



Impacto da proveniência das abelhas na qualidade da própolis

Gomes da Silva Silveira Cahango

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para a obtenção do
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por

Professor Doutor Miguel Vilas Boas

Doutora Soraia Falcão

Bragança

2017

Dedicatória

Ao meu mano José Lemos Silveira Cahango. Aos meus bem mais que amigos Emanuel Gomes Nambelo Cahango, Fernanda Naluvemba Nambelo Cahango e Aline Hazael da Silveira Cahango, minhas razões de ser

Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre
esteja vivo, quem quase vive já morreu.

Sarah Westphal

Agradecimento

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus pelo sonho realizado, agradecer também o meu orientador Professor Miguel Vilas Boas, pela paciência, dedicação, amizade e brincadeira trocadas e por todo o conhecimento que me transmitiu, pelo tema sugerido e pela inclusão no grupo de trabalho da Professora Alice Pinto que me fez interessar pelo mundo da apicultura que de certa forma desconhecia. Meu muito obrigado!

Agradecer à Doutora Soraia Falcão pelo apoio, encorajamento, ajuda, e pelas pressões feitas para a conclusão do trabalho.

A grande colega e mestre de laboratório, Andreia Tomás que foi durante todo meu percurso uma incansável orientadora, pela amizade, pelo apoio, pela disponibilidade e por tudo que me ensinou e ao professor Luis Filipe de Sousa Teixeira Nunes pelo apoio e disponibilidade. O meu muito obrigado!

Sem querer deixar de parte a minha grande equipa de trabalho de campo, encabeçada pela Professora Alice Pinto e os membros da mesma Cátia Neves, Dora Henriques, Helena, Júlio, Paulo Ventura, o meu muito obrigado pela experiência, convívio e pelo grande ensinamento na parte prática da apicultura.

Agradecer também ao Instituto Superior Politécnico do K-Sul (ISP K-Sul), por ser um grande trampolim para a realização desse sonho na pessoa do Diretor Geral Isaac Manuel Octávio Espínola e ao Instituto Politécnico de Bragança (IPB) pela oportunidade de ter materializado esse tão esperado sonho.

Desde já agradecer à minha família que de uma forma direta e indireta me tem apoiado muito, mesmo estando do outro lado do mundo nunca me senti só. Agradecer também à minha namorada Rita Gonçalves da Silveira, pelo apoio, confiança e amizade, que de uma forma ou de outra nunca me tinha deixado faltar a sua atenção. Meu obrigado Amor.

Agradecer também aos financiadores do projeto *BEEHOPE - Honeybee Conservation centers in Western Europe: an innovative strategy using sustainable beekeeping to reduce honeybee decline*. 138573 - BiodivERsA/0002/2014, que permitiu obter as amostras e ganhar experiência na área da apicultura, um mundo para mim desconhecido.

Dizer que a conclusão desta dissertação finaliza mais uma etapa da minha vida e se confirma uma promessa.

A todos que de uma forma direta ou indireta me apoiaram e fizeram com que esse sonho se tornasse realidade. Meu muitíssimo obrigado!

Resumo

A própolis é uma mistura complexa de material resinoso recolhido pelas abelhas em ramos de árvores, arbustos e folhas e transportado para colmeia, onde são adicionadas secreções cera e pólen. As abelhas usam esta mistura com finalidades mecânicas ou biológicas nomeadamente para a reparação da colmeia, controlo da humidade, mas também para reparar favos ou impedir a entrada de possíveis invasores. A composição química da própolis depende da vegetação em redor do apiário e das condições geográficas e climáticas, observando-se a preferência por fontes de resina específicas. Nas regiões de climas temperados, como Portugal, as principais fontes vegetais de resina para as abelhas são o choupo, carvalho, salgueiro ou acácias.

Este trabalho tem como objetivo analisar a influência da origem das abelhas na qualidade da própolis produzida, por comparação dos parâmetros químicos. As abelhas utilizadas no ensaio foram provenientes da região Sul de Portugal (Vila do Bispo) e Norte (Bragança), bem como do País Basco, Espanha. A produção de própolis foi efetuada em duas regiões geograficamente distintas, Bragança e Vila do Bispo.

Os resultados demonstram uma variabilidade entre a própolis recolhida nos apiários do norte e sul, observando-se um maior teor em ceras e cinzas nas amostras do apiário a sul. No que se refere à composição fenólica os teores em fenóis totais, e flavonoides são superiores para as amostras da região norte. Já no que se refere ao impacto da origem geográfica das abelhas, verifica-se que os parâmetros físicos e a componente fenólica é geralmente semelhante para um mesmo apiário não se observando diferenças significativas entre a própolis produzida no mesmo local por abelhas oriundas do norte, sul ou País Basco.

Palavras-Chave: abelhas; própolis; origem geográfica; propriedades químicas; composição fenólica.

Abstract

Propolis is a complex mixture of resinous material collected by bees from tree branches, bushes and leaves and transported to the beehive, where secretions, wax and pollen are added. Honeybees use this mixture with mechanical and biological purposes, namely, to repair the hive, moisture management, but also to repair honeycombs or to prevent the entrance of intruders. The chemical composition of propolis depends on the botanical source around the apiary but also on the geographical and climatic conditions, with bees preferring specific resin sources. In temperate regions, such as Portugal, the main botanical sources of the resin are poplar, oak, willow and acacia.

The main objective of this work is to analyze how the origin of the honeybees can influence the quality of propolis, comparing its chemical parameters. Honeybees used on this assay came from the south region of Portugal (Vila do Bispo) and north (Bragança), as well as from the Basque country, Spain. Propolis production was carried out in two regions geographically distinct, Bragança and Vila do Bispo.

The results showed variability between the propolis collected in the different apiaries, observing a greater content on wax and ashes in the apiary samples from the south. As regards to the phenolic composition, the content of total phenol and flavonoids was higher on the samples from the north side. In respect to the impact of the geographical origin of honeybees, it is found that the physical parameters and the phenolic characteristics are similar within the same apiary and no significant differences were observed considering the origin of honeybees from north, south or Basque country.

Keywords: Honeybees; propolis; geographical origin; chemical properties; phenolic composition;

Índice geral

Agradecimento	iii
Resumo.....	v
Abstract	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	x
Abreviaturas e símbolos	xi
Capítulo I.....	12
1.1 Introdução	13
1.2 Produtos da colmeia	13
1.3 Mel	14
1.4 Melada.....	15
1.5 Pólen apícola	15
1.6 Geleia real	16
1.7 Veneno de abelha	17
1.8 Cera	18
1.9 Própolis	18
1.9.1 Composição e origem vegetal	19
1.9.2 Propriedades bioativas.....	21
1.9.3 Critérios de qualidade da própolis.....	21
1.9.4 Produção de própolis.....	23
1.9.4.1 Colheita de própolis pelas abelhas	22
1.9.4.2 Técnica de produção intensiva de própolis	24
1.9.4.3 Fatores que influenciam a produção e qualidade da própolis	26
1.10 Objetivos	27
Capítulo II	29
2.1 Materiais e métodos	30
2.2 Solventes e reagentes	30
2.3 Amostragem	30
2.4 Parâmetros físico-químicos	31
2.4.1 Teor de cinzas.....	31
2.4.2 Teor de ceras	32
2.5 Conteúdo balsâmico	32

2.5.1 Extração.....	32
2.5.2 Teor em fenóis totais.....	33
2.5.3 Conteúdo em flavonas e flavonóis	33
2.5.4 Conteúdo em flavanonas e di-hidroflavonóis.....	34
Capítulo III.....	35
3.1 Produção de própolis.....	36
3.2 Teor em cinzas	37
3.3 Teor em ceras	38
3.4 Conteúdo balsâmico	40
3.5 Teor em fenóis totais.....	41
3.6 Teor em flavonas/flavonóis.....	42
3.7 Teor em flavanonas/di-hidroflavonóis	44
3.8 Análise estatística dos resultados	45
Capítulo IV.....	48
4 Conclusão.....	49
Capítulo V	52
Referências bibliográficas	52
Capítulo VI	59
Anexos I.....	63
Anexos II.....	66

Índice de figuras

Figura 1 - a) Mel; b) Pólen; c) Geleia Real; d) Cera; e) Própolis.....	14
Figura 2 - Veneno de abelha	17
Figura 3 – Técnicas de coleta e transporte de própolis, usando as mandíbulas para raspar a resina das plantas.....	18
Figura 4 - Estruturas básicas dos compostos fenólicos mais comuns encontrados na própolis. a) derivados do ácido cinâmico; b) derivados do ácido benzóico; c) flavonóides.	20
Figura 5 - a) benzofenonas polipreniladas; b) C-prenil-flavanona.....	20
Figura 6 - Abelha a recolher resina exsudada de um rebento de choupo	23
Figura 7 - Colheita de própolis com uma rede de plástico colocada no topo da colméia.	24
Figura 8 - Tipos de redes comerciais disponíveis no mercado. A- redes em plástico mais flexível, com a malha de cerca de 4 mm); B – redes em plástico grosso mas maleável, com ranhuras de cerca de 2 mm.	25
Figura 9 - Esquema de colocação das redes comerciais para a recolha de própolis.....	25
Figura 10 - a) colector modelo tira e põe; b) colector modelo pirassununga	26
Figura 11 - Mapa de Portugal e localização das origens das amostras	30
Figura 12 – Mufla utilizada para incineração das amostras	31
Figura 13 - Gouble com papel alumínio para a extração.....	33
Figura 14 - Reta de calibração para a determinação do teor em fenóis totais	41
Figura 15 - Reta de calibração para a determinação do teor em flavonas/flavonóis	43
Figura 16 - Reta de calibração para a determinação do teor em flavanonas/di-hidroflavonóis ..	44

Índice de tabelas

Tabela 1 - Critérios de qualidade para a própolis de choupo e própolis verdes	22
Tabela 2 - Produção de própolis.....	37
Tabela 3 - Caracterização das cinzas em função das amostras	38
Tabela 4 - Conteúdo em ceras	39
Tabela 5 – Conteúdo balsâmico das amostras das própolis por região	41
Tabela 6 – Teor em fenóis totais das amostras de própolis por região.....	42
Tabela 7 – Teor em flavonas/flavonóis das amostras de própolis por região	43
Tabela 8 – Teor em flavanonas/di-hidroflavonóis das amostras de própolis por região.....	45
Tabela 9 – Resultados do teste não paramétricos de Kruskal-Wallis.....	45
Tabela 10 - Resumo da caracterização das matrizes estudadas	46
Tabela 11 – Resultados do teste não paramétrico Mann-Whitney para as comparações múltiplas das cinzas	63
Tabela 12 - Resultados do teste não paramétrico Mann-Whitney para as comparações múltiplas das ceras	63
Tabela 13 - Resultados do teste não paramétrico Mann-Whitney para as comparações múltiplas dos compostos balsâmicos	64
Tabela 14 - Resultados do teste não paramétrico Mann-Whitney para as comparações múltiplas dos fenóis totais.....	64
Tabela 15 - Resultados do teste não paramétrico Mann-Whitney para as comparações múltiplas das flavonas.....	65
Tabela 16 - Resultados do teste não paramétrico Mann-Whitney para as comparações múltiplas das flavanonas	65

Abreviaturas e símbolos

Abs- absorvância

DPN – 2,4-dinitrofenilhidrazina

VB – Vila do Bispo

PB – País Basco

VV – Abelhas de Vila do Bispo/própolis produzida em Vila do Bispo

VB - Abelhas de Vila do Bispo/própolis produzida em Bragança

BV - Abelhas de Bragança/própolis produzida em Vila do Bispo

BB - Abelhas de Bragança/própolis produzida em Bragança

PB - Abelhas País Basco/própolis produzida Bragança.

Capítulo I
Introdução



Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

1.1 Introdução

A apicultura é uma atividade de criação racional e gestão de abelhas melíferas para lazer ou fins comerciais, tendo como objetivo a produção de mel, geleia real, pólen, cera, apitoxina, própolis ou fornecimento de colónias de abelhas para a polinização, com perspectivas de maximizar a produção de culturas agrícolas.¹

Esta atividade tem dado respostas significativas de sustentabilidade, causando impacto positivo no âmbito social, económico e ambiental.^{1,2} No que se refere aos aspetos económicos e sociais, a apicultura destaca-se como alternativa de geração de rendimento, proporcionando a criação de postos de trabalho e contribuindo para a melhoria da qualidade de vida e fixação de populações no meio rural. Na componente ambiental, a importante atuação das abelhas como polinizadoras naturais de espécies nativas, contribui para a manutenção e preservação do meio ambiente, favorecendo o equilíbrio do ecossistema e a manutenção da biodiversidade.²

A polinização tem sido apontada como o benefício mais relevante das abelhas para a Humanidade, sendo que a sua importância e a sua dimensão real para a vida no nosso planeta é quase sempre ofuscada por definições académicas pouco assimiláveis para o público, e pela baixa compreensão geral de como ocorre e quais as suas consequências nos ecossistemas silvestres e agrícolas.³ Estima-se que aproximadamente 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo sejam polinizadas por algumas espécie de abelhas, 27% são polinizadas por outros insetos e aves como moscas, vespas, besouros, borboletas, pássaros e morcegos.⁴

1.2 Produtos da colmeia

O mel é na generalidade o produto que de imediato se associa com as abelhas, no entanto, a diversidade de produtos no interior da colmeia é bastante mais elevada e distinta, fruto não apenas do néctar recolhido, mas de todas as substâncias que as abelhas recolhem e produzem para o seu desenvolvimento, sustentabilidade e defesa. Para obter a energia as abelhas consomem o *mel* armazenado, rico em hidratos de carbono, enquanto para o desenvolvimento das larvas é necessário recorrer a uma fonte

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

de proteínas, obtida através do pólen recolhido nas flores, o *pólen apícola*, que depois de fermentado é transformado em *pão de abelha*. Nos primeiros estados larvares, bem como para a gestação e alimentação da rainha, as abelhas produzem nas suas glândulas um alimento específico, a *geleia real*, que permite diferenciar a produção hormonal e o seu crescimento.

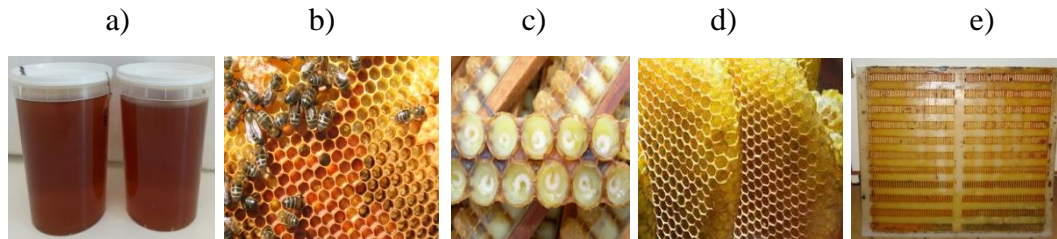


Figura 1 - a) Mel; b) Pólen; c) Geleia Real; d) Cera; e) Própolis

Toda a estrutura da colmeia está organizada com base na *cera* produzida diretamente pelas glândulas no abdómen das abelhas, e que as mesmas usam para construir os favos que suportam a criação e as reservas. Esta mesma cera é também utilizada para misturar com as resinas recolhidas nas plantas, e que quando combinadas dão origem a um produto capaz de manter um interior anti-séptico na colmeia e excelente para a manutenção e reparação do próprio espaço, a *própolis*. A colmeia é assim um espaço único que garante a sustentabilidade da colónia e que por isso as abelhas defendem, muitas vezes com sacrifício do indivíduo, à injeção do *veneno de abelha*, através do seu ferrão. Esta diversidade de recursos da colónia é por isso uma fonte de produtos da colmeia com potencialidades distintas, e com capacidade de proporcionar ao apicultor uma fonte de rendimento diversificada.

1.3 Mel

O mel é um alimento natural usado pelo homem desde os tempos mais remotos, produzido pelas abelhas, a partir do néctar recolhido de flores e transportado para colmeia onde passa por transformações físicas e químicas até sua obtenção.⁵ É uma solução supersaturada de açúcares, principalmente glucose, frutose mas também outros constituintes, tais como enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, carotenóides, vitaminas, minerais e substâncias aromáticas.⁶ A presença de flavonóides e ácidos fenólicos, que atuam como antioxidantes naturais,⁷ é associada a alguns efeitos

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

biológicos. Outras características como a cor, aroma e sabor, dependem, principalmente, das fontes vegetais, das regiões geográficas e clima de onde o mel é produzido.

Para além das suas propriedades nutritivas, o mel é também reconhecido pelas suas propriedades terapêuticas. Com grande utilização na medicina tradicional, está referenciado como tendo ação favorável sobre várias perturbações do aparelho respiratório, circulatório e digestivo, o fígado e dentição das crianças.^{7,8}

1.4 Melada

A melada, um tipo específico de mel, é uma substância espessa, rica em açúcar, produzida por insetos que sugam a seiva das plantas adicionando-lhes enzimas segregadas pelas glândulas salivares e pelo intestino dos mesmos, que após eliminada para o exterior é recolhida pelas abelhas.⁸ Em função da variação geográfica e climática, plantas como o abeto branco, abeto vermelho, pinheiro, carvalho e choupo (não nectaríferas) e ainda a tília, salgueiro e castanheiro (plantas nectaríferas), são as mais relevantes para a produção de melada.⁸

1.5 Pólen apícola

O pólen, um dos produtos fundamentais para o desenvolvimento da colónia, é o gâmeta masculino das flores das plantas, produzido pelas anteras e atraído pelo ovário, com o objetivo de garantir a fecundação das mesmas e consequentemente garantir a reprodução da planta e a sobrevivência da espécie.⁹ O pólen formado por minúsculos grãos, é recolhido pelas abelhas nas flores e, após agregado com secreções salivares das abelhas, é levado para a o interior da colmeia.

No interior da colmeia é usado como suplemento na preparação do alimento das larvas jovens, sendo que na ausência deste, as abelhas metabolizam alguns tecidos dos seus organismos para prolongar sua existência. Por essa razão, a produção de mel, cera e geleia real de um apiário, está diretamente relacionada com a quantidade de pólen necessária para a alimentação das colmeias.⁹

Reconhecido por ser um dos alimentos com elevado valor nutritivo, é uma fonte de proteínas naturais, sais minerais, tais como potássio, fosforo, enxofre, ferro, cobre, magnésio, silício, e vitaminas dos complexos B, C, D e E. Contém ainda uma Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

percentagem de açúcares derivados do néctar que as abelhas misturam aquando da constituição das cargas polínicas que transportam nas suas patas. A composição físico-química do pólen varia em função da fonte botânica que lhe está na origem, sendo elevada a diversidade no pólen.¹⁰ Nos últimos anos tem se verificado um aumento no consumo de pólen, devendo-se este facto às suas propriedades benéficas tais como a sua contribuição para o bom funcionamento do sistema circulatório e imunológico, prevenção de infeções bacterianas e promoção da regulação do aparelho intestinal.⁹ É ainda recomendada no tratamento de anemias, fadiga intelectual e prevenção do envelhecimento.⁹

1.6 Geleia real

A geleia Real, também conhecida por “Leite Real” é um dos produtos da colmeia produzido pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas obreiras jovens, depois destas se alimentarem do pólen das flores, sendo produzida por ação enzimática.^{3,4,11}

A abelha rainha e as operárias, apesar de terem uma origem similar, sofrem um desenvolvimento diferente. A abelha rainha alimenta-se exclusivamente da geleia real durante toda sua vida, conferindo-lhe um desenvolvimento diferenciado e conseqüentemente características e capacidades especiais em relação às operárias. A rainha possui um corpo duas a três vezes superiores ao das operárias e tem uma maior longevidade (4 – 5 anos), produzindo diariamente 1500 – 2000 ovos.¹¹ As operárias alimentam-se da geleia real apenas nos primeiros três dias de vida, tendo um menor tempo de vida, cerca de 30 a 45 dias.¹¹ Na colmeia a geleia real apresenta uma ação antibiótica, bacteriostática e antiviral, sendo capaz de fortalecer as defesas do organismo das abelhas contra ataques de agentes patogénicos.¹²

Da sua composição química fazem parte a água 66%, hidratos de carbono 13%, proteínas 12%, lípidos 5%, enzimas e coenzimas, vitaminas, maioritariamente do complexo B, sais minerais (cobre, zinco, ferro, cálcio, manganês, potássio e sódio), enzimas e coenzimas, ocupam 1% dessa composição química.^{12,13}

A partir da década de 50 a geleia real começou a despertar interesse na comunidade científica e a marcar posição no mercado como complemento alimentar e matéria-prima para a indústria cosmética.¹⁴ No âmbito da apiterapia é usada como

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

reconstituente genérico para pessoas enfraquecidas, submetidas a cansaço e stress, idosos, adoentados, crianças, desportistas e estudantes.¹⁵

1.7 Veneno de abelha

O veneno de abelha (apitoxina), é conhecida como o veneno segregado pelas glândulas do veneno das fêmeas de abelhas *Apis*, Figura 2, e usado na defesa da colmeia contra predadores que vão desde outros artrópodes a vertebrados. De composição química complexa, é bastante valorizado em medicina tradicional, em particular na apiterapia, para o tratamento de artrite, doenças auto-imunes, doenças de pele, dor, infeções e mais recentemente contra alguns tipos de cancro.^{16,17} Além do mais, é amplamente usado pela indústria farmacêutica e cosmética, valorizando assim, comercialmente, este produto.^{16,18}



Figura 2 - Veneno de abelha

(fontes:<https://www.google.pt/search?q=apitoxina&biw=1366&bih=636&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEw>)

Estas propriedades biológicas devem-se à sua composição rica em proteínas (fosfolipase A2, fosfolipase B, hialuronidase) e péptidos (melitina, apamina, adolapina, péptido desgranulador de mastócitos, secapina, procamina, tertiapina e outros péptidos pequenos), aminoácidos (ácido aminobutírico e α -aminobutírico), assim como compostos não peptídicos, tais como aminas biogénicas (histamina, dopamina e noradrenalina), açúcares (glicose e frutose), fosfolípidos, compostos voláteis e minerais.¹⁶

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

1.8 Cera

A cera é um produto da colmeia produzido a partir das glândulas ceríferas localizadas no abdômen das abelhas operárias jovens, com idades compreendidas entre os 12 e os 18 dias. A cera tem múltiplas utilizações, nomeadamente para a construção de favos, para o armazenamento de pólen e mel e para a gestação das abelhas.¹⁹

A cera é maioritariamente composta por ácidos gordos livres (entre 12,0 a 14,0%), álcoois de cadeia longa contendo entre 28 a 35 carbonos, mono-ésteres, hidroxi-mono-ésteres (35,0 a 45,0%), ésteres complexos (15,0 a 27,0%) e hidrocarbonetos (12,0 a 16,0%), podendo esta composição variar consoante a idade das abelhas e espécie.²⁰ Na apicultura, a cera tem um papel importante para o sucesso da atividade, e é utilizada no manejo da colmeia para a renovação dos quadros do ninho, já que com o decorrer do tempo a cera fica escura e o tamanho dos alvéolos vai diminuindo, traduzindo-se na formação de abelhas com menor tamanho provocando menor produtividade.²⁰ Na indústria cosmética e farmacêutica, é um produto bastante utilizado devido à presença de substância com diferentes propriedades bactericidas, emolientes, cicatrizantes e anti-inflamatórias na sua composição.^{21,22}

1.9 Própolis

A própolis é uma mistura complexa de material resinoso recolhido pelas abelhas a partir de secreções e exsudados dos rebentos, folhas ou fendas da casca e partes de plantas de certas árvores e arbustos, e transportada para colmeia nas patas traseiras das abelhas, onde é mastigada e adicionadas enzimas salivares,²³ Figura 3

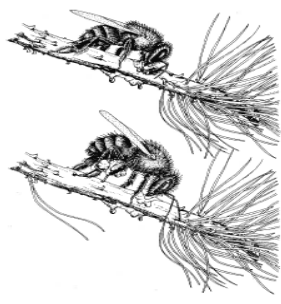


Figura 3 – Técnicas de coleta e transporte de própolis, usando as mandíbulas para raspar a resina das plantas⁷⁴

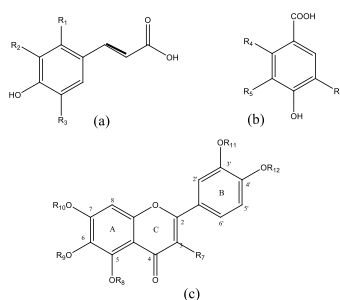
O material recolhido e parcialmente digerido é misturado com a cera e aplicado na colmeia.²³ Por ser um material resinoso, adesivo e lipofílico as abelhas usam-no para impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

dois fins essenciais, um mecânico e outro biológico. A função biológica associasse ao embalsamar de invasores mortos pelas abelhas no interior das colmeias, mas que estas não conseguem transportar para o exterior, evitando assim o processo de decomposição, ou atuando como desinfetante, garantindo, desse modo, menor incidência de bactérias e fungos no interior da colmeia.²⁴ Adicionalmente as abelhas revestem todas as células, antes da postura, com uma fina camada de própolis, supondo assim uma medida de prevenção das larvas contra infecções microbianas. A presença de própolis na entrada da colmeia serve também como repelente, reduzindo a atenção dos invasores.²⁴

1.9.1 Composição e origem vegetal

A própolis é uma resina rica em compostos fenólicos (50%), entre os quais, flavonóides e ácidos fenólicos, cera (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outros compostos orgânicos (5%), entre os quais aminoácidos, vitaminas, sais minerais e resíduos insolúveis.²⁵ Mais de 300 compostos foram identificados até o momento em diferentes amostras de própolis.²⁶ A composição química da própolis depende das fontes vegetais que se encontram em redor da colmeia bem como das condições geográficas e climáticas, determinando assim a sua diversidade química.²⁷ Em função da diversidade das fontes vegetais utilizadas pelas abelhas na produção da própolis, ela apresenta uma cor que pode variar desde verde, vermelha, amarela, castanho claro ou escura.²⁷

A classe de compostos químicos predominantes e a que apresenta maior bioatividade são os compostos fenólicos, onde se incluem os ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico) e os flavonóides (flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, chalconas e di-hidrochalconas) e isoflavonóides^{28,29} Figura 4.



Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

Figura 4 - Estruturas básicas dos compostos fenólicos mais comuns encontrados na própolis. a) derivados do ácido cinâmico; b) derivados do ácido benzóico; c) flavonóides.

Devido a sua elevada variabilidade química, torna-se fundamental o estudo da composição da própolis obtida a partir de diferentes regiões.³⁰ No caso das regiões de clima temperado, como a Europa, América do Norte e regiões não-tropicais da Ásia, em que a principal fonte de resina se encontra nos rebentos de choupo (*Populus spp.*), a própolis apresenta uma composição rica em ácidos fenólicos e derivados, flavonóides e derivados metilados ou esterificados. Em regiões onde o gênero *Populus* não é nativo, as abelhas apresentam preferências para as espécies *Ulmus*, *Pinus*, *Quercus*, *Salix* e *Acacia*, também descritas como fontes da própolis.²⁷ Em regiões de clima tropical, as abelhas recolhem principalmente a resina a partir de rebentos de alecrim do-campo (*Baccharis dracunculifolia*).²⁷ Esta própolis, de cor verde, tem maior predominância no sudeste Brasileiro e em termos comerciais, é a mais importante, por apresentar uma composição rica em derivados prenilados de ácido fenilpropanóico, como a artepilina C e ácidos cafeoilquínicos.^{8,21} A própolis vermelha recolhida por abelhas em Cuba, México e Brasil, a partir de espécies de *Dalbergia*, é caracterizada pela presença de isoflavonóides,^{31,32} enquanto que a resina exsudada pelas flores de *Clusia fluminensis*, em Cuba e Venezuela, origina ainda outro tipo de própolis, onde os constituintes maioritários são benzofenonas polipreniladas, Figura 5.

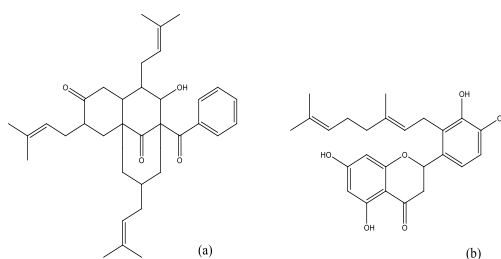


Figura 5 - a) derivado de benzofenona poliprenilada; b) C-prenil-flavanona

No Mediterrâneo, a própolis da Grécia e de Malta apresentam algumas especificidades como uma composição rica em diterpenos, com origem em plantas da família das *Crupressaceae* e da espécie *Ferula communis*.^{33,34} Também na Tunísia, o exsudado de *Cistus spp.* está descrito como origem floral da própolis nessas regiões.³⁴

Embora a flora local seja um aspeto determinante na composição química da resina, há um outro fator também importante que é, a escolha feita pelas abelhas, sendo desconhecidos os critérios de seleção usados, mas evidenciando-se uma clara Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

preferência por fontes florais específicas em redor do apiário.^{34,35} De facto, além da disponibilidade das plantas de uma determinada espécie prevalecer numa maior ou menor extensão, a preferência das abelhas por materiais mais resinosos devido às suas propriedades física ou com maior bioatividade, poderão ser fatores preponderantes na seleção das resinas.³⁶

1.9.2 Propriedades bioativas

Nos últimos anos, a própolis é associada a várias propriedades biológicas e farmacêuticas. Estas propriedades estão intimamente ligadas à sua composição química, particularmente à predominância de compostos fenólicos.³⁷ A diversidade química apresentada pela própolis leva à expectativa de que as propriedades biológicas de diferentes tipos de própolis serão diferentes, no entanto, na maioria dos casos, isso não se tem verificado.³⁸ Entre as muitas propriedades biológicas e farmacológicas apresentadas pela própolis, destacam-se as atividades antimicrobiana,^{36,37} anti-viral,³⁹ antioxidante, anti-hepatotóxico,³⁹ anti-tumoral, anti-inflamatório,⁴⁰ anti-HIV,⁴¹ anti-neurodegenerativo⁴² e anti-tuberculose.⁴³ Além destas propriedades, a própolis apresenta diferentes aplicações ao nível da medicina tradicional, particularmente em estomatologia e odontologia, otorrinolaringologia, doenças respiratórias, gastroenterologia, cancro, no tratamento de lesões da pele, feridas, queimaduras e úlceras.⁴³

1.9.3 Critérios de qualidade da própolis

A própolis é um produto da colmeia de origem vegetal, pelo que a sua padronização deverá ser semelhante à usada para as plantas medicinais, isto é, baseada na concentração dos constituintes bioativos.⁴⁴ Diferentes tipos de própolis são caracterizados pelos seus perfis químicos distintos, surgindo assim dificuldade na definição de critérios de qualidade uniformes, pelo que até ao momento não existe ainda uma regulamentação internacionalmente reconhecida para este tipo de produto da colmeia. Os critérios terão de ser baseados na concentração dos metabolitos secundários de acordo com os tipos de própolis, já que cada tipo apresenta um perfil químico específico mas constante.⁴⁵ A tipificação da própolis com base no conhecimento das

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

plantas que lhe estão na origem poderá ser uma ferramenta importante na sua padronização, assegurando assim a qualidade e a segurança necessárias para a sua comercialização.²⁷

A própolis com origem no choupo (*Populus* sp.) e a própolis verde brasileira (*Baccharis* sp.), são os dois tipos de própolis mais estudados e para os quais a Comissão Internacional do Mel já propôs valores para a concentração de constituintes biologicamente ativos.⁴⁶ Na Tabela 1 podem encontrar-se os valores propostos por esta comissão bem como os valores descritos na literatura a própolis portuguesa.²⁷ Além da composição em compostos bioativos, outros critérios de qualidade podem ser usados como sensoriais (consistência, cheiro, sabor e cor).⁴⁷ A própolis para ser considerada de qualidade elevada deverá conter uma baixa percentagem de ceras, materiais insolúveis e cinzas, não conter contaminantes e a sua origem botânica deverá ser conhecida, com um conteúdo elevado de compostos bioativos.^{27,48}

Tabela 1 - Critérios de qualidade para a própolis de choupo e própolis verde.^{27,50,51}

Componentes	Própolis portuguesa tipo I	Própolis portuguesa tipo II	Própolis de choupo	Própolis verde
Conteúdo de cinzas (%)	Máx 2	Máx 4	-	Máx 5
Conteúdo de cera (%)	Máx 25	Máx 31	Máx 25	Máx 25
Teor de água (%)	Máx 5	Máx 5	-	-
<i>L</i> *	Mín 40	Mín 23	-	-
<i>a</i> *	Mín 2	Mín 1	-	-
<i>b</i> *	Mín 23	Mín 4	-	-
<i>C</i> * ab	Mín 23	Mín 4	-	-
Conteúdo balsâmico (%)	Mín 65	Mín 45	Mín 45	Mín 35
Fenóis totais (% própolis bruta)	Mín 18	Mín 6	Mín 21	Mín 5
Flavonas/flavonóis (% própolis bruta)	Mín 3	Mín 2	Mín 5	-
Flavanonas/di-hidrofavonóis (% própolis bruta)	Mín 5	Mín 3	Mín 4	-
EC ₅₀ DPPH. (mg/mL)	Máx 0,02	Máx 0,06	-	-
Poder redutor (mg/g de extrato)	Mín 600	Mín 96	-	-

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

1.9.4 Produção de Própolis

1.9.4.1 Colheita da própolis pelas abelhas

A recolha de resina é feita apenas por algumas obreiras, com idade não inferior a 15 dias, especializadas no pastoreio da própolis.⁵² As abelhas recolectoras recolhem a resina durante o período quente do dia, quando se apresenta mais flexível e macia, a partir de gotas que aparecem na casca de troncos ou membros das árvores, das superfícies de alguns frutos, ou mais tipicamente nos ápices vegetativos (brotos e folhas jovens), mostrando preferência pelos últimos, Figura 6.^{53,54}



Figura 6 - Abelha a recolher resina exsudada de um rebento de choupo

(fonte: <http://teca.fao.org/read/8703>)

Numa primeira fase, durante o processo de recolha, as abelhas extraem as resinas dos tricomas e ductos das folhas precoces, fragmentando com as estruturas vegetais com mandíbulas. Os exsudados são então transferidos das patas dianteiras para as patas do meio e pressionado contra as corbículas das patas traseira. Esta sequência é repetida até que haja uma carga de resina em ambas as corbículas, o que leva cerca de sete minutos.⁵³ Após o regresso à colónia, as obreiras dirigem-se de imediato para os locais onde é necessária, permitindo que as abelhas propolizadoras retirem as resinas, as comprimam e adicionem cera.⁹ Uma abelha recoleitora recolhe em média 10mg de própolis por voo. A produção anual (10-300g / colmeia) varia de acordo com diferentes fatores como a espécie de abelhas, o clima, a flora e o mecanismo de recolha utilizado na produção.⁵⁶ Em regiões mais quentes da Europa, como Portugal, Espanha, Itália e Grécia, tem-se observado abelhas a recolher as resinas desde a Primavera até ao início de Outono.^{9,57} A sazonalidade na recolha da resina, com um aumento da produção de Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

própolis no final do Verão, parece estar relacionado com a redução de pólen e recolha de pólen.⁵⁸ Alguns autores sugerem que esse padrão de comportamento é devido à mudança no comportamento de pastoreio em detrimento das mudanças climáticas, sendo que algumas abelhas podem ser induzidas a recolher a resina em qualquer estação do ano.⁵⁸

1.9.4.2 Técnicas de produção intensiva de própolis

A própolis pode ser recolhida das colmeias a partir de duas técnicas diferentes: coletando o que as abelhas depositam espontaneamente dentro da colmeia ou estimulando-lhe a produção, Figura 7.

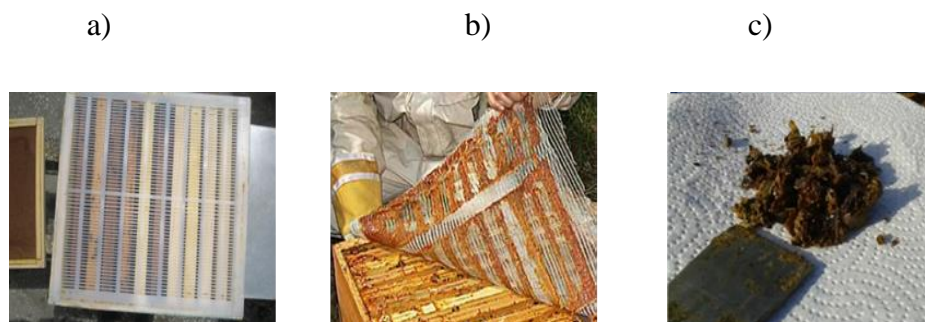


Figura 7 – Colheita de própolis com redes plásticas colocada no topo da colmeia (a, b).⁵⁹ c) própolis obtido por raspagem (fonte: <http://teca.fao.org/read/8703>)

A recolha natural é efetuada através de raspagem da resina depositada pelas abelhas nos cantos, fendas, paredes interiores, nos pontos de apoio entre a colmeia e a prancheta e nas extremidades dos quadros. A própolis obtida desta maneira contém elevadas quantidades de cera, fragmentos de madeira, partes de abelha e outros tipos de impurezas, diminuindo assim o seu valor comercial. Além do mais, este tipo de técnica pode originar própolis de múltiplas estações, e assim diferentes idades, afetando a sua qualidade. Para melhorar a qualidade, recomenda-se a raspagem no final no verão após um fluxo melífero.⁶⁰

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

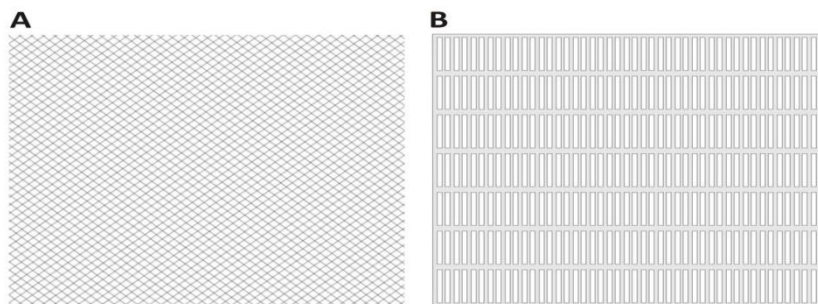


Figura 8 - Tipos de redes comerciais disponíveis no mercado. A- redes em plástico mais flexível, com a malha de cerca de 4 mm; B – redes em plástico expesso mas maleável, com ranhuras de cerca de 2 mm. (fonte: <http://montedomel.blogspot.pt/2011/01/propolis.html>)

O recurso a redes de própolis é usado para estimular a sua produção. No mercado existem disponíveis dois tipos de redes de plástico, uma constituída por uma malha de cerca de 4 mm, Figura 8A, e outra, mais tradicional com uma série de ranhuras de cerca de 2 mm, Figura 8B. Esta ranhura estimula as abelhas a depositar mais resina e menos cera.⁶⁰

As redes devem ser colocadas diretamente sobre o topo dos quadros da colmeia, e coberta pela prancheta e pela tampa metálica, Figura 9.

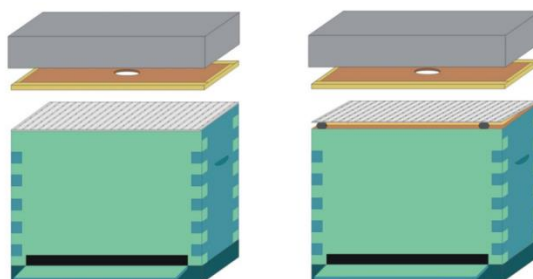


Figura 9 - Esquema de colocação das redes comerciais para a recolha de própolis (fonte: <http://montedomel.blogspot.pt/2011/01/propolis.html>)

Complementarmente é possível estimular a produção de própolis colocando uma cunha de madeira para manter a rede e a prancheta levantadas e desta da forma aumentar o fluxo de ar e luz, obrigando-as a produzir mais própolis para selar esses espaços.⁵⁵ Para recolher a própolis das redes, após removidas da colmeia devem congelar-se de forma a tornar a própolis dura e quebradiça, facilitando a extração.⁵⁵ Além das redes disponibilizadas no mercado podem ser usados outros tipos de materiais para recolher a própolis, tais como: sacos, os usados para armazenar milho e outras culturas, redes metálicas ou de nylon, podendo no entanto condicionar a qualidade da Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

própolis devido à introdução de resíduos dos materiais de suporte. É importante certificar-se de que as abelhas não podem mastigar o material e que as lacunas são adequadamente dimensionadas para incentivar a deposição de resina. Da mesma maneira, estes materiais são colocados no topo dos quadros e a sua colheita é feita após refrigeração.⁵⁵

Na literatura são ainda descritos outros sistemas que favorecem a produção de própolis e consistem em criar espaços vazios na colmeia distanciando os diferentes elementos constitutivos, introduzir caixas não aplainadas, criar na parede interna acanaladuras de 3 ou 4 mm de largura e 5 mm de profundidade, como os usados em apiários no Brasil, Figura 10.^{52,54}



Figura 10 - a) Coletor modelo lateral removível; b) coletor modelo pirassununga.
(Fonte:<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32166/1/ProducaoPropolis>)

Na recolha da própolis, é importante o uso de material e aço inoxidável, tomando o cuidado de não retirar pedaços de madeira ou do plástico nessa operação. A própolis após recolhida deve ser acondicionada em recipientes não tóxicos para evitar a sua contaminação, devendo-se fazer registo da data e local de colheita.^{61,62} Para armazenamento a própolis deve ser guardada a temperaturas baixas e protegida da luz até à sua utilização ou comercialização.^{61,62}

1.9.4.3 Fatores que influenciam a produção e qualidade da própolis

A qualidade da própolis obtida pelas abelhas pode depender de vários fatores como o manuseio das colmeias, a localização do apiário e densidade de colmeias, a

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

linhagem ou raça de abelhas, as espécies de plantas fornecedoras de matéria-prima, a época do ano, bem como dos materiais e ferramentas utilizadas.⁶⁰

O manejo da colmeia é um fator de produção que influencia de forma qualitativa e quantitativa a própolis. Uma colmeia forte com elevada densidade populacional e disponibilidade de alimentos permite uma boa ocupação do espaço o que induz as abelhas a propolizar com maior intensidade. No que se refere à localização do apiário e densidade de a influência está maioritariamente associada à flora disponível e à sua densidade e diversidade. Para a seleção do local mais adequado para a instalação de um apiário é importante a identificação da origem botânica da matéria-prima usadas pelas abelhas para produção de própolis, com vista à obtenção do produto com melhor qualidade. A época do ano é também um fator a considerar visto que em algumas épocas do ano a disponibilidade de vegetação é reduzida.

Alguns dos trabalhos de investigação com diferentes raças de abelhas e utilizando colmeias aparentemente iguais (população, espaço disponível, reserva de alimento, etc), apresentam resultados de produção de própolis significativamente diferentes, atribuindo assim a possibilidade de fatores genéticos poderem influenciar tanto no tipo, como na quantidade de própolis. Por outro lado, está também descrito que colónias de abelhas melíferas produzem mais própolis que outras, característica esta que pode ter um controlo genético.⁶³ Alguns artigos revelam ainda que as abelhas africanas são conhecidas com alto potencial de produção e agressão, fator esse que tem sido explorado para a implementação de melhoramento genético, com seleção de rainhas para aumentar a produção de própolis.⁶⁴

1.10 Objetivos

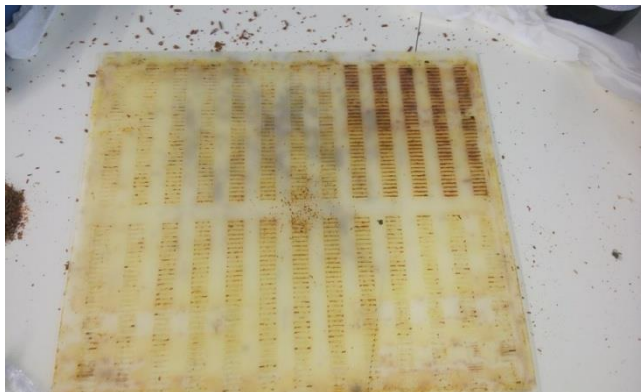
A produção de própolis é uma atividade que muitos apicultores têm descurado, mas que tem ganho cada vez mais interesse devido à procura crescente deste produto apícola nos mercados internacionais. Um fator preponderando na sua valorização é a sua qualidade, pelo que se torna importante compreender alguns dos aspetos que podem contribuir para a definição das melhores condições de produção.

No âmbito deste trabalho pretendeu-se avaliar a influência que o ambiente e as características genéticas poderão causar na seleção das resinas recolhidas pelas abelhas, nomeadamente utilizando abelhas com proveniências geográficas distintas, colocadas em apiários com condições de flora e clima diferenciados.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as condições apícolas proporcionadas pela execução do projeto *BEEHOPE - Honeybee Conservation centers in Western Europe: an innovative strategy using sustainable beekeeping to reduce honeybee decline*. 138573 - BiodivERsA/0002/2014. No âmbito deste projeto foram criados dois apiários experimentais com condições de clima e flora bastante distintos, especificamente, no interior norte de Portugal, Bragança, e no litoral sul, Vila do Bispo. Em ambos os apiários foram colocadas colónias de abelhas provenientes das duas regiões, transferindo-se colmeias do sul para o norte e vice-versa. Adicionalmente, foi colocado no apiário de Bragança um conjunto de colmeias provenientes do País Basco, Espanha.

Para a produção de própolis foi utilizada a estimulação das colmeias com colocação de redes de própolis, permitindo posteriormente a sua recolha. Para aferir a influência do ambiente e da proveniência das abelhas na qualidade da própolis efetuaram-se ensaios analíticos para a determinação do teor em ceras e cinzas, bem como a composição em compostos bioativos, através da determinação do conteúdo balsâmico, do teor em fenóis totais, bem como a quantificação de flavonóides (flavonas/flavonóis e flavanonas/di-hidroflavonóis).

Capítulo II
Materiais e métodos



Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

2.1 Materiais e métodos

Neste capítulo estão descritos os solventes e reagentes utilizados na realização deste trabalho, bem como os ensaios para a análise das características físico-químicas da própolis, como o teor de cinza ou teor de cera. Descreve-se ainda os procedimentos seguidos na preparação dos extratos etanólicos e quantificação dos compostos fenólicos totais, flavonas/flavonóis e flavanonas/di-hidroflavonóis por espectrofotometria de UV-Vis. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

2.2 Solventes e reagentes

Os diferentes padrões fenólicos usados, naringenina, quercetina, ácido gálico, foram adquiridos à Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA).

Na execução experimental, utilizou-se como solventes, metanol, etanol e éter de petróleo adquiridos à Panrec (Barcelona, Espanha). Utilizaram-se como reagentes, carbonato de sódio, reagente de Folin-Ciocalteu e ácido sulfúrico adquiridos à Panrec (Barcelona, Espanha). O cloreto de alumínio foi adquirido à Riedel-de-Häen (Germany) e o 2,4-dinitrofelhidrazina (DPN) foi à Fluka (Buchs, Switzerland). A água utilizada neste estudo foi de tipo I, obtida através de um sistema de purificação Mili-Q (TGI Pure Water Systems, USA).

2.3 Amostragem



Figura 11 - Mapa de Portugal e localização da origem das amostras de própolis

As abelhas utilizadas no ensaio provieram da região Sul de Portugal (Vila do Bispo) e Norte (Bragança), bem como do País Basco, Espanha. A produção de própolis

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

ocorreu em duas regiões geograficamente distintas, Bragança e Vila do Bispo, Figura 11, deslocando-se colmeias de uma localidade para outra: 5 colmeias de Bragança foram transferidas para Vila do Bispo e vice-versa. Adicionalmente foram colocadas em Bragança 5 colmeias provenientes do País Basco. A própolis foi recolhida com redes plásticas após um período de produção de 3 meses, mediados entre Maio e Julho de 2016. Após a produção a própolis foi separada das redes e guardada a -20°C até à sua análise.

Considerando a quantidade de própolis produzida em cada colmeia, ver 3.1, e o valor de massa mínimo para a realização das análises foi necessário agrupar algumas amostras, em particular na região de Vila do Bispo onde a produção foi menor.

2.4 Parâmetros químicos

2.4.1 Teor de cinzas

A partir do procedimento AOAC⁶⁵ determinou-se o teor de cinzas da própolis em fresco. Inicialmente colocou-se os cadinhos a secar numa estufa durante 30 minutos, removidos posteriormente para um exsiccador. Após atingir a temperatura ambiente, pesou-se 1g da amostra de própolis em bruto (w_2) no cadinho previamente pesado (w_1). Em seguida, as amostras foram incineradas numa mufla (Lenton Thermal Designs LTD), Figura 12, a uma temperatura de $600\pm 15^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, até as cinzas ficarem de cor branca ou cinzenta. Os cadinhos foram depois arrefecidos num exsiccador e de seguida pesados (w_3). O processo de incineração e pesagem foi repetido por mais 30 min até à obtenção de peso constante.



Figura 12 – Mufla utilizada para incineração das amostras
Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

O valor em percentagem do conteúdo em cinza foi calculado pela seguinte equação: $[(w3-w1)/(w2-w1)]*100$

2.4.2 Teor de ceras

O conteúdo em ceras foi determinado segundo o método descrito por Woiski e Salatino com algumas modificações.⁶⁶ Uma amostra de própolis 2g (w1) foi extraída por soxhlet, com éter de petróleo durante 6h. O extrato foi evaporado sob pressão no evaporador rotativo (Heidolph), à temperatura de 40°C até peso constante (w2). Em seguida, ao resíduo previamente seco, foram adicionados 80mL de metanol quente e aqueceu-se a mistura até se formar uma solução límpida no topo e um pequeno resíduo oleoso no fundo do balão. Filtrou-se esta mistura em papel de filtro (p1) Whatman n°4, tendo o cuidado de não transferir o resíduo oleoso, para um matraz de 15mL, ambos previamente pesados (f1). Colocou-se o matraz a 0°C e o conteúdo foi novamente filtrado. De seguida, o frasco e o resíduo do frasco foram lavados com 25mL de metanol frio. Após secar para uma massa constante, o matraz (f2) e o papel de filtro (p2) foram pesados e o conteúdo em ceras finais expresso em percentagem de massa. Os valores em percentagem do conteúdo em ceras foram calculados pelas seguintes equações:

$$1^{\text{a}} \text{ parte } (w2/w1)*100$$

$$2^{\text{a}} \text{ parte } [(f2-f1)+(p2-p1)]*100/w1$$

2.5 Conteúdo balsâmico

2.5.1 Extração

A amostra de própolis (1g) foi extraída com 30mL de uma mistura de etanol/água a 70%, à temperatura ambiente, com agitação, durante 24h, Figura 13. Em seguida, a mistura foi filtrada e o resíduo foi re-extraído nas mesmas condições. Após a terceira extração, foi confirmada a ausência de compostos fenólicos no resíduo sólido através da adição de algumas gotas de cloreto de ferro (FeCl₃, 5% em metanol). Não havendo desenvolvimento de cor, os três extratos etanólicos foram combinados num balão de 100mL, ajustando o volume final com etanol/água a 70%.

Para avaliação do conteúdo balsâmico, efetuou-se uma combinação das três repetições (3×2mL) evaporando-se a mistura até a secura, pesando até peso constante.



Figura 13 – Processo de extração

2.5.2 Teor em fenóis totais

O conteúdo em fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton.⁶⁷ Pipetou-se 0,5mL de cada solução para um balão de 10mL e diluiu-se para o volume final com 70% de etanol/água. A uma alíquota (0,2mL) de solução de trabalho foi adicionado água (1,5mL) e reagente de Folin-Ciocalteu's (0,4mL). Em seguida, adicionou-se uma solução de carbonato de sódio a 20% (CaCO₃, 0,6mL) e o volume final foi ajustado a 5mL com água desionizada. A solução foi mantida à temperatura ambiente, no escuro, durante 2h e a absorvância foi medida a 760nm (Analytikijena 200-2004 spectrophotometer). Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento usando 0,2mL de 70% de etanol/água em vez da amostra. Para o traçado da curva de calibração usou-se uma solução de ácido gálico num intervalo de concentrações de 0,300 a 0,025mg/mL, equivalente em ácido gálico, tendo-se obtido a seguinte reta de calibração de $y = 4,1765x + 0,0044$; $R^2 = 0,9996$.

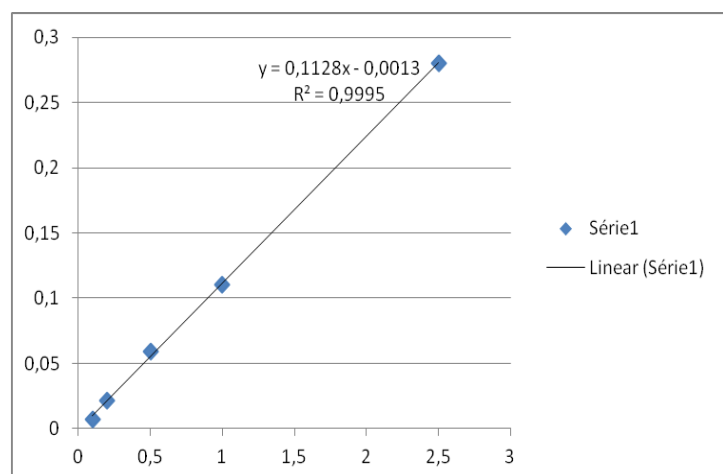
2.5.3 Conteúdo em flavonas e flavonóis

O conteúdo em flavonas e flavonóis, foi determinado espectrofotometricamente seguindo o método de Cvec et al.⁶⁸ Pipetou-se 1.5mL de extrcto de própolis (0,5mL de cada solução) para um balão de 10mL e diluiu-se para o volume final com 70% de etanol/água. Em seguida, num balão volumétrico de 25mL, a uma alíquota (1mL) da solução de trabalho misturou-se com metanol (10mL) e uma solução de cloreto de alumínio a 5% (AlCl₃, 5g em 100mL de metanol; 0,5mL), sendo o volume final ajustado com metanol. A solução ficou 30min, no escuro, à temperatura ambiente. De Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

seguida a absorvância foi medida a 425nm. Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento usando 1mL de metanol em vez da amostra. Como padrão, para o traçado da reta de calibração, usou-se uma solução de quercetina, num intervalo de concentrações de 0,250 a 0,005mg/mL, equivalente em quercetina, tendo-se obtido a reta de calibração de $y = 2,8249x + 0,0028$; $R^2 = 0,9996$.

2.5.4 Conteúdo em flavanonas e di-hidroflavonóis

Para a determinação das flavanonas e di-hidroflavonóis usou-se o método descrito por Papova *et al*,⁶⁹ com modificações. Pipetou-se 9mL da solução de extrato de própolis para um balão volumétrico de 10mL e ajustou-se o volume final com 70% de etanol/água. A uma alíquota (1mL) desta solução misturou-se com 2mL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (1g de DNP em 2mL de ácido sulfúrico a 96 %, perfazendo com metanol para um volume final de 100mL) Esta solução foi aquecida num banho termostatzado a 50°C durante 50 min, a 100 rpm. Após 50 min, a solução foi colocada no escuro, à temperatura ambiente. Após esse período de arrefecimento, a solução foi diluída num balão volumétrico de 10mL com uma solução de 10% de KOH em metanol (w/v). A uma alíquota desta solução (0,5mL), adicionou-se 10mL de metanol e perfez-se o volume final de 25mL com metanol. A absorvância desta solução foi medida a 486nm. Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento usando 1mL de metanol em vez da amostra. Como padrão foi usada uma solução de naringenina para traçar a reta de calibração numa game de concentrações de 2,50; a 0,10mg/mL, equivalente em naringenina, obtendo-se a seguinte reta de calibração $y = 0,1128x - 0,0013$; $R^2 = 0,9995$



Capítulo III

Resultados e discussão

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

3. Resultados e discussão

A própolis é uma mistura complexa, de material resinoso colhida pelas abelhas em ramos de árvores, arbustos ou folhas e transportados para colmeia, onde são adicionadas secreções. A composição química da própolis depende da vegetação em redor do apiário e das condições geográficas e climáticas, observando-se a preferência por fontes de resina específicas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da origem geográfica das abelhas na seleção das fontes florais utilizadas para a produção de própolis, comparando-se os seus parâmetros de qualidade, nomeadamente o teor de cinza, cera e compostos fenólicos.

3.1 Produção de própolis

Na tabela 2 apresenta-se a massa de própolis obtida por colmeia, em cada uma das duas regiões. No apiário de Bragança produziram-se 251g de própolis nas 15 colmeias, com um valor médio por colmeia de 17g. Já em Vila do Bispo este valor foi inferior obtendo-se uma produção média por colmeia próxima das 7g, obtendo-se no total do período 66g. Os fatores de produção associados a estas diferenças, não sendo alvo do estudo, poderão estar relacionados com a disponibilidade da resina em redor de cada um dos apiários, mas também com diferenças na vitalidade das colónias, ou diferenças no período de produção, uma vez que apesar da data de produção ser idêntica, o estado da flora e da colónia é distinto, como consequência das condições climáticas próprias de cada um dos locais.

Considerando a origem geográfica das abelhas, verifica-se que em ambos os apiários, as abelhas oriundas de Vila do Bispo apresentam uma produção média mais elevada, no entanto, esta diferença apenas é estatisticamente significativa no apiário de Vila do Bispo.

Tabela 2 – Quantidade de própolis, por colmeia, nos diferentes apiários

Origem da abelha	Local de produção	Amostra	Peso em g
VB	B	A4	22,45
VB	B	A15	21,78
VB	B	A5	8,18
VB	B	A6	20,35
VB	B	A34	22,42
PB	B	B31	7,32
PB	B	B41	19,50
PB	B	B24	20,71
PB	B	B27	17,37
PB	B	B12	11,86
B	B	B14	18,86
B	B	B15	13,60
B	B	B37	21,39
B	B	B40	17,01
B	B	B45	8,15
B	VB	B 1	4,72
B	VB	B 6	1,89
B	VB	B 17	1,84
B	VB	B 28	8,12
B	VB	B 32	3,6
VB	VB	A 11	1,11
VB	VB	A 22	14,09
VB	VB	A 26	8,32
VB	VB	A 38	10,38
VB	VB	A 42	11,85

Nota: B- Bragança; PB – País Basco; VB – Vila do Bispo

3.2 Teor em cinzas

O teor em cinzas é um parâmetro qualitativo que expressa a mineralização e muito particularmente a presença de impurezas que aparecem nas amostras devido ao processo de produção, tais como restos de madeira, abelhas ou outros insetos, terra, o que poderá resultar num aumento dos valores das cinzas.⁷⁰

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados obtidos para as diferentes amostras agrupadas com base no local de produção e na origem das abelhas. De uma forma geral verifica-se que as amostras de própolis obtidas em Bragança, independentemente da origem das abelhas, apresentam um teor de cinzas mais reduzido que a própolis produzida em Vila do Bispo, observando-se o teor mais elevado, 2%, para as amostras VV e o mais baixo, 1%, para as amostras BB. As amostras de própolis de Bragança produzidas pelas abelhas oriundas do País Basco, PB, e as amostras de própolis de Vila do Bispo produzidas pelas abelhas oriundas de Bragança, VB, são as que apresentam uma dispersão dos resultados mais elevada.

Para o teor de cinzas, podemos encontrar na literatura valores médios em redor dos 2%,²⁵ estando definido pela legislação Brasileira um valor máximo de 5% para a própolis verde de *Baccharis*.²⁵ Para a própolis de regiões temperadas, não está regulamentado um valor específico, mas alguns autores propõem para a própolis Portuguesa valores máximos entre 2 e 4%, dependendo do tipo de própolis.²⁵ Os valores obtidos neste trabalho encontram-se dentro destes limites, confirmando-se inclusive que o teor mais elevado de cinzas encontrado na própolis proveniente de Vila do Bispo, se enquadra na própolis tipo II, definida na literatura para a própolis da região sul.

Tabela 3 – Teor de cinzas por região e origem das abelhas

Cinzas	Estatísticas Descritivas							Intervalo de confiança a 95%	
	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Amplitude interquartil	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
VV	8	1,68	2,36	2,00	0,40	2,01	0,22	1,83	2,19
VB	15	0,50	1,90	1,27	0,31	1,26	0,32	1,08	1,44
BV	9	0,77	1,94	1,31	0,99	1,41	0,47	1,04	1,77
BB	15	0,51	1,59	0,99	0,57	1,04	0,28	0,89	1,20
PB	15	0,14	1,80	1,07	1,15	1,05	0,55	0,75	1,35

Nota: VV – Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Vila do Bispo; VB - Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Bragança; BV - Abelhas de Bragança/produzido em Vila do Bispo; BB - Abelhas de Bragança/produzido em Bragança; PB - Abelhas País Basco/produzido Bragança.

3.3 Teor em ceras

A presença de ceras e ácidos gordos na própolis, tem origem não só a cera de abelha adicionada pelas abelhas durante o fabrico da própolis, mas provém também das ceras recolhidas nas plantas.⁷⁰ O seu teor é dependente do método de recolha, do estado da colónia, mas também da época de produção, particularmente devido à Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

disponibilidade de resinas. Uma elevada percentagem destas substâncias, biologicamente inertes, na composição da própolis, implica uma baixa percentagem de compostos farmacologicamente ativos, pelo que o seu teor pode afetar o valor comercial da própolis. De acordo com os dados disponíveis na literatura,⁴⁷ para a própolis de origem Europeia, o teor em ceras não deverá ultrapassar os 25 a 31%, dependendo da origem floral.

Na Tabela 4 apresentam-se os resultados obtidos para as diferentes amostras, agrupadas de acordo com o local de produção e a origem das abelhas. Pelos valores, verifica-se que a própolis recolhida em Bragança, independentemente da origem das abelhas, apresenta um teor médio em ceras inferior à própolis produzida em Vila do Bispo, observando-se o valor mais baixo para as amostras de Bragança produzidas pelas abelhas da região sul (VB) 2,4%. Já o conteúdo médio mais elevado em cera, apesar de relativamente baixo, foi observado para as amostras recolhidas em Vila do Bispo e produzido pelas abelhas oriundas de Bragança (BV), 7,2%. De registar ainda as diferenças observadas entre os valores obtidos para as medianas das amostras: observa-se que 50% das amostras BV tem pelo menos 8% de ceras, enquanto 50% da amostra VB tem no máximo 2,3% de ceras. Estes valores refletem uma clara diferença na composição das amostras, matriz essa que aponta para uma melhor qualidade da própolis produzida em Bragança, resultado de uma maior quantidade de compostos biologicamente ativos.

Tabela 4 - Conteúdo em ceras por região e origem das abelhas

Ceras	Estatísticas Descritivas						Intervalo de confiança a 95%		
	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Amplitude interquartil	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
VV	8	4,80	7,90	6,50	1,95	6,44	1,08	5,53	7,34
VB	15	0,90	5,90	2,30	1,50	2,41	1,31	1,69	3,14
BV	9	4,40	10,50	8,00	0,50	7,24	1,98	5,72	8,77
BB	9	3,20	7,10	3,90	2,20	4,37	1,33	3,35	5,39
PB	12	2,00	5,80	4,00	1,53	3,72	1,09	3,02	4,41

Nota: VV – Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Vila do Bispo; VB - Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Bragança; BV - Abelhas de Bragança/produzido em Vila do Bispo; BB - Abelhas de Bragança/produzido em Bragança; PB - Abelhas País Basco/produzido Bragança.

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

3.4 Conteúdo balsâmico

A própolis é uma resina rica em compostos fenólicos, responsáveis pela elevada atividade biológica desta matriz. A complexidade destes compostos está relacionada com a diversidade das resinas vegetais, oriundas de diferentes plantas visitadas pelas abelhas, principalmente em locais de grande diversidade fito-geográfica.²⁵ O processo de extração dos mesmos é dependente de condições experimentais, como a temperatura ou diferenças de polaridade do solvente, denominando-se o extrato como conteúdo balsâmico. Sawaya et al 2011 descrevem que para a própolis verde do Brasil, obtida a partir da resina de *Baccharis*, o conteúdo balsâmico deverá apresentar um valor mínimo de 35%, enquanto para a própolis comum nas regiões temperadas, proveniente das resinas de choupo⁵¹ o valor deverá ser superior a 45% o que vai ao encontro dos valores obtidos neste trabalho.

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados encontrados para as diferentes amostras, agrupadas de acordo com o local de produção e a origem das abelhas. Pelos valores obtidos, verifica-se que a própolis recolhida em Bragança, independentemente da origem das abelhas, apresenta um teor médio superior à própolis produzida em Vila do Bispo, observando-se o valor mais elevado para as amostras de Bragança produzidas pelas abelhas da região sul (VB) 74% e pelas abelhas do País Basco (PB), 73%. Já para as amostras de Bragança produzidas por abelhas de Bragança (BB), os resultados estatísticos não diferem das amostras de própolis obtidas na região sul. O conteúdo mais baixo do teor balsâmico foi observado para as amostras recolhidas em Vila do Bispo e produzido pelas abelhas oriundas de Bragança (BV), 62%. Esta tendência para um teor mais baixo na própolis da região sul corrobora as observações efetuadas por Falcão et al 2013.³⁷ De registrar ainda as diferenças observadas entre os valores obtidos para as medianas das amostras: observa-se que 50% das amostras VB tem mais de 76% de compostos balsâmicos, enquanto 50% da amostra VV tem no máximo 65% de compostos balsâmicos. Estes valores refletem uma clara diferença na composição das amostras, apontando para uma melhor qualidade da própolis produzida em Bragança, resultado de uma maior quantidade de extrato etanólico.

Tabela 5 – Conteúdo balsâmico por região e origem das abelhas

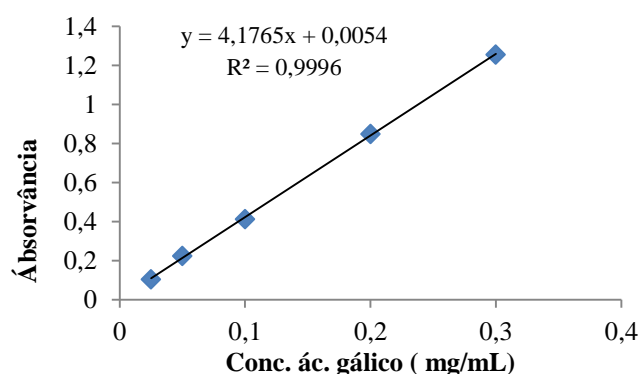
Conteúdo Balsâmico	Estatísticas descritivas							Intervalo de confiança a 95%	
	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Amplitude interquartil	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
VV	7	50,20	83,80	64,80	22,60	65,09	12,27	53,74	76,43
VB	15	55,10	81,30	75,90	8,80	74,13	6,76	70,38	77,87
BV	5	48,80	71,50	71,20	22,70	62,36	12,38	46,99	77,73
BB	12	48,80	77,40	67,40	18,68	64,12	8,56	59,72	68,52
PB	15	68,70	76,10	73,20	3,02	73,31	2,36	72,00	74,61

Nota: VV – Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Vila do Bispo; VB - Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Bragança; BV - Abelhas de Bragança/produzido em Vila do Bispo; BB - Abelhas de Bragança/produzido em Bragança; PB - Abelhas País Basco/produzido Bragança.

3.5 Teor em fenóis totais

A avaliação dos fenóis totais, realizada por espectrofotometria, reflete a composição da resina no conjunto dos ácidos fenólicos, flavonóides e todos os derivados metilados/esterificados. Popova⁶⁹ propõe para a própolis de resina de choupo um mínimo de 21% em fenóis totais. Já a própolis verde brasileira, deverá apresentar um valor bem mais reduzido, de 4%, de acordo com os resultados apresentados por Sawaya.⁴⁵

A quantificação do teor em fenóis totais é uma análise comparativa, utilizando-se frequentemente na análise da própolis o ácido gálico como padrão de referência. Na Figura 14, apresenta-se o reta de calibração obtida, para este padrão, no âmbito deste estudo. Como se pode verificar, o comportamento é linear dentro do intervalo de concentrações utilizado.

**Figura 14** - Reta de calibração para a determinação do teor em fenóis totais

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

Os resultados para o teor em fenóis totais das diferentes amostras é apresentado na Tabela 6 e mostram uma clara diferença entre as amostras produzidas na região sul de Vila do Bispo e as amostras da região norte, Bragança, as quais são independentes da origem das abelhas. Em qualquer uma das situações, os valores estão abaixo do descrito na literatura para a própolis das zonas temperadas,⁵¹ sendo essa diferença mais evidente no caso das amostras do sul. Estas diferenças poderão ser justificadas por variações nas condições experimentais utilizadas no processo de extração, mas também pelo recurso a diferentes padrões de calibração na quantificação.²⁵ No que se refere às diferenças entre as amostras do norte e sul, a menor quantidade de compostos fenólicos encontrada no sul de Portugal foi também observada por outros autores,²⁵ e atribuída à especificidade das características florais das resinas disponíveis em cada uma das localidades.

Tabela 6 – Teor em fenóis totais por região e origem das abelhas

Fenóis Totais	Estatísticas Descritivas							Intervalo de confiança a 95%	
	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Amplitude interquartil	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
VV	9	2,20	9,60	4,80	1,70	5,34	2,31	3,67	7,12
VB	15	13,70	19,90	18,00	1,95	19,91	2,06	16,77	19,05
BV	6	1,30	6,90	3,20	4,90	3,85	2,47	1,25	6,45
BB	12	14,80	18,10	16,40	1,65	16,50	1,09	15,81	17,19
PB	15	14,70	19,30	17,70	1,10	17,79	1,12	17,17	18,41

Nota: VV – Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Vila do Bispo; VB - Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Bragança; BV - Abelhas de Bragança/produzido em Vila do Bispo; BB - Abelhas de Bragança/produzido em Bragança; PB - Abelhas País Basco/produzido Bragança.

De registar ainda as diferenças observadas entre os valores obtidos para as medianas das amostras: observa-se que 50% das amostras VB tem mais de 18% em fenóis totais, enquanto 50% da amostra BV tem no máximo 3% de fenóis.

3.6 Teor em flavonas/flavonóis

As flavonas e flavonóis engloba um conjunto de compostos fenólicos responsáveis por várias atividades biológicas da própolis, como antioxidante, antifúngica e anti-viral.⁷¹ De acordo com o descrito na literatura a composição da própolis neste compostos pode variar entre um mínimo de 4%, na própolis de choupo,²⁵ e um mínimo de 0,5% para a própolis verde do Brasil, pobre em flavonóides.

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

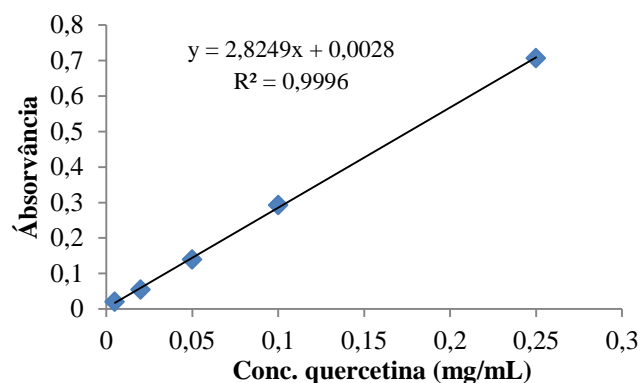


Figura 15 - Reta de calibração para a determinação do teor em flavonas/flavonóis

A quantificação deste conjunto de substâncias foi realizada espectrofotometricamente utilizando como padrão uma solução de quercetina, medindo-se a absorvância a 425 nm. A Figura 15 apresenta o comportamento linear observado na gama de concentrações utilizada neste estudo, permitindo apresentar os resultados em equivalentes de quercetina por 100 g de própolis.

Tabela 7 – Teor em flavonas/flavonóis por região e origem das abelhas

Flavonas/ Flavonóis	Estatísticas Descritivas							Intervalo de confiança a 95%	
	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Amplitude interquartil	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
VV	9	0,60	1,80	0,80	1,00	1,02	0,52	0,63	1,42
VB	15	4,40	7,10	5,90	1,00	6,01	0,89	5,51	6,50
BV	6	0,20	4,10	2,00	3,70	2,07	2,05	-0,08	4,21
BB	12	4,80	6,10	5,75	0,50	5,63	0,41	5,38	5,89
PB	15	4,60	6,50	6,00	0,85	5,79	0,68	5,42	6,17

Nota: VV – Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Vila do Bispo; VB - Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Bragança; BV - Abelhas de Bragança/produzido em Vila do Bispo; BB - Abelhas de Bragança/produzido em Bragança; PB - Abelhas País Basco/produzido Bragança.

Os resultados da quantificação, agrupados de acordo com o local de produção e a origem das abelhas, estão apresentados na Tabela 7 e demonstram uma vez mais que as características da própolis produzida está mais dependente da área geográfica do que da origem das abelhas. Como se pode verificar, os valores médios observados para as amostras produzidas na região norte, (VB), (BB) e (PB) apresentaram teores em flavonas e flavonóis próximos de 6%, valor que encontra-se acima do mínimo descrito para a própolis das regiões temperadas. Já as amostras produzidas na região sul, apresentaram valores muito abaixo do mínimo descrito, com destaque para a amostra produzida por abelhas de Vila do Bispo (VV) com 1% de teor em flavonas, estando de Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

acordo com o encontrado por outros autores para as amostras de própolis desta região, associado à resina de esteva (*Cistus ladanifer*).^{25,72}

3.7 Teor em flavanonas/di-hidroflavonóis

O teor em flavanonas e di-hidroflavonóis na própolis portuguesa é frequentemente mais elevado que para o conjunto de flavonóides anteriormente referidos,³ no entanto, para a própolis de choupo predominante em regiões com clima temperado, o valor mínimo proposto é também de 4%.

Para a identificação do teor em flavanonas e di-hidroflavonóis utilizou-se como padrão de referência a flavanona naringenina, a qual apresentou também um comportamento linear na gama de concentrações utilizada, como se pode constar pela Figura 16.

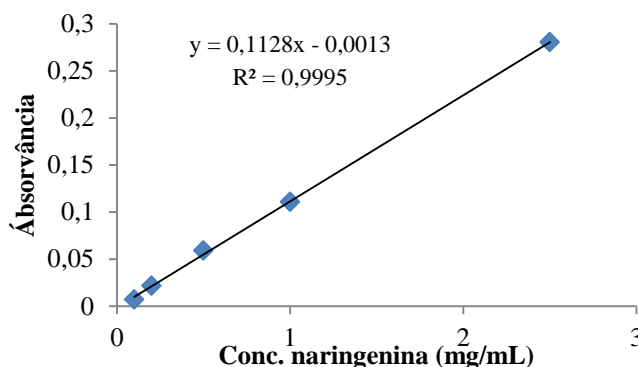


Figura 16 - Reta de calibração para a determinação do teor em flavanonas/di-hidroflavonóis

Os resultados obtidos para as diferentes amostras, agrupadas de acordo com o local de produção e a origem das abelhas estão apresentados na Tabela 8. Como se pode verificar os teores médios para todos os conjuntos de amostras, ultrapassa o limite mínimo de 4% referido na literatura, no entanto, foram encontradas algumas amostras de própolis, em particular na região sul, onde os teores surgem abaixo desse valor, o que está de acordo com o descrito na literatura.⁴⁷

De uma forma geral verifica-se que a própolis recolhida em Bragança, independentemente da origem das abelhas, apresenta um teor médio em flavanonas/di-hidroflavonóis superior à própolis produzida em Vila do Bispo, observando-se o valor mais alto para as amostras de Bragança produzidas pelas abelhas da região sul (VB) Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

10%. Já o conteúdo médio mais baixo em flavanonas, com diferença considerável, foi observado para as amostras recolhidas em Vila do Bispo e produzido pelas abelhas oriundas da região sul (VV) 5%. Quanto às diferenças observadas entre os valores obtidos para as medianas, observa-se que 50% das amostras VB tem pelo menos 10% de flavanonas, enquanto 50% da amostra BV tem no máximo 6%.

Tabela 8 – Teor em flavanonas/di-hidroflavonóis por região e origem das abelhas

Flavanonas/ di-hidroflavonóis	Estatísticas descritivas						Intervalo de confiança a 95%		
	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Amplitude interquartil	Média	Desvio padrão	Limite inferior	Limite superior
VV	9	2,70	7,10	5,30	3,40	4,99	1,79	3,61	6,36
VB	15	3,60	14,40	10,50	5,30	9,84	3,72	7,78	11,90
BV	6	1,50	10,30	5,65	7,90	5,87	4,27	1,38	10,35
BB	12	5,10	11,90	9,10	1,25	8,70	1,86	7,52	9,88
PB	15	6,90	11,30	9,60	2,05	9,19	1,27	8,48	9,89

Nota: VV – Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Vila do Bispo; VB - Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Bragança; BV - Abelhas de Bragança/produzido em Vila do Bispo; BB - Abelhas de Bragança/produzido em Bragança; PB - Abelhas País Basco/produzido Bragança.

3.8 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o teste não paramétricos de Kruskal-Wallis, para verificar a existência de diferenças entre os grupos de amostras de própolis, em cada um dos parâmetros analisados (recorreu-se ao teste não paramétrico em consequência da violação dos pressupostos da Anova). Na Tabela 9 apresentam-se os resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Como se pode observar verifica-se que os resultados obtidos são significativamente diferentes em todas as variáveis.

Tabela 9 – Resultados do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis

Variável	Teste Kruskal-Wallis	Valor prova (p)	Conclusão
Cinzas	22,927	0,000	Existem diferenças significativas entre grupos
Ceras	35,434	0,000	Existem diferenças significativas entre grupos
C. Balsâmico	19,951	0,001	Existem diferenças significativas entre grupos
Fenóis totais	36,821	0,000	Existem diferenças significativas entre grupos
Flavonas	34,135	0,000	Existem diferenças significativas entre grupos
Flavanonas	17,549	0,002	Existem diferenças significativas entre grupos

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

Para identificar especificamente quais os grupos entre os quais se verificam as diferenças significativas, considerando que não existem testes de comparações múltiplas *à posteriori* para as estatísticas não paramétricas, aplicou-se o teste de Mann-Whitney, ajustando o erro de tipo I (erro de significância fortuita) através da correção de Bonferroni (consideram-se diferenças estatisticamente significativas se, $p < 0,05\%$). Os resultados obtidos para cada uma das variáveis encontram-se discriminados no anexo I e resumidos na Tabela 10.

Os resultados da tabela permite evidenciar as diferenças encontradas entre apiários (regiões) e origem das abelhas. Para todos os parâmetros analisados, com exceção do conteúdo balsâmico, é evidente a diferença entre a própolis produzida na região de Bragança e em Vila do Bispo, encontrando-se os valores de cinzas e ceras mais elevados na região sul, enquanto para a composição fenólica, os teores mais elevados encontram-se na região sul. No conteúdo balsâmico, esta diferença já não é distinta, verificando-se que para uma mesma região encontram-se ora valores elevados ou mais reduzidos.

Tabela 10 – Resumo da caracterização das matrizes estudadas

Código	Cinzas Mediana (Amplitude interquartil)	Ceras Mediana (Amplitude interquartil)	Conteúdo balsâmico Mediana (Amplitude interquartil)	Fenóis Totais Mediana (Amplitude interquartil)	Flavonas Mediana (Amplitude interquartil)	Flavanonas Mediana (Amplitude interquartil)
VV	2,00 (0,40) ^a	6,50 (1,95) ^a	64,80 (22,60) ^{ab}	4,80 (1,70) ^b	0,80 (1,00) ^b	5,30 (3,40) ^b
VB	1,27 (0,31) ^b	2,30 (1,50) ^c	75,90 (8,80) ^a	18,00 (1,95) ^a	5,90 (1,00) ^a	10,50 (5,30) ^a
BV	1,31 (0,99) ^{ab}	8,00 (0,50) ^a	71,20 (22,70) ^{ab}	3,20 (4,90) ^b	2,00 (3,70) ^b	5,65 (7,90) ^{ab}
BB	0,99 (0,57) ^b	3,90 (2,20) ^b	67,40 (18,68) ^b	16,40 (1,65) ^a	5,75 (0,50) ^a	9,10 (1,25) ^a
PB	1,07 (1,15) ^b	4,00 (1,53) ^{bc}	73,20 (3,02) ^a	17,70 (1,10) ^a	6,00 (0,85) ^a	9,60 (2,05) ^a

Nota: VV – Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Vila do Bispo; VB - Abelhas de Vila do Bispo/produzido em Bragança; BV - Abelhas de Bragança/produzido em Vila do Bispo; BB - Abelhas de Bragança/produzido em Bragança; PB - Abelhas País Basco/produzido Bragança. Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($P < 0,05$).

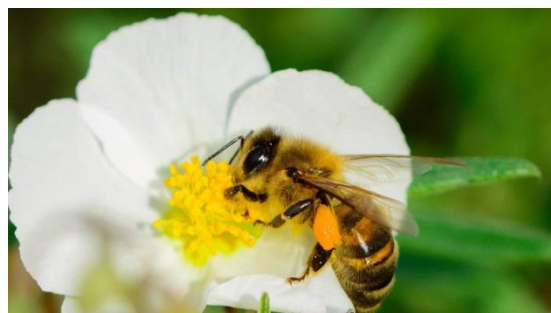
As diferenças entre regiões são de uma forma geral observadas na própolis independentemente da origem das abelhas, com exceção do teor em ceras. Para este parâmetro os resultados apontam para uma diferença estatisticamente significativa entre a própolis produzida em Bragança pelas abelhas oriundas de Vila do Bispo (VB), e a própolis produzida em Bragança pelas abelhas provenientes de Bragança (BB). Já a Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

própolis produzida nesta região pelas abelhas oriundas do País Basco, não se distingue das anteriores. Esta diferença não parece ser suficiente para demarcar as características desta própolis, uma vez que para os restantes parâmetros não se verifica.

CAPÍTULO IV

Conclusão

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da propolis



4. Conclusão

A própolis é um produto apícola, que devido à sua origem, reflete as características botânicas na vizinhança da colmeia, no entanto, é desconhecido qual o impacto da abelha nas especificidades do produto obtido. Este trabalho teve assim como objetivo avaliar a influência da origem geográfica das abelhas na seleção das fontes florais utilizadas para a produção de própolis, comparando-se os seus parâmetros de qualidade, nomeadamente o teor em cinzas, ceras e compostos fenólicos.

Alguns dos estudos anteriores realizados sobre a qualidade da própolis em Portugal^{25,73} evidenciaram diferenças significativas entre a própolis produzida na região norte e sul, em particular devido à disponibilidade das resinas existentes em cada um dessas regiões. Na região norte, o choupo surge como a fonte floral utilizada pelas abelhas, enquanto no sul, as resinas de esteva são a principal marca encontrada. Para explorar esta diferença, foram utilizados dois apiários em áreas geograficamente distintas, Bragança e Vila do Bispo, efetuando-se a transumância de colmeias entre os apiários: 5 colmeias de Bragança, num total de 10, foram transferidas para Vila do Bispo e vice-versa. Adicionalmente foram transferidas para o apiário de Bragança 5 colmeias oriundas do País Basco. A produção de própolis nestes dois apiários foi efetuada durante um período de 3 meses, entre maio e julho de 2016, utilizando-se redes plásticas comerciais colocadas diretamente sobre o topo dos quadros da colmeia. O controlo da produção efetuou-se por pesagem quinzenal das redes.

A maior quantidade de própolis produzida ocorreu no apiário localizado na região norte atingindo-se um valor médio por colmeia de 17g, bastante mais elevado que as 7g obtidas nas colmeias do apiário de Vila do Bispo. As razões associadas a esta diferença poderão estar relacionadas com múltiplos fatores, como a disponibilidade da resina em redor de cada um dos apiários, o estado da flora e de desenvolvimento da colónia no período, bem como as condições climáticas próprias de cada um dos locais. Comparando as diferentes origens geográficas das abelhas, não foi possível estabelecer uma correlação da quantidade de própolis produzida e a sua proveniência no apiário de Bragança. Já para o apiário da região sul, as abelhas de Vila do Bispo apresentaram uma maior produtividade, o que poderá estar associado com um melhor reconhecimento das fontes florais existentes na região.

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

A avaliação da qualidade da própolis obtida neste trabalho foi efetuada através da análise de alguns parâmetros físico-químicos, nomeadamente o teor em cinzas, ceras e conteúdo balsâmico, bem como através do estudo da composição fenólica, por avaliação do teor em fenóis e flavonóides.

A análise das cinzas revelou a presença de teores baixos entre 1 e 2%, significativamente menores que os máximos recomendados na literatura. As amostras analisadas não revelaram a existência de diferenças, para este parâmetro, associadas com a origem das abelhas, no entanto, a quantidade de cinzas nas amostras produzidas em Bragança é estatisticamente inferior às produzidas em Vila do Bispo, provavelmente associado à proveniência botânica das resinas.

O teor em cera das amostras de própolis no âmbito deste estudo apresentou uma variação idêntica à encontrada para as cinzas, observando-se diferenças significativas principalmente entre os locais de produção e não associadas à origem das abelhas. Os valores encontrados para este parâmetro oscilam entre os 7% para a própolis produzida em Vila do Bispo e os 3% verificados para as amostras de Bragança. Em qualquer destas situações, o valor é significativamente inferior ao máximo recomendado para a própolis de regiões temperadas.

A quantidade de compostos fenólicos é um fator importante nos padrões de qualidade da própolis, pois determina frequentemente o seu valor comercial. Neste trabalho, o processo de extração resultou num teor balsâmico com valores acima do mínimo recomendado para este tipo de própolis (45%), oscilando entre os 65 e 76%. Estes valores, associados aos baixos teores de cinzas e ceras anteriormente referidos, confirmam a boa qualidade da própolis Portuguesa. Neste parâmetro, considerando a variabilidade observada para os diversos grupos, os teores obtidos nos dois locais de produção, pelos diferentes grupos de abelhas, não apresentaram diferenças significativas. O mesmo não se verificou ao nível do conteúdo específico do extrato, observando-se uma diferença evidente entre as amostras de própolis produzidas no apiário de Bragança comparativamente às amostras de Vila do Bispo, independentemente da origem das abelhas. Para o teor em fenóis totais, as amostras de Bragança apresentam valores em redor dos 17%, quatro vezes superiores aos encontrados nas amostras de Vila do Bispo. No que se refere ao teor em flavonas/flavonóis e flavanonas/di-hidroflavonóis os valores obtidos para as amostras de Bragança foram de

6 e 9%, respetivamente, enquanto que para as amostras de Vila do Bispo este valores rondaram os 1 e 5%, respetivamente. Estas observações confirmam outros estudos já realizados nas amostras de própolis Portuguesas, onde as amostras da região norte de Portugal apresentam uma composição em compostos fenólicos mais elevada.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as maiores diferenças encontradas entre as amostras de própolis estão associadas às características florais em redor do apiário, não se verificando uma diferença significativa na qualidade da própolis em função da proveniência da abelha na qualidade da própolis. Assim, pode-se afirmar, que as abelhas efetuam uma seleção das resinas mediante a disponibilidade em redor do apiário, adaptando a sua seleção quando colocadas em ambientes distintos.

Na continuação deste trabalho será importante, ao nível da qualidade da própolis avaliar a origem floral das amostras, bem como aumentar o número de amostras para uma avaliação do perfil fenólico.

Este trabalho resultou na elaboração de um póster apresentado no IV Encontro de Jovens Estudantes Investigadores, anexo II.



Capítulo V
Referências Bibliográficas

Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

Referências Bibliográficas

- [1] Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini A.G. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung*. **2002**, 57, 530–533.
- [2] Revista de Economia e Sociologia Rural-*Print version* ISSN 0103-2003. Rev. Econ. Sociol. Rural vol.47 no.3 Brasília July/Sept. 2009. Desempenho da apicultura no estado do Ceará: competitividade, nível tecnológico e fatores condicionantes, acessado online dia 08/03/**2016**.
- [3] Freitas, M; Fonseca, I. L. Vera. Departamento de Zootecnia - CCA, Universidade Federal do Ceará, C.P. 12168 Campus do Pici, CEP 60.021-970, Fortaleza - CE, Brazil. Laboratório de Abelhas, Departamento de Ecologia, IB_US
- [4] Freitas, B. M; Pereira, J. o. P. (eds.) FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Imprensa Universitária. Fortaleza, Brasil. **2004**, p. 19-2.
- [5] Hosam, M. H; Fatima, T; Meqbali, A. L; Kamal, H; Usama, D; Souka; Ibrahim, W. H. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chemistry*. **2014**, 153, 35–43.
- [6] Serem, J. C; Bester, M. J. Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry*. **2012**, 133, 1544–1550.
- [7] Oliveira, P. S; Müller, R. C. S; Dantas K. G F; Alves C. N; Vasconcelos, M. A. M; Venturieri, G. C. Ácidos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* E *Apis mellífera* da Amazônia. *Química Nova*. **2012**, 35 (9), p. 1728-1732.
- [8] Finco, F. D. B. A; Moura, L. L; Silva, I. G. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. *Food Science and Technology* **2010**, 30 (3), 0101 – 2061.
- [9] Casaca, J. D (**2010**). Manual de produção de pólen e própolis. FNAP – Federação Nacional dos Apicultores de Portugal.

- [10] Pascoal, A; Rodrigues, S; Teixeira, A; Feas, X; Estevinho, L. M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and antiinflammatory. *Food and Chemical Toxicology*. **2014**, 63, 233–239.
- [11] Morais, A. C. T; Barbosa, L. P; Neves M. M; Matta, S. L. P; Morais, D. B; Melo, B. E. S. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia* **2009**, 61 (1) 110-118.
- [12] Sabatini, A. G, Marcazzan, G. L, Caboni, M. F., Bogdanov, S, Almeida-Muradian, L. B. Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProducts and ApiMedical Science*. **2009**, 1 (1), 1–6.
- [13] Koshio, S; Almeida-Muradian, L. B. Aplicação da clae para determinação do ácido 10-hidróxi-2-decenóico (10-HDA) em geleia real pura e adicionada o mel brasileiro. *Química nova*. **2003**, 26 (5), 670-673.
- [14] Toledo, V. A. A; Mouro, G. F. Produção de Geléia Real com Abelhas Africanizadas Seleccionadas e Cárnicas Híbridas. *Revista brasileira*. **2005**, 34 (6), 2085-2092.
- [15] Toledo, V. A. A; Neves, C. A; Alves E. M; Oliveira, J. R; Ruvolo-Takasusuki, M. C. C; Faquinello, P. Produção de geleia real em colônias de abelhas africanizadas considerando diferentes suplementos proteicos e a influência de fatores ambientais. *Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá.*, p. **2010**, 32 (1) 101-108.
- [16] Dantas, C. G; Nunes, T. L. G. M; Gomes, M. Z; Gramacho, K. P. Apitoxina: coleta, composição química, propriedades biológicas e atividades terapêuticas. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, Aquidabã*, 2013. 4 (2), 127-150.
- [17] Matysiak, J; Schmelzer, C. E. H; Reinhard, H. H; Neubert, Kokot, Z. J. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2011**, 54, 273–278.
- [18] Dantas, C. A. Potenciais efeitos anti psicóticos e neuroprotetor da apitoxina em modelos experimentais para estudo do sistema dopaminérgico. (Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em saúde e ambiente). Universidade Tiradentes. Brasil, **2013**.
- Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

- [19] Carlos, M. C. Palinologia y Caracteres Físico- Químicos del Pólen Apícola Producido en España. Propuesta de Parámetros objetivos de calidad. Tese (Doutoramento em Química analítica, Nutrição y Bromatologia). Universidade de Salamanca, Faculdade de Farmácia; Salamanca; Espanha. **2004**.
- [20] Peranovich, D. S; Orlando, G; Candelleiro, A.; Orsi, R. O.; Gomes, S. M. A. Eficiência de três métodos na extração e purificação da cera apícola. *PUBVET*. **2009**, 3 (13), s/p.
- [21] Silva, M. C; Aquino, I. S; Abramson, C. I; Santos, J. W. Uso de zangões (*Apis mellifera* L.) na detecção de cera de abelha adulterada. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **2000**, 37(6), 501-503.
- [22] D’Ettorre, P; Wenseleers, T. T; Dawson, J; Hutchinson, S; Boswell, T; Ratnieks, F. L. W. Wax combs mediate nestmate recognition by guard honeybees. *Animal Behaviour*. **2006**, 71, 773–779.
- [23] Pereira, A. S; Seixas, F. R. M. S; Neto, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas despectivas futuras, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Cidade Universitária, 21949-900 Rio de Janeiro – RJ. **2001**
- [24] Zhang, T; Omar, R; Siheri, W; Al-Mutairi, S; Clements, C; Fearnley, J; EdradaEbel, R. A; Watson, D. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African própolis. *Talanta*, **2014**, 120, 181–190.
- [25] Falcão, S. I; Freire, C; Vilas-Boas, M. A proposal for physicochemical standards and antioxidant activity of portuguese propolis. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*. **2013**, 90, 1729-1741.
- [26] Frozza, C. O. S; Garcia, C. S. C; Gambato, G; Souza, M. D. O; Salvador, M; Moura, S; Padilha, F. F; Seixas, F. K; Collares, T; Borsuk, S; Dellagostin, O. A; Henriques, J. A. P; Roesch- Ely, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*. **2013**, 52, 137–142.

- [27] Falcão, S. I. Chemical composition of portuguese própolis. Bioactive properties Tese (Doutoramento em Química). Faculdade de Ciências, Universidade do Porto; Porto; Portugal, **2013**.
- [28] Marcucci M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **1995**, 26, 83-99.
- [29] Bankova V. S; De Castro S. L; Marcucci M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **2000**, 31, 3-15.
- [30] Dias, L. G; Pereira, A. P; Estevinho, L. M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*. **2012**, 50, 4246-4253.
- [31] Ishida, V. F. C; Negri, G; Salatino, A; Bandeira, M. F. C. L. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*. **2011**, 125, 966–972.
- [32] Cuesta-Rubio, O; Frontana-Uribe, B. A; Ramirez-Apan, T; Cardenas, J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Z. Naturforsch.* **2002**, 57c, 372–378.
- [33] Popova, M. P; Chinou, I. B; Marekov, I. N; Bankova, V. S. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*. **2009**, 70, 1262-1271.
- [34] Popova M. P; Trusheva, B; Antonova, D; Cutajar, S; Mifsud, D; Farrugia, C; Tsvetkova, I; Najdensky, H; Bankova, V. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*. **2011**, 126, 1431-1435.
- [35] Sforcin J. M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 113, 1-14.
- [36] Falcão, S. I; Vilas- Boas, M; Estevinho, L. M; Barros, C; Domingues, M. R. M; Cardoso, S. M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2010**, 396, 887-897.
- [37] Falcão, S. I; Tomás, A; Vale, N; Gomes, P; Freire, C; Vilas-Boas, M. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 49, 805–812.

- [38] Segura, M; Novak, I; Akobek, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. **2011**, 124, 1208-1216.
- [39] Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2005**, 2(1), 29-32.
- [41] Gekker, G; Hu, S; Spivak, M; Lokensgard, J. R; Peterson, P. K. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4⁺ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 102, 158-163.
- [42] Chen, J; Long, Y; Han, M; Wang, T; Chen, Q; Wang, R; Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **2008**, 90, 441-446.
- [43] Yildirim Z, Hacievliyagil S, Kutlu NO, Aydin NE, Kurkcuoglu M, Iraz M, Durma R. Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacology. Research*. **2004**, 49, 287-29.
- [44] Bankova, V; Bertelli, D; Borba, R; Conti, B. J; Cunha, I. B. S; Danert, C; Eberlin, M. N; Falcão, S. I; Isla, M. I; Moreno, M. I. N; Papotti, G; Popova, M; Santiago, K. B; Salas, A; Sawaya, A. C. H. F; Schwab, N. V; Sforcin, J. M; Simone-Finstrom, M; Spivak, M; Trusheva, B; Vilas-Boas, M; Wilson, M; Zampini, C. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research, *Journal of Apicultural Research*. **2016**, DOI: 10.1080/00218839.2016.1222661
- [45] Sawaya, A. C. H. F., da Silva, Barbosa, Cunha, I., & Marcucci, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, **2011**, 5 (27), 1-10.
- [46] Righi, A. A. Perfil químico de amostras de própolis brasileiras. Tese (Mestrado em Botânica). Universidade de São Paulo. Brasil, **2008**
- [47] Funari, C. S; Ferro, V. O. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia Alimentar* **2006**, 26 (1), 171 – 178.

- [48] Martinez, O. A; Soares, A. E. E. Melhoria genética na apicultura comercial para produção da própolis. *Revista Brasileira de saúde e produção animal*, Salvador **2012**, 13 (4), 982 – 990.
- [50] Kuropatnicki, A. K; Szliszka, E; Krol, W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2013**, DOI: 10.1155/2013/964149.
- [51] Popova, M:P; Bankova, V; Bogdanov, S; Tsvetkova, I; Naydensky, C; Marcazzan, G. L; Sabatini, A; G. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* **2007**, 38, 306-311.
- [52] Bogdanov, S; Bankova, V. *The propolis book*, chapter 1, **2011**. <http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>. Acedido em 27 julho, 2016.
- [53] Kumazawa, S; Nakamura, J; Murase, M; Miyagawa, M; Ahn, M. R; Fukumoto, S. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften* **2008**, 95, 781–786.
- [54] Kumazawa, S; Yoneda, M; Shibata, I; Kanaeda, J; Hamasaka, T; Nakayama, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2003**, 51(6), 740-742.
- [55] Krell, R. Value-added products from beekeeping. *FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma*. **1996**. from <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm>. Acedido em 14 de Outubro. 2016.
- [56] Inoue, H. T; Sousa, E. A; Orsi, R. O; Funari, S. R. C; Barreto, L. M. R. C; Dib, A. P. S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. **2007**, 15 (2), 65-69.
- [59] Bogdanov, S; Bankova, V. *The propolis book*, chapter 1, 2011. Retrieved 7 November, **2012** from <http://www.bee-hexagon.net/en/propolis.htm>.
- [60] Crane, E. (1990). *Bees and beekeeping: Science, practice, and world resources* (p. 640). Ithaca, NY: Cornell University Press. ISBN: 978-0801424298.
- Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

- [61] Lustosa, S. R; Galindo, A. B; Nunes, L. C. C; Randau, K. P; Rolim Neto, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, , **2008**, 18(3), 447-454.
- [62] Pereira, A. Dos S; Seixas, F. R. M. S; Aquino Neto, F. R de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química nova*, **2002**, 25(2), 321-326.
- [63] Tiemi Inoue, H; De Sousa, E. A; Orsi, R. O; Funari, S. R; Barreto, L. M. R. C; Dib, A. P. S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* **2007**, 15 (2) 65 – 69
- [64] Oliveira, M. L. ; Cunha, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica?. *Ata amazônica*. 2005, 35 (3), 389 - 394
- [65] AOAC Official methods of analysis, 16th edn. **1995**, AOCS Press, Arlington.
- [66] Woiski, R. G; Salatino, A. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*. **1998**, 37, 99 – 105
- [67] Singleton, V; Rossi, J. A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1995**, 16, 144-158.
- [68] Cvec, J; Medić-Šarić, M; Jasprica, I; Zubčić, S; Vitali, D; Mornar, A; Vedrina-Dragojević, I; Tomić, S. Optimization of na extraction procedure and chemical characterization of Croatian própolis tinctures. *Phytochemical Analysis*. **2007**, 18, 451-459.
- [69] Popova, M; Bankova, V; Butovska, D; Petkov, V; Nikolova-Damyanova, B; Sabatini, A. G; Marcazzan, G. L; Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type própolis. *Phytochemical Analysis*. **2004**, 16, 235-240.
- [70] Del Prado, C. C. N; Stefanutto, J. C; Stevanato, J. O; Gonçalves, J. E; Yamaguchi, U. M; Franco, S. L. Análise química da própolis de diferentes regiões do Paraná e formulações de própolis para ser usados com enxaguantes bucais. *Unicesumar* **2013** , ISBN 978-858084-603-4.

[71] Lopes, M. Qualidade dos Produtos Apícolas da Guiné Bissau: Mel e Própolis Tese (Mestrado Farmácia e Química de Produtos Naturais). Instituto Politécnico de Bragança e Universidade de Salamanca **2014**.

[73] Falcão, S. I; Freire, C; Figueiredo, A. C; Vilas-Boas, M. The Volatile Composition of Portuguese Propolis Towards its Origin Discrimination. *Phytotherapy Research* **2015**

[74] Mark L. Wiston, The Biology of the Honey Bee, **1987**, Harvard University Press, Massachusetts, USA

Capítulo VI

Anexos



Impacto da proveniência da abelha na qualidade da própolis

Anexos I

Teste de Mann-Whitney para especificar quais os grupos verificam as significativas.

Por análise da Tabela 11 conclui-se que relativamente às cinzas as diferenças estatisticamente significativas nos resultados obtidos ocorreram entre VV e VB, BB e PB.

Tabela 11 – Resultados dos testes não paramétricos Mann-Whitney para as comparações múltipla das cinzas

Cinzas	Estatística teste Mann-Whitney	Valor prova (p)	Conclusão
VV-VB	-3,713	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-BV	-2,648	0,006	
VV-BB	-3,875	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-PB	-3,680	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-BV	-0,596	0,558	
VB-BB	-1,971	0,050	
VB-PB	-1,017	0,325	
BV-BB	-1,939	0,055	
BV-PB	-1,820	0,073	
BB-PB	-0,187	0,870	

Por análise da Tabela 12 conclui-se que relativamente às ceras as diferenças estatisticamente significativas nos resultados obtidos ocorreram entre VV e VB, BB e PB; entre VB e BV e BB; entre BV e BB e PB.

Tabela 12 - Resultados dos testes não paramétricos Mann-Whitney para as comparações múltiplas das ceras

Ceras	Estatística teste Mann-Whitney	Valor prova (p)	Conclusão
VV-VB	-3,746	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-BV	-1,013	0,321	
VV-BB	-2,792	0,004	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-PB	-3,518	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-BV	-3,849	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-BB	-3,250	0,001	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-PB	-2,713	0,005	
BV-BB	-2,918	0,002	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
BV-PB	-3,526	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
BB-PB	-0,854	0,422	

Por análise da Tabela 13 conclui-se que relativamente ao composto balsâmico as diferenças estatisticamente significativas nos resultados obtidos ocorreram entre BB e VB e PB.

Tabela 13 - Resultados dos testes não paramétricos Mann-Whitney para as comparações múltipla dos conteúdos balsâmicos

Conteúdo Balsâmico	Estatística teste Mann-Whitney	Valor prova (p)	Conclusão
VV-VB	-1,799	0,072	
VV-BV	-0,408	0,683	
VV-BB	-0,223	0,824	
VV-PB	-1,586	0,113	
VB-BV	0,000	0,024	
VB-BB	-3,251	0,001	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-PB	-1,680	0,098	
BV-BB	-2,490	0,999	
BV-PB	-2,229	0,013	
BB-PB	-3,741	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos

Por análise da Tabela 14 conclui-se que relativamente aos fenóis totais as diferenças estatisticamente significativas nos resultados obtidos ocorreram entre VV e VB, BB e PB. E também entre BV e VB, BB e PB.

Tabela 14 - Resultados dos testes não paramétricos Mann-Whitney para as comparações múltipla dos fenóis totais

Fenóis totais	Estatística teste Mann-Whitney	Valor prova (p)	Conclusão
VV-VB	-4,029	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-BV	-1,179	0,239	
VV-BB	-3,840	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-PB	-4,026	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-BV	-3,509	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-BB	-2,052	0,041	
VB-PB	-1,079	0,236	
BV-BB	-3,375	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
BV-PB	-3,504	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
BB-PB	-2,612	0,007	

Por análise da Tabela 15 conclui-se que relativamente às flavonas as diferenças estatisticamente significativas nos resultados obtidos ocorreram entre VV e VB, BB e PB. E também entre BV e VB, BB e PB.

Tabela 15 - Resultados dos testes não paramétricos Mann-Whitney para as comparações múltipla das flavonas/flavonóis

Flavonas	Estatística teste Mann-Whitney	Valor prova (p)	Conclusão
VV-VB	-4,034	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-BV	0,000	0,999	
VV-BB	-3,849	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-PB	-4,034	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-BV	-3,514	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-BB	-1,446	0,148	
VB-PB	-0,706	0,480	
BV-BB	-3,386	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
BV-PB	-3,514	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
BB-PB	-1,273	0,203	

Por análise da Tabela 16 conclui-se que relativamente às flavanonas/di-hidroflavonóis as diferenças estatisticamente significativas nos resultados obtidos ocorreram entre VV e VB, BB e PB.

Tabela 16 - Resultados dos testes não paramétricos Mann-Whitney para as comparações múltipla das flavanonas/di-hidroflavonóis

Flavanonas	Estatística teste Mann-Whitney	Valor prova (p)	Conclusão
VV-VB	-3,012	0,002	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-BV	0,000	0,999	
VV-BB	-3,202	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VV-PB	-3,908	0,000	Diferenças estatisticamente significativas entre grupos
VB-BV	-2,025	0,045	
VB-BB	-1,270	0,204	
VB-PB	-1,709	0,281	
BV-BB	-1,032	0,302	
BV-PB	-1,289	0,197	
BB-PB	-0,855	0,392	

Anexos II

IMPACTO DA PROVENIÊNCIA DA ABELHA NA QUALIDADE DA PRÓPOLIS

GOMES CAHANGO, ANDREIA TOMÁS, SORAIA FALCÃO, MIGUEL VILAS-BOAS

Centro de Investigação da Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal.









Introdução

A própolis é uma mistura complexa, de material resinoso colhida pelas abelhas em ramos de árvores, arbustos ou folhas e transportados para colmeia, onde são adicionadas secreções salivares¹. As abelhas usam esta mistura com finalidades mecânicas ou biológicas nomeadamente na reparação da colmeia, gestão de humidade, mas também para reparar favos ou impedir a entrada de possíveis invasores². A composição química da própolis depende da fonte vegetal em redor do apiário e das condições geográficas e climáticas, observando-se a preferência por fontes de resina específicas. Nas regiões de climas temperados, como a Europa, as principais fontes vegetais de resina para as abelhas são choupos, carvalho, salgueiro e acácia³. Este trabalho tem como objetivo analisar a influência da origem da abelha na qualidade da própolis, comparando os parâmetros físico-químicos.

Metodologia

Para o trabalho foram avaliadas 25 amostras de própolis, de abelhas de diversas origens, da região Sul (Algarve) e Norte (Bragança), bem como do País Basco, Espanha. A produção de própolis foi efetuada em duas regiões geograficamente distintas, Bragança e Vila do Bispo, que após recebidas no laboratório, foram armazenadas a -20 °C até posterior análise.

Teor em Cinzas: Incineração das amostras de própolis.

Teor em Ceras: Extração por Soxhlet com éter de petróleo. Numa segunda etapa foi aplicado um procedimento de extração adicional com metanol.

Conteúdo Balsâmico: A amostra de própolis (1g) foi extraída com 30mL de 70% de etanol/água, à temperatura ambiente, com agitação, durante 24h. Em seguida, foi filtrada e o resíduo foi re-extraído nas mesmas condições.

Composição Fenólica: Efetuou-se através da avaliação do conteúdo em fenóis totais (método Folin-Ciocalteu), flavonas/flavonóis (método cloreto de alumínio) e flavanonas/dihidroflavonóis (método DNP).

Conclusão

Os resultados demonstram uma variabilidade entre a própolis recolhida nos apiários, observando-se um maior teor em ceras e cinzas nas amostras do apiário a sul. No que se refere à composição fenólica os teores em fenóis totais e flavonoides são superiores para as amostras da região norte. Já no que se refere ao impacto da origem geográfica das abelhas, verifica-se que as características físico-químicas e fenólicas são semelhantes para um mesmo apiário não se observando diferenças significativas entre as abelhas oriundas do norte, sul ou País Basco.

Referências Bibliográficas

[1] Zhang, T.; Omar, R.; Sileri, W.; Al-Mutairi, S.; Clements, C.; Fearnley, J.; Estrada-Ebel, R.A.; Watson, D. 2014. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and deropagation of African propolis. *Talanta*, 120, 181–190.

[2] Falcão, S.L.; Freire, C.; Vilas-Boas, M. A proposal for physicochemical standards and antioxidant activity of portuguese propolis. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2013, 90, 3729–3743.

Resultados

Tabela 1- Resultados obtidos da aplicação das metodologias de análise da própolis, no Laboratório da ESA, Bragança.

Parâmetros físico-químicos							
ID	Origem/Local	T. Cinza %	Média por Região	T. Cera %	Média por Região	C. Balsâmico %	Média por Região
A 22	AA	2±0	2±0	7±0	6±2	51±1	65±15
A 24	AA	2±0		4±2		65±0	
A 26	AA	2±0		6±1		80±5	
A 4	AB	1±0	1±0	1±0	3±1	75±1	74±6
A 5	AB	1±0		3±0		77±2	
A 6	AB	1±0		4±2		64±7	
A 15	AB	1±0		2±0		78±7	
A 34	AB	1±0		2±1		77±2	
B 1	BA	2±0	1±1	8±3	7±1	71±0	60±16
B 23	BA	1±0		6±2		-	
B 38	BA	1±0		8±1		49±0	
B 14	BB	1±0	1±0	4±1	4±1	73±5	69±5
B 15	BB	1±0		6±2		61±0	
B 37	BB	1±0		3±1		72±0	
B 40	BB	1±0		4±0		68±1	
B 24	PB	0±0	2±2	4±2	4±1	75±2	74±2
B 27	PB	2±0		3±1		74±3	
B 31	PB	5±0		7±1		74±1	
B 41	PB	2±0		4±0		71±4	

Compostos fenólicos: Fenóis totais, Flavonas e Flavanonas							
ID	Origem/Local	Fenóis totais %	Média por Região	Flavonas %	Média por Região	Flavanonas %	Média por Região
A 22	AA	5±1	6±2	1±0	1±1	3±0	5±2
A 24	AA	5±0		1±0		6±1	
A 26	AA	9±1		2±0		7±0	
A 4	AB	18±1	18±2	7±0	6±1	9±1	10±4
A 5	AB	20±1		6±0		11±1	
A 6	AB	14±1		5±0		4±0	
A 15	AB	20±0		7±0		14±1	
A 34	AB	18±0		6±0		13±0	
B 1	BA	7±0	5±4	4±0	2±3	10±1	6±6
B 38	BA	2±0		0±0		2±1	
B 14	BB	18±1	17±1	6±0	6±0	9±0	10±1
B 15	BB	16±1		6±0		9±1	
B 37	BB	17±0		6±0		10±0	
B 40	BB	17±1		6±0		11±1	
B 48	BB	16±1		5±0		9±1	
B 24	PB	18±1	18±1	6±0	6±1	11±1	10±1
B 27	PB	18±0		5±0		8±1	
B 31	PB	18±1		6±0		10±0	
B 41	PB	19±1		6±0		10±1	

Agradecimentos

Ao grupo de trabalho que incansavelmente apoiou-me (Professora Alice Pinto, Cátia Neves e Dora Henriques)