

Otimização das condições de produção da Geleia Real e avaliação de parâmetros da qualidade do produto final

Catarina Leonor Afonso do Vale Lopes

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia da Ciência Animal

Orientado por
Miguel José Rodrigues Vilas Boas

Bragança

2014

“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, - é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda!”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Ao Professor Doutor Miguel Vilas Boas, meu orientador, pela sua orientação, dedicação, disponibilidade, paciência, assim como todas as críticas, correções e sugestões relevantes feitas ao longo destes meses de orientação.

À Mestre Andreia e Doutora Soraia, pela amizade, atenção, permanente disponibilidade, ajuda e acompanhamento do trabalho.

Ao Professor Doutor Andreas Thrasyvoulou e todos os seus colegas de trabalho e alunos, conhecidos na Universidade Aristóteles de Salónica, pela acomodação num país novo para mim, por toda a atenção dada, amizade, ajuda e ensinamentos prestados ao longo de três meses e meio.

A todos os professores que tive o prazer de conhecer ao longo destes cinco anos na Escola Superior Agrária de Bragança, pelas competências científicas ensinadas, amizade, disponibilidade manifestada e todo o apoio.

Aos meus colegas de mestrado, em especial ao Flávio por me acompanhar nesta jornada desde que entramos para esta escola, obrigado pela amizade, ajuda e apoio incondicional.

Quero agradecer a todos os meus amigos e amigas que estão presentes em todos os momentos, não pretendendo individualizar, porque cada um é importante à sua maneira, sem eles, teria sido muito difícil ultrapassar todas estas barreiras, um muito obrigado pela amizade, apoio, companheirismo e, por terem feito de mim o que sou hoje.

Por último, tendo consciência que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais, irmão e avó por serem modelos de coragem, pelo amor e apoio incondicional, incentivo, paciência e total ajuda na superação de todos os obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. A eles dedico este trabalho!

Resumo

A geleia real, o alimento exclusivo da abelha rainha durante toda a sua vida, é uma segregação aquosa produzida pelo sistema glandular cefálico das abelhas obreiras amas. Apresenta uma consistência macia esbranquiçada, de natureza ácida e cheiro característico com um pH de 4,5 e uma composição em açúcares semelhante à do mel. Na sua composição, para além da água, encontram-se várias vitaminas, minerais, e um conjunto de proteínas com elevada atividade fisiológica onde se inclui a “royalactin”, uma hormona que intervém na regulação do crescimento, desenvolvimento, metamorfoses e é responsável pela diferenciação entre a abelha rainha e as abelhas obreiras. Para além das proteínas, a geleia real contém também um ácido gordo bastante raro na natureza, o 10-hidroxi-dec-2-enóico (10-HDA), uma substância com elevada atividade farmacológica e que é utilizada também como um marcador da qualidade do produto. A sua quantificação é utilizada como critério importante na sua classificação em termos de qualidade e para fins comerciais podendo variar de acordo com a origem da geleia real.

A produção de geleia real ocorre de forma natural no interior da colmeia quer para a alimentação das larvas na sua fase de desenvolvimento inicial quer no processo de substituição/reposição da abelha rainha. A produção nestas condições é muito limitada, pelo que a sua exploração comercial requer a aplicação de procedimentos próprios. Estes procedimentos baseiam-se na aptidão de famílias órfãs, para criarem novas mestras, fornecendo à colónia um conjunto de condições para a formação de um elevado número de alvéolos reais onde as abelhas ama colocarão geleia real, a qual será recolhida num espaço de 48 a 72 horas. O aumento da procura no mercado deste produto apresenta-se como uma possibilidade do apicultor aumentar a sustentabilidade e rentabilidade da exploração.

Este trabalho, realizado numa colaboração entre o Laboratório da Universidade de Aristóteles de Salónica na Grécia e a Escola Superior Agrária de Bragança, teve como objetivo avaliar a produção de geleia real em diferentes condições experimentais, utilizando colónias não-órfãs, bem como analisar os parâmetros de qualidade da geleia real produzida.

Para a produção de geleia real foram preparadas nove colónias não-órfãs, divididas em três grupos com um efetivo de abelhas e reservas previamente harmonizado. Cada colónia foi constituída por um ninho e uma alça, separados por uma

grade excludora, mantendo-se a abelha rainha confinada no ninho. Num dos grupos foi colocado na alça um quadro com 60 cúpulas para a produção de geleia real. Nos restantes dois grupos foi adicionada uma segunda grade excludora no ninho, permitindo confinar a rainha em apenas metade do ninho, colocando-se na outra metade um segundo quadro com cúpulas, totalizando em três colónias 90 cúpulas e nas restantes três, 120 cúpulas. A cada três dias, as cúpulas foram enxertadas com ovos do dia, recolhendo-se a geleia real ao final de 72 horas. A avaliação da produtividade dos três grupos realizou-se em 20 sessões entre os meses de maio e julho, através da contabilização do nível de aceitação dos enxertos e da quantidade de geleia real produzida.

Entre o início do estudo em maio e os primeiros dias do mês de julho, a produtividade de geleia real manteve-se aproximadamente constante sofrendo uma quebra significativa na produção a partir do meio de julho, o que estará associado com a diminuição das condições adequadas ao desenvolvimento da colónia, nomeadamente de disponibilidade de alimento e aumento das temperaturas.

O nível médio de aceitação global dos enxertos foi de 57% observando-se uma redução para as colmeias com maior número de cúpulas. Este decréscimo foi mais evidente com a passagem de 90 para 120 cúpulas por colmeia. O comportamento observado ao nível da produtividade também diminuiu com o aumento do número de cúpulas por quadro, no entanto, a redução entre o grupo de 60 e 90 cúpulas foi muito reduzida, obtendo-se nestes casos 0,25 g por cúpula. Considerando a produção média por cúpula e o grau de aceitação dos enxertos, verifica-se que a metodologia mais adequada para a produção de geleia real é a introdução de 90 cúpulas, atingindo-se para este grupo o valor máximo de produção de geleia real com 788 g.

A avaliação da qualidade de geleia real foi efetuada em seis amostras às quais se adicionou uma amostra de geleia real obtida em Portugal. Os teores em humidade oscilaram entre 58-68 % e as cinzas entre 3-4 %. A frutose e glucose, sendo os açúcares maioritários na geleia real, tiveram valores entre 10-18 %, tendo o total de açúcares oscilado entre 33-41 %. O teor proteico das amostras revelou valores elevados atingindo os 43 %. Para o ácido 10-hidroxidec-2-enóico, reconhecido como o componente mais bioativo da geleia real, foram encontrados valores entre 5-7 %. Estes valores estão todos de acordo com teores recomendados.

Palavras chave: Produção de geleia real; colmeias não-orfãs; qualidade da geleia real; 10-HD

Abstract

Royal jelly, the exclusive food of the queen bee throughout her life, is an aqueous segregation produced by the cephalic glandular system of the nurse worker bees. It presents a whitish, soft consistency of acid nature and a characteristic smell, with a pH of 4,5 and a sugar composition similar to that of honey. In its composition, besides water, can be found several vitamins, minerals and a set of proteins with high physiological activity including the royalactin, a hormone that is involved in regulating the growth, development, metamorphosis and is responsible for the differentiation between the queen bee and the worker bees. In addition to the proteins, royal jelly also contains a fatty acid rather rare in nature, the 10-hydroxy-2-decenoic acid, (10-HDA) a substance with a high pharmacological activity and which is also used as a marker of quality of the product. Its quantification is used as an important criterion in its classification in terms of quality and for commercial purposes, and it may vary according to the origin of royal jelly.

The production of royal jelly occurs naturally within the beehive, either for feeding of larvae in its initial development phase or in the process of replacing/resetting the queen bee. The production in these conditions is very limited, so its commercial exploitation requires the application of proper procedures. These procedures are based on the ability of orphaned families to raise new queens, providing the colony with a set of conditions for the production of a large number of queen cells where the nurse bees will put royal jelly, which will be collected within 48 to 72 hours. The increasing market demand for this product presents itself as a possibility for the beekeeper to increase the sustainability and profitability of the exploitation.

This work, carried out in collaboration between the Laboratory of the Aristotle University of Thessaloniki in Greece and the Escola Superior Agrária de Bragança, aimed to assess the production of royal jelly under different experimental conditions, using non-orphaned colonies, as well as to evaluate the quality parameters of the royal jelly produced.

For the production of royal jelly, nine non-orphaned colonies were prepared, divided into three groups with an effective of bees and reserves previously harmonized. Each colony was composed by a nest and a super, separated by an excluder grid, keeping the queen bee confined to the nest. In one of the groups, a frame with 60 cells was placed on the super for the production of royal jelly. In the remaining two groups, a

second excluder grid was added to the nest, permitting to confine the queen in only half of the nest, placing in the other half a second frame with cells, summing up 90 cells in three colonies and in the remaining three, 120 cells. Every three days the cells were grafted with eggs of the day, being the royal jelly collected at the end of 72 hours. The evaluation of productivity of the three groups was held in 20 sessions, between the months of May and July, by the level of acceptance of the grafts and the amount of royal jelly produced.

Between the beginning of the study in May and the first days of July, the productivity of royal jelly has remained approximately constant, suffering a significant shortfall in production in the middle of July, which can be associated with the reduction of suitable conditions for the development of the colony, in particular the availability of food and the rising temperatures.

The average level of global acceptance of the grafts was of 57%, with a reduction in the hives with the highest number of cells. This decrease was more evident with the passage of 90 to 120 cells per hive. The behaviour observed at the level of productivity also decreased with the increase in the number of cells per frame, however, the reduction between the group of 60 and 90 cells was minimum, obtaining in these cases 0,25 g per cell. Considering the average production per cell and the degree of acceptance of the grafts, it is noticed that the most appropriate methodology for the production of royal jelly is the use of 90 cells, reaching this group the maximum production of royal jelly with 788 g.

Quality evaluation of royal jelly was made in six samples, which added a sample of royal jelly obtained in Portugal. Humidity levels have varied between 58-68 % and the ashes between 3-4 %. Fructose and glucose, being the main sugars in royal jelly, had values between 10-18 %, the total sugar fluctuated between 33-41 %. The protein content of the samples revealed high values reaching 43 %. For the 10-hydroxy-2-decenoic acid, recognized as the most bioactive component of royal jelly, values were found between 5-7 %. These values are all in accordance to recommended levels.

Key words: production of royal jelly; non-orphaned hives; quality of royal jelly; 10-HDA

Índice geral

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
ÍNDICE GERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XII

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Mel.....	2
1.2. Pólen	3
1.3. “Pão de abelha”	4
1.4. Própolis	5
1.5. Cera.....	6
1.6. Apitoxina – Veneno da Abelha	7
1.7. Geleia Real	8
1.7.1. Composição da geleia real	8
1.7.2. Propriedades.....	11
1.7.3. Produção, colheita e armazenamento	11
1.8. Objetivos	13

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Localização do apiário	16
2.2. Organização das colónias em estudo	16
2.2.1. Distribuição de quadros – ninho	17
2.2.2. Distribuição de quadros – alça	18
2.3. Produção de Geleia Real	20
2.3.1 Preparação das cúpulas.....	20

2.3.2 Recolha de geleia real.....	22
2.4. Análise qualitativa da geleia real.....	24
2.4.1. Solventes e Reagentes	24
2.4.2 Humidade.....	24
2.4.3. Cinzas	24
2.4.4 Proteínas	24
2.4.5 Açúcares	25
2.4.6. 10-HDA (Ácido 10-hidroxidec-2-enóico).....	26

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.1. Produção de geleia real	28
3.1.1. Nível de aceitação de cúpulas	28
3.1.2. Produtividade	30
3.1.3. Comparação das metodologias de produção.....	33
3.2. Parâmetros de qualidade da geleia real.....	34
3.2.1 Humidade.....	34
3.2.2. Cinzas	35
3.2.3. Proteínas	35
3.2.4. 10-HDA	35
3.2.5. Açúcares	37

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

Índice de figuras

Figura 1 - Pólen	4
Figura 2 - “Pão de abelha”	5
Figura 3 - Própolis	6
Figura 4 - Geleia Real	8
Figura 5 - Cúpula com larva e geleia real	12
Figura 6 - Porta cúpulas preenchido com geleia real.....	13
Figura 7 - Origem geográfica da geleia real.....	16
Figura 8 - Grade excludora de rainhas.....	17
Figura 9 - Esquema de distribuição de quadros no ninho - Grupo A	18
Figura 10 - Esquema da distribuição de quadros no ninho - Grupo B e C	18
Figura 11 - (a) Colocação da alça sobre o ninho; (b) Organização de quadros entre o ninho e a alça	19
Figura 12 - Esquema de distribuição de quadros nas alças - Grupos A, B, C.....	19
Figura 13 - (a) Instrumento utilizado no “picking”; (b) Acondicionamento das cúpulas	21
Figura 15 - Corte da cera dos alvéolos reais	22
Figura 14 - (a) Fixação do porta cúpulas no quadro; (b) Remoção do quadro porta cúpulas da colmeia para recolha da geleia real.....	22
Figura 16 - (a) Retirada das larvas; (b) Recolha manual da geleia real.....	23
Figura 17 - Nível de aceitação de cúpulas por grupo – (a) grupo A (60 cúpulas); (b) grupo B (90 cúpulas); (c) grupo C (120 cúpulas)	29
Figura 18 - Produção de geleia real - (a) grupo A, 60 cúpulas; (b) grupo B, 90 cúpulas; (c) grupo C, 120 cúpulas	31
Figura 19 - Perfil cromatográfico relativo à análise de 10-HDA: PI - 4-hidroxibenzoato de metilo. (a) Padrões; (b) Amostra de geleia real G05	36
Figura 20 - Perfil cromatográfico relativo à análise de açúcares	38

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição da geleia real	9
Tabela 2 - Média de aceitação de cúpulas por colmeia ao longo do estudo.....	30
Tabela 3 - Valor médio da quantidade de geleia real por cúpula	32
Tabela 4 - Valores globais de produção de geleia real.....	33
Tabela 5 - Parâmetros de qualidade da geleia real, em percentagem	34
Tabela 6 - Análise quantitativa de açúcar nas amostras de geleia real	37

Abreviaturas e símbolos

10-HDA – 10-hidrodec-2-enóico

HDAA – 10-hidrodecanoico

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

MRJP – Proteínas maioritárias da geleia real

PI – Padrão interno

RI – Índice de refração

UV – Ultra violeta



Capítulo I

Introdução

- 1.1. Mel
- 1.2. Pólen
- 1.3. “Pão de abelha”
- 1.4. Própolis
- 1.5. Cera
- 1.6. Apitoxina (veneno da abelha)
- 1.7. Geleia Real
- 1.8. Objetivos

A apicultura é uma atividade agrícola de gestão e criação de abelhas com o objetivo de recolher produtos apícolas, proporcionando em simultâneo um serviço de polinização fundamental à manutenção dos ecossistemas. Em Portugal é uma atividade em forte expansão, verificando-se atualmente um incremento no número de apicultores profissionais (mais de 150 colmeias), estando maioritariamente direcionada para a produção de mel, impulsionada pela demanda deste produto numa Europa deficitária (GPP, 2010). São, no entanto, cada vez mais diversos os produtos apícolas explorados, considerando as suas potencialidades em termos nutricionais e farmacológicos, como promotores da saúde humana. A sua utilização na dieta humana e medicina popular é referida desde a antiguidade (Bankova, V. et al., 2002).

Apesar da relevância da produção de mel de qualidade para o apicultor, a sustentabilidade da atividade económica está cada vez mais dependente da diversificação na produção e capacidade de intervir em vários mercados. No entanto, se por um lado a diversificação das produções é uma solução para garantir e potenciar a rentabilidade da apicultura, a sua implementação requer um acréscimo significativo de conhecimentos e tecnologias por parte do apicultor, de forma a garantir ao consumidor produtos de qualidade. Em Portugal, para além do mel, só agora é que os consumidores começam se aperceber a da importância de outros produtos apícolas como o pólen a própolis ou a geleia real. Parte desta falta de informação dos consumidores também está associada com o desconhecimento do seu real valor pelos apicultores, limitados pela dificuldade de ajustar as suas explorações a estas produções. É por isso importante otimizar processos de produção e disponibilizar para o setor informação que permita aos apicultores evoluir e diversificar na obtenção de produtos da colmeia.

1.1. Mel

O mel define-se como uma substância natural doce produzida pelas abelhas *Apis Mellífera*. As obreiras preparam-no recolhendo o néctar das flores, secreções das partes vivas das plantas ou excreções de insetos, que depois transformam, combinam com secreções de várias glândulas, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia, ventilando com as asas para evaporar a água. Quando resta menos de 18 % de água, passa a chamar-se mel e, a abelha sela o favo com uma película de cera, o opérculo.

O sabor e a cor do mel variam conforme a flora que predomina em redor das colmeias. Podem observar-se cores diferentes, do mais claro, como o mel rico em néctar da flor de laranjeira, ao mais escuro, o mel de montanha. Dependendo da origem floral, o mel pode classificar-se como mel monofloral, quando contém mais de 45% de pólen da mesma espécie botânica, ou mel multifloral quando resulta da combinação do néctar de várias espécies, no qual não se realçam características predominantes de uma determinada planta. Podem por vezes verificar-se algumas exceções à percentagem que define o mel monofloral, dependendo se as flores são ricas ou pobres em pólen (GPP, 2010).

A composição do mel contém mais de 180 componentes distintos, mas é essencialmente uma solução sobressaturada de açúcares, principalmente, frutose e glucose (> 60 %), com um teor de humidade aproximado de 18 %. Adicionalmente apresenta também uma grande variedade de compostos secundários, como os flavonóides e ácidos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas e vitaminas (Condón M., Carlos, 2005). A presença destes compostos fazem do mel um alimento energético por excelência, no entanto, é cada vez mais frequente a sua utilização para outros fins, explorando as suas propriedades bioativas, nomeadamente no controlo de doenças gastrointestinais, na cicatrização de feridas e queimaduras ou como um agente anti-microbiano (Al-Mamary, M. et al., 2002).

1.2. Pólen

O pólen é o gâmeta masculino das flores das plantas, produzido nas anteras das flores, indispensáveis para a fecundação e conseguinte transformação de flor em frutos. É recolhido nas flores e aglomerado pelas abelhas com a adição de néctar e secreções salivares, Figura 1, e transportado para a colmeia na corbícula, uma estrutura localizada no terceiro par de patas da abelha. Uma vez na colmeia, as abelhas obreias armazenam as cargas polínicas nos favos junto à criação. O pólen, como alimento azotado, é fundamental para o desenvolvimento das abelhas melíferas; uma colónia de abelhas adultas poderia manter-se bastante tempo sem pólen, tendo como único alimento o mel ou xarope de açúcar, no entanto, não teria condições para a criação de larvas, porque para o seu desenvolvimento é indispensável a presença de pólen (Condón M., Carlos, 2005). Do ponto de vista composicional, o pólen é constituído por 35 % de proteínas,

das quais mais de metade está na forma de aminoácidos livres, representando elementos essenciais capazes de serem assimilados pelo organismo. Adicionalmente, contém 40 % de hidratos de carbono, representados por várias formas de açúcares, 5% de gorduras, 3 % de minerais e 7 a 10 % de humidade. Os restantes 13 % são elementos minoritários, dos quais poucos foram identificados como, o ácido pantoténico, ácido nicotínico, ácido fólico, cianocobalimina e também algumas vitaminas A, C, D e E (Bogdanov S., 2001).

De acordo com diversos autores, o pólen apícola apresenta propriedades bioativas, nomeadamente como regulador das funções orgânicas, pois estimula o metabolismo celular, reforça a imunidade, neutraliza os resíduos metabólicos, diminui os riscos de cancro e doenças cardiovasculares, além de outros usos (FNAP, 2010).



Figura 1 - Pólen. (Fonte: <http://meioambiente.culturamix.com/blog/wp-content/gallery/polinizacao-por-abelhas-2/polinizacao-por-abelhas-5.jpg>)

1.3. “Pão de abelha”

O pólen após capturado e armazenado no interior da colmeia, sofre uma alteração, particularmente importante ao nível da sua digestibilidade devido à adição de mel e enzimas pelas abelhas. Esta adição induz uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação e transforma o pólen em “pão de abelha” (Herbert & Shimanuki, 1978). A conversão de pólen para “pão de abelha” e as suas alterações bioquímicas é o resultado de uma ação microbiana, principalmente do ácido láctico e da fermentação provocada por bactérias e leveduras, reduzindo o pH (Foote, H.L, 1957). No interior da colmeia é fácil localizar este produto pelo seu aspeto colorido, Figura 2, encontrando-se normalmente no primeiro quadro após a zona de criação, o que permite uma rápida alimentação das larvas (Nagai, T. et al., 2004). O “pão de abelha” é uma fonte de

proteínas, rica em aminoácidos essenciais, vitaminas (C, B1, B2, E, H), pigmentos, enzimas como a amílase e fosfatase, flavonóides e diversos minerais como cálcio, ferro, magnésio, fósforo, entre outros (Standifer, L.N., et al., 1980). A elevada quantidade de ácido láctico no “pão de abelha”, aproximadamente seis vezes mais elevada que no pólen, reflete-se num grau de acidez mais acentuado e conseqüentemente num valor de pH mais baixo. Esta acidez do “pão de abelha” é responsável pela sua autoconservação pois inibe o crescimento dos bolores e outros microrganismos o que não se verifica na conservação do pólen, que requer uma secagem logo após a recolha para evitar a sua degradação (Nagai, T. et al., 2004).



Figura 2 - “Pão de abelha”. (Fonte: <http://montedomel.blogspot.pt/2012/08/um-apicultor-idoso.html>)

1.4. Própolis

A própolis é uma substância produzida pelas abelhas, resultante das resinas colhida nas hastes, folhas, gomos e botões de certas plantas, como o freixo, choupo, bétulas, pinho, amieiro ou salgueiro, à qual as abelhas adicionam secreções salivares, pólen e cera (Sabatini, A. G., Carpana, E. 2002; Ghisalberti, E.L. 1979), Figura 3. De aroma intenso, a própolis pode apresentar uma coloração variável, desde o amarelo ao preto, passando por diversas tonalidades de castanho, vermelho ou esverdeado, dependendo da origem floral das resinas. Esta resina é utilizada pelas abelhas para recobrir as paredes da colmeia, fixar as caixas, reforçar os favos, preencher as fendas, restringir as entradas, para barrar as celas vazias antes de a abelha rainha pôr os ovos e de uma forma geral

para eliminar qualquer aspereza. É também usada como substância de ‘embalsamento’, cobrindo a carcaça de um invasor da colmeia que as abelhas mataram, mas que não conseguem transportar para fora da colmeia. As potencialidades de aplicação da própolis devem-se às suas características físicas e ao amplo espectro de atividades biológicas. Estas propriedades biológicas estão relacionadas com a sua composição química e, mais especificamente, com a presença de concentrações elevadas de compostos fenólicos.

Quimicamente, a própolis é uma mistura resinosa que contém aproximadamente 50 % de resina e bálsamo, 30 % de cera, 10 % de óleos essenciais e aromáticos, 5 % de pólen, e 5 % de impurezas. A composição é muito variável, pois está muito dependente, da variabilidade da flora em redor torno da colmeia, de onde as abelhas recolhem os exsudatos (FNAP, 2010; Toreto, V.C, et al., 2013).



Figura 3 - Própolis.

(Fonte:http://en.wikipedia.org/wiki/Propolis#mediaviewer/File:Propolis_in_beehives.jpg)

1.5. Cera

A cera é um dos produtos apícolas de origem animal obtido nas glândulas ceríferas das abelhas obreiras com idades compreendidas entre os 12 e os 18 dias. A cera pura, tal como se encontra nas escamas segregadas pelas operárias, é um produto de cor branca a qual sofrerá um amarelecimento que dependerá da presença de mel, pólen e própolis. As abelhas usam a cera de abelha para a construção do favo, em que as células iniciais são levantadas para o armazenamento de pólen e mel. É uma substância sólida, hidrofóbica, maciça, de consistência escorregadia e gordurosa. Para que esta seja produzida no interior da colmeia a temperatura tem de rondar os 33 a 36 °C. O seu ponto de fusão oscila entre os 61 e 65 °C, e quando sujeita a baixas temperaturas pode tornar-se dura e quebradiça. A cera de *Apis Mellifera* contém mais de 300 componentes, mas

maioritariamente é composta por uma mistura de ácidos gordos, ceroleína, vitamina A e outras substâncias com diferentes propriedades bactericidas, emolientes, cicatrizantes e anti-inflamatórias. (Sabatini, A. G., Carpana, E. 2002, Condón M., Carlos. 2005). Para além do uso na apicultura para a preparação de cera laminada, a cera é também utilizada para outros fins na indústria, cosméticos, na farmacêutica, na preparação de velas e também na indústria alimentar. (Bogdanov, S. 2009).

1.6. Apitoxina – Veneno da Abelha

O veneno da abelha, outros dos produtos de origem animal, é produzido principalmente por uma glândula de secreção ácida denominada glândula ácida ou mais simplesmente glândula do veneno, situada no interior do abdómen da abelha obreira. No extremo da glândula encontra-se um reservatório piriforme, a bolsa de veneno, onde o veneno, uma vez segregado, se acumula, atingindo cerca de 0,3 mg.

A abelha, quando pica o homem ou em geral outro vertebrado, geralmente não consegue retrainir o ferrão devido à presença de farpas na sua estrutura e à elasticidade da pele. Por conseguinte, devido ao esforço que a abelha faz para se afastar, dilacera os últimos segmentos abdominais, deixando o ferrão para trás, unido a uma parte das vísceras e à glândula do veneno. A abelha, embora consiga escapar, não sobrevirá. Pelo contrário, se uma abelha picar outra abelha, ou em geral outro inseto, consegue retrainir o ferrão dada a consistência rígida do tegumento perfurado (Sabatini, A. G., Carpana, E., 2002, Bogdanov, S., 2014).

A melitina está descrita como o principal componente responsável pelos efeitos dolorosos ou letais do veneno da abelha, e corresponde a mais de 50% do conteúdo total do veneno. A elevada atividade fisiológica desta enzima está também diretamente ligada às potencialidades terapêuticas da aplicação do veneno de abelha. Para além desta substância, a composição do veneno inclui ainda glucose, frutose e fosfolípidos em concentração similar à da hemolinfa, bem como vestígios de outros compostos tais como ácido fosfórico, ácido fórmico, ácidos gordos e substâncias orgânicas de diversa natureza provenientes do corpo do inseto e que podem concorrer ao desencadeamento dos fenómenos alérgicos reconhecidos no veneno. A aplicação mais interessante no ser humano é no tratamento da artrite reumatóide. Estudos clínicos recentes mostram que a taxa de sucesso para este produto varia de 70 a 90 % (Bogdanov, S., 2014).

1.7. Geleia Real

Contrariamente aos restantes produtos da colmeia, utilizados desde a antiguidade, a geleia real não despertou atenção até meados do século passado. Apenas a partir da década de cinquenta a geleia real começou a conquistar uma posição própria no mercado dos produtos das abelhas, propondo-se como complemento alimentar e como matéria-prima para a indústria cosmética. A geleia real é um produto inteiramente de origem animal, segregado pelo sistema glandular cefálico (glândulas hipofaríngeas e mandibulares) das abelhas obreiras com idade compreendida entre os 3 e os 10 dias. É um dos produtos mais importantes para a colmeia, pois serve de alimento para as larvas na sua fase inicial de desenvolvimento, e para a rainha durante toda a sua vida, permitindo a sua diferenciação dentro da colónia, Figura 4. Este produto é dotado de propriedades biológicas que suscitam interesse e curiosidade mas, que até hoje não são completamente compreendidas. Na verdade, muitos aspetos acerca das propriedades da geleia real são controversos ou, de alguma maneira, não estão ainda esclarecidos a nível científico e o reconhecimento do valor nutritivo excepcional desta substância não basta para justificar a atribuição de efeitos prodigiosos e muito menos a utilização farmacológica (Sabatini, A. G., Carpana, E., 2002, Bogdanov, S; Gallamann, P, 2008).



Figura 4 - Geleia Real. (Fonte: <http://www.reidaverdade.net/geleia-real-engorda-preco.html>)

1.7.1. Composição da geleia real

A composição da geleia real é complexa, incluindo proteínas, aminoácidos, lípidos, ácidos orgânicos, esteróis, fenóis, açúcares, minerais, entre outros (Krell, 1996; Wiese, 2000, Garcia-Amoedo e Almeida-Muradian, 2003; Nagai et al. 2003; Nagai, Inque,

2004; Almeida-Muradian e Penteado, 2007). O ácido 10-hidroxi-dec-2-enóico (10-HDA), principal componente da fração lipídica é considerado o princípio ativo da geleia real mais importante, por possuir propriedades farmacológicas. Adicionalmente este composto é também um bom indicador de qualidade e frescor da geleia real, bem como importante na certificação da autenticidade do produto (Bloodworth et al., 1995; Garcia-Amoedo, Almeida-Muradian, 2003; Koshio, Almeida-Muradian, 2003; Pamplona et al., 2004; Almeida-Muradian e Penteado, 2007). Na Tabela 1 apresentam-se os valores característicos descritos na literatura para a composição da geleia real.

Tabela 1 - Composição da geleia real (Ramadan, M. F., Al-Ghamdi, A., 2012)

	Geleia real fresca (%)	Geleia real liofilizada (%)
Água	60 -70	< 5
Lípidos	3 – 8	8 - 19
Ácido 10-hidróxidec-2-enóico (10-HDA)	> 1,4	> 3,5
Proteínas	9 – 18	27 – 41
Açúcares	7 – 18	> 30
Frutose	3 – 13	-
Glucose	4 – 8	-
Sacarose	0,5 – 2	-
Cinzas	0,8 – 3	2 - 5

A geleia real apresenta regularmente um elevado teor de humidade oscilando entre os 60 e 70 %, apesar de exibir uma considerável estabilidade microbiana. Este teor de humidade é assegurado no interior da colmeia, pela adição contínua de novos suplementos desta substância pelas abelhas ama, mas fundamentalmente pela regularidade no nível de humidade ambiental mantido no interior da colónia, além disso, a não solubilidade de alguns compostos pode explicar as variações no teor de água (Barnuti, et al., 2011).

Os hidratos de carbono são também frequentes na geleia real e responsáveis por cerca de 30 % da sua matéria seca (Barnuti, et al., 2011). Com uma presença relativamente constante dos mesmos açúcares, a sua concentração é consideravelmente variável. Como para o mel, a frutose e glucose são os principais monossacarídeos encontrados na geleia real, representando em conjunto mais de 90 % dos açúcares totais (Lercker et al., 1986). Para além destes é também possível encontrar na geleia real outros oligossacarídeos, tais como maltose, sacarose, trealose, gentiobiose, isomaltose, rafinose, melezitose ou erlose. Embora presentes em quantidades mínimas, são úteis

para a identificação de um padrão característico, que é comparável ao do mel, e em alguns casos é indicativo da autenticidade do produto (Sabatini et al., 2009).

As proteínas representam a parte mais importante da matéria seca da geleia real, podendo atingir mais de 40 %. Uma parte significativa deste conteúdo é composto por proteínas de elevado peso molecular, 49-87 kDa, denominadas de “proteínas maioritárias da geleia real”, MRJP. Neste grupo de proteínas estão já identificadas nove, incluindo a “royalactina” e são associadas com as diferentes etapas do desenvolvimento fisiológico das abelhas (Simuth, 2001). Para além deste grupo, o conteúdo proteico inclui ainda diversos peptídeos bioativos e aminoácidos livres, como a prolina, lisina, ácido glutâmico, alanina, fenilalanina, serina e aspartato (Boselli et al., 2003).

A geleia real é também rica em minerais, especialmente em potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, manganês, silício, chumbo entre outros, refletindo-se num teor de cinzas entre os 0,8 e 3 % de massa fresca. Os oligoelementos desempenham um papel fundamental nas atividades biomédicas associados com a geleia real, uma vez que estes elementos têm uma infinidade de funções biológicas conhecidas. As hipóteses sobre a presença quantitativa destes metais concentraram-se em fatores externos à colónia (ambiente, aquisição de alimentos e período de produção) e a alguns fatores internos (fatores biológicos associados às abelhas) (Benfenati, Sabatini, & Nanetti, 1986).

A percentagem de lípidos presentes na geleia real é também bastante significativa, representando um valor entre os 3 e os 8 % da massa fresca. Os ácidos gordos são os componentes maioritários apresentando ácidos de cadeia curta hidroxilados ou ácidos dicarboxílicos. Para além destes, é possível encontrar também alguns lípidos neutros e esteróis, bem como hidrocarbonetos semelhantes aos encontrados na cera. Os ácidos hidroxilados são os responsáveis maioritários pela atividade biológica da geleia real, em particular o ácido trans-10-hidroxidec-2-enoico (10-HDA) e o seu equivalente saturado, o ácido 10-hidroxidecanóico (HDAA) (Terada, Narukawa, & Watanabe, 2011). A presença do 10-HDA é considerada não apenas um avaliador da qualidade da geleia real, mas também um marcador para identificação de adulterações, considerando-se que o seu teor em geleia real pura deverá ser superior a 1,4 % da massa fresca (Sabatini, A. G., 2008).

1.7.2. Propriedades

A geleia real é um importante alimento funcional que possui várias propriedades promotoras de saúde. A sua utilização a nível comercial tem crescido significativamente com a incorporação em medicamentos, alimentos saudáveis e cosméticos. A geleia real tem demonstrado possuir várias propriedades funcionais tais como atividade antibacteriana, anti-inflamatória, atividades vasodilatadoras e hipotensores, ação desinfetante, atividade antioxidante e atividade anti tumoral. Esta atividade é atribuída em particular ao conteúdo lipídico e proteico com a presença de 10-HDA e MRJP.

Recentemente o mecanismo da atividade anti tumoral da geleia real foi atribuído à presença de 10-HDA, e ao seu efeito inibitório no fator de crescimento do endotélio vascular, induzindo a angiogénese e consequente bloqueando a proliferação e migração das células cancerígenas. Por outro lado verificou-se também que as MRJP estimulam a necrose de tumores em ratos (Crenguta, et al., 2011). Ao nível da ação neurotrófica é reconhecida a capacidade da geleia real na diferenciação de todo o tipo de células cerebrais, bem como a capacidade do 10-HDA para incrementar a produção de neurónios. A aplicação de geleia real em ratos provou também ter uma ação neurotrófica e neuroprotetora sobre o hipocampo (Crenguta, et al., 2011). Para além destes são conhecidos diversos exemplos da funcionalidade da geleia real para casos de cansaço, astenia, falta de apetite, esgotamento físico e mental, transtornos de comportamento, deficiência de crescimento e desenvolvimento da puberdade e na adolescência, nas anemias, amenorreias e na debilidade senil (Ramadan, et al., 2012).

1.7.3. Produção, colheita e armazenamento

Mesmo que a geleia real se encontre em todas os alvéolos em que se criam as jovens larvas, as quantidades presentes nos alvéolos das obreiras e dos machos não chegam para conseguir uma produção significativa de geleia real, Figura 5.



Figura 5 - Cúpula com larva e geleia real (Bogdanov, S., 2014)

Um sistema rudimentar para produção de geleia real, consiste em esperar o momento de enxameamento, que eventualmente se pode favorecer com uma adequada alimentação estimulante, para extrair depois alvéolos reais criados espontaneamente. Existem todavia outros métodos para extrair geleia real, desde métodos amadores muito simples, a métodos intensivos. Os métodos amadores designados também por “naturais” adequados a pequenas produções, baseiam-se em provocar a orfandade das colónias bem povoadas e na recolha, três dias depois, dos alvéolos reais produzidos pelas abelhas para garantir uma nova rainha para a colónia. Com este método, geralmente, não se obtêm mais de 50 g de geleia real por colmeia e por estação.

Os métodos intensivos ou artificiais, baseiam-se sempre na aptidão das famílias órfãs para criarem mestras. Porém, em vez de esperar pela produção espontânea de alvéolos reais, fornecem-se à colónia um conjunto de pequenos dispositivos idênticos à base de um alvéolo, denominados de cúpulas, Figura 6, nos quais se introduz uma jovem larva de idade inferior a 36 horas que será depois alimentada pelas abelhas ama com geleia real. Na prática é o mesmo princípio da criação de abelhas rainhas com a diferença que o ciclo da larva é interrompido, após 2 a 3 dias, para proceder à recolha da geleia real (Sabatini, A, G., Carpana, E., 2002, Condón M., Carlos, 2005).



Figura 6 - Porta cúpulas preenchido com geleia real (Bogdanov,S., 2014)

A aplicação dos métodos de produção intensiva podem ser realizados em colónias sem rainha, colónias órfãs, ou alternativamente em colónias onde a rainha é confinada a um espaço limitado da colmeia. A presença de abelha rainha é importante para a produção de geleia real, e tem uma influência sobre a obtenção de uma maior percentagem de aceitação de larvas enxertadas, assim como a quantidade de geleia real por cúpula. As condições climatéricas, particularmente a disponibilidade de fontes de néctar e pólen, bem como as condições de colheita têm uma influência significativa na percentagem de aceitação de larvas introduzidas, bem como a quantidade de geleia real produzida por cúpula.

A geleia real é uma substância gelatinosa, viscosa de cor esbranquiçada/amarelada, com odor pungente e sabor ácido. Quando armazenada à temperatura ambiente ou no frigorífico torna-se lentamente mais viscosa e mais escura podendo facilmente rancificar. Estas mudanças são aparentemente devido a atividades enzimáticas contínuas e interações entre as frações lipídicas e proteicas (Bogdanov, S; Gallamann, P, 2008), pelo que para uma boa preservação, após a recolha, deve ser imediatamente congelada ou liofilizada, evitando ao máximo o contato com o ar.

1.8. Objetivos

A apicultura em Portugal está vocacionada maioritariamente para a produção de mel, verificando-se com frequência oscilações anuais dos níveis de rentabilidade da atividade, fruto da incerteza das condições climatéricas. Por esta razão, a diversificação na obtenção de outros produtos da colmeia surge como uma estratégia para o apicultor intervir em vários mercados e garantir a sustentabilidade da atividade. No entanto, se

por um lado a diversificação das produções é uma solução para garantir e potenciar a rentabilidade da apicultura, a sua implementação requer um acréscimo significativo de conhecimentos e tecnologias por parte do apicultor, de forma a garantir ao consumidor produtos de qualidade.

Este trabalho realizado em colaboração como o Laboratório da Universidade de Aristóteles de Salónica na Grécia, teve por objetivo avaliar a produção de geleia real em diferentes condições experimentais, utilizando colónias não-órfãs com a rainha restringida e variando o número de cúpulas colocadas nas colónias. A avaliação da produtividade da colónia foi considerada ao nível da percentagem de aceitação das cúpulas, bem como da quantidade de geleia real média produzida por cúpula.

Para além da produtividade, o trabalho incidiu na caracterização qualitativa da geleia real produzida através da avaliação de parâmetros nutricionais como humidade, cinzas, proteínas, perfil de açúcares e teor em 10-hidroxidec-2-enóico. Para comparação foi também avaliada uma amostra de geleia real produzida em Portugal, retirada de alvéolos reais de um apiário da Escola Superior Agrária de Bragança.



Capítulo II

Material e Métodos

2.1. Localização do apiário

2.2. Produção de geleia real

2.3. Organização das colónias em estudo

2.4. Análise qualitativa da geleia real

Neste capítulo descreve-se a origem, as metodologias de produção, os reagentes e os equipamentos utilizados no trabalho, assim como, os procedimentos e as condições experimentais aplicadas na avaliação da geleia real.

2.1. Localização do apiário

Este estudo foi realizado no Laboratório de Apicultura da Universidade Aristóteles de Salónica, Grécia, com abelhas da subespécie *Apis Mellifera Macedonica*, uma subespécie da abelha ocidental encontrada na região norte da Grécia, Figura 7. O apiário utilizado encontrava-se junto às instalações do laboratório. A produção de geleia real foi realizada entre os meses de maio a julho, correspondendo a uma época do ano em que existe maior atividade de recolha de néctar e pólen e, portanto, um maior desenvolvimento da postura da rainha e de toda a sua comunidade que se prepara para armazenar reservas e para, naturalmente produzir a geleia real.

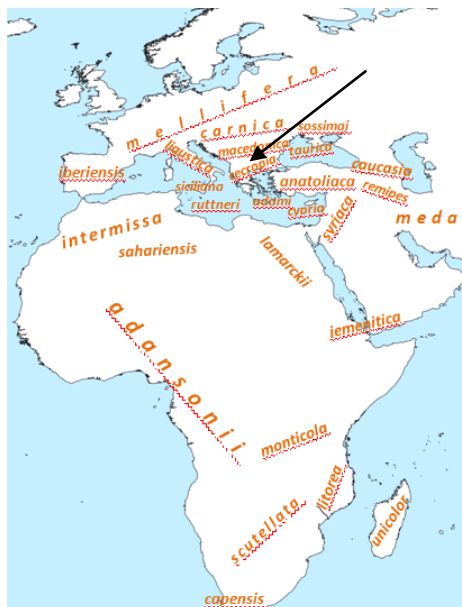


Figura 7 - Origem geográfica da geleia real

2.2. Organização das colónias em estudo

A preparação das colónias para o estudo implicou a uniformização da sua vitalidade de modo a organizar grupos homogéneos que permitam a posterior comparação dos resultados de produção de geleia real. O estudo incidiu sobre nove colónias constituídas

por uma população de abelhas e criação aproximadamente igual. Em cada uma destas colónias colocou-se uma rainha com a mesma idade e oriunda da mesma mãe. Após a avaliação da vitalidade (quantificação da população de abelhas, da criação e da quantidade de reservas de mel e pão de abelha), foram constituídos três grupos com três colónias cada, e nomeados de A, B e C. Cada grupo foi posteriormente sujeito a diferentes condições de produção de geleia real, nomeadamente através da adição de um ou dois quadros porta-cúpulas, variando o número de cúpulas presentes em cada quadro. Em todos os grupos a rainha foi condicionada no ninho através da colocação de uma grade excludora entre o ninho e a alça, Figura 8.

Após a seleção das colónias foi necessário proceder a uma reorganização dos quadros do ninho e da alça. Esta reorganização foi realizada através de dois procedimentos distintos, um aplicado ao grupo A e outro aos grupos B e C.



Figura 8 - Grade excludora de rainhas

2.2.1. Distribuição de quadros – ninho

Para a organização das colónias do grupo A o ninho foi preenchido com dez quadros, contendo larvas (criação aberta), pupas (criação operculada) e reservas, de acordo com o esquema apresentado na Figura 9. Na distribuição foram colocadas na extremidade do ninho dois quadros com mel (posição 1 e 10), seguindo-se de três quadros de pupas (2, 8 e 9), dois quadros com larvas na posição 3 e 6, juntamente com dois quadros de pólen na posição 4 e 7. No centro (posição 5) é colocado um quadro com a rainha para a postura do dia.

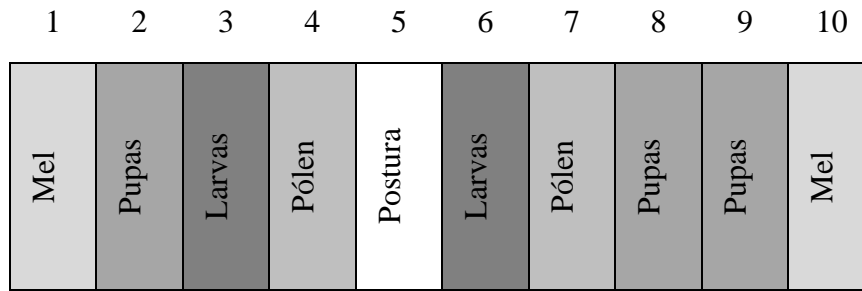


Figura 9 - Esquema de distribuição de quadros no ninho - Grupo A

Para as colónias dos grupos B e C colocaram-se no ninho apenas nove quadros, ao qual se adicionou uma segunda grade excludora de rainhas vertical, separando de um lado a rainha com cinco quadros (posição 1 a 5) e do outro quatro quadros como área de produção de geleia real (posição 7 a 10). A posição 6 fica ocupada pela grade excludora vertical. Na zona limitada para a rainha estão colocados quatro quadros para postura e um para a alimentação da colmeia. Do lado oposto, a distribuição dos quadros segue o esquema da Figura 10, onde a posição 10 é ocupada por um quadro com pupas, na posição 9 coloca-se o quadro com pólen, na posição 7 localiza-se o quadro com as larvas e a posição 8 fica reservada para a colocação do quadro porta cúpulas para produção de geleia real. A colocação dos quadros com pólen junto ao quadro porta cúpulas é importante para garantir a alimentação adequada das larvas e deste modo maximizar a produção de geleia real.

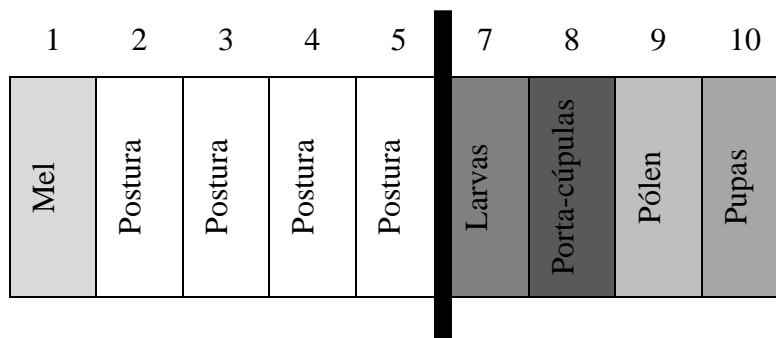


Figura 10 - Esquema da distribuição de quadros no ninho - Grupo B e C

2.2.2. Distribuição de quadros – alça

Sobre os ninhos das colónias foi colocada uma alça, Figura 11. A distribuição dos quadros colocados nas alças foi idêntica para todos os grupos, dispondo cada alça de 10 quadros organizados de acordo com o esquema apresentado na Figura 12. Nos extremos

(posição 1 e 10) colocaram-se os quadros com reservas de mel, seguindo-se quatro quadros com criação operculada (posições 2, 3, 8 e 9). Após estes quadros foram colocados dois com pólen na posição 4 e 7, sendo o centro ocupado por um quadro de pupas juntamente com o quadro porta cúpulas.

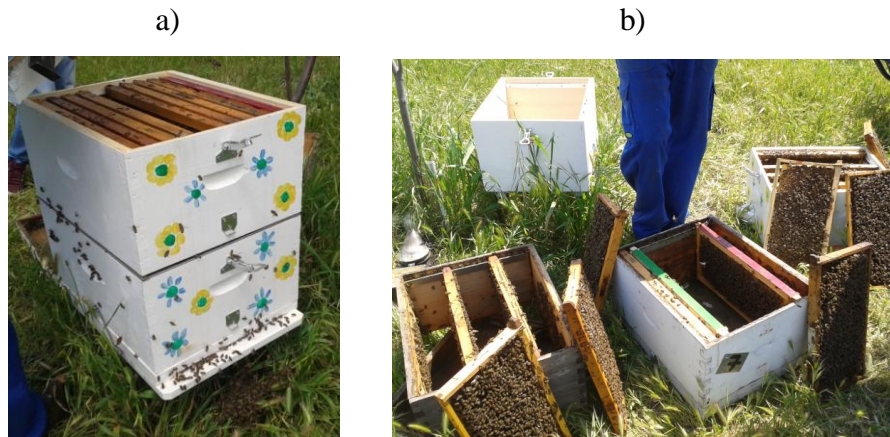


Figura 11 - (a) Colocação da alça sobre o ninho; (b) Organização de quadros entre o ninho e a alça

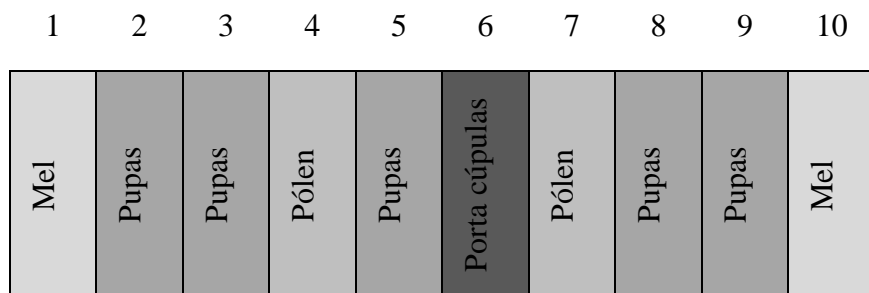


Figura 12 - Esquema de distribuição de quadros nas alças - Grupos A, B, C

A cada seis dias, foi necessário proceder à troca de quadros entre o ninho e a alça, deslocando-se para o ninho os quadros de criação da alça (quadros com alvéolos vazios após o nascimento das obreiras) e da alça para o ninho os novos quadros de criação, com novas larvas e ovos, resultante da postura contínua da rainha.

No grupo A, para a produção de geleia real, foi utilizado apenas um quadro porta cúpulas colocado na alça, contendo 60 cúpulas no total. No grupo B foram colocados dois quadros porta cúpulas, um no ninho com 30 cúpulas, e outro na alça com 60 cúpulas. Por fim, no grupo C, foram colocadas 120 cúpulas divididas em igual número entre os dois quadros porta cúpulas do ninho e da alça.

2.3. Produção de Geleia Real

Para a produção de geleia real uma colónia deve estar sempre bem alimentada, com realce para os níveis proteicos das reservas provenientes sobretudo do pólen, de modo a ser administrada uma boa quantidade de geleia real a cada alvéolo construído sobre a cúpula. Mesmo em plena época de floração, onde há maior disponibilidade de néctar, as colónias produtoras de geleia real devem ser alimentadas artificialmente com pequenas doses de xarope de açúcar de modo a maximizar a sua produção. Neste estudo, as colónias foram alimentadas a cada três dias de intervalo com um a dois litros de xarope de açúcar (1:1), colocado no interior da colónia sobre os quadros da alça, num alimentador apropriado.

2.3.1 Preparação das cúpulas

A abelha rainha alimenta-se durante todo o seu ciclo de vida de geleia real produzida pelas abelhas obreiras nas glândulas hipofaríngeas, aumentando a sua produção principalmente no processo de desenvolvimento de uma nova rainha. As obreiras constroem células reais para substituição da rainha em dois casos, quando a rainha morre, ou quando a população da colmeia se torna excessivamente grande e a rainha se prepara para formar um novo enxame com parte das obreiras da colónia. Nas horas que se seguem à morte ou à decisão de formação de um novo enxame, as obreiras fabricam numerosas células de maior tamanho (alvéolos reais), transformando as células da postura contendo larvas de dois dias. As abelhas prosseguem então a alimentação destas larvas com geleia real até à operculação das células escolhidas para abrigarem as futuras rainhas. O princípio de produção intensiva da geleia real consiste em tornar uma colónia órfã por eliminação da rainha ou então pela introdução de uma grade excludora que condiciona a rainha numa zona limitada do ninho, introduzindo-se de seguida na colmeia, próximo do local de postura, um quadro contendo células artificiais, cúpulas, nas quais previamente o apicultor colocou uma jovem larva. As abelhas aceitam estas células e criam as larvas que aí se encontram como futuras rainhas, introduzindo grandes quantidades de geleia real em cada uma destas células. Três dias mais tarde, o apicultor retira o quadro e recolhe a geleia real contida em cada um dos alvéolos reais artificiais.

Após a organização das colónias, realizada neste estudo através do acondicionamento da rainha, efetuou-se a preparação dos quadros porta cúpulas para a produção de geleia real. Para a sua preparação selecionou-se da região de postura da rainha ou em alternativa, nas restantes colónias do apiário, “colónias de apoio”, diversos quadros com ovos e/ou larvas de idade adequada, no máximo até dois dias. Estas larvas foram de seguida transferidas do seu alvéolo para a cúpula artificial com o auxílio de um pequeno instrumento apropriado, Figura 13a, colocando-se a larva no fundo da cúpula. Este processo é denominado habitualmente de “picking”, Figura 13c. Para a aderência da larva é necessário acondicionar previamente a cúpula com umas gotas de uma solução de mel e água, ou com uma solução preparada misturando algumas larvas e água, Figura 13b.

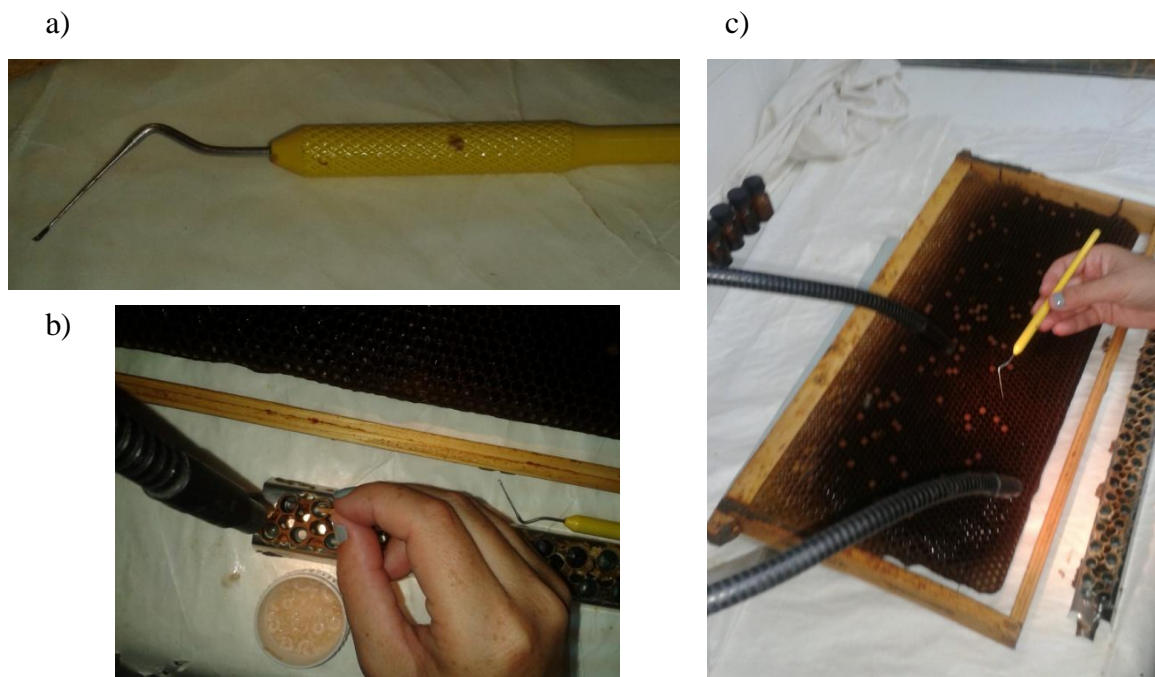


Figura 13 - (a) Instrumento utilizado no “picking”; (b) Acondicionamento das cúpulas
(c) Transferência das larvas, “picking”

O processo de transferência das larvas é decisivo para a aceitação das cúpulas pelas abelhas, pelo que é necessário ter determinadas precauções como evitar o contacto direto com a larva transferida ou uma exposição prolongada a temperaturas altas. Esta operação deve ser executada encurtando o mais possível o tempo entre a transferência da larva e a sua colocação na colónia recetora, colocando-se um pano húmido sobre o porta cúpulas durante este período. O transporte do quadro porta cúpulas para a colmeia

e a sua colocação no quadro de suporte deve ser cuidada para que o movimento não desloque a larva da sua localização, ou seja, o centro da cúpula, Figura 14.



Figura 14 - (a) Fixação do porta cúpulas no quadro; (b) Remoção do quadro porta cúpulas da colmeia para recolha da geleia real

2.3.2 Recolha de geleia real

Três dias após a sua colocação, os quadros porta cúpula, contendo a geleia real são removidos da colónia, Figura 14b, e transferidos para o laboratório para a extração. A primeira operação consiste no corte dos bordos das cúpulas, que as abelhas encheram de cera, com a ajuda de um instrumento elétrico quente e de corte bem afiado. Esta operação visa evitar que os restos de cera venham a degradar a qualidade da geleia real, Figura 15.



Figura 15 - Corte da cera dos alvéolos reais

A recolha da geleia real das cúpulas pode fazer-se por sucção, ou por meio de uma espátula. Em primeiro lugar retira-se a larva do alvéolo com a ajuda de um palito ou do

instrumento utilizado no “picking”, Figura 16a, e depois a geleia real nele contida, a qual se armazena num frasco âmbar para impedir a ação da luz, Figura 16b. Após a remoção da geleia real de todas as cúpulas contabiliza-se o grau de aceitação da colónia, isto é, o número de cúpulas contendo geleia real, bem como a massa obtida por colónia, conservando-se a geleia a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior análise.

O processo de preparação das cúpulas, e recolha de geleia real foi repetido a cada três dias, tendo-se realizado no período em estudo vinte seções de produção/recolha.

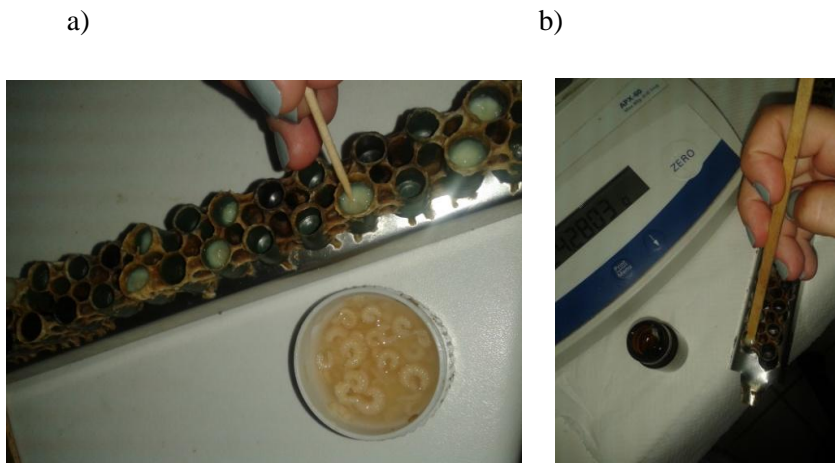


Figura 16 - (a) Retirada das larvas; (b) Recolha manual da geleia real

2.3.3. Recolha da geleia real em Portugal

Para permitir a comparação da qualidade da geleia real produzida neste estudo com a geleia real produzida em Portugal, foi efetuada uma amostragem num dos apiários da Escola Superior Agrária de Bragança, através da recolha de geleia real do interior de alvéolos reais naturais, produzidos em colónias que se encontravam em enxameação. Após a recolha manual da geleia real do interior dos alvéolos a amostra foi pesada e conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em frasco de vidro âmbar, até posterior análise.

2.4. Análise qualitativa da geleia real

2.4.1. Solventes e Reagentes

Para a execução experimental da componente qualitativa da geleia real, utilizaram-se diversos solventes como metanol (Panreac, p.a), acetonitrilo (Fisher Scientific, qualidade HPLC) e etanol (Panreac, qualidade HPLC). Na análise quantitativa dos açúcares utilizaram-se frutose, glucose, sacarose e maltose, adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Na quantificação do ácido 10-hidroxi-2-decenóico utilizou-se 10-HDA (Cayman Chemical Company, $\geq 99\%$) (Michigan, USA), e 4-hidroxibenzoato de metilo (Sigma Chemical, 98%). Todos os restantes produtos químicos e solventes foram de grau analítico e adquiridos a partir de fornecedores comuns. A água foi tratada através de um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.4.2 Humidade

O teor de humidade das amostras foi avaliado por liofilização. Para tal pesou-se inicialmente 0,5 g de amostra homogeneizada, colocando-se no liofilizador até peso constante. Este procedimento foi realizado em triplicado, e os resultados vêm expressos em percentagem.

2.4.3. Cinzas

A determinação de cinzas foi realizada por um método gravimétrico após incineração (AOAC, 1995). Pesou-se num cadinho de porcelana 0,3 g de amostra liofilizada, colocando-se numa mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas. Após arrefecimento, o cadinho foi pesado para determinar a quantidade de cinzas remanescentes. Este procedimento, repetido até peso constante, foi efetuado em triplicado expressando-se os resultados em percentagem.

2.4.4 Proteínas

Para a determinação do teor em proteínas foi aplicado o método Kjeldahl, e que consiste na determinação indireta, baseando-se na quantificação do azoto orgânico total (González P., A.M., 2002). Esse processo iniciou-se com a digestão da 1 g de amostra liofilizada por adição de ácido sulfúrico e de um catalisador metálico que acelera o processo de oxidação da matéria orgânica. Após a degradação da amostra e transformação do azoto em sulfato de amónio segue-se um processo de neutralização, de destilação e finalmente a titulação do amónio libertado. Para a conversão do teor de azoto em proteína total utilizou-se um fator de 6,25, exprimindo-se os resultados em percentagem de proteína. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.4.5 Açúcares

2.4.5.1 Preparação das amostras

A quantificação de açúcares livres foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI). Previamente foi necessário proceder-se a uma diluição, pesando-se 1 g de geleia real e adicionando-se 5 mL de uma solução água metanol (3:1). Posteriormente filtrou-se a solução através de filtros millipore 0,2 µm. O volume injetado foi de 10 µL.

2.3.5.2. Condições cromatográficas

A determinação dos açúcares foi realizada num cromatógrafo integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex). Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30 °C (forno Grace 7971 R). Como fase móvel utilizou-se uma mistura de acetonitrilo/água 80:20 (v/v), com um caudal de 1,5 mLmin⁻¹. A identificação dos açúcares foi obtida por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões, nomeadamente, frutose ($y= 52,365x+14,625$; $R^2 = 0,998$), glucose ($y= 47,304x+2,1084$; $R^2= 0,998$), sacarose ($y= 52,978x-7,0966$; $R^2 =$

0,999) e maltose ($y= 27,85x-1,5868$; $R^2= 0,9996$). Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca. A análise foi realizada em triplicado.

2.4.6. 10-HDA (Ácido 10-hidrodec-2-enóico)

2.4.6.1. Preparação das amostras

Para a análise, as amostras de geleia real liofilizadas (30 mg) foram dissolvidas em 10 mL da fase móvel. Em cada uma das amostras adicionou-se como padrão interno (PI) 4-hidroxibenzoato de metilo, numa concentração final de $0,1 \text{ mgmL}^{-1}$. Cada amostra foi filtrada através de uma membrana de nylon de $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ (Whatman) injetando-se de seguida $10 \text{ }\mu\text{L}$ da solução. Os dados cromatográficos foram adquiridos a 210 nm .

2.3.6.2. Condições cromatográficas

O teor de 10-HDA da geleia real foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção UV, de acordo com a literatura (Zhou, J., 2007). O sistema de cromatografia líquida utilizado foi idêntico ao descrito anteriormente para a análise de açúcares. Para a separação utilizou-se uma coluna C18 Nova-Pak, de $150 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm DI}$, com um diâmetro de partículas de $5 \text{ }\mu\text{m}$ (Waters, Irlanda), mantida a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. A fase móvel consistiu numa mistura de metanol, água e ácido fosfórico (50:50:0,3, em volume), com um fluxo de $0,8 \text{ mLmin}^{-1}$. Para a quantificação utilizou-se uma curva de calibração obtida numa gama de concentrações entre $0,0125$ e $0,2 \text{ mgmL}^{-1}$ ($y= 11,486x-0,0329$, $R^2= 0,9997$). Os resultados foram expressos em percentagem de massa seca. A análise foi realizada em triplicado.



Capítulo III

Resultados e Discussão

3.1. Produção de geleia real

3.2. Parâmetros de qualidade da geleia real

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na produção de geleia real e na caracterização das amostras, nomeadamente quanto aos parâmetros de qualidade, tais como, humidade, cinzas, proteínas, açúcares livres e 10-HDA.

3.1. Produção de geleia real

A otimização das condições de produção de geleia real é um fator importante na rentabilidade do apicultor quer através da minimização do tempo utilizado na preparação das colmeias quer na maximização da quantidade de produto obtido por colónia. Neste ponto são apresentados e discutidos os resultados obtidos para a avaliação do impacto do número de cúpulas introduzidas em colónias não-órfãs na produção de geleia real. A recolha de dados decorreu ao longo de vinte sessões entre o período de maio e julho.

3.1.1. Nível de aceitação de cúpulas

Na Figura 17 apresenta-se a variação do nível de aceitação das cúpulas para cada um dos três grupos em análise. Para a sua contabilização considerou-se como aceites as cúpulas contendo geleia real. Como se pode verificar na Figura 17a, grupo A, observa-se um ligeiro aumento de cúpulas aceites no início da produção, mantendo-se, em média, um valor aproximadamente constante até 15 de julho correspondendo ao máximo preenchimento de cúpulas com 161, isto é 89 % de aceitação. A partir desta data o número de cúpulas preenchidas sofre uma redução acentuada atingindo o mínimo de 39 cúpulas preenchidas com geleia real no final do estudo. O comportamento verificado no grupo B, segue o mesmo perfil descrito anteriormente, atingindo-se no dia 12 de julho o preenchimento máximo de cúpulas com 203, correspondendo a 75 % de aceitação, seguindo-se uma quebra que chega até às 48 cúpulas no último dia de produção, 27 de julho. O grupo C com 120 cúpulas por colmeia é de todos os grupos, aquele onde o aumento de cúpulas aceites entre a data inicial e o pico máximo de produção é mais significativo, passando de 169 para 293, com 81 % de aceitação, no dia 30 de junho, um aumento de 73 %, Figura 17c. Como seria de esperar, o número de cúpulas aceites aumenta em valor absoluto do grupo A para o C, no entanto, esse aumento não corresponde a uma maior aceitação.

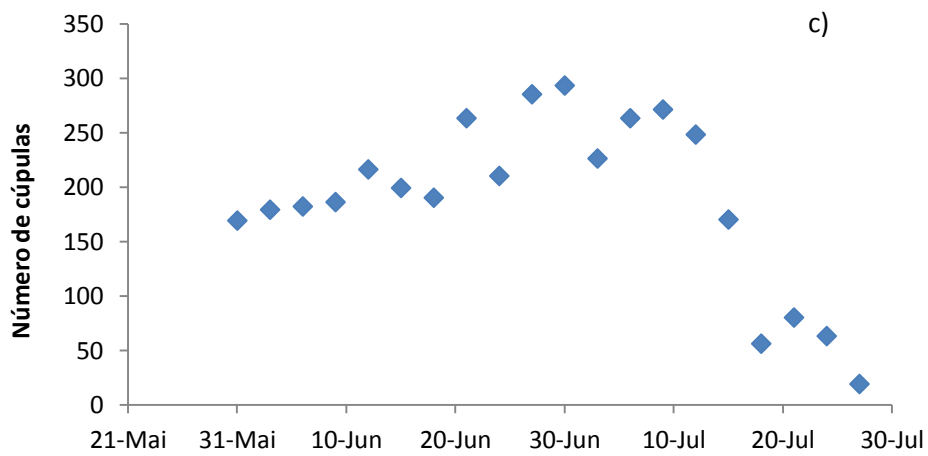
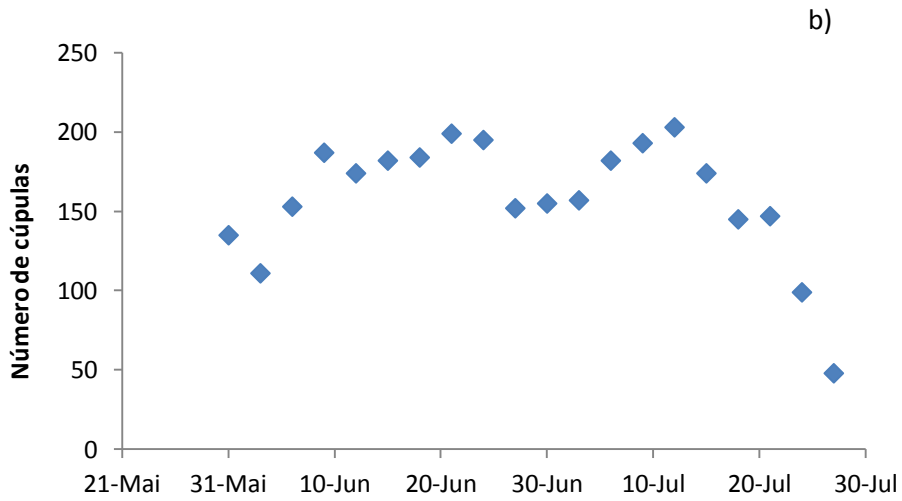
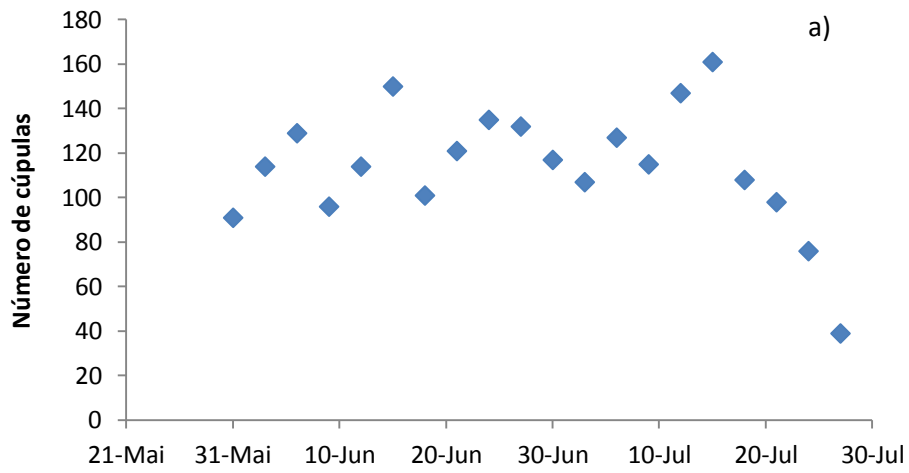


Figura 17 - Nível de aceitação de cúpulas por grupo – (a) grupo A (60 cúpulas); (b) grupo B (90 cúpulas); (c) grupo C (120 cúpulas)

Na Tabela 2 apresenta-se a percentagem de aceitação de cúpulas para cada uma das colmeias de cada grupo. Como se pode verificar há uma aceitação maior no grupo A com um valor médio de 62 %, diminuindo esse valor com o aumento do número de cúpulas por colónia, atingindo 51 % para as colónias do grupo C. Esta redução do nível de aceitação de cúpulas poderá estar associada com a maior carga de trabalho que as abelhas ama, responsáveis pela produção de geleia real, têm com o aumento de alvéolos reais, podendo no limite verificar-se um abandono de alguns dos alvéolos por incapacidade de a colónia produzir alimento suficiente para todas as larvas nas cúpulas.

Tabela 2- Média de aceitação de cúpulas por colmeia ao longo do estudo

Colmeia	60 Cúpulas %	90 Cúpulas %	120 Cúpulas %
1	46,4	61,2	44,0
2	66,9	56,3	53,0
3	72,1	55,1	55,9
Média	62±14	58±3	51±6

3.1.2. Produtividade

Na Figura 18 é possível avaliar a variação da produção de geleia real por grupo, observando-se dois períodos distintos. Entre o início do estudo em maio e os primeiros dias do mês de julho, a produtividade de geleia real manteve-se aproximadamente constante. Este período corresponde a uma altura do ano onde se verifica uma temperatura relativamente amena e uma disponibilidade alta de néctar, sempre conjugado com uma alimentação artificial. A partir do meio de julho observa-se uma quebra significativa na produção, o que estará associado com a diminuição das condições adequadas ao desenvolvimento da colónia, nomeadamente de disponibilidade de alimento e aumento das temperaturas.

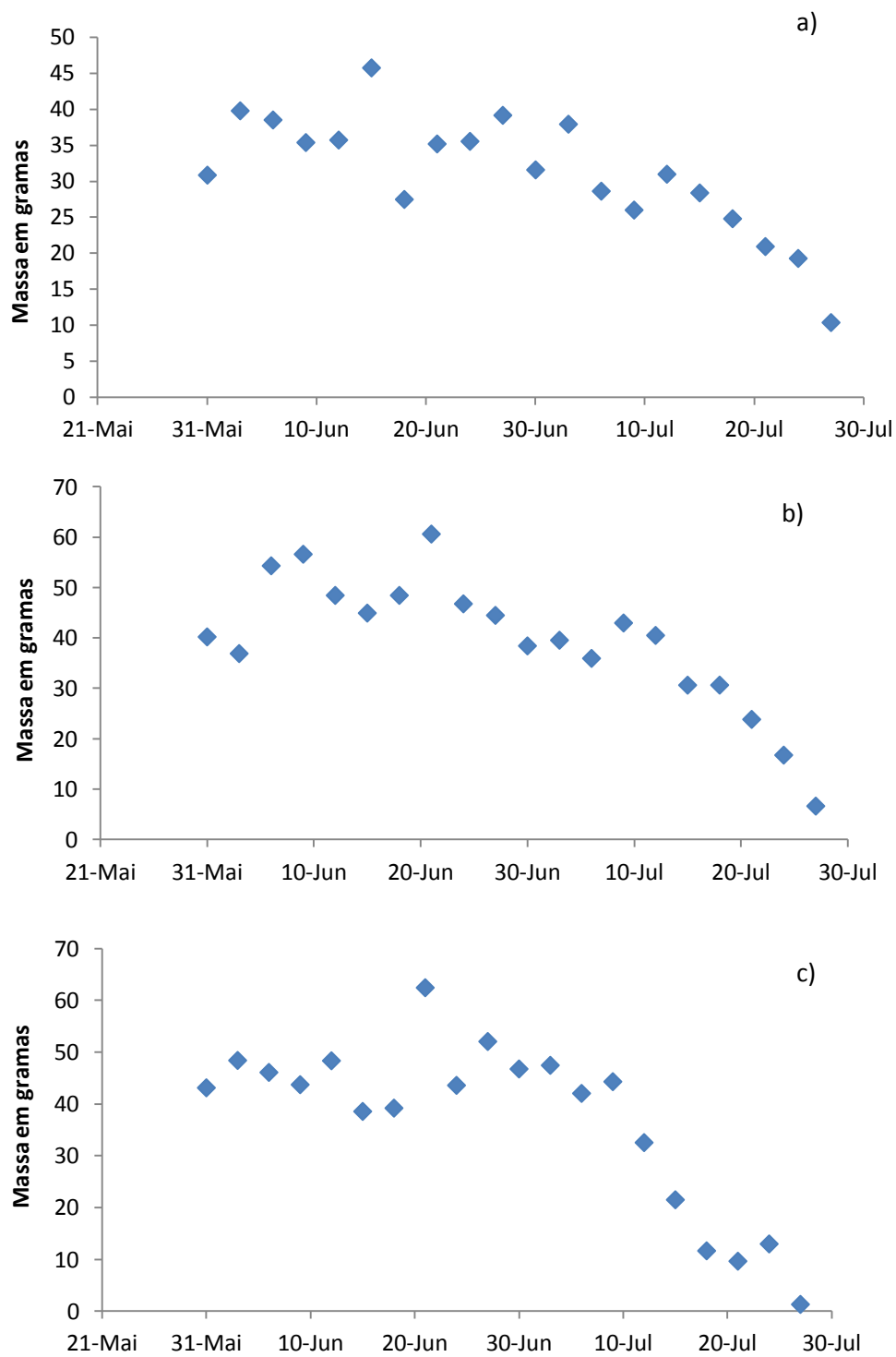


Figura 18 - Produção de geleia real - (a) grupo A, 60 cúpulas; (b) grupo B, 90 cúpulas; (c) grupo C, 120 cúpulas

Para o grupo A, Figura 18a, os valores máximos de produção de geleia real rondaram as 35 g, atingindo-se o máximo de produção no dia 15 de junho com 45 g, 15 g por colónia. No último dia de recolha de geleia real, o valor de produção atingiu neste grupo o seu valor mais baixo com uma média de 3 g por colónia, correspondendo a um decréscimo de produção de 80 %.

Para os grupos B e C, a produtividade no período de produção máxima apresenta valores médios muito semelhantes de aproximadamente 46 g por recolha, Figura 18b e Figura 18c, demonstrando claramente que o aumento de 90 para 120 cúpulas não se reflete na produtividade das colónias. Uma vez mais este comportamento é indicativo da incapacidade das abelhas para produzir a quantidade de alimento necessário para todas as cúpulas do grupo C. Após os primeiros dias de julho, ambos os grupos demonstram uma queda acentuada da produtividade observando-se um mínimo de 2 g por colónia no grupo B e 0,5 g no grupo C, indicativo claramente do desajustamento da época de produção de geleia real

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados médios da produção de geleia real por cúpula, considerando o número de cúpulas aceites em cada uma das colónias. Como se pode verificar a massa de geleia real produzida em cada cúpula apresenta um valor aproximado de 250 mg para os grupos A e B, mas sofre um decréscimo de 25 % para o grupo C. Este resultado sugere que ao aumentar o número de cúpulas de 60 para 90 as abelhas conseguem responder com um incremento na produção de geleia real na colónia de modo a garantir a mesma quantidade de alimento para cada um das larvas nas cúpulas. No entanto, com a passagem para 120 cúpulas, esse aumento não será suficiente pelo que as abelhas têm de fazer uma melhor distribuição da geleia real por cada cúpula, reduzindo na quantidade.

Tabela 3 - Valor médio da quantidade de geleia real por cúpula

Colmeia	60 Cúpulas g	90 Cúpulas g	120 Cúpulas g
1	0,19	0,26	0,15
2	0,30	0,27	0,18
3	0,30	0,21	0,24
Média	0,26±0,06	0,25±0,03	0,19±0,05

3.1.3. Comparação das metodologias de produção

Na Tabela 4 apresentam-se os resultados globais obtidos para cada uma das três metodologias de produção de geleia real em análise, nomeadamente o número de enxertos colocados e a sua percentagem de aceitação, bem como a média de geleia real produzida por cúpula e a massa global. Ao longo das 20 sessões de produção que ocorreram desde o dia 31 de maio até 27 de julho, foram enxertadas um total de 81 000 cúpulas. O nível médio de aceitação dos enxertos foi de 57 % observando-se uma redução para as colmeias com maior número de cúpulas enxertadas. Este decréscimo foi mais evidente com a passagem de 90 para 120 cúpulas por colmeia. O comportamento observado ao nível da produtividade considerando a quantidade de geleia real produzida por cúpula também diminuiu com o aumento do número de cúpulas por quadro, no entanto, a redução entre o grupo de 60 e 90 cúpulas foi muito reduzida, obtendo-se nestes casos 0,25-0,26 g por cúpula. Este resultado está de acordo com a literatura (Bogdanov, S.,2014), a qual refere uma produção característica de 0,3 g por cúpula.

Tendo em consideração que a média de produção por cúpula no grupo B (90 cúpulas) é aproximadamente idêntico ao do grupo com menor número de cúpulas, e dado que o grau de aceitação entre estes dois grupos diferiu apenas de 4 %, o maior número de cúpulas enxertadas provoca um aumento de geleia real com o grupo B a atingir o valor máximo com 788 g. Já para o grupo C com 120 cúpulas, apesar do maior número de cúpulas enxertadas, a menor eficiência na aceitação e o menor rendimento por cúpula tem um impacto significativo na produção, obtendo-se ao longo das 20 sessões apenas 736 g. Considerando estes resultados e tendo em atenção o tempo despendido para a realização dos enxertos, o grupo B é o grupo com melhores condições para a produção de geleia real

Tabela 4 - Valores globais de produção de geleia real

Grupos	Larvas enxertadas	Aceitação	Total em g de geleia real	Geleia real por cúpula
A	3600	61,8	622,2	0,26
B	5400	57,5	788,3	0,25
C	72000	51,0	735,6	0,19
Total	81000	56,8	2146,1	0,23

3.2. Parâmetros de qualidade da geleia real

A geleia real é um produto com um valor comercial extremamente elevado, o que se fica a dever em parte à exigência técnica na sua produção mas também à sua composição, a qual requer especial atenção em termos de conservação. O crescente interesse deste produto por parte dos consumidores fez também aumentar a presença no mercado internacional de produtos adulterados, pelo que o controlo de qualidade deste produto, para além de avaliar o estado de conservação, é fundamental para a identificação da sua autenticidade. De seguida apresentam-se os resultados obtidos para os vários parâmetros de qualidade da geleia real produzida no ensaio, nomeadamente a humidade, o teor em cinzas e proteína, o perfil em hidratos de carbono e a quantificação no princípio ativo da geleia real, o ácido 10-hidroxidec-2-enóico, 10-HDA. Adicionalmente apresentam-se também os valores obtidos para uma amostra de geleia real portuguesa.

3.2.1 Humidade

A geleia real apresenta na sua composição um elevado teor de humidade, a qual está associada às condições de produção. De acordo com a literatura (Sabatini A, G., et al., 2008) para a geleia real fresca o valor oscila entre os 60 a 70 %. Como se pode verificar através dos resultados da Tabela 5, as amostras obtidas na Grécia apresentam valores de humidade variando entre um mínimo de 60 e um máximo de 68 %, dentro do intervalo descrito.

Tabela 5 - Parâmetros de qualidade da geleia real, em percentagem

Amostras	Humidade	Cinzas	Proteínas	10-HDA
G01	60,0±0,7	2,6±0,0	41,5±0,0	6,6±0,1
G02	64,2±1,2	3,0±0,2	35,6±0,0	5,1±0,0
G03	68,1±0,2	3,7±0,5	39,6±0,0	5,0±0,0
G04	67,1±0,9	3,5±0,1	37,5±0,0	4,7±0,6
G05	64,3±0,4	2,8±0,1	40,1±0,0	5,4±0,0
G06	66,0±0,7	3,2±0,3	43,4±0,0	4,6±0,0
P01	58,3±0,1	2,7±0,0	36,6±0,0	6,8±0,0

Comparativamente, a amostra portuguesa apresenta um valor ligeiramente mais baixo com 58 %, o que poderá dever-se às condições de recolha da geleia real, particularmente o facto de a geleia ser recolhida no interior de um favo real já operculado, correspondendo a uma geleia real e uma larva com mais alguns dias de idade.

3.2.2. Cinzas

O teor em cinzas reflete a mineralização do produto e para a geleia real o valor recomendado deverá oscilar entre os 2 e os 5 % (Sabatini A, G., et al., 2008). Como se pode verificar pelos resultados apresentados na Tabela 5, o teor das amostras analisadas não variam significativamente oscilando entre os 2 a 4 %. A amostra portuguesa apresenta também um teor na mesma ordem de grandeza, ligeiramente inferior a 3 %.

3.2.3. Proteínas

Para a produção de geleia real as abelhas necessitam de ingerir grandes quantidades de pólen, devido ao seu elevado conteúdo proteico. Efetivamente, as proteínas são os compostos em maior percentagem na composição da geleia real desidratada. Para as amostras em estudo, Tabela 5, o teor de proteínas oscilou entre um mínimo de 36 % para a amostra G02 e um máximo de 43 %, para a amostra G06. A amostra portuguesa apresentou um valor ligeiramente mais baixo com 37 %. De acordo com a literatura (Sabatini A, G., et al., 2008) para a composição da geleia real o teor em proteína deverá apresentar-se no intervalo entre 27 e 41 %, verificando-se neste caso duas amostras com um conteúdo ligeiramente superior, o que poderá estar associado com as diferenças na alimentação das abelhas e com as características do pólen ingerido.

3.2.4. 10-HDA

A atividade biológica da geleia real é em grande parte atribuída à presença na componente lipídica da geleia real de um ácido orgânico, o ácido 10-hidroxidec-2-enóico (10-HDA). A presença deste composto é também utilizada para a deteção de fraudes resultantes da adição à geleia real de outras substâncias artificiais, devendo por

isso o seu valor em geleia real liofilizada ser superior a 3,5 % (Sabatini A., G., et al., 2008). A quantificação deste composto realizou-se por cromatografia líquida. Na Figura 19 pode observar-se os cromatogramas obtidos para a solução de padrão, Figura 19a e para uma das amostras analisadas, Figura 19b. Em ambos os cromatogramas pode identificar-se o 10-HDA bem como o padrão interno 4-hidroxibenzoato de metilo utilizado para a quantificação. Os valores obtidos para cada uma das amostras estão expressos na Tabela 5.

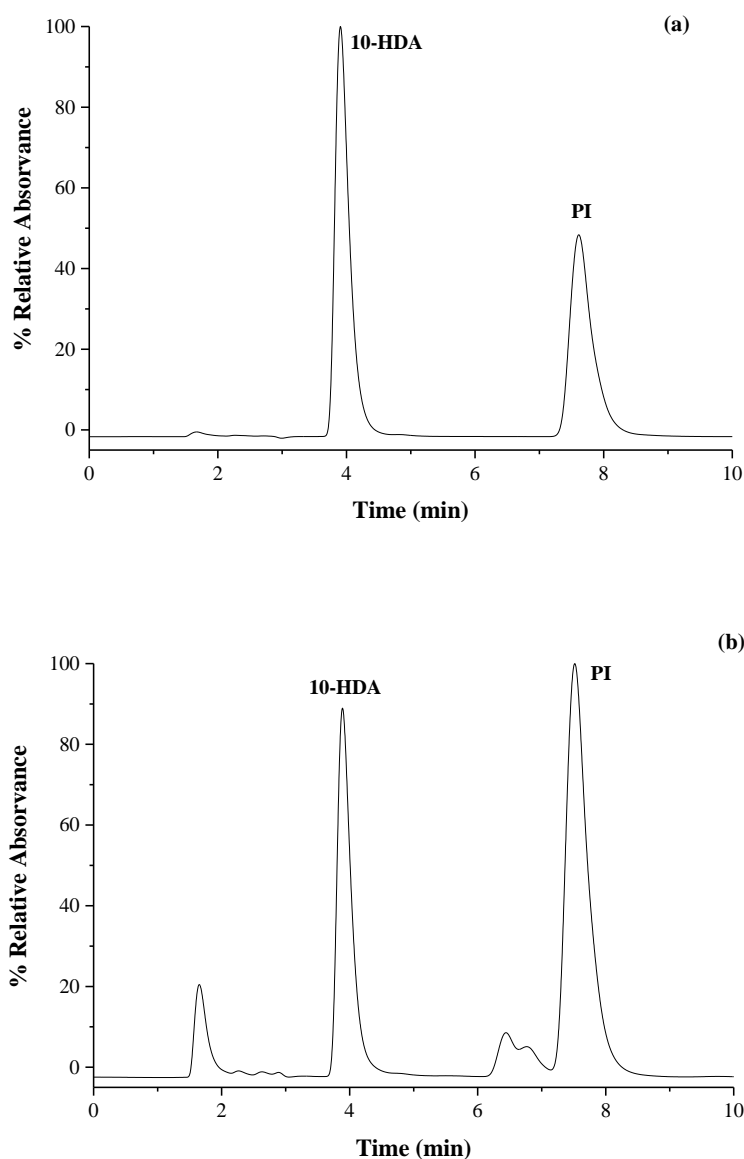


Figura 19 - Perfil cromatográfico relativo à análise de 10-HDA: PI - 4-hidroxibenzoato de metilo. (a) Padrões; (b) Amostra de geleia real G05

Como se pode verificar, todas amostras apresentam um conteúdo superior ao mínimo descrito na literatura, oscilando entre o valor mínimo de 4,6 % para a amostra G06 e um valor máximo de 6,6 % concretamente na G01. A amostra portuguesa revelou o valor mais alto de 10-HDA com 6,8 %.

3.2.5. Açúcares

A geleia real é um produto apícola com uma quantidade significativa de hidratos de carbono provenientes maioritariamente do consumo de mel pelas abelhas. Por esta razão, os monossacarídeos frutose e glucose, característicos do mel, são encontrados em maior quantidade no seu perfil de açúcares, surgindo também com frequência outros, principalmente dissacarídeos.

Na Figura 20 pode observar-se os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida para uma solução de padrões, Figura 20a e para uma amostra de geleia real, Figura 20b. Os quatro açúcares avaliados, frutose, glucose, sacarose e maltose, surgem em todas amostras independentemente da sua origem geográfica, não se observando nenhum outro pico adicional em quantidades mensuráveis.

Tabela 6 - Análise quantitativa de açúcar nas amostras de geleia real

Amostras	Frutose (g/100g)	Glucose (g/100g)	Sacarose (g/100g)	Maltose (g/100g)	Total de Açúcares (g/100g)
G01	14,2±0,4	15,4±0,7	2,8±0,2	1,3±0,8	33,6±1,3
G02	15,1±0,2	16,0±0,8	1,7±0,0	1,8±0,5	34,5±1,5
G03	15,4±0,5	17,2±0,0	3,1±0,2	3,0±0,1	39,1±0,3
G04	16,9±0,2	16,7±0,9	3,1±0,2	2,8±0,1	40,1±0,1
G05	17,3±0,2	17,7±0,2	3,1±0,3	3,0±0,4	41,4±0,2
G06	17,7±0,1	13,6±1,4	8,1±0,1	1,9±0,6	41,2±0,6
P01	13,4±0,6	9,5±0,0	8,5±0,2	1,2±0,4	32,5±0,6

A quantificação do teor de cada um dos açúcares, realizada através de uma calibração externa, apresenta-se na Tabela 6. Como se pode comprovar a frutose é, na maioria das amostras, o açúcar com maior contribuição para o total de hidratos de carbono, com valores que oscilam entre o mínimo de 13,4 % para a amostra portuguesa,

e o máximo de 17,7 % para a amostra G06. A glucose apresenta também níveis na mesma ordem de grandeza, oscilando entre 9,5 de mínimo e os 17,7 % na amostra G5, atingindo em alguns casos valores mesmo superiores à frutose. A maltose é o açúcar com valores mais baixos, compreendidos entre 1,2 % para a amostra portuguesa e 3 % para as amostras G03 e G05. No que se refere ao valor da sacarose, os teores são bastante variáveis oscilando entre os 1,7 % e os 8,5 % encontrados na amostra portuguesa.

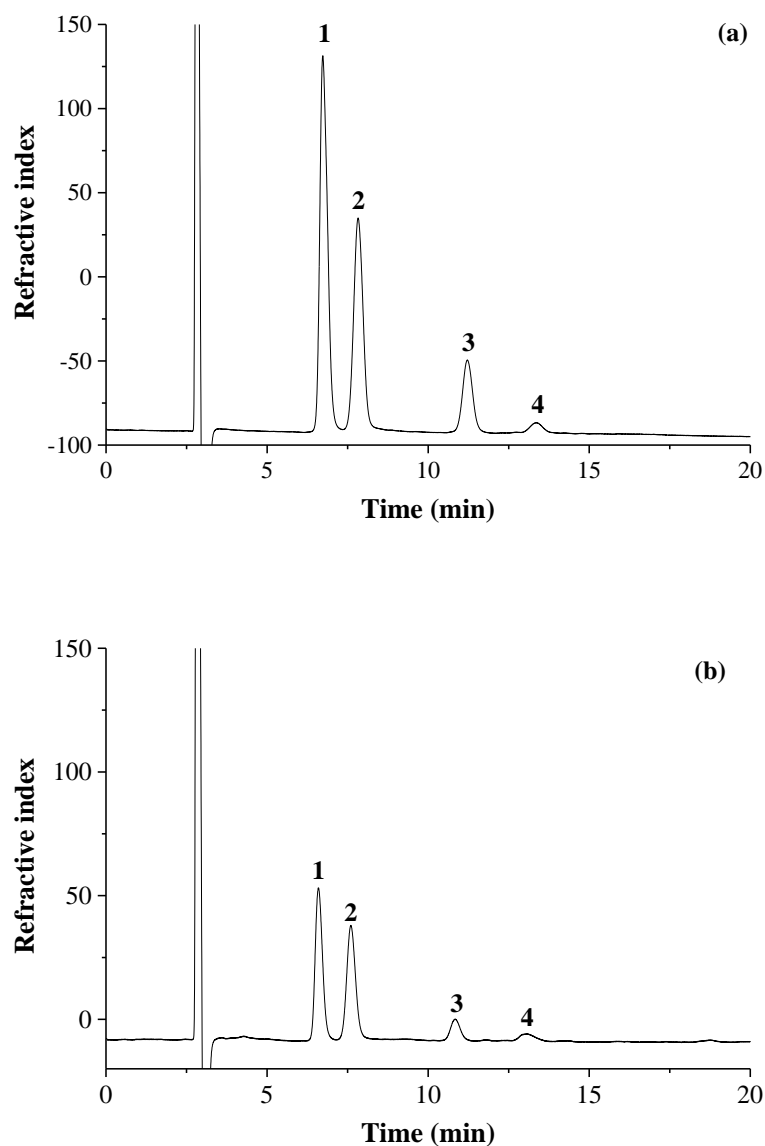


Figura 20 - Perfil cromatográfico relativo à análise de açúcares: 1-frutose; 2-glucose; 3-sacarose; 4- maltose. (a) Padrões; (b) Amostra de geleia real G04

De acordo com os valores descritos na literatura, o total de açúcares na geleia real é superior a 30 %, o que e está de acordo com os resultados obtidos nas amostras estudadas (Barnatiu,L. I., et al., 2011). Por outro lado, o elevado valor obtido para o teor em sacarose reflete o procedimento utilizado na produção, nomeadamente a alimentação continuada das colónias com xarope de sacarose, evidente também na geleia real produzida em Portugal onde a colónia, na época de recolha da amostra, estava sujeita a alimentação artificial.



Capítulo IV

Conclusão

Conclusão

A geleia real é um dos produtos mais relevantes para a colmeia, pois serve de alimento para as larvas na sua fase inicial de desenvolvimento, e para a rainha durante toda a sua vida, permitindo a sua diferenciação dentro da colónia. As potencialidades deste produto da colmeia são muito elevadas devido ao seu elevado valor nutritivo e em especial a sua atividade farmacológica, associada a uma composição rica em proteínas com elevada atividade fisiológica e à presença de ácidos hidroxílicos como o 10-HDA. Estas características fazem da geleia real um produto com elevado valor comercial, e simultaneamente são uma oportunidade para os apicultores diversificarem as suas produções e rentabilizarem a sua exploração. Os resultados deste trabalho permitem disponibilizar informação específica quanto às metodologias de produção utilizada para produzir geleia real, e simultaneamente orientar os procedimentos para a maximização da produção, garantindo a qualidade do produto final.

A produção de geleia real requer o uso de colónias saudáveis e populosas, e pode ser realizada através do confinamento da abelha rainha numa área limitada da colónia. Este procedimento evita a necessidade de torna a colmeia órfã, maximizando assim o sucesso na aceitação de alvéolos enxertados artificialmente. Esta metodologia, aplicada neste estudo, demonstrou ser adequada permitindo avaliar as diferenças de produtividade de geleia real com a variação do número de cúpulas inseridas na colmeia.

Ao longo das vinte sessões de recolha da geleia real, a produção de geleia real em todos os grupos avaliados demonstrou um comportamento semelhante com uma produtividade estável entre o mês de maio até inícios de julho, observando-se de seguida um decréscimo abrupto da quantidade produzida. Esta redução está associada às elevadas temperaturas bem como à escassez de alimento disponível na região nesta época do ano.

Em relação à percentagem de aceitação das cúpulas verificou-se que o grupo A, onde se inseriu 60 cúpulas por sessão, o grau de aceitação das larvas enxertadas foi mais elevado com um valor que atingiu os 62 %. Este valor foi decrescendo com o aumento do número de cúpulas inseridas obtendo-se para o grupo B uma aceitação de 58 %, enquanto o grupo C apresenta o menor valor com 51 %. Esta redução do nível de aceitação de cúpulas poderá estar associada com a maior carga de trabalho que as abelhas ama, responsáveis pela produção de geleia real, têm com o aumento do número de alvéolos reais, podendo no limite verificar-se um abandono de alguns dos alvéolos

por incapacidade da colónia produzir alimento suficiente para todas as larvas nas cúpulas.

A redução da quantidade média de geleia real produzida por cúpula segue também um decréscimo idêntico com o aumento do número de cúpulas por quadro, no entanto, a redução entre o grupo de 60 e 90 cúpulas foi muito limitada, obtendo-se nestes casos 0,26 e 0,25 g por cúpula, respetivamente. Para o grupo com 120 cúpulas a massa de geleia real por cúpula decresceu mais de 25 %, o que sugere com este aumento a quantidade de geleia real produzida não será suficiente requerendo uma distribuição da geleia real disponível por cada cúpula, reduzindo na quantidade.

Considerando que a média de produção por cúpula no grupo B (90 cúpulas) é aproximadamente idêntica ao do grupo com menor número de cúpulas, e dado que o grau de aceitação entre estes dois grupos diferiu apenas de 4 %, o acréscimo no número de cúpulas enxertadas resulta num aumento de geleia real, atingindo para o grupo B o valor máximo do estudo com 788 g. Já para o grupo C com 120 cúpulas, apesar do maior número de cúpulas enxertadas, a menor eficiência na aceitação e o menor rendimento por cúpula tem um impacto negativo na produção, obtendo-se ao longo das 20 sessões apenas 736 g. Considerando estes resultados e tendo em atenção o tempo despendido para a realização dos enxertos, as condições aplicadas para o grupo B são as mais adequadas para a maximização da quantidade de geleia real produzida.

A análise qualitativa da geleia real revelou, de uma forma geral, um conjunto de parâmetros nutricionais como humidade, cinzas, proteínas, açúcares e 10-HDA dentro dos parâmetros internacionais estabelecidos para este produto da colmeia. A geleia real sendo o produto da colmeia com maior percentagem de água apresentou, para as seis amostras originárias da Grécia, um teor em humidade entre um mínimo de 60 e um máximo de 68 %. Comparativamente, a amostra portuguesa apresenta um valor ligeiramente abaixo do valor descrito, com apenas 58 %, o que poderá dever-se às diferenças nas condições de recolha da geleia real desta amostra, isto porque contrariamente às restantes seis amostras produzidas na Grécia e retiradas a cada três dias de produção, esta geleia real foi obtida em alvéolos reais naturais já operculados, correspondendo a uma geleia real menos fresca e por isso com uma menor quantidade de água. Para o teor em cinzas, as amostras apresentaram valores a rondar os 2 a 4 %, o que corresponde a um nível de mineralização do produto dentro das normas estabelecidas.

As proteínas representam a maior componente da matéria seca da geleia real, o que se verificou também nas amostras em estudo. O teor de proteína encontrado variou entre um mínimo de 36 % e um máximo de 43 %. A amostra portuguesa apresentou um valor ligeiramente inferior, com apenas 37 %. Estes valores, particularmente os relativos às seis amostras produzidas na Grécia, estão ligeiramente acima dos máximos descritos na literatura para este produto apícola, o que será consequência das especificidades de alimentação das abelhas nessa região e às características do pólen ingerido.

A composição em hidratos de carbono da geleia real é bastante idêntica à encontrada para o mel, surgindo como açúcares maioritários os monossacáridos frutose e glucose em proporções aproximadamente equivalente. Para além destes dois açúcares, a sacarose e a maltose surgem também em quantidade significativas, estando os teores de sacarose relacionados com a alimentação artificial das colónias. A contribuição conjunta de todos os açúcares representou, para as sete amostras, uma percentagem da matéria seca a oscilar entre 33 e 41 % o que está de acordo com o teor global de açúcares recomendado.

No que se refere ao teor de ácido 10-HDA, os valores obtidos para as amostras apresentam-se claramente acima dos mínimos descritos na literatura, oscilando entre um mínimo de 4,6 % e o máximo de 6,6 %. A amostra portuguesa revelou o valor mais elevado com 6,8 %. Para além de confirmar a autenticidade das amostras, os elevados valores encontrados de 10-HDA representam também um valor comercial superior, dada a relevância da concentração deste princípio ativo para a atividade farmacológica da geleia real.

Referências Bibliográficas

Al-Mamary, M., Al-Meeri, A., Al-Habori, M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. 22. p. 1041-1047.

Almeida-Muradian, L B; Pamplona, L C; Coimbra, S; Barth, O M. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1). p. 105–111.

Almeida-Muradian, L. B., Penteado, MD. V. C. 2007. *Vigilância sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos*. Editora Guanabara. p. 203.

AOAC. 1995. *Official methods of analysis*. (16th ed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.

Bachanova, K., Klauđiny, J., Kopermichy, J., Šimuth, J., 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel, *Apidologie*. 33. p. 259-269.

Barnutiu, L. I., Marghitas, L. A., Dezmirean, D. S., Mihai, C. M., Bobis, O., 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Royal Jelly – Review, *Animal Science and Biotechnologies*. 44 (2). p. 67-71.

Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A.-G. 2002. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57c. p. 530–533.

Benfenati, L; Sabatini, A G; Nanetti, A. 1986. Composizione in Sali minerali della gelatina reale. *Apicoltura*. 2. p. 129 – 143.

Bloodworth, B. C., Harn, C. S., Hock, C.T., Boon, Y.O. 1995. Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing royal jelly. *J. AOAC Int.*, Washington. 78 (4), p. 1019-1023.

Bogdanov, S. 2001. Royal Jelly, Bee Brood: Composition, Health. Medicine - A Review. Bee Product Science. p. 2-5.

Bogdanov, S; Gallamann. 2008. P: Royal jelly and health: an overview. Apimedical & Apiquality, 2nd Apimondia International Forum. Rome. p. 61.

Bogdanov, S. 2014. Beeswax Book, Chapter 1. Bee Product Science. <http://www.bee-hexagon.net/en/wax.htm>.

Bogdanov, S. 2014. Royal Jelly and Bee Brood: Harvest, Composition, Quality. The Royal Jelly Book. 1. p. 1-13.

Bogdanov, S. 2014. Royal Jelly, Bee Brood: Composition, Nutrition, Health. The Royal Jelly Book. 2. p. 1-34.

Bogdanov, S. 2014. The Bee Venom Book, Chapter 1. Bee Product Science. <http://www.bee-hexagon.net/en/venom.htm>

Condón M., Carlos. 2005. Palinología y Caracteres Físico- Químicos del Pólen Apícola Producido en España. Propuesta de Parámetros objetivos de calidad.. 281f. Tese (doutoramento em Química analítica, Nutrição y Bramatologia). Universidade de Salamanca, Faculdade de Farmácia; Salamanca; Espanha.

Crenguta I. Pavel, Liviu Al. Marghitas, Otilia Bobis, Daniel S. Dezmirean, Agripina Sapcaliu, Ion Radoi, Mariana N.Madas, 2011. Biological Activities of Royal Jelly – A Review. Animal Science and Biotechnologies. 44 (2). p. 108-118.

FNAP, 2010. Federação Nacional dos Apicultores de Portugal. Manual de Produção de Pólen e Própolis. http://www.fnap.pt/gestor/doc_up/documento_cnt_projectos_151.pdf.

FOOTE, H. L.. 1957. "Possible use of microorganisms in synthetic bee bread production". American Bee Journal. p. 3-10.

Garcia-Amoedo, L. H., Almeida-Muradian, L. B. 2003. Determination trans 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) in Brazilian royal jelly from São Paulo State, Brazil. *Ciên. Tecnol. Aliment.* 23. p. 62-65.

Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. *Bee world.* 60. p. 59-84.

González Paramás, A.M. 2002. "Diferenciación de Mieles Basada en sus Caracteres Cromáticos y Composición Aminoacídica y Mineral." Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

GPP. 2010. Ministério da Agricultura do desenvolvimento Rural e das Pescas. Programa Apícola Nacional – Triénio 2011 – 2013. (http://www.gpp.pt/MA/apicultura/PAN_2011_13.pdf).

HERBERT & SHIMANUKI. 1978. "Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee stored pollen." *Apidologie.* 9 (1). p. 33-40.

KELLER, I, Peter Fluri, Anton Imdorf. 2005. "Pollen nutrition and colony development in honey bees: part I." *Bee World.* p. 1-8.

Koshio, S., Almeida-Muradian, L. B. 2003. Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10 hidróxi-2-decenóico (10-HDA) em geleia real pura e adicionada a mel brasileiro. *Quim Nova, São Paulo.* 25 (5). p. 670-673.

Lercker, G; Savioli, S; Vecchi, M A; Sabatini, A G; Nanetti, A; Piana, L. 1986. Carbohydrate determination of royal jelly by high resolutions gas chromatography (HRGC). *Food Chemistry.* 19. p. 255-264.

Mohamed Fawzy Ramadan and Ahmed Al-Ghamdi. 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A Review. *Journal of Functional Foods.* 4. p. 39-52.

Nagai, T, Nagashimi, T, Myode, T, Inoue, R. 2004. Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Department of Food Science and Technology.* 3. p. 226-229.

Pamplona, L. C., Azedo, R. A. B., Oliveira, K. C. L. S., et al., 2004. Physicochemical analyses indicated to the quality control of royal jelly with honey. *Food Science and Technology*. 24. p. 608-612.

Ramadan, Mohamed Fawzy; Al-Ghamdi, Ahmed. 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly. *Journal of Functional Foods*. p. 39-52.

Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Caboni, M. F., Bogdanov, S., Almeida-Muradian. L. B., 2008. Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1 (1). p. 16-21.

Sabatini, A. G., Carpana. E., 2002. In *Apicultura, o Sabor de uma História: os Produtos da Apicultura – Bragança: Corane – Associação de Desenvolvimento dos Concelhos da Raia Nordeste – Terra Fria*. p. 1-108.

Simuth, J. 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis Mellifera*) Royal Jelly. *Apidology*. 32. p. 69-80.

Standifer, L.N., McCaughey, W.F., Dixon, S.E., Gilliam, M., Loper, G.M. 1980. Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, amino acids and enzymes. *Apidologie*. 11. p. 163-171.

Snyder LR, Kirkland JJ e Glajch JL. 1997. *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Nova Iorque. p. 1- 13.

Terada Y, Narakawa M, Watanabe T. 2011. Specific hydroxyl fatty acids in royal jelly activate TRPA1. *Journal Agric Food Chem*. p. 1-8.

Toreto, V.C; Sato, H.H; Pastore, G.M; Park, Y.K. 2013. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. p. 2-9.