

**Eficácia da Própolis no controlo da Loque Americana:
Avaliação em zonas controladas**

Hélder Pereira Garção

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de
Mestre em Tecnologias Animais*

Orientado por

Professor Doutor Miguel José Rodrigues Vilas-Boas

Esta dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

**Bragança
2010**

A presente investigação foi realizada no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária de Bragança e no Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia da Universidade do Minho em parceria com a Associação de Apicultores do Parque Natural de Montesinho, Associação de Apicultores da Região de Leiria, Apilegre, Cooperativa Agrícola de Produtores de Boticas e a Montimel no âmbito do projecto “Eficácia da própolis no controlo da Loque Americana: Avaliação em zonas controladas”, financiado pelo Programa Apícola Nacional, medida 6A.

RESUMO

A Loque Americana, é causada pela bactéria anaeróbia facultativa *Paenibacillus larvae*, e é a mais grave das doenças que afecta as abelhas do género *Apis mellifera*, em particular a criação. A propagação da Loque Americana, ocorre facilmente no maneo, através do material e equipamento apícola e pilhagem das colónias fracas ou mortas. Somente 10 esporos são necessários para causar infecção em 24 horas, que pode ocorrer em qualquer época do ano, desde que, as colónias apresentem criação. A ausência de tratamentos homologados e eficazes no controlo da Loque Americana, compatíveis com a produção de mel, forçam a procura de alternativas nos produtos naturais, face à proibição no uso de antibióticos.

O objectivo deste estudo, é avaliar *in vivo* a eficácia da aplicação de extractos etanólicos de própolis (PEE), diluídos na alimentação artificial (solução açucarada), no controlo do número de esporos contidos no mel.

O estudo foi implementado em colaboração com cinco entidades gestoras de zonas controladas de doenças, as quais, instalaram um apiário experimental com quinze colónias dispostas em três grupos homogéneos de cinco, previamente identificadas como contendo esporos de *Paenibacillus larvae*, mas assintomáticas.

Um grupo foi alimentado só com solução açucarada, actuando como controlo, e os outros dois foram alimentados com xarope contendo 6% de extracto etanólico de própolis. Estes extractos foram obtidos por extracção etanólica a 70% ou 96% durante 10 dias, á temperatura ambiente sobre uma placa de agitação, posteriormente filtrados e levados à evaporação, até se obter uma massa similar à do mel. Os extractos foram dissolvidos em etanol a 96% para uma concentração de 10%, resultando no extracto etanólico de própolis (PEE) inicial. A evolução dos esporos foi avaliada em amostras de mel recolhidas junto da criação nos dias 0, 21, 42 e 84 após a aplicação dos xaropes. A análise foi realizada por crescimento das bactérias em meio MYPGP sólido, contendo ácido naladixico e pipemídico, e as placas incubadas a 37 °C durante 3-4 dias. Após a contagem de colónias, o resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colónias (UFC). A confirmação de bactérias *P.larvae* foi realizada por PCR com primers baseados em partes específicas do seu gene 16SrDNA.

A caracterização química dos extractos etanólicos de própolis foi efectuada

para o teor de residuo seco, ceras, flavonas, flavanonas e perfil fenólico. A análise permitiu a identificação dos compostos fenólicos característicos das zonas temperadas, em que, a origem botânica é o *Populus spp.* Os extractos etanólicos a 70% são os que possuem a menor quantidade de compostos fenólicos, mas maior poder redutor e capacidade bloqueadora de radicais livres. A irregularidade de esporos nas condições de estudo e nos períodos de amostragem não comprova a eficácia da própolis contra o *Paenibacillus larvae*.

Keywords: Loque Americana, Extracto etanólico de própolis, *Paenibacillus Larvae*, Zonas Controladas.

ABSTRACT

The American foulbrood is caused by anaerobic facultative bacteria *Paenibacillus larvae*, and it is the most serious diseases affecting the bees of the genus *Apis mellifera*, in particular the breeding. The spread of American Foulbrood, occurs easily through the management, material and beekeeping equipment and with robbery of weak or dead colonies. Only 10 spores are needed to cause infection in 24 hours, which can occur at any time of year, since the colonies have breeding. The current lack of approved and effective treatments for controlling American Foulbrood, consistent with honey production, stretch the researchers for alternatives in natural products, considering the prohibition on the use of antibiotics.

The objective of this study is to evaluate the effectiveness *in vivo* of propolis ethanol extract (PEE) application, diluted in artificial feeding (sugar solution), in controlling the number of spores present in honey.

The study was implemented in collaboration with five institutions responsible for controlled areas by management, which installed an experimental apiary with fifteen colonies, arranged in three homogeneous groups of five, previously identified as containing *Paenibacillus larvae*, but asymptomatic. One group was fed only with sugar solution, as the control group, and the other two where fed with syrup containing 6% of ethanol extract of propolis. This extract was obtained by ethanol extraction 70% or 96% for 10 days at room temperature under agitation, then filtered and taken to evaporation, until a mass similar to honey. The extracts were dissolved in 96% ethanol for a concentration of 10%, resulting in the initially ethanol extract of propolis (PEE). The evolution of the spores was assessed in samples of honey collected after application of syrups on days 0, 21, 42 and 84. The analysis was performed by growing the bacteria in solid medium MYPGP, with acid naladixic and pipemidic, and the plates were incubated at 37 °C for 3-4 days. After counting the bacteria, the results were expressed as Colony Forming Units (CFU). Confirmation of *P.larvae* bacteria was performed by PCR with primers based on specific parts of its gene 16SrDNA.

The chemical characterization of propolis ethanol extract was performed in tenor of dry residue, waxes, flavones, flavanones and phenolic profile. The results allowed the identification of the phenolic compounds characteristic of the temperate

zone, where the botanical origin is the *Populus spp.* The ethanolic extracts at 70% present fewer phenolic compounds, but higher reducing power and radical scavenging effect. The irregular number of spores under the conditions of study and sampling periods do not confirm the effectiveness of propolis against *Paenibacillus larvae*.

Keywords: American Foulbrood, Própolis Ethanolic Extract, *Paenibacillus larvae*, Controlled Areas.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Miguel Vilas Boas, meu orientador, pelo apoio incondicional, disponibilidade, empenhamento, atenção dispensada, incentivo e conhecimentos transmitidos.

À Soraia Falcão, pelo apoio incondicional, incentivo, amizade, disponibilidade, conhecimentos transmitidos, sugestões efectuadas e ajuda nos procedimentos laboratoriais.

Ao Professor Doutor Luís Dias, pelo apoio, incentivo, amizade, disponibilidade, conhecimentos transmitidos e apoio informático.

Ao Professor Doutor Alfredo Teixeira, Professor Doutor Ramiro Valentim e à Professora Doutora Maria José Arabolaza, pelo apoio, incentivo, amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao Silvestre Natário, por todo o apoio, amizade, incentivo, disponibilidade e sugestões efectuadas.

Aos colegas de laboratório, Vânia, Lilian, Filipa, Sandrine, Rafaela, Marco, João por toda a amizade, apoio, incentivo e disponibilidade em ajudar.

Às colegas de trabalho Helena Guedes, Margarida Neto e Dulce Alves, pelo apoio, incentivo, amizade e disponibilidade.

À Sofia Mónica, por todo o apoio, incentivo, disponibilidade, amizade e compreensão.

Ao Eng^o José Luís Rosa, pelo apoio e informação informática

Às associações de apicultores, pelo apoio e cooperação do pessoal técnico.

À minha família, mãe e irmã pelo incondicional apoio, incentivo, compreensão e paciência que sempre me dedicaram para alcançar este objectivo.

A todos aqueles que directa ou indirectamente me apoiaram neste percurso e que não se encontram aqui mencionados, pelo apoio, disponibilidade e amizade.

Índice geral

| | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | iii |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| ABREVIATURAS..... | xi |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 - Loque Americana | 3 |
| 1.1.1 - Tratamentos..... | 4 |
| 1.1.2 - Maneio apícola..... | 6 |
| 1.2 - Própolis | 7 |
| 1.2.1 - Origem botânica..... | 8 |
| 1.2.2 - Composição..... | 8 |
| 1.2.3 - Aplicações..... | 9 |
| 1.3 - Objectivos | 10 |
| | |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 12 |
| 2.1 - Procedimentos de campo..... | 13 |
| 2.1.1 - Amostragem | 13 |
| 2.1.2 - Vitalidade | 15 |
| 2.1.3 - Instalação de apiários experimentais..... | 15 |
| 2.1.4 - Aplicação dos extratos etanólicos de própolis | 16 |
| 2.2 - Procedimentos laboratoriais..... | 16 |
| 2.2.1 - Optimização da metodologia de crescimento e quantificação de esporos | 17 |
| 2.2.2 - Confirmação do <i>Paenibacillus larvae</i> por PCR..... | 17 |
| 2.2.3 - Extratos etanólicos de própolis | 18 |
| 2.2.4 - Resíduo seco..... | 18 |
| 2.2.5 - Ceras..... | 19 |
| 2.2.6 - Fenóis totais | 19 |
| 2.2.7 - Flavonas e flavonóis..... | 19 |
| 2.2.8 - Flavanonas e di-hidroflavonóis | 20 |
| 2.2.9 - Perfil fenólico..... | 20 |
| 2.2.10 - Poder redutor | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.11 - Avaliação do efeito bloqueador de radicais livres – DPPH | 21 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| 3.1 – Apiários experimentais | 24 |
| 3.1.1 - Amostragem - pré-selecção | 24 |
| 3.1.2 - Confirmação do <i>Paenibacillus larvae</i> por PCR | 25 |
| 3.1.3 - Quantificação de esporos | 25 |
| 3.1.4 - Vitalidade | 29 |
| 3.1.5 - Instalação dos apiários experimentais | 29 |
| 3.2 - Eficiência dos tratamentos com extractos etanólicos de própolis | 30 |
| 3.2.1 - Amostragem-eficiência | 30 |
| 3.2.2 - Quantificação de esporos | 31 |
| 3.3 - Caracterização dos extractos de própolis | 33 |
| 3.3.1 - Resíduo seco | 34 |
| 3.3.2 - Ceras | 34 |
| 3.3.3 - Compostos fenólicos totais | 35 |
| 3.3.4 - Flavonas/Flavonóis | 36 |
| 3.3.5 - Flavanonas e di-hidroflavonóis | 37 |
| 3.3.6 - Perfil fenólico | 37 |
| 3.3.7 -Efeito bloqueador de radicais livres – DPPH | 40 |
| 3.3.8 - Poder redutor | 41 |
| | |
| 4. CONCLUSÕES..... | 43 |
| 5. TRABALHOS FUTUROS | 46 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 48 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | Pág. |
|--|------|
| TABELA 1 - QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> NAS ZONAS CONTROLADAS DE NISA E LEIRIA. | 26 |
| TABELA 2 - QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> NAS ZONAS CONTROLADAS DE BRAGANÇA E BOTICAS. | 27 |
| TABELA 3 - QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS DE <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> NA ZONA CONTROLADA DE CHAVES. | 28 |
| TABELA 4 - VITALIDADE DAS COLÓNIAS SELECIONADAS EM BRAGANÇA, E SUA DISTRIBUIÇÃO PELOS GRUPOS DE ESTUDO. | 29 |
| TABELA 5 - NÚMERO DE AMOSTRAS RECOLHIDAS AO LONGO DO ENSAIO. | 31 |
| TABELA 6 - QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS (UFC/20 mL) DE <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> EM CHAVES. | 32 |
| TABELA 7 - QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS (UFC/20 mL) DE <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> EM BRAGANÇA. | 33 |
| TABELA 8 - QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS (UFC/20 mL) DE <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> EM NISA. | 33 |
| TABELA 9 - RESÍDUO SECO E TEOR EM CERAS NOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS | 34 |
| TABELA 10 - TEOR EM FLAVONÓIS, FLAVANONAS E FENÓIS TOTAIS NOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS. | 36 |
| TABELA 11 - PERFIL FENÓLICO NOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS. | 39 |
| TABELA 12 - PODER REDUTOR E DPPH, DOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS. . | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| FIGURA 1 - IMAGEM MICROSCÓPICA DOS ESPOROS DE <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> [9]. | 3 |
| FIGURA 2 - IDENTIFICAÇÃO DE CAMPO DA LOQUE AMERICANA. | 4 |
| FIGURA 3 - PRODUTO DE USO VETERINÁRIO UTILIZADO EM PORTUGAL. | 5 |
| FIGURA 4 - DESTRUIÇÃO DE UMA COLÓNIA INFECTADA PELO <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> . | 5 |
| FIGURA 5 - AMOSTRAGEM DE COLÓNIAS ASSINTOMÁTICAS. | 14 |
| FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DAS ZONAS CONTROLADAS COLABORANTES. | 14 |
| FIGURA 7 - APLICAÇÃO DA ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL. | 16 |
| FIGURA 8 - FASES DA EXTRACÇÃO ETANÓLICA DA PRÓPOLIS. | 18 |
| FIGURA 9 - AMOSTRAGEM EFECTUADA NA PRÉ-SELECÇÃO. | 24 |
| FIGURA 10 - GEL DE AGAROSE PARA CONFIRMAÇÃO DO <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> POR PCR. 1/2 CONTROLO POSITIVO COM DUAS COMBINAÇÕES DE PRIMERS DIFERENTES; LINHAS 3/4 AMOSTRA DE MEL DA COLÓNIA TF47; 5/6 AMOSTRA DE LARVAS INFECTADAS DA COLÓNIA TF47; LINHAS 7/8 AMOSTRA DE MEL DA COLÓNIA TF49; 9/10 AMOSTRA DE LARVAS INFECTADAS DA COLÓNIA TF49. | 25 |
| FIGURA 11 - LOCALIZAÇÃO E DISPOSIÇÃO DE COLÓNIAS NOS APIÁRIOS EXPERIMENTAIS. | 30 |
| FIGURA 12 - TEOR DE RESÍDUO SECO OBTIDO PARA A AMOSTRA 1 E 2, A 96% E 70%. | 34 |
| FIGURA 13 - TEOR DE CERAS OBTIDO PARA A AMOSTRA 1 E 2, A 96% E 70%. | 35 |
| FIGURA 14 - TEOR EM COMPOSTOS FENÓLICOS OBTIDO PARA A AMOSTRA 1 E 2, A 96% E 70%. | 36 |
| FIGURA 15 - TEOR EM FLAVONAS/FLAVONÓIS OBTIDO PARA A AMOSTRA 1 E 2, A 96% E 70%. | 36 |
| FIGURA 16 - TEOR EM FLAVANONAS E DI-HIDROFLAVONÓIS OBTIDO PARA A AMOSTRA 1 E 2, A 96% E 70%. | 37 |
| FIGURA 17 - CROMATOGRAMA PARA O EXTRACTO DA AMOSTRA 1 OBTIDA A 70%, DE ETANOL. | 38 |
| FIGURA 18 - CROMATOGRAMA PARA O EXTRACTO DA AMOSTRA 2 OBTIDA A 70%, DE ETANOL. | 38 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 19 - PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO EXTRACTO DE PRÓPOLIS (AMOSTRA 2, 70%)..... | 40 |
| FIGURA 20 – CAPACIDADE BLOQUEADORA DE RADICAIS LIVRES PARA A AMOSTRA 1 E 2, EXTRAÍDAS A 96% E 70%. | 41 |
| FIGURA 21 – PODER REDUTOR PARA A AMOSTRA 1 E 2, EXTRAÍDAS A 96% E 70%. | 42 |

ABREVIATURAS

DAD - Detector de matriz de Diodos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho

PCR - Reacção em cadeia da polimerase

PEE - Extracto etanólico de própolis

UFC - Unidade formadora de colónias

EC₅₀ - Concentração correspondente a 50% do efeito máximo (inibição).

MYPGP - Meio de cultura (extracto de levedura, caldo Mueller-Hinton, glucose, K₂HPO₄, piruvato de sódio e ágar)

PLA - Meio de cultura (caldo Tryptic Soy, peptona de caseína, peptona de carne, extracto de levedura, NaCl, Na₂HPO₄)

DNP - 2,4-dinitrofenilhidrazina

AARL - Associação de Apicultores da Região de Leiria

AAPNM - Associação de Apicultores do Parque Natural de Montesinho

CAPOLIB - Cooperativa Agrícola de Boticas

APILEGRE - Associação de Apicultores do Nordeste do Alentejo

MONTIMEL - Cooperativa de Apicultores do Alto do Tâmega, CRL

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 - Loque Americana

1.1.1 - Tratamentos

1.1.2 – Maneio apícola

1.2 - Própolis

1.2.1 - Origem botânica

1.2.2 - Composição

1.2.3 - Aplicações

1.3 - Objectivos

A Loque Americana é uma doença das abelhas causada pela bactéria Gram positiva *Paenibacillus Larvae*, que afecta em particular a criação e conduz à morte da colónia, contribuindo para o descontentamento dos apicultores portugueses face aos prejuízos que a mesma acarreta, com maior repercussão em regiões húmidas propícias à sua proliferação.

A disseminação desta doença é facilmente negligenciada durante a actividade apícola pois uma colónia apesar de estar contaminada poderá ainda não evidenciar os sintomas visíveis para o apicultor (assintomática), pelo que, a sua propagação pode ocorrer com alguma facilidade através dos utensílios apícolas, desdobramentos, captura de enxames, pilhagem, transumância, madeiras, mel e cera. Actualmente, dada a elevada resistência dos esporos a tratamentos químicos e temperatura, a forma mais eficaz de controlo desta doença passa pela incineração da colónia, com graves prejuízos para o apicultor.

Não será também de desprezar que a consciencialização da impossibilidade de aplicação de antibióticos, por questões legais nacionais e comunitárias relacionadas com a isenção de resíduos no mel, possa estar relacionada com o surgimento de um maior número de casos.

Recentemente, alguns trabalhos de investigação internacionais de avaliação das propriedades de produtos apícolas, reconheceram que a própolis, uma mistura de resinas, cera, mel e pólen que as abelhas recolhem para revestir os favos de criação, tapar buracos e fendas da colmeia ou para embalsamar intrusos, apresenta também capacidade de controlar os níveis de esporos do *Bacillus Paenibacillus Larvae* presentes nas colónias de abelhas [1], desde que os níveis de contaminação não sejam críticos. Os investigadores verificaram que a aplicação de extractos etanólicos de própolis *in vitro* [2] e *in vivo* [3,4], promove a inibição de bactérias Gram-positivas. Nesse sentido, e face ao grau de incidência da Loque Americana na apicultura nacional foi objectivo do presente trabalho realizar o estudo de avaliação *in vivo* da eficácia da própolis de Portugal no controlo da Loque Americana.

1.1 - Loque Americana

A origem do nome comum “Loque Americana”, deve-se à sua identificação por um americano [5]. Esta doença é causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, subsp *larvae*, e é a mais grave das doenças que afectam as abelhas do género *Apis mellifera* [5-7]. É uma bactéria anaeróbia facultativa com capacidade de formar endósporos muito distintos. Enquanto que grande parte dos esporos de *Bacillus* possuem 4-5 camadas de protecção, os esporos de *Paenibacillus larvae* contêm sete camadas de protecção, conferindo-lhes viabilidade de pelo menos 35-50 anos [7,8]. A bactéria existe em duas formas: a fase de esporos e a fase vegetativa, que consiste numa delgada haste em forma de células bacterianas. A forma vegetativa apresenta $5\mu\text{m} \times 0,5-0,8\mu\text{m}$ e os esporos $1,3\mu\text{m} \times 0,6\mu\text{m}$, como se pode constatar na figura 1 [5].

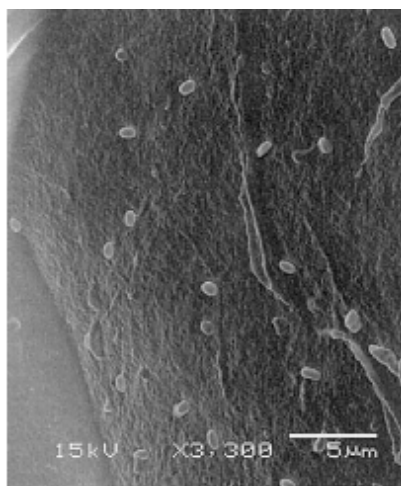


Figura 1 - Imagem microscópica dos esporos de *Paenibacillus larvae* [9].

Somente a fase de esporos é contagiosa para as abelhas [10], em particular para as jovens larvas mais susceptíveis à infecção, sendo que, o número de esporos de *Paenibacillus larvae* para causar infecção nas larvas mais velhas é superior. As características das cepas é outro factor que contribui de forma significativa para a relação entre o nível de esporos e o grau de infecção [5]. Ao contrário da maioria das bactérias os esporos são muito resistentes ao calor extremo, frio e produtos químicos e podem permanecer viáveis nos favos, mel, material lenhoso, mesmo nas colmeias abandonadas, capaz de provocar a re-infecção, por um período muito longo, certamente décadas [1,10]. A Loque Americana pode ocorrer em qualquer época do ano, desde que, as colónias apresentem criação. Geralmente as colónias infectadas acabam por morrer [1]. Os esporos são frequentemente transmitidos às abelhas

adultas durante a limpeza de células contendo larvas infectadas, as quais irão transmitir os esporos às larvas através da alimentação. Uma vez nas larvas, a bactéria desenvolve-se e multiplica-se originando a morte do hospedeiro. Quando estas abelhas começam a alimentar as larvas, somente 10 esporos são suficientes para causar uma infecção em 24 horas [1,5].

As abelhas amas podem reconhecer as larvas infectadas, e removê-las dos alvéolos antes ou depois da operculação. Se a larva morrer depois de a célula ser operculada, a cera da operculação fica húmida, escura e côncava. Nesta fase, se utilizarmos um palito e perfurarmos o alvéolo, os restos da larva são retirados mediante um líquido semi-líquido, viscoso e de cor castanha (Figura 2) [1], o que permite o seu fácil reconhecimento. Adicionalmente, a célula das larvas mortas irá criar espaços vazios entre a criação (criação em mosaico) permitindo também a sua identificação.



Figura 2 - Identificação de campo da Loque Americana.

1.1.1 - Tratamentos

Em Portugal e nos países comunitários não existe actualmente um tratamento homologado e eficaz para o controlo da Loque Americana, compatível com a produção de mel.

De acordo com a legislação europeia (Regulamento CEE 2377/90) o uso de antibióticos é impraticável na apicultura pois qualquer presença de resíduos no mel impede a sua comercialização. Além disso, não há limites máximos de resíduos (LMR), de tetraciclina, sulfonamidas ou outros antibióticos estabelecidos para o mel, de acordo com os regulamentos da Comunidade Europeia. Apenas em casos excepcionais, a Direcção Geral de Veterinária pode autorizar na profilaxia da doença

o emprego de uma formulação antibiótica registada para uso veterinário (Figura 3) isoladamente ou em associação com tratamentos alternativos [11]. No entanto a recomendação actual das entidades responsáveis passa pela erradicação das colmeias sintomáticas, por incineração (Figura 4).

Em países, como os EUA, Canadá e Argentina, os tratamentos com antibióticos são permitidos, considerando-se um procedimento de rotina para evitar focos de Loque Americana [5]. No mercado americano existem três formulações de Terramicina (TM25, TM50D e TM100D) registadas para uso na prevenção da Loque Americana [12], no entanto, sempre que o uso de antibióticos seja autorizado, a sua aplicação não deve ser efectuada em colónias que visem a produção para consumo humano [12].



Figura 3 - Produto de uso veterinário utilizado em Portugal.



Figura 4 - Destruição de uma colónia infectada pelo *Paenibacillus larvae*.

Perante a ausência de produtos químicos compatíveis com a actividade apícola e o seu efeito prejudativo na saúde humana, a comunidade científica procura alternativas viáveis em métodos e produtos naturais, que permitam controlar a doença e a sua proliferação.

O “Shaking Method”, é um método biotecnológico aplicado ao enxame em casos de incidência significativa da doença. Este consiste em transferir as abelhas de uma colónia sintomática para outra colmeia, totalmente desinfectada e com quadros isentos de cera. Após alguns dias, em que as abelhas vão consumindo o mel infectado presente no sistema digestivo, os favos entretanto construídos são removidos, eliminando-se assim os esporos provenientes da colónia inicial. Este método reduz o número de esporos e evita a incidência de resíduos no mel e cera [10,13]. As desvantagens principais residem no maneiço exaustivo e no impacto monetário que

acarreta [13], não garantindo uma eficácia completa. O recurso a óleos essenciais, como o de canela, é outra das alternativas naturais para manter baixos os níveis de esporos na colónia [11,13].

Em relação à aplicação de antibióticos os mesmos podem surtir algum efeito sobre a bactéria mas também podem mascarar a doença e contribuir para a sua disseminação pois não apresentam efeito sobre os esporos [14].

Para a desinfecção do material contaminado estão descritas na literatura diversas alternativas. O método mais comum no seio dos apicultores, e que não acarreta tantos prejuízos aquando da incidência de Loque Americana nas colónias é a desinfecção do material em soda cáustica a temperaturas elevadas e/ou desinfecção com chama. [12]

A irradiação do material apícola é outra alternativa eficaz para matar os esporos da Loque Americana. Os raios gama penetram nas células e rompem as cadeias de DNA, afectando o crescimento bacteriano que não poderá ocorrer. É um tratamento isento de resíduos que permite a reutilização imediata de todo o material apícola e equipamento [15].

A aplicação dos referidos métodos aos enxames e ao material apícola não garante ainda um controlo satisfatório na apicultura mundial, perante a facilidade de propagação da doença, sendo por isso a solução mais viável e satisfatória a curto prazo a destruição de todo o material infectado, mas com um custo muito elevado [11,16].

1.1.2 - Maneio apícola

A incineração da colónia apresenta um impacto económico muito elevado para a maioria dos apicultores causando o descontentamento e inflacionando os custos da actividade apícola das explorações. Apesar disso e da importância da Loque Americana entre as doenças das abelhas, não existem actualmente métodos que permitam detectá-la precocemente [7]. Deste modo, é ao apicultor que cabe o ónus de reduzir os custos através da opção de medidas de maneio preventivo, constantes, evitando a proliferação e reduzindo os níveis de contaminação.

Algumas das operações de maneio apícola a implementar passam por: (i) verificar a sintomatologia das colónias duas vezes por ano durante a primavera e outono; (ii) organizar as colmeias no apiário de modo a que deriva das abelhas seja

reduzida, ao mínimo; (iii) substituir anualmente quadros de criação com cera e quadros desinfectados; (iv) recusar enxames de origem desconhecida; (v) não transferir quadros entre colónias ou dividir colónias, sem que antes se verifique com cuidado os sintomas da Loque Americana; (vi) não alimentar as abelhas com mel ou pólen de uma fonte desconhecida. No que se refere ao material deve-se evitar adquirir material velho, pois pode estar infectado, e eliminar todo o material apícola contaminado, desinfectando todos os utensílios com fogo, álcool ou soda cáustica [10]. A remoção de colónias fracas ou mortas no apiário é uma operação a realizar logo que seja detectada a Loque Americana, de forma a evitar a pilhagem e consequentemente a proliferação da contaminação.

1.2 - Própolis

A própolis é uma combinação de substâncias resinosas e balsâmicas de consistência viscosa e cor escura [17] que é coletada pelas abelhas a partir de rebentos, cascas de árvores [18], flores e exsudados [19], e transportada para o interior da colméia, onde é modificada pelas abelhas com adição de ceras, polen e secreções salivares. O termo própolis deriva do Grego “pro” (em defesa de) e “polis” (cidade ou comunidade), isto é, substância em defesa da colónia [17,20].

As abelhas utilizam a própolis para diversas finalidades na colmeia, tais como proteger o seu interior, para desinfeção dos favos, preencher fendas, reduzir o tamanho das entradas, como isolante térmico e consolidação dos componentes estruturais [17,19]. A própolis é também usada para embalsamar os corpos de predadores (besouros, roedores, pequenos lagartos) que entram na colméia, mas que as abelhas não conseguem transportar para o exterior da colmeia, impedindo desta forma a sua decomposição e putrefação [17,19,21].

Devido à variabilidade dos factores envolvidos na produção da própolis, é de esperar que as propriedades físico-químicas sejam variáveis reflectindo-se na sua actividade e nas propriedades farmacológicas. É por isso importante conhecer a sua composição e identificar os constituintes responsáveis pelos seus efeitos [1].

1.2.1 - Origem botânica

A própolis é colectada nas folhas e caules de praticamente qualquer fonte vegetal abundante na área envolvente da colmeia, seja de choupo, eucalipto, pinheiro, castanheiro, carvalho, betula, salgueiro e demais existentes. Nas zonas temperadas, a resina da própolis vem principalmente do exsudato de botões florais de álamo de choupos pertencentes ao gênero *Populus spp.* Nas áreas mais tropicais a própolis é obtida a partir de outras plantas [22]. O própolis verde do Brasil é internacionalmente reconhecido pela sua composição particular resultante da recolha de resinas a partir de folhas de algumas espécies de *Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria* e *Eucalyptus* [23], enquanto a recolha na Venezuela e Cuba recai em plantas resinosas do gênero *Clusia*, originando uma própolis vermelha. No Canadá está descrito que as abelhas são capazes de encontrar outras fontes vegetais de própolis na ausência da sua fonte preferida *P. nigra L.*, nas regiões do norte da América do Norte [24]. Essas fontes foram identificadas como *P. trichocarpa (Sec. Tacamahaca)* e *P. tremuloides* [24]. Na zona Norte da Rússia a recolha é efectuada a partir de botões de bétula (*Betula verrucosa*) e *P.tremula* [25]. Na Turquia a própolis provém de *Populus sp.*, *Eucalyptus sp.* e *Castanea sativa* [26]. Já em zonas Mediterrânicas como Portugal os choupos e as folhas de *Cistus spp.* são as duas espécies maioritárias descritas como fontes de resina. Esta diversidade de origem floral, reflecte-se na complexidade da composição da própolis, mas por outro lado serve como marcador da origem botânica e geográfica [22]. Em situações extremas de ausência de substâncias resinosas, as abelhas recorrem inclusivé à captação de tintas, alcatrão das estradas e óleos minerais para o interior da colmeia que podem colocar em dúvida o uso farmacológico da própolis [17].

1.2.2 – Composição

A composição da própolis varia qualitativa e quantitativamente de acordo com a origem geográfica, botânica, época de colheita e até mesmo a hora do dia em que as abelhas recolhem a resina [27]. Os componentes principais são resinas e bálsamos, com um elevado teor ($\pm 50\%$) em compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres), um conteúdo variável em ceras (7,5-35%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outras substâncias (4,4-19,5%). Adicionalmente, poderá também encontrar-se

pequenas quantidades de terpenos, taninos e secreções das glândulas salivares das abelhas, assim como, possíveis contaminantes.

A maioria dos estudos que se encontram na literatura não pretendem determinar a composição química da própolis, mas principalmente identificar os componentes activos da própolis incluindo, as flavonas, flavonóis, flavanonas e dihidroflavonóis. de interesse, em particular os flavonóides [22]. Actualmente mais de 300 compostos, entre os quais, polifenóis, terpenóides, esteróides, açúcares e aminoácidos foram detectados na própolis [27]. Em particular, na própolis portuguesa foram identificados 37 compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos e flavonóides característicos de zonas temperadas, mas também vários compostos nunca referidos noutras amostras [28]. Os flavonóis crisina e apigenina, e a flavanona naringenina são os compostos predominantes em amostras de própolis Turco [28]. Já na própolis da Anatólia, flavonóides como a pinocembrina, quercetina, naringenina, galangina e crisina foram os principais compostos identificados. Em amostras de Teerão as flavanonas como a pinobanksina, acetato 3-*O*-pinobanksina, pinocembrina e flavonas como a crisina e galangina são os componentes principais [29]. Nas regiões tropicais, como o Brasil, onde a própolis provém de outras fontes vegetais, como a *Araucaria*, *Baccharis* e *Eucalyptus*, a composição das amostras é totalmente distinta das zonas temperadas, encontrando-se os flavonóides em pequenas quantidades. Nestas amostras os principais compostos bioactivos são essencialmente ácidos fenólicos, terpenóides específicos e derivados prenilados [23].

1.2.3 - Aplicações

A utilização da própolis remete à antiguidade, introduzida nos remédios da medicina popular em muitas partes do mundo [19]. Os primeiros registos da utilização da própolis envolveram o seu uso na mumificação dos antigos egípcios, no tratamento de infecções e inchaços pelos Assírios. Mais tarde os gregos antigos, especialmente Aristóteles, Dioscorides e Hipócrates, descreveram a utilidade medicinal da própolis em cicatrizações internas e externas [30].

Actualmente, é um produto natural de extraordinário interesse no campo da medicina humana, veterinária [31] e na indústria farmacêutica [22]. Encontra-se na composição de produtos farmacêuticos e cosméticos, como em cremes anti-acne, cremes faciais, pomadas, loções e soluções [19], particularmente devido á sua

composição fenólica. Na literatura pode-se encontrar uma enorme variedade de resultados descrevendo as inúmeras actividades biológicas observadas experimentalmente *in vitro* [5] e *in vivo* [3,4], incluindo antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral [20,26-29,32-42], dermatológica, odontológica, ortopédica [19], antibiótica, antitumoral [43], hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anti-HIV [44], na prevenção de diabetes [45], cancro, disfunções cardiovasculares, tratamento de inflamações [28], na luta contra a Leishmaniose [23,46,47] e regeneradora de tecidos através de aplicações tópicas que é um dos seus usos mais populares no presente [48].

Muito recentemente surgiu na literatura a exploração da actividade anti-microbiana da própolis ao nível do controlo da infecção de colónias de abelhas melíferas por Loque Americana. Os resultados obtidos com extractos de propolis apresentaram *in vitro* um efeito inibidor do crescimento dos esporos, verificando-se uma variação das performances consoante a proveniência do própolis. Ao nível dos ensaios de campo verificou-se que a dosagem mais adequada para aplicação do extracto etanólico de propolis será de um xarope de 2:1 açúcar/água com uma concentração em extracto de 6%. A aplicação sobre a forma de alimento, após a época de cresta, mostrou-se mais eficiente do que a pulverização sobre as abelhas, reduzindo os níveis de infestação de 100% para 0% ao final de 85 dias após a aplicação [3-5].

1.3 - Objectivos

O presente estudo pretende avaliar, *in vivo*, a eficácia, da aplicação de xaropes contendo extractos etanólicos de própolis Português (PEE), no controlo dos níveis de esporos de *Paenibacillus larvae*, em colónias doentes mas assintomáticas

O trabalho tem como base os resultados reportados *in vitro* e *in vivo* pela comunidade científica [3-5], os quais se pretendem reproduzir nas condições edafoclimáticas regionais Portuguesas. A eficiência dos tratamentos com própolis será avaliada pela determinação do número de esporos de *Paenibacillus larvae* contidos no mel, determinado por crescimento das bactérias num meio selectivo e confirmando-se a identidade das bactérias por técnicas de biologia molecular, PCR. Os xaropes a aplicar nas colónias serão preparados com extractos de própolis obtidos em diferentes condições de extracção. Estes extractos serão caracterizados ao nível da sua composição em ceras, resíduo seco e em particular na sua composição fenólica. Será

ainda avaliada a actividade biológica dos extractos em termos do poder redutor e capacidade de bloqueamento de radicais livres.

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Procedimentos de campo

2.1.1 - Amostragem

2.1.2 - Vitalidade

2.1.3 - Instalação de apiários experimentais

2.1.4 - Aplicação dos extratos etanólicos de própolis

2.2 - Procedimentos laboratoriais

2.2.1 - Optimização da metodologia de crescimento e quantificação de esporos

2.2.2 - Confirmação do *Paenibacillus larvae* por PCR

2.2.3 - Extractos etanólicos de própolis

2.2.4 - Resíduo seco

2.2.5 - Ceras

2.2.6 - Fenóis totais

2.2.7 - Flavonas e flavonóis

2.2.8 - Flavanonas e di-hidroflavonóis

2.2.9 - Perfil fenólico

2.2.10 - Capacidade bloqueadora de radicais livres - DPPH

2.2.11 - Poder redutor

Neste capítulo faz-se a descrição dos materiais e procedimentos utilizados ao longo do trabalho. Esta descrição está organizada conforme as operações se reportam a trabalhos de campo ou de execução laboratorial.

2.1 - Procedimentos de campo

A execução do estudo no campo inclui a recolha de amostras de mel provenientes de apiários com colónias assintomáticas, pré-seleccionadas e identificadas pelas diversas equipas técnicas de cada uma das Associações/Cooperativas de apicultores. Após a análise das amostras e com base na vitalidade, sintomatologia e número de esporos, procedeu-se à instalação dos apiários experimentais com 15 colónias da pré-selecção, distribuídas por três grupos homogéneos. Depois da instalação, cada grupo foi sujeito ao tratamento apropriado com alimentação artificial contendo extracto de própolis. A avaliação sintomatológica de cada colónia foi efectuada ao longo do tempo à medida que se recolhiam amostras de mel e se procedia à quantificação de esporos para avaliar a eficácia dos extractos etanólicos de própolis na inibição do *Paenibacillus larvae*.

2.1.1 - Amostragem

A recolha de amostras ocorreu em duas fases, a primeira com vista à pré-selecção de colónias para o ensaio, e a segunda após a aplicação dos tratamentos para avaliação da sua eficiência. Para a selecção das colónias a integrar nos ensaios, foi necessário recolher amostras de mel, em colónias situadas em apiários onde foram registados casos sintomáticos de Loque Americana nos últimos dois anos. Para a selecção destes apiários foram seguidas as orientações das entidades gestoras das zonas controladas e da Direcção Geral de Veterinária, considerada a sua localização no território nacional, mas também o interesse demonstrado pelas entidades gestoras para a realização dos ensaios de campo.

As zonas controladas de doenças são áreas geográficas reconhecidas pelo director geral de veterinária, geridas por organizações de apicultores legalmente constituídas, e desde que estas organizações integrem um número de apicultores igual ou superior a 60% dos registados naquela área geográfica, ou que, representem 60% do total das colmeias existentes nessa área. Os apicultores cujos apiários estejam

implantados nestas zonas controladas são obrigados às disposições do Decreto-Lei nº 203/2005, Artº 13º, ponto 1.

A recolha de mel, cerca de 80 gramas foi realizada nos quadros de criação de colónias sem sintomas visíveis de doença, e utilizando material descartável ou desinfectado para cada recolha, figura 5.



Figura 5 - Amostragem de colónias assintomáticas.

As amostras foram conservadas no frio até envio ao laboratório para quantificação dos esporos de *P. Larvae*. Para a avaliação do nível de esporos ao longo do tempo foram recolhidas amostras de mel em todas as colónias no dia de aplicação dos tratamentos e repetido 21, 42 e 84 dias após a primeira aplicação. Esta recolha foi executada como descrito anteriormente.

Neste trabalho colaboraram a Apilegre, a Associação dos Apicultores da Região de Leiria, a Associação dos Apicultores do Parque Natural de Montesinho, a Cooperativa Agrícola de Boticas e a Montimel, entidades gestoras das “Zonas Controladas”, identificadas na figura 6.

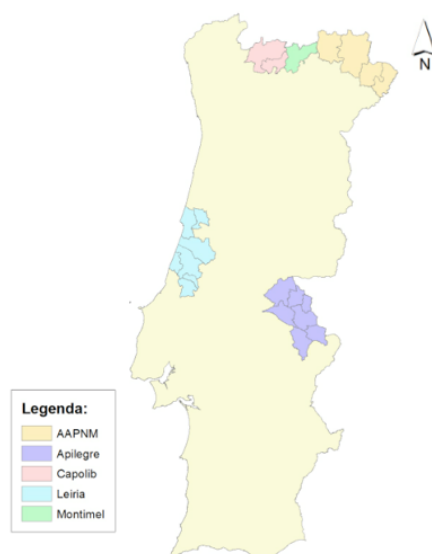


Figura 6 - Localização geográfica das zonas controladas colaborantes.

2.1.2 – Vitalidade

Durante o processo de selecção das colónias, mas também ao longo da execução do trabalho foi necessário avaliar a presença de sintomas da doença e a vitalidade da colónia.

A identificação sintomatológica de cada colónia passou por identificar *in situ* os sintomas característicos da Loque Americana como a cõncavidade e cor da cera dos opérculos, o odor a cola de sapateiro, a criação em mosaico e a realização do teste com um palito para avaliação da presença de larvas decompostas com filamento viscoso, como se pode constatar na figura 5. A presença de sintomas de Loque Americana determinará a exclusão da colónia do estudo.

A vitalidade, foi calculada através da avaliação da quantidade de abelhas adultas e de criação, considerando-se para o efeito a inspecção dos quadros 2, 4, 6 e 8. Em cada um destes quadros, foi identificado o grau de cobertura por abelhas/criação para uma das faces, atribuindo-se um valor de 0 (0%) a 4 (100%) e aplicando-se a fórmula seguinte:

$$Vitalidade = \left(\sum A + \sum C \right) \times 5$$

sendo que *A* corresponde ao valor atribuído para a cobertura de cada face por abelhas adultas e *C* corresponde ao valor atribuído para a cobertura de cada face por criação.

A vitalidade das colónias determinará a disposição nos grupos a instalar.

2.1.3 - Instalação de apiários experimentais

Em cada uma das zonas controladas colaboradoras foi instalado um apiário experimental para o estudo da eficiência dos extractos de própolis no controlo da Loque Americana. A localização do apiário foi definida pela entidade gestora da respectiva zona controlada. Cada um dos apiários experimentais foi constituído por 15 colónias assintomáticas dispostas em três grupos de 5 colónias de acordo com a avaliação sintomatológica, vitalidade e quantificação de esporos. Dois grupos são para avaliar a eficácia dos extratos etanólicos de própolis obtidos a 96% e 70% e o terceiro funcionando como controlo. Os respectivos apiários foram identificados pela colocação de uma placa mencionando as entidades colaboradoras e financiadora.

2.1.4 - Aplicação dos extratos etanólicos de própolis

A aplicação dos extractos de própolis nas colónias foi efectuada através da alimentação. Para tal foi preparada uma solução açucarada na proporção de 2:1 (açúcar/água) e adicionada uma solução de extracto etanólico de própolis (ver adiante) PEE, para uma concentração final de 6% de PEE. O xarope foi disponibilizado a cada uma das colónias dos grupos 1 e 2 através de um alimentador com capacidade de um litro, colocado sobre o ninho da colmeia, figura 7. A aplicação dos xaropes foi efectuada com extractos etanólicos de própolis obtidos a 96% e 70% [4]. No grupo 1 colocou-se extracto etanólico resultante da extracção com etanol a 96% e para o grupo 2, 70%. No grupo de controlo foi colocada solução açucarada isenta de qualquer extracto etanólico de própolis. O alimento foi colocado no alimentador dependendo da capacidade de consumo da colónia, até se atingir 2 litros. A aplicação não foi repetida, e ocorreu em épocas diferentes conforme a disponibilidade dos apiários experimentais.



Figura 7 - Aplicação da alimentação artificial.

2.2 - Procedimentos laboratoriais

Laboratorialmente o estudo incidiu numa primeira fase na optimização da metodologia de crescimento, quantificação de esporos e confirmação do *Bacillus Paenibacillus larvae* por PCR. Estes trabalhos foram da responsabilidade do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia da Universidade do Minho [49]. Numa segunda fase procedeu-se à preparação dos extractos etanólicos de própolis e avaliação da sua composição, em termos do resíduo seco, teor em ceras, fenóis totais, perfil fenólico, flavonóis e flavonas, flavanonas e di-hidroflavonóis.

Finalmente, foi avaliado o poder redutor e a capacidade bloqueadora de radicais livres, duas propriedades descritivas da actividade biológica dos extratos.

2.2.1 - Optimização da metodologia de crescimento e quantificação de esporos

Para a avaliação correcta do *Paenibacillus larvae* foi necessário realizar uma optimização das condições de cultura mais adequadas ao crescimento, recorrendo-se a amostras de mel contaminadas. A recolha destas amostras foi efectuada especificamente num quadro de criação de uma colónia com os sintomas característicos de Loque Americana, ou seja, sintomática. Foram retirados deste quadro três amostras de mel e submetidas a diferentes condições experimentais, nomeadamente diferentes meios de cultura, adição de antibióticos de supressão, tempo de incubação para a activação dos esporos, factores de diluição do mel e condições de centrifugação. Foram utilizados os meios de cultura J-agar, MYPGP e PLA e avaliada a adição dos antibióticos ácido nalidíxico e ácido pipemídico.

As amostras de mel foram previamente diluídas e filtradas, sujeitas a um processo de centrifugação para libertação dos esporos e a um aquecimento a 80°C para activação dos esporos. O crescimento das bactérias foi efectuado no estado sólido, em quintuplicado, realizando a contagem das colónias após 2-4 dias de crescimento a 37°C.

Nesta fase de optimização, verificou-se a necessidade de diferenciar as colónias de bactérias correspondentes ao *bacillus Paenibacillus larvae* em análise, de outras bactérias não patogénicas presentes nas amostras de mel. A necessidade desta identificação tornou-se ainda mais evidente pelo facto do teste da catalase (utilizado frequentemente para identificação de *P. larvae larvae*, uma bactéria catalase-negativa) ter dado positivo para todas as colónias desenvolvidas nas amostras de mel analisadas nesta fase. Este método, apesar de usado na despistagem, tem sido alvo de discussão dado que foram descritas outras estirpes desta bactéria com reacções positivas no teste da catalase, como a *P. larvae pulvificiens*, também ela letal para as abelhas.

2.2.2 - Confirmação do *Paenibacillus larvae* por PCR

A confirmação do *bacillus* foi realizada através do desenvolvimento de primers específicos a partir de partes do gene 16SrDNA de *Paenibacillus larvae*. Com este objectivo foi feito o alinhamento e mapeamento da zona conservada e da zona aleatória deste gene, comparando-o com outros genes 16SrDNA das espécies *Paenibacillus* (*P. larvae*, *P. larvae pulvificiens*, *P. alvei*), e a espécie não patogénica

Bacillus subtilis. Os primers foram desenhados para que os produtos de PCR só surjam quando o gene 16SrDNA do *P. Larvae* está presente. Estes primers não têm homologia com o mesmo gene das espécies *P. Alvei* ou *B. subtilis*

O PCR foi realizado directamente nas colónias de *Paenibacillus larvae* das placas, em detrimento do isolamento prévio do DNA genómico da cultura, seguindo um protocolo apropriado. Após a abertura das células recolheu-se 2 μ L do sobrenadante, adicionando-se á mistura de PCR e aplicou-se o programa de temperaturas para a reacção.

2.2.3 - Extratos etanólicos de própolis

A própolis utilizada para o estudo foi adquirida comercialmente a apicultores nacionais da região centro (Leiria e Figueira da Foz). As duas amostras foram trituradas, homogeneizadas e limpas de impurezas resultantes do processo de recolha.

O processo de extracção foi efectuado através da mistura de 400g de própolis num litro de solução etanólica a 96% e 70%, incubando-se durante 10 dias à temperatura ambiente 22-25 °C , numa placa de agitação e protegida da luz, figura 8 [4]. Posteriormente, as misturas foram filtradas através de papel de filtro Albet (24 mm) e sujeitas ao evaporador rotativo (Butchi) de forma a eliminar o etanol e obter um extrato de consistência similar à do mel. Este extrato foi diluído posteriormente em etanol a 96% para uma concentração final de 10% de extrato, dando origem à solução inicial de extrato etanólico de própolis (PEE) [4].

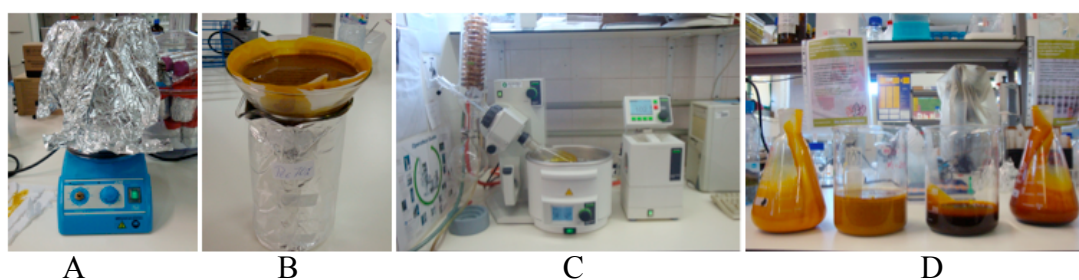


Figura 8 - Fases da extracção etanólica da própolis.

2.2.4 - Resíduo seco

O resíduo seco foi determinado segundo o método descrito na literatura [50]. Aproximadamente 1,5 g de extracto etanólico de própolis (PEE) foram pesadas num vidro de relógio (previamente seco a massa constante) e evaporando-se o solvente

numa placa de aquecimento a ± 40 °C. De seguida, colocou-se na estufa a 105 °C durante 3 h, transferindo-se o resíduo seco para um exsiccador com sílica gel anidra onde arrefeceu. Por fim procedeu-se à pesagem do vidro de relógio para determinação da percentagem do resíduo seco. Todas as medições foram realizadas em duplicado.

2.2.5 - Ceras

O conteúdo em ceras foi determinado segundo o método descrito na literatura [51] com algumas modificações. Uma amostra de extrato etanólico de própolis (5mL) foi evaporada à secura sob pressão reduzida num evaporador rotativo. Do extracto foi retirada uma quantidade, pesada ($\pm 1,5$ g) e colocada num soxhlet, para extracção com *n*-hexano, durante 3 h. O extracto foi levado à secura, à temperatura de 40 °C. Após secar para uma massa constante, o balão com o resíduo foi pesado e o conteúdo em ceras finais expresso em percentagem de PEE.

2.2.6 - Fenóis totais

O conteúdo em fenóis totais nos extractos etanólicos de própolis foi efectuado segundo o método descrito na literatura [52]. A uma alíquota (0,5 mL) de extracto etanólico de própolis diluído (0,05 mg/mL) foi adicionado o reagente de Folin-Ciocalteu's (0,25 mL). Após 3 min, adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio, ajustando o volume final a 5 mL com água desionizada. A mistura foi aquecida durante 10 min a 70 °C, e colocada no escuro durante 30 minutos. Após este período a absorvância foi medida a 700 nm (espectofotómetro Analytikijena 200-2004). Para a medição do branco efectuou-se o mesmo procedimento usando 0,5 mL de etanol a 96%, em detrimento da solução de PEE. Para o traçado da curva de calibração (1-30 µg/mL) usou-se como padrão uma mistura de ácido cafeico: quercetina: naringenina (1:1:1). Para cada amostra efectuaram-se duas medições.

2.2.7 - Flavonas e flavonóis

O conteúdo em flavonas e flavonóis foi determinado segundo o método descrito na literatura com algumas modificações [50]. A uma alíquota (2 mL) de extracto etanólico de própolis (0,25 mg/mL) foi adicionada 0,2 mL de uma solução de cloreto de alumínio (2 % de cloreto de alumínio e 5 % de ácido acético glacial em

metanol) e o volume final ajustado, para 5 mL, com ácido acético 5 % em metanol. A solução repousou 30 min, no escuro, à temperatura ambiente, medindo-se de seguida a absorvância a 415 nm. Para a medição do branco efectuou-se o mesmo procedimento mas sem a adição de cloreto de alumínio. Como padrão, para o traçado da curva de calibração, usou-se uma solução de quercetina (flavonol) num intervalo de concentrações de 0,5-10 µg/mL. Para cada amostra efectuaram-se duas medições.

2.2.8 - Flavanonas e di-hidroflavonóis

As flavanonas e di-hidroflavonóis foram determinados segundo o método descrito na literatura [50] com modificações. A uma alíquota (0,5 mL) de extracto etanólico de própolis diluído (0,5 mg/mL) adicionou-se 1 mL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (0,5g de DNP em 1 mL de ácido sulfúrico a 96 %, perfazendo com metanol para um volume final de 50 mL) e 1 mL de metanol. Esta solução foi aquecida num banho termostatizado a 50 °C, durante 50 min com uma agitação de 100 rpm. Após este período, a solução foi colocada no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 min. Em seguida, foi adicionada 2,5 mL de uma solução de hidróxido de potássio a 10% (metanol/água 70:30). Após 2 min de incubação, adicionou-se 2,5 mL de metanol a 0,5 mL da solução e centrifugou-se a mistura a 5000 rpm durante 10 min. A absorvância foi medida a 495 nm. A solução do branco foi preparada de modo semelhante, mas não adicionando amostra. Como padrão para avaliação da curva de calibração (3-60 µg/mL) usou-se a naringenina (flavanona). Para cada amostra efectuaram-se duas medições.

2.2.9 - Perfil fenólico

Para avaliar o perfil fenólico dos extractos etanólicos de própolis utilizou-se a cromatografia líquida (HPLC) em fase reversa com detector de diodos, de acordo com o método descrito na literatura [53] com algumas modificações. A análise foi realizada num módulo de separação equipado com uma bomba Varian 9010, detector de diodos (DAD) Varian Pro Star e um forno para a coluna (modelo 7981). A aquisição de dados e controlo remoto do sistema de HPLC-DAD foi realizada pelo software Star Workstation versão 6.41 (Varian). A coluna utilizada foi uma Nucleosil C₁₈, em fase reversa, com um tamanho de 250 mm× 4 mm id e 5µm de diâmetro de partículas (Macherey-Nagel), acondicionada a uma temperatura de 30 °C. Para a fase

móvel utilizou-se uma mistura de eluentes composta por: (A) 0,1 % de ácido fórmico em água; (B) 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrilo, previamente filtrados e degaseificados. O gradiente começou com 80 % de A e 20 % de B, atingindo os 30 % de B aos 10 min, 40 % de B aos 40 min, 60 % de B aos 60 min e 90 % de B aos 80 min, seguido de retorno às condições iniciais. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min.

Na análise por HPLC, os extractos de própolis (10 mg/mL) foram dissolvidos em 80 % de etanol (1 mL). Todas as amostras foram filtradas através de membranas Whatman de nylon 0,2 µm. O volume injectado foi de 10 µL.

A identificação dos compostos presentes na amostra foi efectuada por comparação dos tempos de retenção e dos espectros obtidos no Diodo Array com padrões obtidos comercialmente e com os resultados descritos na literatura para uma amostra de própolis do nordeste, disponível na base de dados do laboratório [54].

2.2.10 - Poder redutor

O poder redutor foi determinado segundo o método de descrito na literatura [55]. 2,5 mL do extracto etanólico diluído (10-200 µg/mL) foram adicionados a tampão fosfato (2,5 mL, 0,2 mol/L, pH 6.6) e ferrocianeto de potássio (2,5 mL, 1%). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Após este tempo adicionou-se uma aliquota de ácido tricloroacético a 10% (2,5 mL) centrifugando-se de seguida a mistura a 3000 rpm durante 10 minutos. Da solução sobrenadante retirou-se 2,5 mL e dissolveu-se em igual volume de água, adicionando FeCl₃ (0,5 mL, 0.1%), e medindo a absorvância a 700 nm. Uma mistura de quercetina:crisina (1:1) foi utilizada como padrão. Todas as medições foram realizadas em duplicado.

2.2.11 - Avaliação do efeito bloqueador de radicais livres – DPPH

A avaliação do efeito bloqueador de radicais livres foi realizada através do radical DPPH, utilizando-se o procedimento descrito na literatura [56] com modificações: uma aliquota da solução de extracto diluído (0,08 mL) foi diluída em etanol a 80% a diferentes concentrações de extracto, adicionando-se a 0,150 mL de DPPH e 0,142 mL de etanol 80%. Todas as soluções foram preparadas no próprio dia. O ensaio foi realizado para soluções de extracto diluídas em 80% etanol, num intervalo de concentrações de 2,5 a 40 µg/mL. Após 45 minutos a absorvância foi medida a 515 nm. Como padrão utilizou-se uma mistura de compostos fenólicos

constituída por crisina e quercetina (1:1). O valor de EC_{50} foi calculado com base na redução de 50% da intensidade do sinal para o DPPH.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Apiários experimentais

3.1.1 - Amostragem - pré-selecção

3.1.2 - Confirmação do *Paenibacillus larvae* por PCR

3.1.3 - Quantificação de esporos

3.1.4 - Vitalidade

3.1.5 - Instalação dos apiários experimentais

3.2 – Eficiência dos tratamentos com extractos etanólicos de própolis

3.2.1 - Amostragem - eficiência

3.2.2 - Quantificação de esporos

3.3 – Caracterização dos extractos de própolis

3.3.1 - Resíduo seco

3.3.2 - Ceras

3.3.3 - Compostos fenóis totais

3.3.4 - Flavonas/Flavonóis

3.3.5 - Flavanonas/Di-hidroflavonóis

3.3.6 - Perfil fenólico

3.3.7 - Efeito bloqueador de radicais livres – DPPH

3.3.8 - Poder redutor

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos apiários experimentais das respectivas zonas colaborantes, a quantificação de esporos, a confirmação do *Paenibacillus larvae* e no último sub-capítulo a caracterização química dos extractos etanólicos da própolis em resíduo seco, ceras, flavonas, flavanonas, perfil fenólico, capacidade bloqueadora de radicais livres e poder redutor.

3.1 – Apiários experimentais

3.1.1 – Amostragem - pré-selecção

Com base na informação disponibilizada pelas entidades responsáveis pelas zonas controladas e identificados os apicultores que nos últimos anos foram afectados pela Loque Americana, procedeu-se a uma visita aos apiários na presença dos apicultores e do técnico da associação para recolha de amostras. Foram inspeccionadas 208 colónias em 19 apiários, nas zonas controladas intervenientes, figura 9. Nestas inspecções detectou-se 22 colónias sintomáticas, correspondendo a 11% do total amostrado, com maior incidência de casos na região de Nisa, Chaves e Bragança.

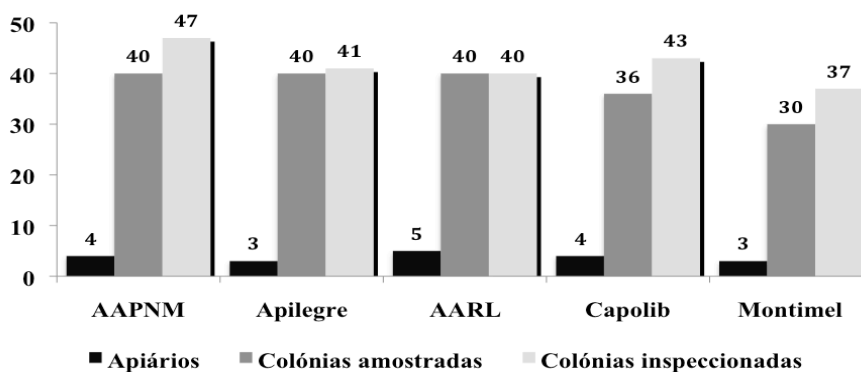


Figura 9 - Amostragem efectuada na pré-selecção.

As amostras recolhidas foram identificadas, conservadas a $\pm 4^{\circ}$ C e remetidas para o Instituto de Bioengenharia e Biotecnologia da Universidade do Minho para identificação e quantificação do nível de esporos de *Paenibacillus larvae*.

3.1.2 - Confirmação do *Paenibacillus larvae* por PCR

Nas condições de crescimento seleccionadas (capítulo 2.2.1), foi possível verificar com alguma frequência o surgimento de colónias de bactérias com diferentes características. Por essa razão foi imperativo certificar a presença do bacillus *P. larvae*. A figura 10 é exemplificativa de um gel de agarose relativo aos produtos de um ensaio de confirmação por PCR. Para a preparação deste ensaio efectuou-se o crescimento do material genético recolhido em duas amostras de mel provenientes de colónias sintomáticas, linhas 3/4 e 7/8 da figura 10, e em duas amostras de larvas, decompostas, infectadas por *P. Larvae*, linhas 5/6 e 9/10 da figura 10. Como controlo positivo utilizou-se duas combinações de primers diferentes (gen. DNA de *P. larvae* estirpe DSM 7030), linhas 1 e 2. resultantes do patogénico *P. Larvae*. A semelhança obtida na figura 10, entre as amostras e os controlos positivos, para ambos os primers, permite concluir com certeza que as bactérias em análise pertencem ao *Paenibacillus larvae*.

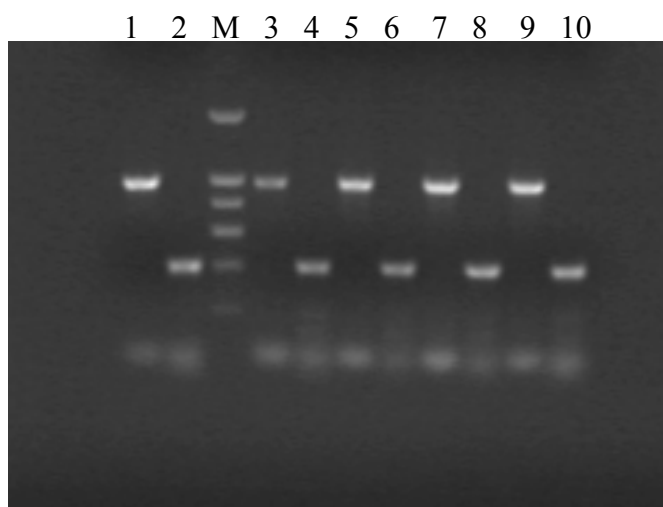


Figura 10 - Gel de agarose para confirmação do *Paenibacillus larvae* por PCR. 1/2 controlo positivo com duas combinações de primers diferentes; linhas 3/4 amostra de mel da colónia TF47; 5/6 amostra de larvas infectadas da colónia TF47; linhas 7/8 amostra de mel da colónia TF49; 9/10 amostra de larvas infectadas da colónia TF49.

3.1.3 – Quantificação de esporos

Com base nos resultados de confirmação foi possível com segurança efectuar a quantificação dos esporos de *P. Larvae*. Esses resultados encontram-se expressos nas tabelas seguintes, evidenciando-se a identificação das colónias, o número de unidades

formadoras de colónias (UFC) por cada 20 mL e o respectivo resultado negativo/contaminado.

Tabela 1 - Quantificação de esporos de *Paenibacillus larvae* nas zonas controladas de Nisa e Leiria.

| Apilegre | | | AARL | | |
|----------|-----------|-------------|---------|-----------|-------------|
| Amostra | UFC/20 mL | Resultado | Amostra | UFC/20 mL | Resultado |
| AL_01 | 24 | Contaminado | RL_01 | 0 | Negativo |
| AL_02 | 2 | Contaminado | RL_02 | 0 | Negativo |
| AL_03 | 0 | Negativo | RL_03 | 0 | Negativo |
| AL_04 | 308 | Contaminado | RL_04 | 0 | Negativo |
| AL_05 | 511 | Contaminado | RL_05 | 0 | Negativo |
| AL_06 | 6 | Contaminado | RL_06 | 0 | Negativo |
| AL_07 | 15 | Contaminado | RL_07 | 0 | Negativo |
| AL_08 | 2 | Contaminado | RL_08 | 0 | Negativo |
| AL_09 | 5 | Contaminado | RL_09 | 0 | Negativo |
| AL_10 | 33 | Contaminado | RL_10 | 0 | Negativo |
| AL_11 | 2 | Contaminado | RL_11 | 0 | Negativo |
| AL_12 | 0 | Negativo | RL_12 | 0 | Negativo |
| AL_13 | 1 | Contaminado | RL_13 | 0 | Negativo |
| AL_14 | 8 | Contaminado | RL_14 | 0 | Negativo |
| AL_15 | 112 | Contaminado | RL_15 | 0 | Negativo |
| AL_16 | 2732 | Contaminado | RL_16 | 0 | Negativo |
| AL_17 | 1 | Contaminado | RL_17 | 0 | Negativo |
| AL_18 | 0 | Negativo | RL_18 | 0 | Negativo |
| AL_19 | 3 | Contaminado | RL_19 | 0 | Negativo |
| AL_20 | 2 | Contaminado | RL_20 | 0 | Negativo |
| AL_21 | 428 | Contaminado | RL_21 | 0 | Negativo |
| AL_22 | 24 | Contaminado | RL_22 | 0 | Negativo |
| AL_23 | 49 | Contaminado | RL_23 | 0 | Negativo |
| AL_24 | 25 | Contaminado | RL_24 | 0 | Negativo |
| AL_25 | 0 | Negativo | RL_25 | 0 | Negativo |
| AL_26 | 0 | Negativo | RL_26 | 0 | Negativo |
| AL_27 | 1 | Contaminado | RL_27 | 0 | Negativo |
| AL_28 | 4 | Contaminado | RL_28 | 0 | Negativo |
| AL_29 | 11 | Contaminado | RL_29 | 0 | Negativo |
| AL_30 | 4 | Contaminado | RL_30 | 0 | Negativo |
| AL_31 | 32 | Contaminado | RL_31 | 0 | Negativo |
| AL_32 | 0 | Negativo | RL_32 | 3 | Contaminado |
| AL_33 | 0 | Negativo | RL_33 | 0 | Negativo |
| AL_34 | 0 | Negativo | RL_34 | 0 | Negativo |
| AL_35 | 214 | Contaminado | RL_35 | 0 | Negativo |
| AL_36 | 279 | Contaminado | RL_36 | 3 | Contaminado |
| AL_37 | 0 | Negativo | RL_37 | 12 | Contaminado |
| AL_38 | 46 | Contaminado | RL_38 | 0 | Negativo |
| AL_39 | 27 | Contaminado | RL_39 | 0 | Negativo |
| AL_40 | 158 | Contaminado | RL_40 | 0 | Negativo |

Tabela 2 - Quantificação de esporos de *Paenibacillus larvae* nas zonas controladas de Bragança e Boticas.

| AAPNM | | | CAPOLIB | | |
|---------|-----------|-------------|---------|-----------|-------------|
| Amostra | UFC/20 mL | Resultado | Amostra | UFC/20 mL | Resultado |
| TF_01 | 0 | Negativo | CL_01 | 10 | Contaminado |
| TF_02 | 45 | Contaminado | CL_02 | 0 | Negativo |
| TF_03 | 0 | Negativo | CL_03 | 0 | Negativo |
| TF_04 | 0 | Negativo | CL_04 | 0 | Negativo |
| TF_05 | 4 | Contaminado | CL_05 | 0 | Negativo |
| TF_06 | 4 | Contaminado | CL_06 | 0 | Negativo |
| TF_07 | 19 | Contaminado | CL_07 | 46 | Contaminado |
| TF_08 | 0 | Negativo | CL_08 | 0 | Negativo |
| TF_09 | 0 | Negativo | CL_09 | 0 | Negativo |
| TF_10 | 33 | Contaminado | CL_10 | 308 | Contaminado |
| TF_11 | 31 | Contaminado | CL_11 | 0 | Negativo |
| TF_12 | 17 | Contaminado | CL_12 | 0 | Negativo |
| TF_13 | 0 | Negativo | CL_13 | 0 | Negativo |
| TF_14 | 0 | Negativo | CL_14 | 0 | Negativo |
| TF_15 | 3 | Contaminado | CL_15 | 0 | Negativo |
| TF_16 | 4 | Contaminado | CL_16 | 3 | Contaminado |
| TF_17 | 13 | Contaminado | CL_17 | 0 | Negativo |
| TF_18 | 0 | Negativo | CL_18 | 0 | Negativo |
| TF_19 | 10 | Contaminado | CL_19 | 0 | Negativo |
| TF_20 | 14 | Contaminado | CL_20 | 221 | Contaminado |
| TF_21 | 0 | Negativo | CL_21 | 650 | Contaminado |
| TF_22 | 0 | Negativo | CL_22 | 261 | Contaminado |
| TF_23 | 0 | Negativo | CL_23 | 0 | Negativo |
| TF_24 | 0 | Negativo | CL_24 | 570 | Contaminado |
| TF_25 | 0 | Negativo | CL_25 | 629 | Contaminado |
| TF_26 | 0 | Negativo | CL_26 | 284 | Contaminado |
| TF_27 | 0 | Negativo | CL_27 | 0 | Negativo |
| TF_28 | 0 | Negativo | CL_28 | 0 | Negativo |
| TF_29 | 139 | Contaminado | CL_29 | 130 | Contaminado |
| TF_30 | 0 | Contaminado | CL_30 | 0 | Negativo |
| TF_31 | 0 | Negativo | CL_31 | 0 | Negativo |
| TF_32 | 1020 | Contaminado | CL_32 | 0 | Negativo |
| TF_33 | 1 | Contaminado | CL_33 | 41 | Contaminado |
| TF_34 | 34 | Contaminado | CL_34 | 0 | Negativo |
| TF_41 | 138 | Contaminado | CL_35 | 0 | Negativo |
| TF_42 | 1000 | Contaminado | CL_36 | 0 | Negativo |
| TF_43 | 467 | Contaminado | | | |
| TF_44 | 5 | Contaminado | | | |
| TF_45 | 60 | Contaminado | | | |

Tabela 3 - Quantificação de esporos de *Paenibacillus larvae* na zona controlada de Chaves.

| Montimel | | |
|-----------------|------------------|------------------|
| Amostra | UFC/20 mL | Resultado |
| MT_01 | 26 | Contaminado |
| MT_02 | 2992 | Contaminado |
| MT_03 | 0 | Negativo |
| MT_04 | 207 | Contaminado |
| MT_05 | 66 | Contaminado |
| MT_06 | 47 | Contaminado |
| MT_07 | 0 | Negativo |
| MT_08 | 32 | Contaminado |
| MT_09 | 0 | Negativo |
| MT_10 | 317 | Contaminado |
| MT_11 | 455 | Contaminado |
| MT_12 | 12 | Contaminado |
| MT_13 | 2980 | Contaminado |
| MT_14 | 1528 | Contaminado |
| MT_15 | 0 | Negativo |
| MT_16 | 5136 | Contaminado |
| MT_17 | 54 | Contaminado |
| MT_18 | 28 | Contaminado |
| MT_19 | 0 | Negativo |
| MT_20 | 505 | Contaminado |
| MT_21 | 14 | Contaminado |
| MT_22 | 0 | Negativo |
| MT_23 | 11 | Contaminado |
| MT_24 | 0 | Negativo |
| MT_25 | 0 | Negativo |
| MT_26 | 0 | Negativo |
| MT_27 | 0 | Negativo |
| MT_28 | 0 | Negativo |
| MT_29 | 6 | Contaminado |
| MT_30 | 3 | Contaminado |

A quantificação de esporos nas amostras identificadas permitiu realizar uma selecção prévia de colónias a instalar em cada um dos apiários experimentais nas respectivas zonas controladas colaborantes. Das análises efectuadas o maior índice de incidência de *Paenibacillus larvae* verificou-se na região de Nisa com níveis de contaminação de 77,5%, seguindo-se a região de Chaves com 63,3%, Bragança com 57,5%, Boticas com 30,5% e por último a região de Leiria com 7,5%.

3.1.4 - Vitalidade

Para efectuar uma distribuição homogénea das colónias pelos grupos em avaliação realizou-se, para além da contagem do nível de esporos, a avaliação do vigor da colónia. O quadro da tabela 4 resume os resultados encontrados para a vitalidade das 15 colónias seleccionadas para o estudo na região de Bragança, segundo a equação do capítulo 2.1.2. Os valores obtidos variam entre um máximo de 50 e um mínimo de 10, sendo que algumas colónias não apresentavam criação, mas em todas foi verificada a presença da rainha. Com base nestes valores e no nível de esporos de *P. Larvae*, efectuou-se uma distribuição pelos grupos como consta na tabela 4. O mesmo tipo de avaliação foi considerado nos restantes apiários.

Tabela 4 – Vitalidade das colónias seleccionadas em Bragança, e sua distribuição pelos grupos de estudo.

| | Quantificação de esporos | | Vitalidade | | | | | | | | Total |
|----------|--------------------------|----------|------------|------|------|------|---------|------|------|------|-------|
| | Amostra | UFC/20ml | Abelhas | | | | Criação | | | | |
| | | | 2 | 4 | 6 | 8 | 2 | 4 | 6 | 8 | |
| Grupo 1 | TF_32 | 1020 | 0,00 | 0,50 | 1,75 | 1,25 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 17,5 |
| | TF_13 | 60 | 3,00 | 2,50 | 2,50 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 50 |
| | TF_02 | 45 | 0,00 | 2,00 | 1,25 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 26,25 |
| | TF_04 | 33 | 0,50 | 2,00 | 1,25 | 0,50 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 23,75 |
| | TF_11 | 31 | 1,50 | 1,25 | 0,25 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 20 |
| Grupo 2 | TF_42 | 1000 | 1,50 | 1,25 | 1,00 | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 1,25 | 0,00 | 27,5 |
| | TF_29 | 139 | 0,00 | 2,25 | 2,50 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 1,25 | 0,00 | 40 |
| | TF_08 | 45 | 0,75 | 2,25 | 2,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 30 |
| | TF_10 | 33 | 1,00 | 1,50 | 2,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 27,5 |
| | TF_26 | 33 | 2,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 1,50 | 1,50 | 0,00 | 0,00 | 30 |
| Controlo | TF_28 | 1420 | 0,00 | 1,25 | 2,50 | 1,50 | 0,00 | 0,00 | 1,25 | 0,00 | 32,5 |
| | TF_03 | 40 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 10 |
| | TF_34 | 34 | 0,00 | 1,25 | 1,50 | 1,25 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 20 |
| | TF_24 | 20 | 0,00 | 0,25 | 2,50 | 3,25 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 35 |
| | TF_09 | 20 | 0,00 | 1,00 | 1,25 | 0,50 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 13,75 |

3.1.5 - Instalação dos apiários experimentais

Após a selecção e avaliação das colónias procedeu-se à instalação definitiva. Em Bragança a instalação realizou-se em Novembro de 2009, em Nisa e Chaves em Março/Abril de 2010 e em Boticas, Agosto de 2010. As colónias foram localizadas de acordo com as coordenadas assinaladas na figura 11.

Em Leiria, efectuou-se a instalação de um apiário provisório com 15 colmeias mas que não revelaram níveis de contaminação adequados que permitisse prosseguir os estudos. Em Chaves, após a selecção das colónias verificou-se que 4 desenvolveram sintomas de Loque Americana, pelo que, o estudo prosseguiu apenas com 11 colónias. As colónias seleccionadas foram colocadas em grupos de cinco colónias, dois para aplicação de solução açucarada com os extractos de própolis obtidos a 96% ou 70% de etanol e um como grupo de controlo, onde apenas se aplicou a solução açucarada.



Apiário experimental de Boticas
(41°41'23.27''N – 7°44'11.10''W)



Apiário experimental de Bragança
(41°54'52.61''N – 6°40'0.25''W)



Apiário experimental de Nisa
(39°38'31.64''N – 7°32'5.84''W)



Apiário experimental de Chaves
(41°43'8.01''N – 7°30'31.27''W)

Figura 11 - Localização e disposição de colónias nos apiários experimentais.

3.2 – Eficiência dos tratamentos com extractos etanólicos de própolis

3.2.1 – Amostragem - eficiência

Para controlar o nível de esporos nas colónias em estudo foi efectuada a recolha de amostras de mel nos quadros de criação, ao longo do decurso do ensaio, iniciando-se a partir da primeira aplicação de xarope, inclusivé, até se alcançarem os

84 dias. No apiário experimental de Bragança efectuou-se também uma amostragem 200 dias após a aplicação inicial. A recolha de amostras foi efectuada nas colónias que se mantiveram assintomáticas/vivas ao longo do tempo.

Na presença de colónias sintomáticas ou mortas, as mesmas, foram removidas e eliminadas do estudo, para evitar focos de pilhagem e possíveis propagações de Loque Americana para as demais colónias em estudo. O número de amostras efectuadas nos apiários experimentais nos tempos previstos e de acordo com a sintomatologia verificada *in situ* está expressa na tabela 5. A ausência de esporos nas colónias pré-seleccionadas em Leiria não nos permitiu prosseguir com a referida avaliação. O ensaio em Boticas está ainda em curso, não se discutindo por isso os resultados após a aplicação dos tratamentos.

Tabela 5 - Número de amostras recolhidas ao longo do ensaio.

| Zona Controlada | D_0 | D+21 | D+42 | D+84 | D+200 | Total |
|------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| AAPNM | 15 | 15 | 15 | 10 | 6 | 61 |
| Apilegre | 15 | 13 | 12 | 12 | - | 52 |
| Montimel | 11 | 11 | 11 | 8 | - | 41 |
| Total | | | | | | 154 |

3.2.2 - Quantificação de esporos

Os resultados da quantificação de esporos de *Paenibacillus larvae* nas amostras recolhidas nos diversos apiários experimentais estão expressos nas tabelas que se seguem de acordo com a região controlada correspondente. Os valores demonstram um decréscimo significativo do número de colónias de bactérias entre a fase de pré-selecção e o início do ensaio. Já entre a aplicação dos tratamentos e o dia 84, a contaminação de esporos é muito variável, não seguindo um padrão. Adicionalmente, verifica-se em todos os ensaios que a mortalidade de colónias é igual ou superior nos grupos 1 e 2 relativamente ao grupo de controlo, apontando possivelmente para alguma toxicidade do tratamento. No ensaio de Bragança, a mortalidade é ainda mais significativa, mas a razão pode ser consequência eventual de o mesmo ter sido efectuado durante o inverno, época com maior probabilidade de mortandade. Apesar dos registos técnicos apontarem para uma melhoria do estado das colónias após a aplicação dos extractos etanólicos de própolis nos dias que se seguiram, de facto, a quantificação de esporos não demonstra efectivamente este

efeito. A oscilação dos resultados e a interpretação dos mesmos não nos permite assim aclamar positivamente um efeito anti-bacteriano contra o *Paenibacillus larvae* nas condições experimentais aplicadas.

Podemos apenas evidenciar que o extracto obtido a 96% apresenta melhor acção no controlo/prevenção dos esporos em relação ao de 70%, pelo menor grau de incidência de esporos nas colónias no D+84, em todos os apiários experimentais.

Uma explicação para a oscilação do número de esporos no mel nos referidos períodos poderá estar relacionada com a data e o ponto de recolha na colmeia. Se por um lado, em épocas em que a quantidade de criação é reduzida ou nula, o grau de infestação deverá decrescer contaminando menos o mel, por outro lado, como o mel pode permanecer vários meses na colmeia operculado, a recolha de uma amostra de mel poderá não reflectir de facto a evolução da doença no interior da colmeia, mas o estado da colónia no momento da operculação desse mel [15].

Tabela 6 - Quantificação de esporos (UFC/20 mL) de *Paenibacillus larvae* em Chaves.

| | Amostra | Pré-selecção | D_0 | D+21 | D+42 | D+84 |
|------------------------------------|----------------|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Grupo 1 PEE (96%) | MT_01 | 26 | 7 | 20 | 283 | - |
| | MT_04 | 207 | 50 | 80 | 1000 | 0 |
| | MT_06 | 47 | 0 | 1 | 72 | 0 |
| | MT_13 | 2980 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | - | - | - | - | - | - |
| Grupo 2 PEE (70%) | MT_05 | 66 | 10 | 1000 | 1000 | 2 |
| | MT_08 | 32 | 2 | 2 | 6 | 0 |
| | MT_10 | 317 | 0 | 1 | 1000 | 0 |
| | MT_16 | 5136 | 2 | 2 | 0 | 4 |
| | - | - | - | - | - | - |
| Grupo Controlo | MT_17 | 54 | 3 | 0 | 1000 | 135 |
| | MT_18 | 28 | 0 | 2 | 0 | 9 |
| | MT_21 | 14 | 0 | 20 | 1000 | - |
| | - | - | - | - | - | - |
| | - | - | - | - | - | - |

Tabela 7 - Quantificação de esporos (UFC/20 mL) de *Paenibacillus larvae* em Bragança.

| | | Amostra | Pré-selecção | D_0 | D+21 | D+42 | D+84 | D+200 |
|----------------|------------------|----------------|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Grupo 1 | PEE (96%) | TF_02 | 45 | 11 | 47 | 0 | - | - |
| | | TF_04 | 33 | 0 | 111 | 59 | - | - |
| | | TF_11 | 31 | 38 | 2 | 4 | - | - |
| | | TF_13 | 60 | 1 | 0 | 15 | 0 | 0 |
| | | TF_32 | 1020 | 48 | 3 | 238 | 0 | 0 |
| Grupo 2 | PEE (70%) | TF_08 | 45 | 26 | 29 | 0 | 0 | - |
| | | TF_10 | 33 | 3 | 1 | 0 | 1 | - |
| | | TF_26 | 33 | 3 | 0 | 0 | - | - |
| | | TF_29 | 139 | 19 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| | | TF_42 | 1000 | 35 | 89 | 15 | - | - |
| Grupo | Controlo | TF_03 | 40 | 12 | 7 | 2 | 2 | 0 |
| | | TF_09 | 20 | 0 | 7 | 0 | - | - |
| | | TF_24 | 20 | 2 | 56 | 40 | 197 | 0 |
| | | TF_28 | 1420 | 2 | 0 | 5 | 1 | 0 |
| | | TF_34 | 34 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |

Tabela 8 - Quantificação de esporos (UFC/20 mL) de *Paenibacillus larvae* em Nisa.

| | | Amostra | Pré-selecção | D_0 | D+21 | D+42 | D+84 |
|----------------|------------------|----------------|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Grupo 1 | PEE (96%) | AL_06 | 6 | 0 | - | - | - |
| | | AL_10 | 33 | 0 | 0 | 11 | 0 |
| | | AL_21 | 428 | 6 | 17 | 0 | 0 |
| | | AL_22 | 24 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | | AL_40 | 158 | 0 | - | - | - |
| Grupo 2 | PEE (70%) | AL_04 | 308 | 4 | 25 | 372 | >1000 |
| | | AL_09 | 5 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| | | AL_24 | 25 | 8 | - | - | - |
| | | AL_35 | 214 | 132 | 16 | 0 | >1000 |
| | | AL_38 | 46 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Grupo | Controlo | AL_14 | 8 | 0 | 81 | 1 | 0 |
| | | AL_15 | 112 | 0 | 0 | 0 | >1000 |
| | | AL_31 | 32 | 0 | 0 | 40 | 0 |
| | | AL_36 | 279 | 21 | 20 | 0 | 3 |
| | | AL_39 | 27 | 0 | 692 | 0 | 0 |

3.3 - Caracterização dos extractos de própolis

As soluções etanólicas de extractos de própolis obtidos para o estudo foram avaliados ao nível da sua composição em resíduo seco, ceras e em compostos fenólicos, efectuando-se neste caso a avaliação do teor em fenóis totais, o perfil fenólico e a composição em flavonóides. Adicionalmente, realizou-se a avaliação da

actividade biológica dos extractos, em relação ao poder redutor e a capacidade bloqueadora de radicais livres.

3.3.1 - Resíduo seco

Como se pode observar na tabela 9, e na figura 12, o resíduo seco obtido para os dois extractos varia entre os 9,5% e os 11,0%. Estes resultados aproximam-se dos valores expectáveis considerando que a solução foi preparada para conter 10,0% de extracto de própolis. Os desvios podem estar associados à dificuldade em obter um extracto de própolis totalmente seco durante o processo de evaporação do solvente após a extracção, o que se verificou mais difícil no extracto a 70%. Os valores mais elevados são observados para os extractos obtidos a 96%.

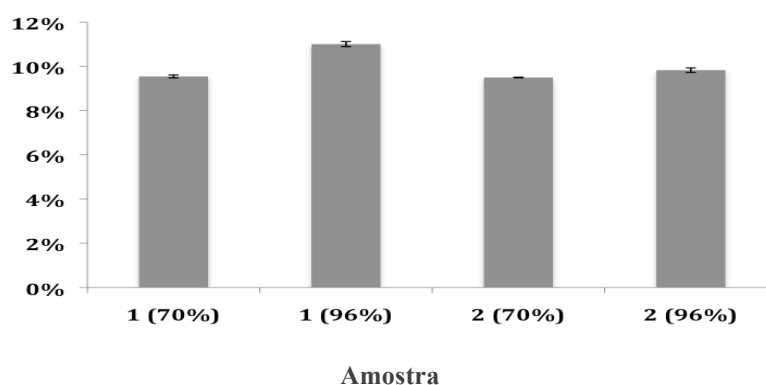


Figura 12 - Teor de resíduo seco obtido para a amostra 1 e 2, a 96% e 70%.

Tabela 9 – Resíduo seco e teor em ceras nos extractos etanólicos de própolis.

| Amostra | Resíduo Seco (%) | Ceras (Resíduo n-hexano) % |
|---------|------------------|----------------------------|
| 1 (70%) | 9,5 | 11,0 |
| 1 (96%) | 11,0 | 10,0 |
| 2 (70%) | 9,0 | 12,0 |
| 2 (96%) | 10,0 | 16,0 |

3.3.2 - Ceras

A determinação de ceras na própolis é de extrema importância, pois é um dos constituintes através da qual pode ser determinada a qualidade da própolis. A maior ou menor composição da própolis em cera, que é biologicamente inerte, influencia directamente a percentagem de compostos activos, ou seja, os compostos fenólicos.

Segundo a literatura a composição de cera na própolis ronda os 30% [19,31], contudo, estes valores podem variar mediante as necessidades da colónia no desenrolar das actividades e perante o processo de recolha da própolis, quer seja obtida por redes ou por raspagem das paredes da colmeia.

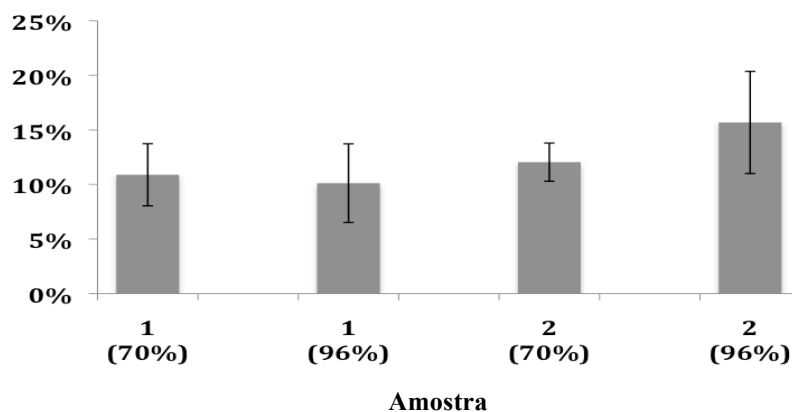


Figura 13 - Teor de ceras obtido para a amostra 1 e 2, a 96% e 70%.

Para o nosso estudo, os valores expectáveis são obrigatoriamente inferiores, uma vez que se está a caracterizar, não a própolis bruta, mas o extracto etanólico, onde parte das ceras foram já removidas. A percentagem de ceras obtidas está entre os 1,1% e os 1,6%, sendo que a amostra 2 extraída a 96% possui a maior percentagem 1,6%, seguindo-se o extracto da amostra 2 a 70% com 1,2%. A amostra 1 possui os valores mais baixos 1,1% para a extracção a 70% e 1,0% para a extracção a 96%, tabela 7. Os baixos valores obtidos nos extractos etanólicos de própolis são indicadores de uma quantidade/qualidade de compostos biologicamente activos significativa.

3.3.3 – Compostos fenólicos totais

A composição da própolis é rica em compostos fenólicos, responsáveis em grande parte pela sua actividade biológica. Na tabela 10 são apresentados os valores obtidos para a avaliação da composição fenólica dos extractos etanólicos de própolis por métodos espectrofotométricos. Como se pode verificar, figura 14, o teor em compostos fenólicos totais é superior para os extractos obtidos a 96%. Este resultado indica que o etanol é o solvente mais adequado para uma maior extracção dos compostos fenólicos determinados por este método analítico, o que poderá influenciar as propriedades biológicas do extracto. Comparativamente, o teor em compostos

fenólicos não varia significativamente entre as duas amostras de própolis utilizadas nos ensaios.

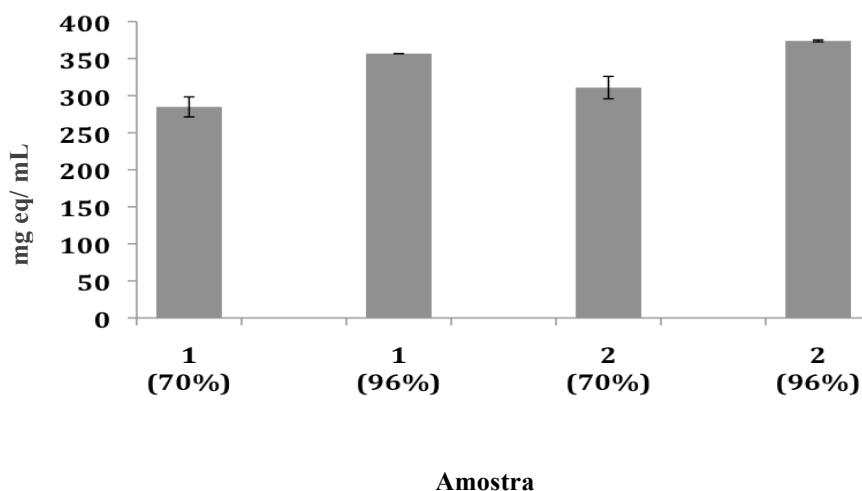


Figura 14 - Teor em compostos fenólicos obtido para a amostra 1 e 2, a 96% e 70%.

Tabela 10 – Teor em flavonóis, flavanonas e fenóis totais para os extractos etanólicos de própolis.

| Amostra | Flavonas/Flavonóis ^a | Flavanonas/Di-hidroflavonóis ^a | Fenóis totais ^a |
|---------|---------------------------------|---|----------------------------|
| 1 (70%) | 69,6 | 29,8 | 284,9 |
| 1 (96%) | 88,4 | 39,0 | 356,8 |
| 2 (70%) | 38 | 16,4 | 311,0 |
| 2 (96%) | 75,5 | 25,0 | 374,0 |

^aOs resultados estão expressos segundo a concentração média (mg eq/mL de PEE).

3.3.4 – Flavonas/Flavonóis

Ao contrário do descrito para o teor em fenóis totais, a quantidade de flavonas/flavonóis apresenta um valor inferior para a segunda amostra de própolis, mais significativo para a extração a 70%, figura 15.

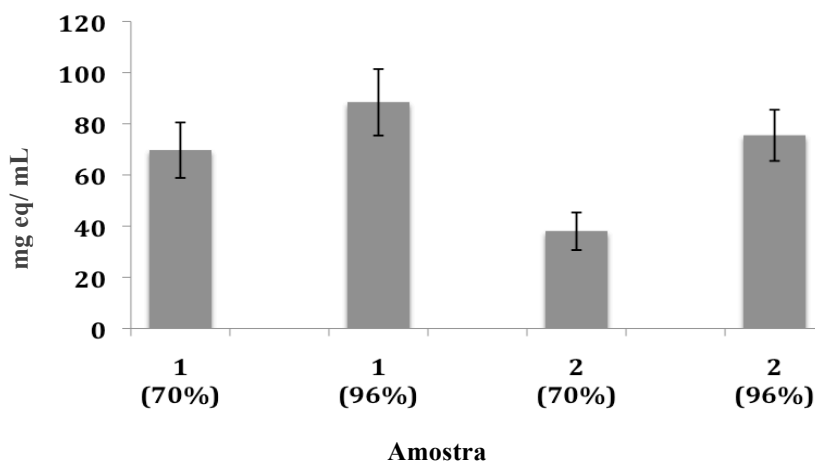


Figure 15 - Teor em flavonas/flavonóis obtido para a amostra 1 e 2, a 96% e 70%.

Independentemente do solvente utilizado na extracção, os valores expressos na tabela 10 são superiores para as amostras extraídas a 96%, com valores de 88,4 mg eq/mL para a amostra 1 e de 75,5 mg eq/mL para a amostra 2. O valor mais baixo obtido corresponde a 38,0 mg eq/mL para a amostra 2 a 70%. A amostra 1 é assim mais rica em flavonas/flavonóis, consequência de uma diferença floral em redor do apiário de recolha da própolis.

3.3.5 - Flavanonas e di-hidroflavonóis

Os teores das flavanonas presentes nos extractos estão expressos na tabela 10, onde se destaca a amostra 1 com maior quantidade de flavanonas, 29,8 mg eq/mL para a extracção a 70% e 39,0 mg eq/mL na extracção a 96%, sendo também o valor mais alto obtido.

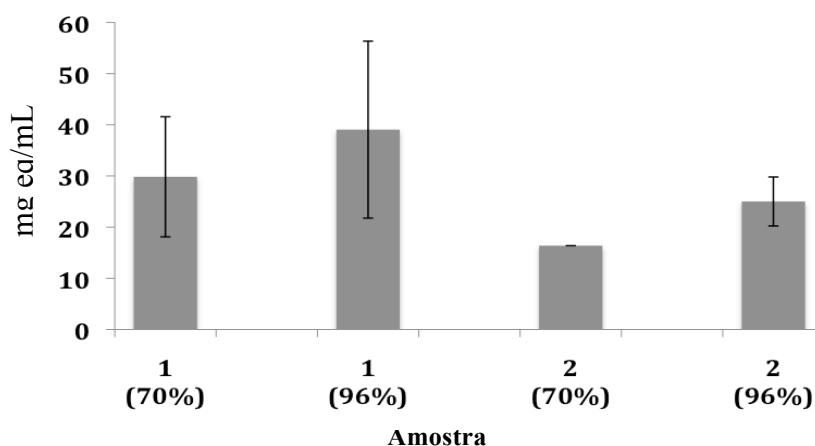


Figura 16 - Teor em flavanonas e di-hidroflavonóis obtido para a amostra 1 e 2, a 96% e 70%.

A amostra 2 apresenta valores mais baixos, 25,0 mg eq/mL para a extracção a 96% e 16,4 mg eq/mL para a extracção a 70%. Também para este parâmetro, os extractos obtidos a 96% de etanol apresentam uma quantidade superior de flavanonas/di-hidroflavonóis.

3.3.6 - Perfil fenólico

A análise do perfil fenólico dos extractos etanólicos de própolis foi efectuada por HPLC com detector de diodos. Nas duas amostras analisadas (figuras 17 e 18) foram identificados 24 compostos, maioritariamente flavonóides como a pinocembrina (pico 17), crisina (pico 18), cafeato de etilfenilo (pico 19), galangina e acetato de 3-*O*-pinobanksina, mas também ácidos simples como o cafeico (pico 1),

ferúlico (pico 3), isoferúlico, *p*-cumárico (pico 2) e benzóico (pico 5), coincidindo com os resultados obtidos na literatura [54].

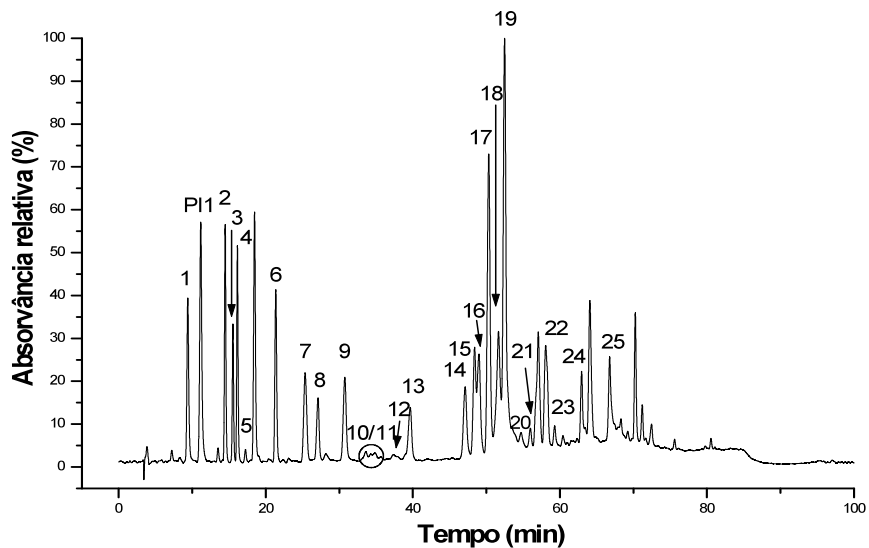


Figura 17 - Cromatograma para o extracto da amostra 1 obtida a 70%, de etanol.

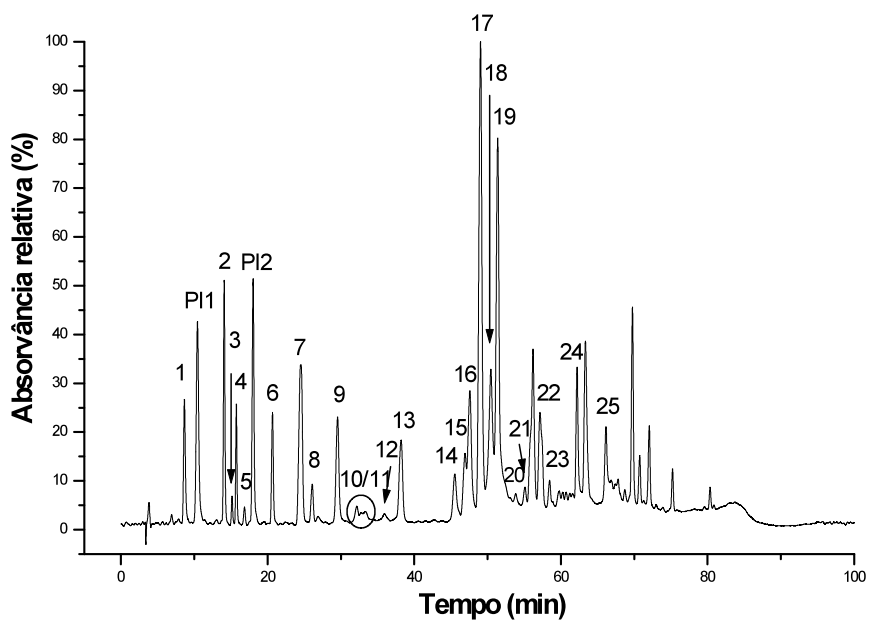


Figura 18 - Cromatograma para o extracto da amostra 2 obtida a 70%, de etanol.

A constituição de ambas as amostras em flavonóides e ácidos aromáticos simples revela que as duas amostras de própolis provêm de exsudados de choupos, característico de zonas temperadas, como a Europa, América do Norte e de regiões não tropicais da Ásia [24,25,29,54]. A diferença entre as amostras reside unicamente na intensidade de cada um dos picos, consistente com a proveniência de uma mesma área geográfica e origem botânica semelhante [19], evidenciando a predominância floral da região da Figueira da Foz de onde foram recolhidas as amostras. As diferenças observadas resultaram de uma distribuição botânica distinta em redor dos apiários de recolha.

Tabela 11 - Perfil fenólico dos extractos etanólicos de própolis.

| Pico | Composto | UV _{max} | |
|------|---|-------------------|------|
| 1 | Ác. cafeíco | 323 | * |
| 2 | Ác. <i>p</i> -cumárico | 309 | * |
| 3 | Ác. ferúlico | 323 | * |
| 4 | Ác. isoferúlico | 323 | * |
| 5 | Ác. benzóico | 229 | * |
| 6 | Ác. 3,4-dimetilcafeíco | 323 | * |
| 7 | 5-Metoxipinobanksina | 291 | [54] |
| | Ác. cinâmico | 276 | * |
| 8 | <i>p</i> -Cumarato de metilo | 309 | * |
| 9 | Pinobanksina | 291 | [54] |
| 10 | 5-Metoxipinoembrina | 289 | [54] |
| 11 | Apigenina | 266, 336 | * |
| 12 | 5-Metoxicrisina | 265, 311 | [54] |
| 13 | Ác. cinamilidenacético | 310 | [54] |
| 14 | Cafeato de isoprenilo | 323 | * |
| 15 | Cafeato de isoprenilo (isómero) | 323 | [54] |
| 16 | Cafeato de benzilo | 323 | [54] |
| 17 | Pinocembrina | 289 | * |
| 18 | Crisina | 265, 311 | * |
| 19 | Cafeato de etilfenilo | 325 | * |
| | Acetato de 3- <i>o</i> -pinobanksina | 291 | [54] |
| | Galangina | 357 | * |
| 20 | 6-Metoxicrisina | 265, 311 | [54] |
| 21 | <i>p</i> -cumarato de isoprenilo | 309 | [54] |
| 22 | Cafeato de cinamilo | 323 | [54] |
| 23 | Propionato de 3- <i>o</i> -pinobanksina | 291 | [54] |
| 24 | Butirato de 3- <i>o</i> -pinobanksina | 291 | [54] |

*Confirmado com padrão, [54] Confirmado através de referência.

A comparação entre os cromatogramas obtidos para a mesma amostra, com diferentes solventes (70 ou 96% etanol), revelou uma ligeira diferença na quantidade de ácidos fenólicos e no teor em crisina. Para o extracto obtido a 70%, a maior

polaridade da água revelou uma maior eficiência para extrair os ácidos simples como o ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, isoferúlico, benzóico e ácido 3,4-dimetilcafeico, enquanto a quantidade de crisina foi superior nos extractos a 96% de etanol.

3.3.7 -Efeito bloqueador de radicais livres – DPPH

No gráfico da figura 19 apresenta-se o comportamento do extracto de própolis na capacidade de inibição dos radicais livres de DPPH, para diversas concentrações do extracto. Como se pode verificar, o valor obtido para a concentração mais baixa utilizada, apresenta uma redução superior a 50% de inibição, atingindo-se a partir de 0,05 mg/mL um patamar na percentagem de inibição. Este facto é revelador da aptência dos extractos para o bloqueamento de radicais livres. Para o cálculo do valor de EC_{50} , tabela 12, e considerando o comportamento observado na figura 19, utilizaram-se apenas os três primeiros pontos para concentrações mais baixas de extracto, determinando-se a melhor recta e extrapolando o valor da concentração de extracto para uma redução de 50% de inibição.

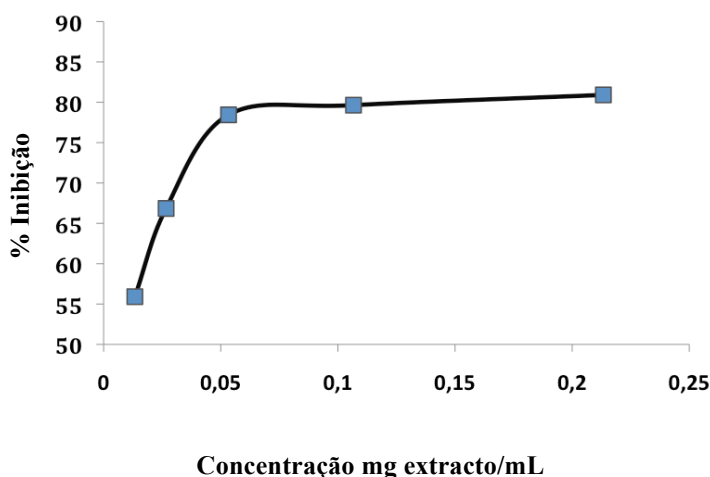


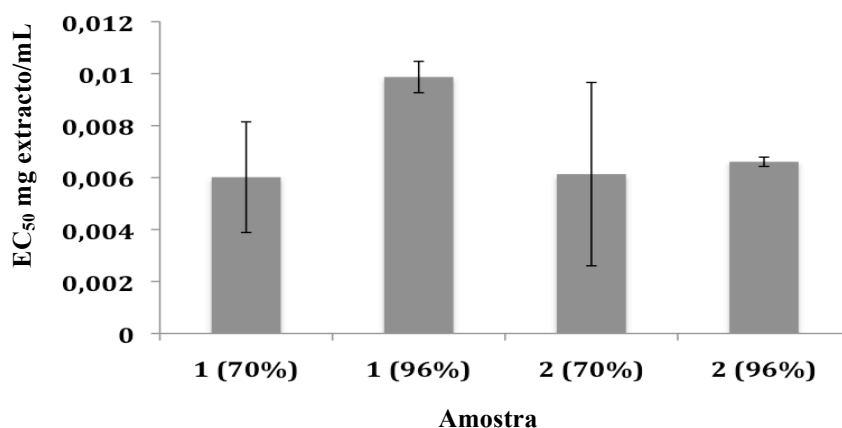
Figura 17 – Percentagem de inibição em função da concentração do extracto de própolis (amostra 2, a 70%).

Os resultados obtidos para ambas as amostras expressos na tabela 12, demonstram que os valores mais baixos (maior efeito bloqueador) correspondem às extracções efectuadas a 70% com 0,006 mg extracto/mL (amostra 1) e 0,0061 mg extracto/mL (amostra 2), seguindo-se as amostras de extracção a 96% com 0,0066 mg extracto/mL (amostra 2) e 0,0099 mg extracto/mL (amostra 1), figura 20.

Tabela 12 – Poder redutor e DPPH, dos extractos etanólicos de própolis.

| Amostra | Poder redutor mg eq/mL | DPPH mg extracto/mL |
|----------------|-------------------------------|----------------------------|
| 1 (70%) | 175,0 | 0,0060 |
| 1 (96%) | 183,0 | 0,0099 |
| 2 (70%) | 213,0 | 0,0061 |
| 2 (96%) | 184,0 | 0,0066 |

Apesar de as amostras 1 e 2 extraídas a 96% apresentarem de forma geral maior número de compostos fenólicos, flavonas/flavonóis e flavanonas/di-hidroflavonóis, apresentam também uma percentagem elevada de ceras em relação às amostras extraídas a 70%, sendo que, os compostos bioactivos presentes nas amostras a 70%, ainda que em menor quantidade, apresentam maior capacidade bloqueadora de radicais livres e maior poder antioxidante. A presença de maior quantidade de ácidos livres observada no perfil fenólico poderá também contribuir para esta maior actividade dos extractos a 70%.

**Figura 18** – Capacidade bloqueadora de radicais livres para a amostra 1 e 2, extraídas a 96% e 70%.

3.3.8 - Poder redutor

Os valores obtidos para o poder redutor dos extractos estão expressos na tabela 12, variando entre os 175,0 mg eq/mL e 213,0 mg eq/mL. O valor mais alto corresponde à amostra 2 extraída a 70% com 213 mg eq /mL, seguindo-se a extracção a 96% com 184,0 mg eq/mL, a amostra 1 extraída a 70% com 183 mg eq/mL e por último, com o valor mais baixo, a extracção a 96% com 174,0 mg eq/mL. As amostras 1 e 2 extraídas a 70% apresentam maior poder redutor em relação às extracções a 96%. Os valores obtidos para o poder redutor coincidem com os do DPPH, em que as amostras com menor valor de DPPH, possuem maior capacidade redutora

(antioxidantes), reforçando o mencionado anteriormente no DPPH. Assim, uma maior composição em compostos fenólicos, não reflete directamente um maior poder antioxidante. A amostra 2 extraída a 70% é um exemplo disso, pois apresenta os valores mais baixos, flavonas/flavonóis e flavanonas/di-hidroflavonóis e valores mais altos de poder redutor e DPPH, conferindo-lhe uma maior actividade dos compostos biologicamente activos.

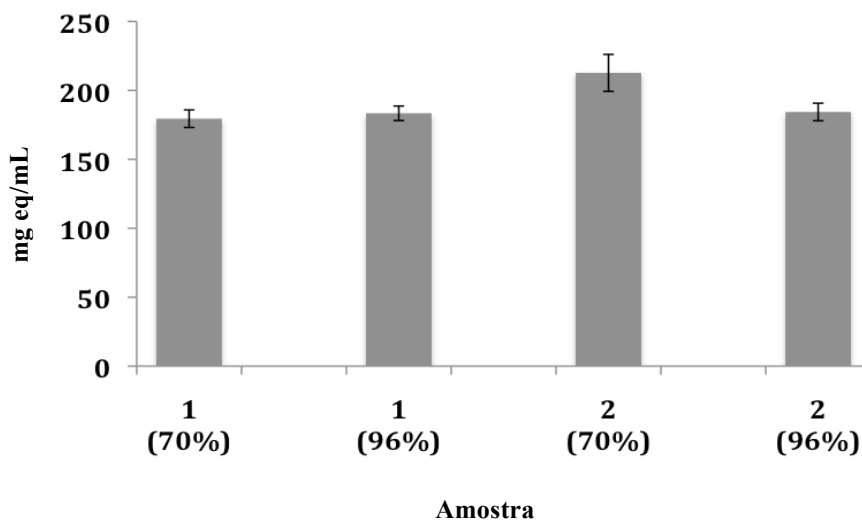


Figura 19 – Poder redutor para a amostra 1 e 2, extraídas a 96% e 70%.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

O presente estudo avaliou a eficácia da própolis no controlo da Loque Americana, em zonas controladas, através da aplicação de extractos etanólicos de própolis, procedendo-se também à caracterização química dos referidos extractos.

Foi evidente durante o estudo, aquando da recolha de amostras e instalação dos apiários experimentais, a destruição que a Loque Americana causa no interior das colónias, o impacto nos apicultores e a conseqüente repercussão na apicultura nacional.

Na fase de optimização, verificou-se a necessidade de diferenciar as colónias de bactérias correspondentes ao *Paenibacillus larvae* em análise de outras bactérias não patogénicas presentes nas amostras de mel. A necessidade desta identificação tornou-se ainda mais evidente pelo facto do teste da catalase (utilizado frequentemente para identificação de *P. larvae larvae*, uma bactéria catalase-negativa) ter dado positivo para todas as colónias desenvolvidas nas amostras de mel analisadas nesta fase. A confirmação de *Paenibacillus larvae* foi efectuada com duas combinações de primers diferentes (gen. DNA de *P. larvae* estirpe DSM 7030).

A quantificação de esporos foi realizada em meio nutritivo após 36 horas em condições de temperatura e humidade óptimas de desenvolvimento. O meio de cultura utilizado foi o MYPGP por ser o mais fácil de elaborar associado a um baixo custo. Nisa, Chaves e Bragança são as regiões mais afectadas, com 77,5%, 63,3% e 57,5% de colónias infectadas com o *Paenibacillus larvae*, das amostras efectuadas. Na região de Leiria foi onde se verificou o nível mais baixo de infestação de 7,5%. Globalmente cerca de 52% das amostras totais recolhidas estavam contaminadas. Os resultados obtidos na quantificação dos esporos após o momento de aplicação dos extractos demonstraram uma variação flutuante entre os períodos de amostragem, não permitindo mencionar à presente data um efeito antibacteriano contra o *Paenibacillus larvae*, conforme se encontra descrito na literatura actual.

A caracterização química das amostras em resíduo seco, ceras, compostos fenólicos, poder redutor e DPPH, permitiu quantificar os compostos biologicamente activos e a actividade da própolis oriunda da Figueira da Foz. As amostras em estudo evidenciaram quantidades de cera relativamente baixas, evidenciando uma composição em compostos fenólicos (flavonas/flavonóis e flavanonas/di-hidroflavonóis) significativa. O resíduo seco apresenta valores de acordo com a diluição inicial de PEE (10%). O perfil fenólico obtido por HPLC-DAD, permitiu identificar os compostos biologicamente activos, e em particular, flavonóides como a

pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina e ácidos aromáticos livres como o ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido isoferúlico e ácido benzóico, coincidentes com os dados da literatura. Através da sobreposição dos cromatogramas de ambas as amostras extraídas, a diferentes percentagens de etanol foi possível averiguar que a diferença entre ambas é pouco notória, confirmando uma maior quantidade de ácidos fenólicos na extracção com 70% de etanol. A composição das amostras 1 e 2 nos referidos compostos activos, permite-nos afirmar, que a sua origem botânica é o *Populus spp.*, característico das zonas temperadas, como a Europa, América do Norte e regiões não tropicais da Ásia. A avaliação do poder redutor e DPPH, dos referidos compostos activos permitiu identificar o poder antioxidante das duas amostras. A amostra 2 apresenta uma maior capacidade bloqueadora de radicais livres em relação à amostra 1, ainda que, a amostra 1 possua uma maior quantidade de compostos fenólicos. Entre todos os extractos, o obtido para a amostra 2(70%) é a que possui maior poder antioxidante, indicando que a quantidade em flavonóides não pressupõe maior poder antioxidante de acordo com os resultados alcançados.

Apesar de os resultados alcançados *in vivo* não demonstrarem qualquer efeito da própolis Portuguesa contra o *Paenibacillus larvae*, a caracterização química demonstra que a composição da própolis possui uma constituição em compostos activos qualitativa/quantitativa significativa, bem como elevada actividade biológica, pelo que a aplicação de extractos de própolis deverá ser optimizada.

CAPÍTULO 5

TRABALHOS FUTUROS

Perante os resultados alcançados no estudo, não foi possível verificar a eficiência dos extractos etanólicos de própolis na acção antibacteriana contra o bacillus *Paenibacillus larvae* nas condições aplicadas. No que se refere aos ensaios de avaliação da quantidade dos extractos etanólicos de própolis os desvios padrões entre ensaios não concedem a coerência técnico-científica com a melhor performance. Contudo, o presente estudo lançou as bases para o conseqüente ajustamento dos procedimentos de campo e laboratoriais a aplicar.

Nesse âmbito, os trabalhos futuros passarão por: (i) aumentar a frequência de aplicações de extractos etanólicos de própolis; (ii) utilização de outros procedimentos para aplicação dos extractos, seja através de gotejamento ou dispersão sobre as abelhas; (iii) avaliar o procedimento de amostragem, garantindo que a amostra de mel recolhida retrata o estado da doença da colónia; (iv) reajustar os procedimentos laboratoriais, de modo a garantir uma maior precisão de resultados.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFIA

- [1] Crane, E. Bees and Beekeeping: science, practice and world resources. Heinemann Newnes. **1990**
- [2] Bastos, E. M. A. F.; Simone, M.; Jorge, D. M.; Soares, A. E. E. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology. **2008**, 97, pp 273-281.
- [3] Antúnez, K.; D'Alessandro, B.; Piccini, C.; Corbella, E.; Zunino, P. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. Journal of Invertebrate Pathology. **2004**, 86, pp 56-58.
- [4] Antúnez, K.; Harriet, J.; Maggi, M.; Eguaras, M.; Zunino, P. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. Veterinary Microbiology. **2008**, 131, pp 324-331.
- [5] Lindström, A. Distribution and Transmission of American Foulbrood in Honey Bees. Swedish University of Agricultural Sciences. **2006**.
- [6] Spivak, M.; Router, G. S. Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. Apidologie. **2001**, 32, pp 555-565.
- [7] Lauro, F. M.; Favaretto, M.; Covolo, L.; Rassa, M.; Bertoloni, G. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. International Journal of Food Microbiology. **2003**, 81, pp195-201.
- [8] Ryba, S.; Titera, M.; Stopka, P. A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. Veterinary Microbiology. **2009**, 139, pp 193-196.
- [9] Piccini, C.; Zunini, P. American Foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from Larvae with Clinical Symptoms and Adult Honeybees and Susceptibility to oxytetracycline. Journal of Invertebrate Pathology. **2001**, 78, pp 176-177.
- [10] Hamdan, K. American Foulbrood Bee Disease.
http://www.countryrubes.com/images/American_Foulbrood_AFB_pdf.pdf. **2010**

- [11] Gende, L. B.; Maggi, M. D.; Damiani, N.; Fritz, R.; Eguaras, M. J.; Floris, I. Advances in the apiary control of the honeybee American Foulbrood with cinnamon (*cinnanomum zeylanicum*) essential oil. *Bulletin of Insectology*. **2009**, 62 pp 93-97.
- [12] Skinner, J. A.; Parkman, J. P.; Studer, M. D. Using Terramycin for the Prevention of American foulbrood. Agricultural Extension Service, University of Tennessee. **2010**, SP 596.
- [13] Hansen, H.; Brødsgaard, C. J. Control of American Foulbrood by the shaking method. *Apiacta*. **2003**, 38, pp 140-145.
- [14] Katznelson, H. The influence of antibiotics and sulfa drugs on *Bacillus larvae*, cause of American Foulbrood of the honeybee, in vitro and in vivo. Department of Agriculture, Ottawa, Canada. **1950**, pp 471-479.
- [15] Ambrose, K.; Trend Bill. Preventing the spread of American Foulbrood disease. Department of Agriculture and Food. **2008**, Note 298.
- [16] Gillard, M.; Charriere, J. D.; Belloy, L. Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. *Journal of Invertebrate Pathology*. **2008**, 99, pp 92-95.
- [17] Bankova, V. S.; Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **2000**, 31, pp 3-15.
- [18] López, A, S.; Subosky, M. J.; Maidana, J. F.; Castillo, A. Organoleptic and physical characteristics of propolis from northeastern Argentina. *Spanish Journal of Agricultural Research*. **2003**, 1, pp 37-40.
- [19] Marcucci, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. **1995**, 26, pp 83-89.
- [20] Basim, E.; Basim, H.; Özcan, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*. **2006**, 77, pp 992-996.

- [21] Ghisalberti, E. L. Propolis: a review. *Bee world*. **1979**, *60*, pp 59-84.
- [22] Farré, R.; Fransquet, I.; Sanchez, A. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. **2004**, *45*, pp 21-43.
- [23] Machado, G. M. C.; Leon, L. L.; Castro, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. Institute Oswaldo Cruz. **2007**, *102* pp 73-77.
- [24] Christov, R.; Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Bertrand, M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Natural Product Research*. **2006**, *20*, pp 531-536.
- [25] Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini, A. G. Chemical composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *National Institute of Beekeeping*. **2002**, *57*, pp 530-533.
- [26] Silici, S.; Ünlü, M.; Vardar-Ünlü, G. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2007**, *23*, pp 1797-1803.
- [27] Kalogeropoulos, N.; Konteles, S. J.; Troullidou, E.; Mourtzinos, I.; Karathanos, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food chemistry*. **2009**, *116*, pp 452-461.
- [28] Mercan, N.; Kivrak, I.; Duru, M. E.; Katircioglu, H.; Gulcan, S.; Malci, S.; Acar, G.; Salih, B. Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. *Annals of Microbiology*. **2006**, *56*, pp 373-378.
- [29] Mohammadzadeh, S.; Sharriatpanahi, M.; Hamedi, M.; Ahmadkhaniha, R.; Samadi, N.; Ostad, S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*. **2007**, *103*, pp 1097-1103.

-
- [30] Funari, C. L.; Ferro, V. C.; Mathor, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (*Compositae*) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, 111, pp 206-212.
- [31] Bankova, V.; Krasteva, G. B.; Popov, S.; Sforcini, J. M.; Funari, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian própolis. *Apidologie*. **1998**, 29, pp 361-367.
- [32] Popova, M.; Silici, S.; Kaftanoglu, O.; Bankova, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantative chemical composition. *Phytomedicine*. **2005**, 12, pp 221-228.
- [33] Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**, 64, pp 235-240.
- [34] Silici, S.; Kutluca, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 99, pp 69-73.
- [35] Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S.; Marcucci, M.; C., Tsvetkova, I.; Kujumgiev A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian Propolis. *Fitoterapia*. **1999**, 70, pp 190-193.
- [36] Ahn, M. R.; Kumazawa, S.; Usui, Y.; Nakamura, J.; Matsuka, M.; Zhu, F.; Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*. **2007**, 101, pp 1383-1392.
- [37] Hamasaka, T.; Kumazawa, S.; Fujimoto, T.; Nakayama T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Japan. *Food Science and Technology Research*. **2003**, 10, pp 86-92.
- [38] Sforcin, J. M.; Jr, A. F.; Lopes, C.A.M.; Bankova, V.; Funari, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **2000**, 73, pp 243-249.

-
- [39] Choi, Y. M.; Noh, D. O.; Cho, S. Y.; Suh, H. J.; Kim, K. M.; Kim, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. **2006**, 39, pp 756-761.
- [40] Moreira, L.; Dias, L. G.; Pereira, J. A.; Estevinho, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. **2008**, 46, pp 3482-3485.
- [41] Alencar, S. M.; Oldoni, T. L.C. ; Castro, M. L.; Cabral, I. S. R.; Costa-Neto, C. M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 113, pp 278-283.
- [42] Cushnie, T. P. T.; Lamb, A. J. Antimicrobial activity of flavanoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **2005**, 26, pp 343-356.
- [43] Burdock, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food and Chemical Toxicology*. **1998**, 36, pp 347-363.
- [44] Fernandes, A.; Lopes, M. M. R.; Colombari, V.; Cecília, A.; Monteiro, M.; Vieira, E. P. Atividade Antimicrobiana de Própolis de *Apis Mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*. **2006**, 36, pp 294-297.
- [45] Zhu, W.; Chen, M.; Shou, Q.; Li, Y.; Hu, F. Biological Activities of Chinese Propolis and Brazilian Propolis on Streptozotocin-Induced Type 1 *diabetes mellitus* in Rats. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2010**, pp 1-8.
- [46] Pontin, K.; Filho, A. A. S.; Santos, F. F.; Silva, M. L. A.; Cunha, W. R.; Nanayakkara, N. P. D.; Bastos, J.K.; Albuquerque, S. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis. *Parasitology Research*. **2008**, 10, pp 487-492.
- [47] Miguel, M. G.; Nunes, S.; Dandlen, S. A.; Cavaco, A. M.; Antunes, M. D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, 48, pp 3418-3423.

- [48] Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. **2002**, 73, pp S1-S6.
- [49] Costa, C. Optimização do modo de cultivo de *Paenibacillus larvae*, causador da Loque Americana. Universidade do Minho. **2009**. Resultados não publicados.
- [50] Cvec, J.; Medić-Šarić, M.; Jasprica, I.; Zubčić, S.; Vitali, D.; Mornar, A.; Vedrina-Dragojević, I.; Tomić, S. Optimization of an extraction procedure and chemical characterization of Croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*. **2007**, 18, pp 451-459.
- [51] Woiski, R.G.; Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apiculture Research*. **1998**, 37, pp 99-105.
- [52] Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Journal of Enology and Viticulture*. **1965**, 16, pp 144-158.
- [53] Gardana, C.; Scaglianti, M.; Pietta, P.; Simonetti, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2007**, 45, pp 390-399.
- [54] 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, pp 887-897.
- [55] Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. **1986**, 44, pp 307–315.
- [56] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT – Food Science and Technology*, **1995**, 28, 25-30.