

Avaliação da composição, segurança e impacto dos suplementos alimentares para abelhas comercializados em Portugal

**Marcela de Souza
Zangirolami**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e
Segurança Alimentar no âmbito da Dupla Diplomação
com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientado por

**Professor Doutor Miguel José Rodrigues Vilas Boas
Professor Doutor Paulo Henrique Março**

**Bragança
2018**

Avaliação da composição, segurança e impacto dos suplementos alimentares para abelhas comercializados em Portugal

**Marcela de Souza
Zangirolami**

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação primeiramente a Deus por sempre estar comigo, à minha família e a todos que de alguma maneira me incentivaram nessa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela oportunidade que tive de estudar em outro país, adquirindo mais conhecimento e agregando novos hábitos e costumes diferentes dos meus, foi uma grande experiência.

Agradeço imensamente a minha família, responsáveis por esta etapa da minha vida: a minha mãe Silvana, ao meu pai Lázaro e ao meu irmão Murilo por estarem comigo em todos os momentos e por me apoiarem nas minhas decisões. E, claro, ao meu namorado Lucas, que me incentivou e me motivou em todos os momentos.

Quero também agradecer a todos os professores da UTFPR-CM que fizeram parte da minha trajetória durante todos esses anos e aos amigos que fiz e que estiveram comigo desde o início, principalmente aos meus amigos: Bianca, Guilherme e Núbia, que estiveram e se fizeram presentes em todos os momentos.

Agradeço ao IPB e a todas pessoas que estiveram envolvidas neste trabalho, em especial a Andréia que desde o início me acompanhou no laboratório, pela paciência e boa vontade de me ensinar e me ajudar em todas as atividades, e claro, pela amizade e companheirismo que tivemos durante todo esse tempo, convivendo dia a dia, o que tornou tudo mais leve e divertido. Meu muito obrigada.

Também agradeço ao meu orientador Miguel e ao meu coorientador Paulo Henrique, que estiveram sempre muito dispostos a me ajudar quando precisei, acrescentando muito ao meu trabalho.

Este trabalho foi financiado pelo Programa Apícola Nacional numa parceria entre:



ÍNDICE

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO GERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 TAXONOMIA.....	3
2.2 A ORGANIZAÇÃO DAS ABELHAS	3
2.2.1 A abelha rainha.....	4
2.2.2 Obreiras	5
2.2.3 Zangões	6
2.3 O CICLO DE VIDA.....	6
2.4 ANATOMIA.....	8
2.4.1 Sistema digestivo.....	9
2.4.2 Digestibilidade e absorção dos alimentos	11
2.5 NUTRIÇÃO DAS ABELHAS	12
2.5.1 Hidratos de carbono.....	12
2.5.2 Proteínas	13
2.5.3 Lípidos.....	14
2.5.4 Vitaminas, minerais e água.....	15
2.5.5 Necessidades nutricionais de acordo com a fase do desenvolvimento	16
2.6 ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL	18
2.6.1 Suplementação energética.....	18
2.6.2 Suplementação proteica	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21

3.1 AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS ATUAIS DE ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL	21
3.2 AMOSTRAGEM.....	21
3.3 PADRÕES E REAGENTES	21
3.4 ANÁLISES NUTRICIONAIS	22
3.4.1 Determinação de proteínas	22
3.4.2 Determinação de gorduras	23
3.4.3 Determinação do teor em cinzas.....	24
3.4.4 Determinação do teor em humidade	24
3.4.5 Determinação de hidratos de carbono.....	24
3.5 ANÁLISE COMPOSICIONAL.....	25
3.5.1 Açúcares	25
3.5.5.1 Preparação das amostras	25
3.5.5.2 Condições Cromatográficas.....	26
3.5.2 Minerais	26
3.5.2.1 Digestão da amostra.....	26
3.5.2.2 Análise da amostra.....	27
3.5.3 Determinação da Prolina.....	29
3.6 HIDROXIMETILFURFURAL.....	30
3.7 DETECÇÃO DA PRESENÇA DE OGM.....	30
3.8 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE DESEMPENHO DOS SUPLEMENTOS	32
3.8.1 Origem das abelhas.....	32
3.8.2 Gaiolas de ensaio	33
3.8.3 Condições experimentais.....	33
3.8.4 Avaliação dos resultados	35
3.9 TRATAMENTO DE DADOS.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

4.1	AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS ATUAIS DE ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL	37
4.2	DESCRIÇÃO DA COMPOSIÇÃO ANUNCIADA DOS SUPLEMENTOS..	38
4.3	AVALIAÇÃO NUTRICIONAL.....	40
4.4	AVALIAÇÃO COMPOSICIONAL	43
4.4.1	<i>Composição em açúcares</i>	43
4.4.2	<i>Prolina</i>	44
4.4.3	<i>Análise de minerais</i>	45
4.5	AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO	46
4.5.1	<i>Análise de hidroximetilfurfural (HMF)</i>	46
4.5.2	<i>Deteção da presença de OGM</i>	47
4.6	DESEMPENHO DOS SUPLEMENTOS NO DESENVOLVIMENTO DAS COLÓNIAS DE <i>APIS MELLIFERA</i>	48
4.6.1	<i>Consumo dos suplementos</i>	49
4.6.2	<i>Taxa de mortalidade</i>	51
5	CONCLUSÃO	55
6	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO I	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alvéolo real.....	5
Figura 2. Principais estágios do desenvolvimento: 1° ovo, 2° larva, 3° pupa e 4° adulto7	
Figura 3: Morfologia da abelha <i>Apis mellífera</i> : Cabeça, Tórax e Abdômen.....	8
Figura 4. Sistema digestivo das larvas.	10
Figura 5. Sistema digestivo das abelhas adultas.....	11
Figura 6: Extração de gorduras pelo método de Soxhlet.	24
Figura 7: Preparação da amostra com azoto líquido para deteção de ADN.....	31
Figura 8: Amostras aplicadas no gel numa tina de 8 poços.	31
Figura 9: Gaiola experimental, com 50 abelhas emergentes. Água (A), cera (B), suplemento energético (C), suplemento proteico (D).....	33
Figura 10: Aspecto dos suplementos preparados para teste. (a) energéticos (b) proteicos.	35
Figura 11: Localização dos apiários dos inquiridos	37
Figura 12: Gráfico dos scores obtidos por <i>análise de componentes principais</i> dos resultados de análise centesimal dos suplementos alimentares para abelhas. PC1 x PC2. 1: Bee food; 2: Baniaia; 3: Abejapi; 4: AlbuPower; 5: Energéticos V.A.; 6: Energético proteico.	42
Figura 13: Gráfico dos loadings obtidos por análise de componentes principais dos resultados de análise centesimal de suplementos alimentares para abelhas. Variáveis x PC1 PC2. 1: Cinzas (%); 2: Humidade (%); 3: Proteínas (%); 4: Gordura (%); 5: Hidratos de carbono (%).	42
Figura 14: Cromatograma de padrões: Frutose; Glucose; Sacarose; Maltose.	43
Figura 15: Perfil de açúcares do suplemento E09: Frutose; Glucose; Sacarose.	44
Figura 16: Deteção da presença de ADN nas amostras de suplementos analisados.	48
Figura 17: Consumo diário por abelha dos suplementos analisados e substâncias de controlo (sacarose e albumina).	50
Figura 18: Taxa de mortalidade (%) por dia do ensaio. A- Controlos; B- Energéticos; C- Proteicos.	52
Figura 19: Gaiolas dos tratamentos E06 e E09 no 27° dia de ensaio.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variações no peso (em fresco) e conteúdo em proteína durante o desenvolvimento sucessivo dos estágios da abelha.....	17
Tabela 2: Soluções padrões preparadas a partir das soluções 2 e 3.	28
Tabela 3: Padrões utilizados para construir a curva de calibração.....	29
Tabela 4: Composição anunciada dos suplementos alimentares para abelhas, em estudo.	39
Tabela 5: Resultados da análise centesimal para os suplementos artificiais em estudo.	40
Tabela 6: Quantificação de açúcares livres realizada por cromatografia líquida (HPLC-RI).....	44
Tabela 7: Quantidade de Prolina nos suplementos alimentares	45
Tabela 8: Composição dos suplementos em minerais.....	46
Tabela 9: Teor de hidroximetilfurfural (HMF) nos suplementos.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Micrograma

Abs: Absorbância

g: grama

HCl: Ácido clorídrico

HFCS: *High Fructose Corn Syrups*- “Xarope de milho rico em frutose”

HMF: Hidroximetilfurfural

mg: Miligrama

OGM: Organismo geneticamente modificado

PCA: Análise de componentes principais

PCs: Componentes principais

RESUMO

As abelhas, *Apis mellifera*, coletam um conjunto de substâncias da natureza para assegurarem a sua sobrevivência, nomeadamente o néctar que é a principal fonte em hidratos de carbono e utilizado para produção de energia, o pólen da onde retiram: proteínas, minerais, vitaminas e lípidos e a água que atua no controle da temperatura e humidade da colmeia. O consumo de hidratos de carbono ocorre em todas as fases do desenvolvimento das abelhas, porém na fase adulta a dieta é quase exclusiva à base destas substâncias, necessitando uma abelha de aproximadamente 4 mg de açúcar por dia para sobreviver. A suplementação artificial de hidratos de carbono é normalmente realizada fornecendo às abelhas pastas e xaropes de mel, sacarose, açúcares invertidos, xaropes de milho de elevado conteúdo em frutose (HFCS) e outros xaropes de frutos, enquanto que as dietas proteicas podem ser à base de farinha de soja, albumina, farinha de arroz, farinha de milho, entre outros.

O presente trabalho teve como objetivo identificar as práticas atuais de alimentação artificial utilizadas pelos apicultores portugueses por meio de um inquérito que ficou disponível em plataforma digital e avaliação de seis suplementos comerciais. A avaliação incidiu sobre: (i) o seu potencial nutritivo, nomeadamente através do teor de humidade, cinzas, hidratos de carbono, proteínas e gorduras; (ii) a sua composição no que se refere ao perfil de açúcares por cromatografia, quantificação de minerais por espectroscopia de absorção atómica e do aminoácido prolina por espectroscopia; (iii) a sua segurança, a partir da determinação dos teores de hidroximetilfurfural por espectroscopia e deteção da presença de ADN para as amostras proteicas; (iv) bem como o impacto desses suplementos na longevidade das abelhas por meio de um ensaio *in vitro*, com temperatura e humidade controlada.

Os resultados obtidos das análises nutricionais passaram por análise multivariada (Análise de Componentes Principais), onde foi possível evidenciar a semelhança das amostras energéticas (*Bee food*, *Baniaia* e *Abejapi*) pelo teor em hidratos de carbono, e as amostras *Albupower*, e *Energético proteico* pelos teores em cinzas e proteínas. A amostra *Energéticos V.A.* diferenciou-se das demais por se mostrar influenciada pelos teores de humidade e gordura. Para as análises composicionais, a amostra que mais se aproximou da composição de açúcares do mel foi a *Bee food*, com 18% de frutose e 43% em glucose. A quantificação dos minerais mostrou que os suplementos proteicos são mais

ricos em micronutrientes sendo os elementos mais comuns sódio, potássio e cálcio, e em menor quantidade o magnésio. A quantidade de prolina encontrada nas amostras proteicas foi elevada, mesmo quando comparada com as quantidades desse aminoácido presentes no pólen apícola. A partir dos resultados obtidos nos ensaio *in vitro* foi possível verificar a aceitação de todos os alimentos pelas abelhas, no entanto, o único suplemento energético capaz de aumentar a longevidade das abelhas, considerando o modo de aplicação *ad libitum*, foi o *Baniaia*. Os demais suplementos energéticos causaram disenterias e um aumento na taxa de mortalidade das abelhas a partir do 10º dia de vida, recomendando-se outros modos de aplicação. Entre os suplementos proteicos os produtos *Albupower*, e *Energético proteico* apresentaram bons desempenhos, enquanto o *Energéticos V.A.* demonstrou elevada toxicidade quando fornecido de forma continuada representando um risco à saúde das abelhas. Os resultados demonstram uma clara necessidade de regulamentação dos produtos para alimentação artificial de abelhas, devido às lacunas existentes no que se refere à informação disponível sobre composição, modo de aplicação e eficácia dos produtos, mas também porque se identificou claras divergências entre a composição encontrada e as especificações dos produtos.

ABSTRACT

The honeybee, *Apis mellifera*, collect a set of substances from nature to ensure their survival, namely the nectar that is the main source of carbohydrates and used for energy production, pollen from where they take: proteins, minerals, vitamins and lipids and water that acts as temperature control and humidity of the hive. The consumption of carbohydrates occurs at all stages of bee development, but in adulthood the diet is almost exclusively based on these substances, requiring a bee of approximately 4 mg of sugar per day to survive. Artificial carbohydrate supplementation is usually accomplished by supplying bees with honey pastes and syrups, sucrose, inverted sugars, high fructose corn syrups (HFCS) and other fruit syrups, whereas protein diets may be the base soy flour, albumin, rice flour, maize flour, among others.

The present work had as objective to identify the current practices of artificial feeding used by the Portuguese beekeepers, through a survey that was available in digital platform, together with the evaluation of six commercial food supplements. The evaluation focus on: (i) their nutritional potential, namely for the moisture content, ashes carbohydrates, proteins and fats; (ii) their composition by means of the sugar profile, quantification of minerals and the amino acid proline by means of spectroscopy; (iii) its safety, with the quantification of hydroxymethylfurfural contents by spectroscopy and the detection of the presence of DNA for the protein samples; (iv) and the impact of these supplements on the longevity of the bees with *in vitro* assays with controlled temperature and humidity.

The results obtained from the nutritional analyzes underwent a multivariate analysis (Principal Components Analysis), where it was possible to show the similarity of the energetic samples (*Bee food*; *Baniaia e Abejapi*) by the carbohydrate content, and the samples *Albupower*, and *Energético proteico* by the ash content and proteins. The *Energéticos V.A.* sample was different from the others because it was influenced by moisture and fat content. For the compositional analysis, the sample that most approached the composition of sugars found in honey was *Bee food*, with 18% fructose and 43% glucose. Quantification of minerals has shown that protein supplements are richer in micronutrients and most common elements are sodium, potassium and calcium, and to a lesser extent magnesium. The amount of proline found in the protein samples was very high, even when compared to the amounts of this amino acid detected in bee pollen.

From the results obtained in the *in vitro* assays it was possible to conclude that all the food supplements were accepted by the bees, however, the only energetic supplement able to increase the longevity of the bees, under *ad libitum* conditions, was *Baniaia*. All the other energetic supplements caused diarrheas and increase the mortality rate of the bees from the 10th day of life, so these products should be provided in a shorter interval of time. Among the protein supplements, *Albupower*, e *Energético proteico* revealed a good performance, while *Energéticos V.A.* showed high toxicity when supplied continuously producing a health risks for bees.

The results show a clear need for regulation of artificial bee feeding products due to the existing gaps in available information on composition, mode of application and efficacy of the products, but also because clear differences were identified between the composition found and product specifications.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são os principais agentes polinizadores dos vegetais contribuindo para a manutenção dos ecossistemas terrestres, equilíbrio ecológico da flora e preservação da biodiversidade, ao mesmo tempo que proporcionam um conjunto dos mais variados produtos, como a geleia real, cera, própolis, pólen, mel e até mesmo o veneno (apitoxina). Como garantia de uma produção que gere rentabilidade, o setor de apicultura vem ganhando cada vez mais espaço no conjunto das diferentes atividades agrícolas (POTRICH, et al., 2018).

A apicultura é considerada uma atividade agrícola de uso múltiplo, pois além de contribuir para a sustentabilidade dos sistemas desenvolve o setor socioeconómico de determinada região, todavia é muito dependente dos recursos naturais, e por isto possui oscilações de produção de acordo com as condições climáticas e ambientais de cada região. Na ausência de florações apropriadas, quando a reserva de alimento é insuficiente, o apicultor tem uma importante função complementar, o de fornecer a chamada alimentação artificial (CASACA, 2010).

A alimentação artificial, ou suplementação, genericamente fornecida às abelhas em períodos de escassez de alimento, é cada vez mais uma ferramenta de manejo apícola não limitada apenas à sustentabilidade da colónia, mas associada a um conjunto de ações muito variável como seja o estímulo à criação, suplemento energético, suporte à criação de rainhas, melhoria da qualidade de postura, redução de níveis de reprodução de varroa, melhoria da microflora intestinal das abelhas, prevenção da nosema, melhoria da saúde de colmeias infestadas por loque americana, entre outras (KOHSAKA, et al., 2017).

1.1 Objetivo geral

Com a realização desse trabalho de investigação aplicada pretende-se identificar as práticas atuais de alimentação artificial utilizadas pelos apicultores portugueses e avaliar a qualidade e segurança dos produtos comerciais disponíveis no mercado, bem como o seu potencial nutritivo e impacto no desenvolvimento das colónias.

1.2 Objetivos específicos

A avaliação da qualidade dos produtos será conseguida através de:

- ❖ Análises nutricionais com aferição dos conteúdos em cinzas, proteínas, gorduras e hidratos de carbono, permitindo obter um valor nutricional para cada um dos produtos;
- ❖ Análise composicional pormenorizada, com particular relevância para identificação do perfil de açúcares, minerais e teor em prolina.
- ❖ Avaliação de fatores de risco, nomeadamente através da quantificação de hidroximetilfurfural, o que permitirá aferir a segurança destes alimentos no que se refere a substâncias nocivas para as abelhas.
- ❖ A presença de OGM em todas as dietas proteicas.
- ❖ Ensaios *in vivo* do potencial nutritivo para as abelhas emergentes, com a identificação do impacto dos alimentos artificiais na longevidade das abelhas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Taxonomia

A ordem Himenóptera que compreende moscas, vespas, formigas e abelhas é uma das quatro maiores, possuindo mais de 153 mil espécies descritas e prevendo-se mais de um milhão que ainda não foram descritas. Dentre elas incluem-se parasitoides, predadores e polinizadores que tem uma grande relevância ecossistêmica e econômica, pois desenvolvem um papel fundamental (PETERS, et al., 2017).

A família Apidae é uma das maiores famílias pertencentes a este grupo, com mais de 17 mil espécies de abelhas divididas em subfamílias. As abelhas produtoras de mel pertencem a duas subfamílias da família Apidae, são elas: Apinae e Meliponinae englobando esta última as abelhas sem ferrão. A Apinae possui apenas um gênero, *Apis*, dos quais a espécie *Apis mellifera* tem uma importância muito maior comparada com as restantes. Entre as raças das espécies de *Apis*, as nativas de regiões frias armazenam mais mel do que as nativas de regiões tropicais e subtropicais onde a sua atividade não é interrompida por períodos de frio (LUZ, et al., 2016).

Esta espécie espalhou-se em toda Europa e no Oriente Médio dando origem a cinco linhagens diferentes através de uma sucessiva colonização: Africana (A), Europa Ocidental (M), Europa Oriental (C), Oriente Médio (O) e etíope (Y). Dentre essas inúmeras raças o resultado de uma integração entre as linhagens M e A deram origem à *Apis mellifera iberiensis* (ENGEL, 1999), que juntas povoam toda a Península Ibérica (JARA, et al., 2012).

2.2 A organização das abelhas

As abelhas passam toda a sua vida em agregados denominados de enxames. Normalmente, um enxame é composto por uma rainha (abelha mãe), por milhares de obreiras ou fêmeas atrofiadas e ainda por centenas de machos que se nomeiam zangões. As abelhas são capazes de reconhecer qual o seu enxame pelo cheiro específico que cada um tem, podendo-a distinguir das outras. No caso das abelhas melíferas, o enxame ocupa normalmente uma cavidade que poderá ser natural ou artificial, denominando-se o seu

conjunto como colmeia. Na colmeia são construídos os favos, compostos por milhares de alvéolos, onde as abelhas armazenam o alimento recolhido e onde são colocados os ovos pela rainha (PAIXÃO, 1974).

2.2.1 A abelha rainha

Toda a harmonia na colmeia e o trabalho desenvolvido pelo enxame é devido à importância da abelha rainha, pois é ela quem produz e distribui para todas as outras abelhas um conjunto de substâncias denominado de feromona da rainha, que, para além de outras funções, sinaliza a sua presença dentro da colmeia e impede que os órgãos reprodutores das obreiras se desenvolvam. Como consequência disso, ela é a única que apresenta um outro papel fundamental dentro da colmeia, que é o da reprodução da espécie (VILLAR; GROZINGER, 2017).

A rainha nasce de um ovo fecundado inserido num alvéolo de maiores dimensões, Figura 1, e é alimentada durante todas as fases da sua vida pelas obreiras com geleia real, um alimento rico em proteínas, vitaminas e hormonas, e que induz um desenvolvimento diferenciado das obreiras. Para ser fecundada, a abelha rainha tem de realizar o voo nupcial que ocorre a partir do seu nono dia de vida. Somente os zangões mais ágeis conseguem localizar a rainha a partir da sua feromona, alcançá-la e então a fecundar em voo, são em média 6 a 8 zangões para fecundar uma única rainha. Este é o único voo de fecundação realizado em toda a sua vida, ficando o sêmen armazenado na sua espermateca (FRATINI, et al., 2016).

Uma rainha coloca cerca de 1000 ovos por dia podendo viver mais de três anos. É à rainha que cabe a diferenciação entre as castas. Para isso a abelha rainha avalia com as suas patas a dimensão do alvéolo onde vai colocar o ovo, se esse alvéolo for estreito o ovo será depositado ao mesmo tempo que comprime a sua espermateca para libertar os espermatozoides, fecundando assim o ovo que originará as obreiras. Se este alvéolo for maior, as rainhas somente depositam o ovo e deste ovo não fecundado nascem os zangões (SANTOS, et al., 2016).



Figura 1. Alvéolo real

Fonte: (STAROSTA, 2007).

2.2.2 Obreiras

As obreiras são fêmeas como a abelha rainha, porém elas diferem por apresentar o órgão sexual atrofiado e consequente transformação do ovipositor no seu órgão de defesa, o ferrão. Esta diferença resulta da sua alimentação na fase de desenvolvimento larvar, a qual, a partir do terceiro dia, deixa de ser geleia-real, como na rainha, e passa a ser constituída por mel e pólen (GALLO, et al., 2002).

As obreiras são as responsáveis por todo o trabalho exercido na colmeia e desenvolvem as atividades de acordo com a idade, desenvolvimento glandular e necessidades da colmeia. Do primeiro ao quinto dia cuidam da limpeza dos alvéolos e das abelhas recém-nascidas, do quinto ao décimo dia de vida elas possuem a função de nutrizas, ou seja, são responsáveis pela alimentação das larvas e pelo seu desenvolvimento, pois já apresentam grande parte das glândulas hipofaríngeas e mandibulares desenvolvidas, capazes de produzir geleia-real. Após o décimo dia de vida as glândulas ceríferas já estão bem desenvolvidas, por isso nesta fase, até seu vigésimo dia de vida, produzem cera para a construção de favos, recebem e desidratam o néctar trazido pelas percoladoras para elaboração do mel e ainda armazenam o pólen nos favos. Entre o décimo oitavo e vigésimo primeiro as operárias realizam a defesa da colmeia pois já possuem o ferrão bem desenvolvido e veneno acumulado em grande quantidade,

podendo também colaborar no controle da temperatura da colmeia. Após a esta idade e até à sua morte são encarregadas de coletar o néctar, o pólen, resinas e água. Nesta fase são denominadas percoladoras (CAMARGO, et al., 2002).

2.2.3 Zangões

Os zangões são os machos da colmeia e possuem uma única função, a de fecundar a rainha. O período de vida de um zangão é de 2 a 3 meses, atingindo a sua maturidade sexual a partir do décimo segundo dia de vida. A partir daí podem realizar o voo nupcial, porém os machos que fecundam a abelha rainha tem uma morte certa, pois os seus genitais ficam presos a ela após o acoplamento (GALLO, et al., 2002).

Os zangões são maiores e mais fortes do que as abelhas operárias, apresentando os olhos e o olfato mais desenvolvidos, além de possuírem asas maiores e musculadas, o que resulta da sua necessidade de efetuar longos voos e possuir uma excelente orientação para detecção da rainha (CAMARGO, et al., 2002).

2.3 O ciclo de vida

O desenvolvimento das três castas de abelhas: rainha, obreiras e zangões, passa por quatro estágios principais: ovo, larva, pupa e adultos, como se pode observar na Figura 2. Durante o estágio larvar, as três castas ganham muito peso, aumentando as obreiras cerca de 900 vezes o peso do ovo enquanto a rainha aumenta 1700 e os zangões 2300 vezes (WINSTON, 1991).



Figura 2. Principais estágios do desenvolvimento: 1° ovo, 2° larva, 3° pupa e 4° adultos.

Fonte: Adaptado de (STAROSTA, 2007).

Os ovos depositados pelas rainhas possuem cor branca perolada, um formato cilíndrico oval e alongado, curvado ligeiramente e mais espessos na extremidade, onde se formará a cabeça, comparado com a extremidade abdominal. A rainha coloca um ovo por alvéolo numa extremidade do fundo da célula, e após 3 dias eclode e inicia-se o estado larvar.

A larva é inicialmente alimentada pelas abelhas nutrizas, capazes, a partir de suas glândulas, de produzir a geleia-real. Apenas as larvas mais velhas podem receber diretamente mel e pólen. Passados 6 dias após a eclosão, a larva já atingiu o peso ideal, deixando de ser alimentada pelas obreiras, que fecham a célula com uma camada de cera, opérculo. Quando isto ocorre a larva envolve-se num casulo e então dá-se o terceiro estágio de desenvolvimento, pupa, onde se estabelece a forma e estrutura da abelha. Após o 12 dia já é possível observar os contornos formados de cabeça, tórax e abdômen. Posteriormente, começam a aparecer as antenas o aparelho bucal, a pigmentação dos olhos e pernas e asas, o que nos indica o final da metamorfose. O desenvolvimento para uma abelha obreira, leva em média 21 dias, findos os quais a abelha adulta rompe a película de cera e pode dar início aos seus trabalhos (RAMOS; CARVALHO, 2007).

2.4 Anatomia

O corpo da abelha pode ser dividido em três partes: cabeça, tórax e abdômen, Figura 3, sendo que nesses três compartimentos encontram-se as principais glândulas e sistemas.

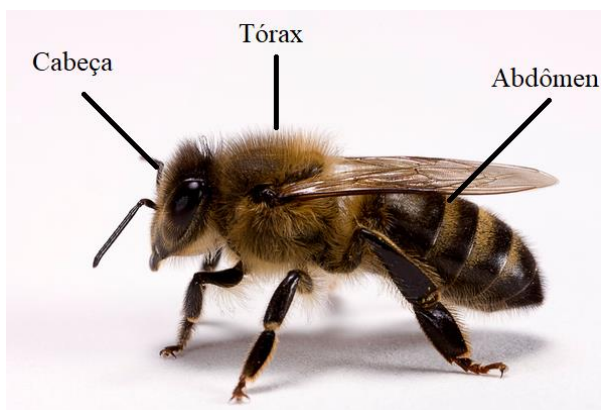


Figura 3: Morfologia da abelha *Apis mellifera*: Cabeça, Tórax e Abdômen.

Fonte: Adaptado de (STAROSTA, 2007).

Na cabeça estão localizados os olhos e as antenas. O olfato é realizado por meio das cavidades olfativas, em maior número nos zangões comparado com as obreiras ou a rainha. O aparelho bucal é composto por duas mandíbulas e a língua ou glossa. As mandíbulas são estruturas fortes, utilizadas para cortar e manipular cera, própolis e pólen. Servem também para alimentar as larvas, limpar os favos, retirar abelhas mortas do interior da colmeia e na defesa. A língua é uma peça bastante flexível, coberta de pelos, utilizada na coleta e transferência de alimento, na desidratação do néctar e na evaporação da água quando se torna necessário controlar a temperatura da colmeia. Ainda na cabeça estão localizadas três importantes glândulas: as mandibulares, que dissolvem a cera e ajudam a processar a geleia-real que alimentará a rainha e as hipofaríngeas, que funcionam do quinto ao 12 dia de vida da operária e transformam o alimento comum (mel e pólen) em geleia-real (LANDIM, 2009).

O tórax é formado por três segmentos, o primeiro está ligado à cabeça e é conhecido como protórax, em seguida está o mesotórax e por último, ligado ao terceiro compartimento do abdômen, está o metatórax. Nesta seção estão os órgãos locomotores, estando as pernas posteriores adaptadas para o transporte de pólen e resinas, bem como auxiliar a manipulação de cera e própolis e na limpeza do corpo. Na parte superior

encontram-se dois pares de asas com uma estrutura membranosa, responsáveis pelo voo, e ainda uma grande quantidade de pelos que tem a importante função de fixar os grãos de pólen. Nesta região encontram-se também os espiráculos, que são órgãos de respiração, o esôfago que é parte do sistema digestivo e as glândulas salivares, envolvidas no processamento do alimento (LANDIM, 2009).

O abdômen é formado por membranas bastante flexíveis que facilitam o seu movimento. É nesta parte do corpo que se encontra o aparelho digestivo, circulatório, reprodutor, excretor, os órgãos de defesa, as glândulas produtoras de cera e o ferrão, que está ligado a uma pequena bolsa onde o veneno fica armazenado (LANDIM, 2009; RAMOS; CARVALHO, 2007). Dada a importância para o trabalho, o aparelho digestivo será descrito em maior pormenor.

2.4.1 Sistema digestivo

O sistema digestivo dos insetos é constituído por um tubo, que se estende desde a boca até o ânus e geralmente é um pouco enrolado. Este canal pode ser dividido em três regiões, nomeadamente, intestino anterior ou também chamado estomadeu, intestino médio ou mesentero e intestino posterior ou também denominado proctodeu (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005; CATAE, et al., 2014).

A estrutura do sistema digestivo das larvas pode ser vista na Figura 4. Na fase larvar não existe conexão entre o proctodeu e o mesentero e conseqüentemente não há a eliminação dos excrementos. O amadurecimento do proctodeu só ocorre no final da fase larvar quando o casulo já foi construído, e nesse momento todo o alimento armazenado no estômago é descarregado no intestino. Durante o processo de metamorfose, ou seja, no momento em que o simples aparelho digestivo das larvas se transforma no sistema complexo das abelhas adultas, elas não se alimentam, sobrevivendo apenas das reservas obtidas na fase larvar (GONÇALVES, et al., 2017).



Figura 4. Sistema digestivo das larvas.

Fonte: Adaptado de (LANGSTROTH et al., 1975).

Nas abelhas adultas o aparelho digestivo inicia-se na cavidade bucal com o estomadeu, constituído pela faringe, esófago, papo e proventrículo, Figura 5. A faringe possui músculos de compressão e contração que permitem criar um movimento de sucção que aspira o alimento através do esófago, terminando numa bolsa denominada de vesícula nectarífera ou papo. É nesta vesícula que as abelhas transportam o néctar para a colmeia, tendo a capacidade de o regurgitar quando chegam à colmeia, ou alternativamente consumir mediante as suas necessidades. Neste caso, é através da abertura do proventrículo que se dá a passagem para o mesentero onde decorrerá a ação enzimática e absorção dos produtos da digestão. A absorção de água, sais e a eliminação dos resíduos da digestão ocorrem posteriormente no proctodeu subdividido em intestino delgado e grosso. É nesta região que se observam os túbulos de Malpighi que consistem em filamentos longos e finos, capazes retirar da hemolinfa os resíduos azotados resultantes da decomposição das proteínas durante o metabolismo (FRIOL, et al., 2017).

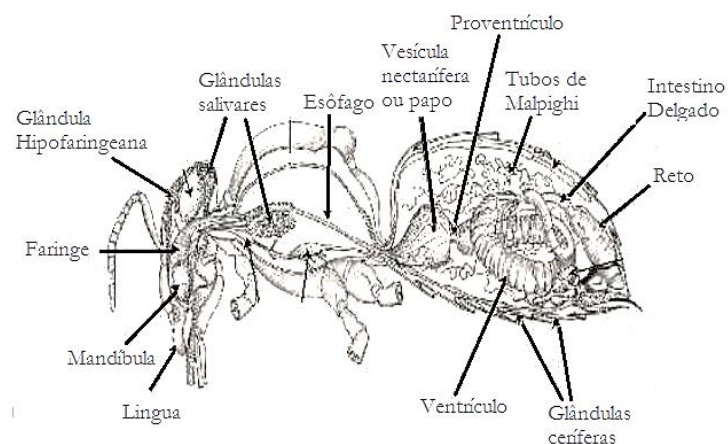


Figura 5. Sistema digestivo das abelhas adultas.

Fonte: Adaptado de (BARBOSA, et al., 2007).

2.4.2 Digestibilidade e absorção dos alimentos

Na região do estomodeu ocorre a ingestão, armazenamento, moagem e transporte de alimentos para a próxima região, o intestino médio, onde são produzidas e segregadas as enzimas digestivas que promovem a decomposição dos alimentos ingeridos, dando-se início à absorção dos nutrientes. O material não absorvido, em conjunto com os resíduos excretados pelos túbulos de Malpighi, entram para o proctodeu, sofrendo, ainda antes da eliminação das fezes através do ânus, a absorção de água e sais. A digestão de alimentos nas abelhas ocorre majoritariamente no ventrículo, porém, existem estudos que indicam a existência de bactérias e enzimas no papo, o que sugere logo aí o início da digestão. Estas enzimas podem ter origem glandular, ser resultantes da regurgitação ventricular ou resultarem das bactérias presentes (LANDIM, 2009).

Para o pólen a digestão ocorre da mesma forma em larvas e abelhas adultas, sendo que o tempo de permanência no trato digestivo depende da idade da abelha, da quantidade de alimento ingerido e o motivo da retenção. Geralmente a passagem pelo tubo digestivo ocupa de 1 a 3 horas, 3 a 12 horas no ventrículo e 5 a 20 minutos no proctodeu. A eficácia da digestão deste nutriente é mesmo assim limitada, estando descrito que somente 50% do pólen ingerido é aproveitado (RICIGLIANO, et al., 2017).

Para os hidratos de carbono, o processo de digestão inicia-se majoritariamente no ventrículo onde a sacarose é convertida em glicose e frutose e em seguida absorvida

para a hemolinfa fornecendo a energia necessária para o gasto metabólico (CANDY, et al., 1997). A absorção da glucose, frutose e 3-o-metilglucose ocorre nos dois terços iniciais do ventrículo por difusão simples e acontece de forma idêntica no verão e no inverno, sendo que os hidratos de carbono contidos no intestino podem continuar a ser absorvidos (CRAILSHEIM, 1988).

2.5 Nutrição das abelhas

Para se obter uma colmeia saudável, onde todos os indivíduos se desenvolvam e realizem as funções e ocorra a reprodução da espécie, as abelhas necessitam, como qualquer outro animal, de um conjunto de alimentos essenciais para sua sobrevivência em proporções adequadas, nomeadamente, hidratos de carbono (açúcares do néctar ou mel), aminoácidos (proteínas de pólen), lípidos (ácidos gordos e esteróis), vitaminas, minerais (sais) e água (HUANG, 2010).

Apesar das três castas de abelhas necessitarem dos mesmos alimentos durante a sua vida, cada uma possui necessidades nutricionais próprias e mecanismos de alimentação específicos, criando ao longo das diferentes etapas de desenvolvimento, mecanismos diferentes para processar esses alimentos (WINSTON, 1991).

2.5.1 Hidratos de carbono

Toda a energia que as abelhas necessitam para exercer as atividades musculares, gerar calor para o corpo, manter as funções vitais de órgãos e glândulas, como a produção da cera, é obtida a partir da maior fonte natural em hidratos de carbono, o néctar (DEGIRMENCI, et al., 2017).

Os açúcares são produzidos pelas flores das plantas, mas também podem ser encontrados em nectários extraflorais ou em secreções de outros insetos que se alimentam em plantas, os chamados exsudados que originam méis de melada. O néctar é a principal fonte de carboidratos para polinizadores e mutualistas defensivos. Os principais solutos encontrados na maioria dos néctares são proporções variáveis de sacarose, glucose e frutose. Açúcares mais raros, incluindo arabinose, galactose, manose, gentiobiose, lactose, maltose, melibiose, trealose, melezitose, rafinose e estaquiose foram também

identificados nos néctares de algumas flores, podendo exibir algumas toxicidades se consumidos pelas abelhas, porém há estudos referindo que as hidrolases glicosídicas são capazes de hidrolisar estas substâncias e também podem ser metabolizados pela microbiota intestinal (RICIGLIANO, et al., 2017; ROY, et al., 2017).

Após sugarem o néctar, as abelhas iniciam a sua transformação logo durante o voo de retorno para a colmeia com a adição de enzimas (invertases, diastases e glucose oxidase) durante a estada do néctar no papo, continuando também durante a fase de regurgitação e armazenamento nos favos para reserva de alimentação (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010). Estas enzimas adicionadas provocam a dissociação dos polissacarídeos em monossacarídeos, ao mesmo tempo que o teor de água é reduzido transformando o néctar em mel. Geralmente o mel tem um conteúdo de 80-85% de hidratos de carbono, 15-17% de água, 0,3% de proteínas, 0,2% de cinzas e pequenas quantidades de aminoácidos, fenóis, pigmentos e vitaminas. Os hidratos de carbono são representados na maioria por glucose e frutose em redor dos 30 a 40%, respetivamente, além de outros dissacarídeos e trissacarídeos (LIRA, 2014; KHAN, et al., 2018).

2.5.2 Proteínas

Uma das exigências nutricionais e de grande importância na vida das abelhas são as proteínas e a sua fonte natural é o pólen. O pólen é o plasma genital masculino das plantas, produzido a partir das anteras e utilizado para fecundar o gâmeta feminino, podendo assim reproduzir a espécie e garantir a sobrevivência da mesma (CASACA, 2010).

A composição nutricional do pólen pode variar de acordo com a fonte botânica de onde provém, porém sabe-se que, para além da água que corresponde a aproximadamente 30%, contém elevadas quantidades de açúcares (20 a 40%), proteínas (10 a 36%) e ácidos gordos (1 a 5%), bem como diversos minerais como o zinco, cobre ou ferro e alta relação potássio/sódio (1 a 7%), aos quais se juntam quantidades significativas de várias vitaminas como a provitamina A, vitamina E (tocoferol), niacina, tiamina, ácido fólico e biotina (CAMPOS, et al., 2010; MORETI, 2006).

Metade do teor em proteínas do pólen correspondem a aminoácidos

fundamentais para o desenvolvimento das abelhas, vários dos quais não são possíveis de sintetizar pelas próprias. Alguns estudos realizados por Paoli, et al. (2014), apontam que a composição de aminoácidos necessários para satisfazer as exigências nutricionais, para além de 20% de proteína bruta, deverá conter ainda 3 % de arginina, 2,5 % de fenilalanina, 1,5 % de histidina, 4 % de isoleucina, 4,5 % de leucina, 3 % lisina, 1,5 % de metionina, 3% de treonina, 1 % de triptofano e 4% de valina.

A prolina é outro aminoácido sugerido como importante na dieta das abelhas, verificando-se que estas preferem os nectários ricos em prolina, devido a capacidade que possuem de a saborear, bem como ao papel potencial deste aminoácido nos voos dos insetos. Efetivamente, a seletividade das abelhas por determinados aminoácidos é evidenciado em alguns estudos que demonstram que abelhas mostraram estar dispostas preferir alimentar-se com fenilalanina em detrimento de sacarose ao mesmo tempo que evitam o consumo de glicina mesmo quando enriquecido com sacarose (ROY, et al., 2017).

2.5.3 Lípidos

De acordo com Ares, et al. (2018), as abelhas obtêm os lípidos exclusivamente a partir do pólen, variando o teor lipídico de acordo com as espécies de onde é recolhido, oscilando entre 1 e 19%. Estas substâncias, para além de funcionarem como fagoestimulantes, desempenham diversas funções biológicas, desde o armazenamento de energia, como elemento estrutural nas membranas biológicas, fatores enzimáticos, composição de hormonas e mensageiros intracelulares (NELSON; ROBINSON, 2006; GIRI, et al., 2018).

A importância do consumo de lípidos está comprovada na literatura por vários autores: Black (2006) verificou que para obter a quantidade necessária de ácido linoleico, ácido linolénico e esteróis, as abelhas teriam de ingerir 1,6 mg/g de pólen para obter o ácido linoleico necessário e 5,5 mg/g para atingir o valor de ácido linolénico, valores estimados por defeito devido à grande excreção desses ácidos gordurosos pelas abelhas adultas. O investigador Manning, et al. (2007) testou o efeito do aumento do pólen de baixo teor lipídico com ácidos gordo na longevidade das abelhas e encontrou uma diminuição da vida útil das mesmas quando alimentadas com concentrações de ácido

oleico acima de 2%, ao contrário de quando foram submetidas a uma alimentação com ácido linoleico, pois apresentaram uma maior tolerância. Vaudo, et al. (2015), explicou que os lípidos são importantes numa variedade de processos fisiológicos em abelhas, como por exemplo no desenvolvimento do ovo, produção de cera e fonte de energia secundária e ainda que contribuem para a saúde larval e adulta. Ensaio realizados com a adição de 2 a 4% de lípidos na dieta das abelhas também demonstraram um aumento na área de criação (BRODSCHNEIDER; CRAILSHHEIM, 2010).

2.5.4 Vitaminas, minerais e água

As vitaminas do complexo B estão descritas como essenciais para a maioria dos insetos e juntamente com o ácido pantotênico, tiamina, riboflavina, piroxidina e vitaminas A e K, surgem relacionadas com o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas e com o desenvolvimento das larvas. Estudos feitos por Lengler (2002) detetaram a presença de vitamina B12 e vitamina A no pólen apícola e quantidades variáveis de vitamina B1, B2, B3, B6, B7, B8, B9, bem como vitamina C, D e E. Porém, o armazenamento por longos períodos, superiores a 12 meses acabam por deteriorar muitas destas vitaminas devido à sua instabilidade, contribuindo para a diminuição do seu valor alimentar (SOMERVILLE, 2005).

Segundo Black (2006) a biotina, colina, ácido fólico, inositol, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, riboflavina, tiamina, vitamina B12, vitamina A e Vitamina K mostraram ser essenciais na dieta das abelhas, e apesar do ácido ascórbico ser sintetizado por elas, quando adicionados aos suplementos, indicaram uma melhora nos seus desempenhos.

Os minerais são também muito importantes na nutrição das abelhas, pois atuam no funcionamento celular normal, como cofator enzimático, participam no metabolismo, regulam a expressão gênica, atuam na manutenção estrutural de biomembranas, imunidade e proteção contra radicais livres, síntese de proteínas, entre outras (ARES, et al., 2018).

As abelhas não recolhem os minerais separadamente mas a partir do pólen, água e néctar. O pólen contém de 2,5% a 6,5% de minerais encontrando-se mais

frequentemente o potássio, fósforo, cálcio, magnésio e ferro. Segundo Somerville (2005), as abelhas nutridas com dietas contendo concentrações de cinzas no pólen entre 0,5-1% produziram uma maior quantidade de criação. Já a adição de níveis superiores a 2% de cinzas na dieta das abelhas pareceu ser desvantajoso (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

Alguns estudos que investigam a variação do conteúdo de micronutrientes de insetos ao longo do tempo no campo, sugerem que as abelhas podem regular ativamente a ingestão específica de micronutrientes e ainda que os requisitos de micronutrientes de abelhas adultas mudam com a estação. Um exemplo é teor de magnésio que apresenta redução de mais de 50% entre verão e outono e o sódio que exibe múltiplas quedas de mais de 50%. Também no cálcio verifica-se um aumento na concentração no outono o que pode ser devido ao seu uso no movimento muscular para gerar calor no período de inverno (BONOAN, et al., 2018).

Contrariamente ao que se passa com o néctar e pólen, as abelhas não armazenam a água, portanto, é necessário a sua disponibilidade nas proximidades das colmeias. A água é fundamental para a sua sobrevivência, tanto para manter a homeostase do fluido corporal das abelhas adultas, produzir secreções glandulares e diluir mel para alimentar a criação mas também para manter e regular a temperatura e humidade relativa da colónia. Cada colmeia pode consumir até 20 litros de água por semana (OSTWALD, et al., 2016; BARBOSA, et al., 2007).

2.5.5 Necessidades nutricionais de acordo com a fase do desenvolvimento

As larvas, logo após a eclosão, são alimentadas com geleia-real proveniente das secreções das glândulas hipofaríngeas das obreiras, enquanto as larvas mais velhas recebem adicionalmente mel e pólen. Como não existe comunicação entre o estômago e o ânus nas larvas, todo o alimento que é ingerido é armazenado e utilizado nos estágios de pré-pupa e pupa. Nesta fase o aprovisionamento de alimento é muito maior do que o consumo e por isso a larva aparenta um aspeto leitoso, até que essa taxa de provisão de alimento se torne igual a de consumo (GIROU, 2002). Para criar uma larva, é necessário 25-37,5 mg de proteína, sendo que as larvas jovens são visitadas e alimentadas com menos frequência do que as larvas mais velhas (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM,

2010). Ao sexto dia após a eclosão, e com o fechar do alvéolo, a larva deixa de receber mais alimento e todo o desenvolvimento até à fase adulta é realizado com as reservas provisionadas. Após o nascimento e nos seis dias seguintes, apesar de aparentemente estar concluído o desenvolvimento da abelha, verifica-se um elevado consumo de hidratos de carbono e proteína, necessário para o desenvolvimento das suas glândulas hipofaríngeas, mas também para a deposição de tecidos e músculos, refletindo-se num aumento do peso corporal, como se constata na Tabela 1. A partir do 5 dia de idade e com as glândulas hipofaríngeas já bem desenvolvidas, as abelhas nutrizas são capazes de segregar produtos ricos em proteínas, como a geleia-real, os quais serão distribuídos por trofalaxia para as larvas mais jovens (CORBY-HARRIS, et al., 2016).

No estado adulto, as abelhas conseguem sobreviver na ausência de proteínas, lípidos, minerais e vitaminas pois estes podem ser catabolizados das reservas armazenadas durante o seu desenvolvimento, ao contrário dos hidratos de carbono os quais precisam de ser ingeridos constantemente, uma vez que as abelhas possuem baixas reservas de glicogénio no corpo, somente 0,05-0,47 mg, o que não é suficiente para sobreviver por longos períodos (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010; GHOSH, et al., 2016).

Estudos iniciais feito por De Groot (1953), avaliaram as mudanças no peso e no teor em proteína durante o ciclo de vida das abelhas, Tabela 1. Como se pode verificar, apesar do peso diminuir aproximadamente 10% entre a fase da abelha emergente e a abelha nutriz, o conteúdo em proteína aumenta 40%, associado ao desenvolvimento glandular referido anteriormente.

Tabela 1. Variações no peso (em fresco) e conteúdo em proteína durante o desenvolvimento sucessivo dos estágios da abelha.

Estágio de desenvolvimento	Peso abelha (mg)	Conteúdo em proteína (mg)
Ovo	0.05	-
Larva	0.3-150	0.09-2.2
Pupa	117-150	1.8-2.2
Abelha emergente	80	1.9
Nutriz	72	2.6
Percoladora	66	1.4

Fonte: Adaptada (DE GROOT, 1953)

2.6 Alimentação artificial

Existem diversas razões para o qual é apelativo fornecer artificialmente um alimento para as abelhas, podendo classificar-se o suplemento em duas categorias: de manutenção ou estimulante, sendo que o alimento de manutenção é aplicado em períodos de escassez como garantia de sobrevivência e o estimulante pressupõe uma intenção orientada, por parte do apicultor (SOMERVILLE, 2005).

A aplicação de alimentação artificial é hoje em dia utilizada pelos apicultores não apenas para manter as colónias em situações de confinamento e garantir reservas alimentares adequadas durante os períodos de inverno ou períodos de escassez de alimentos naturais (pólen e néctar), mas, cada vez mais, para provocar o desenvolvimento artificial da colónia. São diversas as situações em que é vantajoso provocar este desenvolvimento, por exemplo, para obter populações ótimas a tempo de fluxos de néctar ou para a polinização de culturas, para multiplicar colónias por divisão na primavera ou no final do verão, para estimular a criação, produzir rainhas e abelhas, prolongar a temporada para populações altas de zangões para acasalamento da rainha, etc.

A alimentação artificial pode ser oferecida às abelhas sob a forma líquida, pastosa ou sólida, podendo também ser energética, proteica ou complementar dependendo da reserva de alimentos que a colmeia possui (WOLFF, 2007).

2.6.1 Suplementação energética

Nos períodos de escassez de néctar as colónias tornam-se mais agressivas na defesa da colmeia, observando-se um declínio na procura de pólen, uma vez que a quantidade de energia disponível para realizar os voos é menor, diminuindo também o seu comportamento higiénico e alterando o funcionamento da colónia. A aplicação de alimentação energética nestas situações poderá manter a área de incubação das larvas e a população da colónia num nível elevado ou mesmo provocar um estímulo de expansão. Alguns autores recomendam a aplicação de um alimento energético sempre que as colmeias estiverem com menos de dois quadros de reservas (aproximadamente 6-8 kg de mel) (SOMERVILLE, 2005).

Um dos alimentos artificiais utilizado como suplemento é o xarope de milho rico em frutose (HFCS), comumente usado porque o seu perfil de açúcar é muito semelhante ao do mel. Este suplemento é produzido por hidrólise enzimática de vários tipos de amido de milho obtendo-se uma mistura de glicose / frutose. (SAMMATARO; WEISS, 2013). Outro dos alimentos energéticos que tem sido muito usado recentemente é o açúcar invertido, no entanto, diversos resultados apontam que durante a quebra da sacarose em glucose e frutose pela ação dos ácidos adicionados, há a liberação de hidroximetilfurfural (HMF), um composto que é bastante nocivo para as abelhas, pois causa úlcera intestinal e disenteria (KRAINER, et al., 2015). Autores como LeBlanc (2009) também constataram a toxicidade do HMF para abelhas, mostrando que em concentrações entre 57 e 200 mg/kg não afetou na sobrevivência das abelhas, no entanto, o tratamento que possuía a concentração de 250 mg/kg apresentou uma alta taxa de mortalidade.

2.6.2 Suplementação proteica

O fornecimento de pólen é particularmente necessário quando se pretende manter ou aumentar a criação de novas abelhas ou quando o pólen disponível no campo se torna limitado, o que acontece geralmente antes ou durante um fluxo de néctar. A quantidade e o tempo em que esse suplemento deve ser aplicado depende da força da colônia, do nível de produção desejado, da atratividade do suplemento, mas também da sua eficácia (SOMERVILLE, 2005; DEGRANDI-HOFFMAN, et al., 2015).

Os suplementos proteicos contendo pólen são geralmente mais bem aceites do que sem o pólen, porém é de notar que as propriedades nutritivas do pólen quando armazenado por um longo tempo poderão degradar-se, sendo o congelamento a melhor forma de armazenar estes alimentos. Embora o pólen seja sem dúvida o alimento proteico mais eficiente, são diversos os estudos que procuram uma fonte de proteínas alternativa para suprir as necessidades das abelhas, uma vez que oferecer um alimento rico em pólen como suplemento é economicamente inviável (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

As abelhas podem ser alimentadas artificialmente com uma mistura de pólen, açúcar granulado, levedura de cerveja e água ou ainda recorrendo a farinha de soja e leite

em pó, contudo há indicações que alguns destes alimentos apresentam toxicidade para as abelhas. Estudos recentes referem que 40% dos açúcares contidos na soja são tóxicos para as abelhas e que a adição de 10% de lactose ou galactose aumenta a mortalidade das obreiras e reduz a aceitabilidade do xarope de açúcar fornecido (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Avaliação das práticas atuais de alimentação artificial

Esta etapa teve por base a realização de um inquérito efetuado aos apicultores com o objetivo de avaliar as práticas de alimentação artificial atuais dos apicultores portugueses, quer ao nível dos produtos utilizados, da época e modo de aplicação, bem como das razões associadas, Anexo I. Adicionalmente efetuou-se a avaliação do nível de mortalidade das colónias nos apicultores inquiridos de modo a estabelecer correlações com a prática de alimentação artificial. Estes inquéritos foram disponibilizados através de uma plataforma online para uma resposta mais fácil. A sua aplicação foi feita através das organizações associadas da FNAP, permitindo assim atingir uma abrangência nacional. O número total de respostas validadas foi de 133 distribuídas por todo país. Os suplementos alimentares a testar foram escolhidos em função dos resultados dos inquéritos aos apicultores e das características nutricionais, e administrados de acordo com as necessidades de desenvolvimento das colónias.

3.2 Amostragem

Para este estudo foram utilizados seis suplementos comercializados em Portugal, sendo que 3 deles são classificados como energéticos: *Bee food* (E06), *Baniaia* (E08), *Abejapi* (E09) e os outros 3 como proteicos: *Albupowder* (P05), *Enerjet V. A.* (P06), *Enerjet proteico* (EP01). Os suplementos foram obtidos diretamente dos fornecedores. Para os ensaios de desempenho utilizou-se os suplementos diretamente, enquanto para a análise da sua composição efetuou-se, numa alíquota, a liofilização e conservação num exsiccador.

3.3 Padrões e reagentes

Ao longo deste trabalho utilizaram-se como solventes metanol (Panreac, p.a), acetonitrilo (Fisher Scientific, qualidade HPLC) e n-hexano (Lab-Scan, 95% qualidade

HPLC). Como reagentes recorreu-se a hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, ambos adquiridos da Panreac (Barcelona, ES).

Os padrões utilizados para a quantificação dos açúcares: frutose, glucose, sacarose e maltose, qualidade p.a., foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Todos os restantes produtos químicos e solventes foram de grau analítico e adquiridos a partir de fornecedores comuns. A água foi tratada através de um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

3.4 Análises nutricionais

Neste ponto analisou-se de uma forma global o valor nutricional dos diferentes suplementos através da quantificação do teor de proteínas, gorduras, cinzas, humidade e hidratos de carbono.

3.4.1 Determinação de proteínas

O teor de proteína bruta foi obtido pelo método de Kjeldahl, desenvolvido por Johann Kjeldahl em 1883. Foram pesados aproximadamente 1 g das amostras que, em seguida, foram transferidos para os tubos de determinação de proteínas, onde se adicionou 15 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 g do catalizador metálico ((Cu) 9% em $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Os tubos foram transferidos para o digestor de proteínas onde permaneceram até alcançar a temperatura de 400°C, aguardando-se a reação de oxidação, indicada pelo aparecimento da coloração verde. Após a digestão os tubos foram arrefecidos e seguiram para o destilador de azoto. Inicialmente a amostra foi diluída com água destilada, o excesso de ácido sulfúrico neutralizado com hidróxido de sódio a 40% e o azoto total destilado na forma amônia foi recolhido com erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico a 0,5% (v/v) com indicador misto verde de bromocresol e vermelho de metila. Na sequência a solução obtida foi titulada com solução de HCl a 0,5 mol/L até atingir o ponto de viragem identificado pela passagem da coloração azul para a rosada. Para a conversão do teor de azoto em proteína total utilizou-se um fator de 6.25, exprimindo-se os resultados em percentagem de proteína.

3.4.2 Determinação de gorduras

A determinação do percentual de gordura total foi realizada pela extração com éter dietílico utilizando-se aparelho de Soxhlet seguindo instruções de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (1995). Para o experimento, foram pesados aproximadamente 2 gramas das amostras em cartuchos elaborados com papel filtro e, posteriormente, transferidos para o equipamento. Utilizou-se um volume aproximado de 100 mL de solvente éter dietílico em cada tubo de extração, os quais foram secos (em estufa de secagem a 105°C por 2 horas) e tiveram os pesos devidamente ajustados. Em seguida, o solvente foi aquecido à ebulição e permaneceu em refluxo e em contato com amostra por 4 horas, Figura 6. Passado este tempo, procedeu-se a recuperação do éter dietílico e a retirada dos tubos de extração, que foram colocados em estufa a 105°C por aproximadamente 2 horas, para total evaporação dos resíduos de solvente. Em seguida foram retirados da estufa e transferidos para o exsiccador onde permaneceram em temperatura ambiente até o momento da pesagem. Os resultados foram expressos segundo a equação a seguir e o teor de gordura total expresso em percentagem.

$$X = \frac{100 \cdot N}{P}$$

Onde:

X= Teor em gordura (%)

N = massa de gordura (g)

P = massa de amostra (g)



Figura 6: Extração de gorduras pelo método de Soxhlet.

3.4.3 Determinação do teor em cinzas

A metodologia de determinação do teor de cinzas seguiu os procedimentos adotados pela AOAC (1995). Pesou-se aproximadamente 2 gramas de amostra para uma cápsula de porcelana previamente calcinada e manteve-se em mufla à temperatura de $600^{\circ}\text{C} \pm 15^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas. Após arrefecimento, a cápsula foi pesada para determinar a quantidade de cinzas remanescentes.

3.4.4 Determinação do teor em humidade

O teor de humidade foi determinado por liofilização utilizando-se 2g de amostra. Após 72 horas foram colocadas num exsiccador e pesadas após obtenção de peso constante.

3.4.5 Determinação de hidratos de carbono

A determinação dos hidratos de carbono foi feita através do método da Antrona, um método colorimétrico no qual o reagente da Antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno)

emite uma cor verde na presença de produtos da destruição de carboidratos, quando reage com ácido sulfúrico e calor. O ensaio iniciou-se com uma hidrólise, onde se pesou 50 mg de amostra e adicionou-se 2,5 mL de HCl a 2,5 mol/L, e levou-se a um banho a 100°C durante 3 horas. Os tubos foram retirados do banho e arrefecidos num banho de água fria, e em sequência neutralizados com carbonato de sódio até cessar fervura. Completou-se o volume para 100 mL com água desionizada e em seguida as amostras foram centrifugadas. Por fim o sobrenadante foi recolhido. Seguidamente adicionou-se a cada tubo 1 mL da solução anterior, mais 4 mL do reagente Antrona (2mg/mL), agitando-se no vórtex. Em seguida coloca-se os tubos num banho de água fria durante 2 minutos, depois são transferidos para um banho a 100°C durante 10 minutos e voltam novamente a um banho de água fria durante 5 minutos. Por último a absorvância é lida a 630nm. Os resultados foram calculados por comparação com uma reta de calibração da glucose em que as concentrações variaram de 0,02mg/mL a 0,1mg/mL.

3.5 Análise composicional

Neste âmbito, e considerando as limitações temporais em que decorreu este trabalho, a análise da composição dos suplementos centrou-se apenas no perfil de hidratos de carbono, minerais e na quantificação do aminoácido prolina.

3.5.1 Açúcares

3.5.5.1 Preparação das amostras

A determinação de açúcares livres foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a um detector de índice de refração (HPLC-RI). Previamente foi necessário preceder-se a uma diluição, pesando-se 2 gramas de amostra e adicionando-se 30 mL de água deionizada, sob agitação durante 30 minutos. Em seguida, filtrou-se a mistura com papel filtro para um para um balão volumétrico de 50 mL, adicionando-se 12,5 mL de metanol e aferindo-se o volume final com água deionizada. Posteriormente filtrou-se com filtros millipore, 0,45 mm, para vials de 2 mL. O volume injetado foi de 20 µL.

3.5.5.2 Condições Cromatográficas

A quantificação dos açúcares foi realizada num cromatógrafo integrado com uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detector de RI (Knauer Smartline 2300). Os dados foram posteriormente analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex). Para a separação cromatográfica foi usada uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30°C (forno Grace 7971 R). A fase móvel foi uma mistura de acetonitrilo/água 80:20 (v/v), com um caudal de 1.3 mL/min. A identificação dos açúcares foi obtida por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões, nomeadamente, frutose ($y=160,4x+397,73$; $R^2=0,9985$), glucose ($y=157,83x+301,23$; $R^2= 0,9988$), sacarose ($y=157,88x+416,14$; $R^2=0,9997$), maltose ($y=109,59x+25,557$; $R^2=1$). Os resultados foram expressos em g/100g de massa seca. A reta de calibração foi estimada pelo método de padrões externos, utilizando-se as concentrações de 1,87 a 60 mg/mL para frutose, 1,41 a 45 mg/mL para glucose, 1,56 a 50 mg/mL para sacarose e 0,14 a 4,5 mg/mL para maltose.

3.5.2 *Minerais*

Para a análise dos minerais foi avaliada a presença dos seguintes elementos potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) recorrendo a um espectrofotómetro de absorção atómica por chama: Pye Unicam PU9100X. A determinação dos elementos manganês (Mn), cobre (Cu) e cádmio (foi feita por espectrofotometria de absorção atómica em câmara de grafite usando um espectrofotómetro PinAAcle 900 da Perkin Elmer.

3.5.2.1 Digestão da amostra

Inicialmente foi pesada uma grama de amostra, para um tubo de digestão PTFE, ao qual foi adicionado 10mL de ácido nítrico concentrado (HNO₃). A digestão foi feita no micro-ondas utilizando o seguinte programa: rampa de temperaturas de 15 minutos até aos 200°C com potência de 1200W. Esta temperatura e esta potência foram mantidas por

mais 15 minutos. Por fim deixou-se arrefecer, e transferiu-se quantitativamente o digerido para um balão de 50 mL, aferindo-se o volume.

3.5.2.2 Análise da amostra

A análise dos diferentes minerais requer a preparação prévia de soluções específicas e padrões de acordo com as indicação seguintes:

Potássio e Sódio

Para a análise dos elementos potássio e sódio, preparou-se uma solução tampão de cloreto de cézio 10g/L e as diferentes soluções padrão de acordo com a especificação seguinte:

Solução 1: Pipetar 10mL da solução padrão 1000ppm de potássio e 5mL de solução 1000ppm de sódio para um balão de 20mL, aferir o volume com água desionizada. Em seguida foram preparadas outras soluções padrão com diferentes concentrações, como podemos ver na tabela seguinte:

Padrão	V(sol)/mL	Vf/mL
P1/4	0,25	
P1/2	0,25	
P1	1,00	50
P2	2,00	
P3	3,00	
P4	4,00	
P5	5,00	

Os padrões que são usados para a calibração do espectrofotómetro resultam da diluição de dez vezes destes padrões (solução de 5,0mL de cada um dos padrões e 5mL de solução tampão de CsCl aferidos a 50mL).

Para a deteção do potássio no suplemento, mediu-se 5mL da solução digerida de suplemento, adicionou-se 1mL da solução tampão e 4 mL de água desionizada. Para a deteção de sódio no suplemento, mediu-se 10mL da solução digerida de suplemento e 1mL da solução tampão. As leituras foram feitas de acordo com as condições recomendadas para o equipamento.

Cálcio e Magnésio

Para a análise dos elementos cálcio e magnésio, preparou-se uma solução de lantânio de concentração 10g/L, diluindo-se 13,15g de $\text{La}(\text{NO}_3)_2$ em 1L de água desionizada. Adicionalmente preparou-se uma solução padrão Ca 1000ppm (solução 2) e solução padrão Mg 1000ppm em 10mL de água desionizada (solução 3)

A partir das soluções 2 e 3 foram preparadas uma serie de soluções padrões de acordo com a tabela seguinte.

Tabela 2: Soluções padrões preparadas a partir das soluções 2 e 3.

Padrão	V(Sol 2)/mL	V(sol 3)/mL	Vf/mL
P1/4	0,25	0,25	
P1/2	0,50	0,50	
P1	1,00	1,00	
P2	2,00	2,00	50
P3	3,00	3,00	
P4	4,00	4,00	
P5	5,00	5,00	

Os padrões usados para a calibração do espectrofotômetro para a determinação do Ca resultam da diluição de dez vezes destes padrões (solução de 5,0mL de cada um dos padrões e 5mL de solução La aferidos a 50mL).

Os padrões que são usados para a calibração do espectrofotômetro para a determinação do Mg resultam da diluição de trinta e três vezes destes padrões (solução de 1,50mL de cada um dos padrões e 5mL de solução La aferidos a 50mL).

A análise das amostras efetuou-se pipetando 10 mL de cada uma das soluções digeridas e adicionando-se 1mL da solução de lantânio. As determinações de Ca e Mg foram realizadas de acordo com as condições recomendadas para o equipamento.

Manganês, Cobre e Cádmio

Para determinação do manganês utilizou-se um modificador de matriz diluindo-se 1,7mL da solução de nitrato de magnésio, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 10g/L, para 10mL de solução com água desionizada. Em seguida preparou-se dois padrões para o Manganês

recorrendo-se a uma diluição de 0,50mL de solução padrão 1000ppm para 50mL com água desionizada e uma outra por diluição de 0,20mL da solução anterior para 50mL com água desionizada (padrão 2).

Para o cobre o modificador da matriz foi obtido diluindo-se 1,0mL de solução paládio, Pd, 10g/L e 0,1mL de solução de nitrato de magnésio, $Mg(NO_3)_2$, para 10mL de solução com água desionizada. Em seguida preparou-se dois padrões para o cobre diluindo-se 0,50mL de solução padrão 1000ppm para 50mL com água desionizada para o primeiro padrão e diluindo-se 0,50mL da solução anterior para 50mL para o segundo padrão (padrão 2).

Para a determinação do cádmio o modificador de matriz foi preparado diluindo-se 0,10mL de solução de nitrato de magnésio, $Mg(NO_3)_2$, e 1,0mL de solução fosfato de amônio monobásico, $NH_4H_2PO_4$, a 10% para 10mL, com água desionizada. Em seguida prepararam-se duas soluções padrão, a primeira diluindo-se 0,25mL de solução padrão 1000ppm para 50mL com água desionizada e uma segunda diluindo-se 0,10mL da solução anterior para 50mL com água desionizada (padrão 2).

Os padrões usados para construir a curva de calibração resultaram da diluição automática do padrão 2, de acordo com a tabela.

Tabela 3: Padrões utilizados para construir a curva de calibração

Padrão	V(P2)/ μ L	V(Matriz)/ μ L	V(H ₂ O)/ μ L
P1/4	5	5	15
P1/2	10	5	10
P3/4	15	5	5
P1	20	5	0

Para a análise das amostras foram pipetados 20 μ L de amostra e 5 μ L de modificador de matriz e usadas as condições instrumentais recomendadas para a análise de cada um deles.

3.5.3 Determinação da Prolina

Para a análise da presença de prolina prepara-se inicialmente uma solução de 100 mL pesando-se 0,5g da amostra e diluindo-se com água. De seguida transfere-se 0,5

mL desta solução para um tubo de ensaio e adiciona-se 1 mL de ácido fórmico (98%) e 1 mL de ninhidrina (3%). Após agitação durante 15 minutos transfere-se o tubo para um banho a 100°C durante 15 minutos, e posteriormente para um banho a 70°C durante mais 10 minutos. Por último adiciona-se 5 mL de 2-propanol (50%), permanecendo em repouso durante 45 minutos no escuro. Para a preparação do branco e do padrão aplica-se a mesma metodologia, mas substituindo os 0,5 mL da amostra por água ou pela solução de prolina a 0.032 mg/mL, respetivamente. Após a permanência no repouso a absorvância da solução é lida a 510 nm. Para a quantificação do conteúdo em prolina na amostra aplica-se a equação seguinte (mg/g), (BOGDANOV, 2002).

$$Prolina = \left(\frac{Abs amostra}{Abs padrão} \right) * \left(\frac{m padrão}{m amostra} \right) * 8$$

3.6 Hidroximetilfurfural

Para determinar a quantidade de HMF presente nas amostras aplicou-se um método espectrofotométrico descrito por Bogdanov (2002). Inicialmente prepara-se uma solução dissolvendo-se 5 g de amostra liofilizada em 25 mL de água destilada e transferindo-se para um balão volumétrico de 50 mL, ao qual se adiciona 0,5 mL de solução Carrez I e 0,5 mL de solução Carrez II, perfazendo o volume total com água destilada. Em seguida, lê-se as absorvâncias no espectrofotômetro a 284 e 336 nm. A quantificação de HMF é obtida utilizando-se a seguinte equação:

$$HMF = (Abs 284 - Abs 336) * 149,7 * \left(\frac{2,5}{m amostra} \right)$$

3.7 Detecção da presença de OGM

Para detectar a presença de ADN nos suplementos, preparou-se inicialmente a amostra pesando 1,5 g e adicionando azoto liquido até à sua solidificação (pó), Figura 7, adicionando-se em seguida 7,5 mL de água destilada.

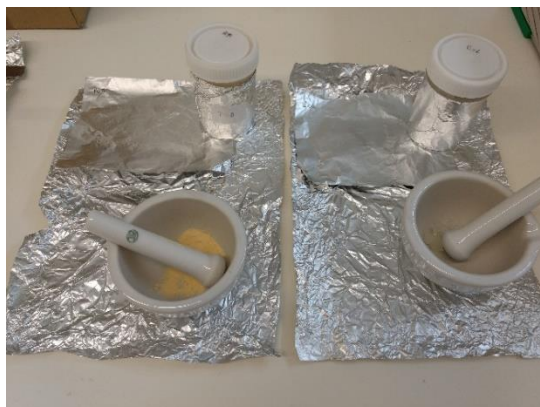


Figura 7: Preparação da amostra com azoto líquido para deteção de ADN.

De seguida transferiu-se 50 μL da solução anterior para um eppendorf contendo 500 μL do tampão instangene matrix, agitando-se e colocando num banho a 95°C durante 5 minutos, após o qual se realiza uma centrifugação durante 5 minutos.

Para preparação do gel, foi pesado 0,64 g de agarose e dissolvido em 50 mL do tampão TE (100 mL de solução de Tris-HCl (1M, pH: 8,0) / 20 mL de EDTA (0,5 M, pH: 8,0), em água tipo I, esta solução foi diluída 10X para seu uso direto) colocando-se no micro-ondas durante 3 minutos. Após o arrefecimento, adicionou-se 0,8 μL de brometo e virou-se a solução para uma tina de 8 poços. Para inserir a amostra no gel, utilizou-se 5 μL do marcador com 5 μL da solução da amostra, de acordo com a Figura 8.

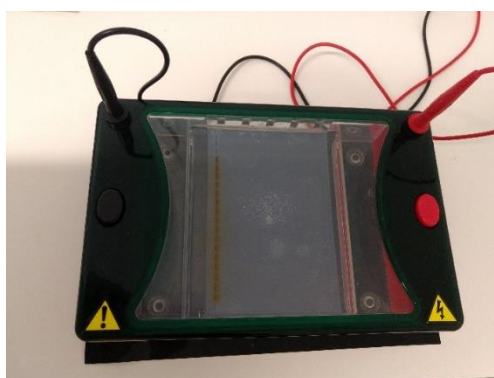


Figura 8: Amostras aplicadas no gel numa tina de 8 poços.

Com ação de corrente elétrica os fragmentos são separados, movendo-se pelo polo positivo a uma taxa inversamente proporcional ao logaritmo da sua dimensão, formando-se bandas que foram visualizadas em um sistema de aquisição de imagem.

Para se confirmar a presença de OGM nas amostras que apresentaram ADN serão efetuados ensaios de despistagem por PCR, baseados numa sequência alvo característica de um grupo a analisar ex: promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (P-35S) e nos terminadores do *Agrobacterium tumefaciens*, presentes na maioria dos OGMs no mercado. Para garantir a integridade de pureza do ADN será utilizado um primer do gene da lecitina da soja ou milho como controlo positivo. No caso de resultados positivos será realizado um PCR para construções específicas, com ampliação da junção entre os diferentes elementos do inserte transgénico.

3.8 Ensaios *in vitro* de desempenho dos suplementos

Para a avaliação do desempenho dos diferentes suplementos foram realizados ensaios com abelhas em ambiente laboratorial.

3.8.1 Origem das abelhas

O apiário de origem está localizado numa área com grande diversidade florística, sem agricultura intensiva e fontes significativas de poluição. Todas as abelhas possuíam origem na mesma colónia ou em colónias com rainhas irmãs, jovens, saudáveis e livres de patogénicos. Com rainhas irmãs a robustez estatística é aumentada apesar de se diminuir a abrangência de generalização dos resultados. Oito semanas antes do início da criação das abelhas para os ensaios, as colónias foram tratadas contra a varroa. Foi inserido um número adequado de quadros de cera laminada nas colónias um mês antes de começar o ensaio, para minimizar riscos de resíduos e melhorar a saúde das abelhas.

Para a recolha das abelhas emergentes, foram retirados das colónias quadros de criação operculada na fase de ninfa de olhos negros e transferidos num recipiente adequado para o laboratório, onde foram mantidos com temperatura e humidade controlada a 35°C e 70%, respetivamente. Para garantir que as abelhas, após o seu nascimento, não se alimentassem de mel/pólen eventualmente presente nos favos, confinou-se a área de criação com uma rede.

Após o nascimento e antes das 12h de vida, as abelhas foram transferidas para as gaiolas de ensaio num total de 50 abelhas/gaiola.

3.8.2 Gaiolas de ensaio

Para a manutenção das abelhas em espaço controlado foram elaboradas gaiolas de ensaio conforme se apresenta na Figura 9. Estas gaiolas são constituídas por um copo perfurado no qual se introduziu uma lâmina de cera, B, para controlo da mobilidade das abelhas. Adicionalmente esta gaiola possui 3 orifícios onde se disponibiliza, *ab libitum*, os diferentes alimentos, nomeadamente água (A) comum a todos os ensaios, alimento energético (D) e alimento protéico (C). Após a colocação das abelhas nas gaiolas de ensaio, as mesmas foram mantidas no escuro, com ventilação, em condições de temperatura e humidade controlada, 30°C e 70%, respetivamente.

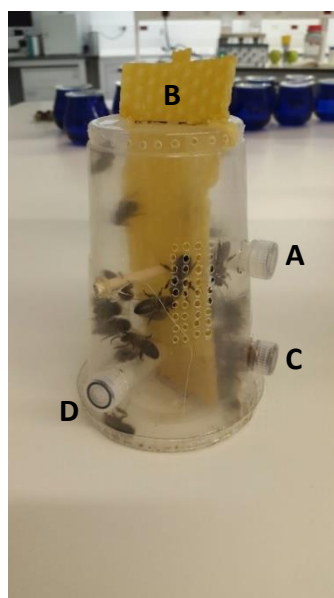


Figura 9: Gaiola experimental, com 50 abelhas emergentes. Água (A), cera (B), suplemento energético (C), suplemento proteico (D).

3.8.3 Condições experimentais

A avaliação dos 6 suplementos alimentares foi realizada em experiências independentes, fornecendo-se o suplemento em complemento com um alimento controlo e sempre na presença de água. Como alimento energético de controlo utilizou-se uma solução de sacarose a 50%, enquanto como controlo proteico utilizou-se albumina em pó. Assim, para os ensaios dos suplementos energéticos, E06, E08 e E09, para além do suplemento fornecido na posição A da gaiola de ensaio, foi fornecido albumina na posição

D. Para os ensaios dos suplementos proteicos, P05, P06 e EP01, para além do suplemento administrado na posição D, foi disponibilizada a solução de sacarose a 50% na posição A.

Os alimentos foram preparados de acordo com a indicação dos fornecedores (Figura 10) e dispostos em recipientes de pequeno volume. Para o suplemento P05 foi necessária diluir 2,5 g em 50 mL de xarope de sacarose a 50%, enquanto para o suplemento proteico P06 dilui-se 0,2 µL do suplemento num xarope contendo 8,3 g de açúcar em 50 mL de água. Os restantes suplementos foram administrados como recebidos. Com excepção do suplemento P05 que recomenda a sua aplicação uma vez/semana e o EP01 com dosagem de 300 a 400 g/semana, os restantes não fazem qualquer referência às doses e períodos de aplicação.

Para cada um dos seis suplementos foram realizadas 7 réplicas contendo 50 abelhas com a mesma idade. Adicionalmente, e para comparação, foram efetuados 3 ensaios de controlo, utilizando apenas sacarose a 50% (sem disponibilização de alimento proteico), apenas albumina (sem disponibilização de alimento energético) e sacarose a 50% conjuntamente com albumina. O conjunto das experiências envolveu a preparação de 63 gaiolas de ensaio, as quais foram seguidas diariamente durante 45 dias.

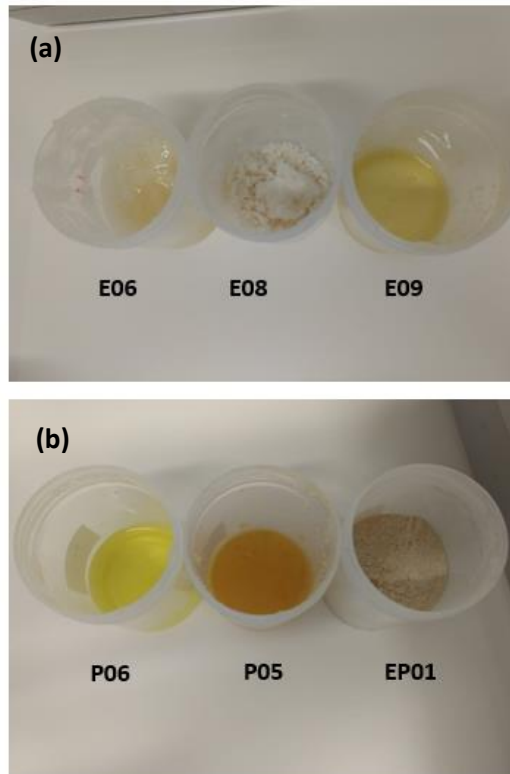


Figura 10: Aspecto dos suplementos preparados para teste. (a) energéticos (b) proteicos.

A cada período de 24 horas procedeu-se à examinação das gaiolas, removendo-se e contabilizando-se as abelhas mortas e o alimento consumido, substituindo-o por uma nova dose. Estas tarefas decorreram sob iluminação fraca.

3.8.4 Avaliação dos resultados

O consumo dos suplementos foi calculado pela soma de diferenças de pesos observadas entre as quantidades iniciais fornecidas e as sobras registradas, dia após dia durante o período experimental. O consumo diário de suplemento por abelha foi calculado a partir do consumo diário de cada repetição dividido pelo número de abelhas existentes em cada copo, por fim foi realizada uma média das repetições.

Para a avaliação das taxas de mortalidade médias por tratamento, expressas em percentagens (%), foram calculadas, a cada 24 horas, dividindo-se o número total de abelhas mortas pelo número inicial de abelhas tratadas (50).

3.9 Tratamento de dados

Os dados analíticos obtidos foram calculados em triplicata com as médias e desvios padrões e em setuplicado para os dados obtidos do desempenho dos suplementos no ensaio *in vitro*. Adicionalmente, e para análise nutricional foi aplicada a análise de componentes principais (PCA) para identificar as dimensões que melhor diferenciam o conjunto de dados em análise, ou seja, os seus componentes principais e realçar as semelhanças e diferenças neles existentes através da identificação de padrões e que futuramente será estendida aos restantes resultados experimentais.

Foi utilizado o método de Análise de Componentes Principais a partir do software Matlab 2007v com o PLS Toolbox 5.2.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS ATUAIS DE ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL

O questionário foi disponibilizado on-line aos apicultores entre dezembro de 2017 e março de 2018, obtendo-se 133 respostas completas. Os participantes do estudo, apresentaram uma gama de idades alargada entre 21 e 79 anos possuindo na sua maioria formação académica ao nível do ensino superior (43%) e ensino secundário (42%), seguindo o mestrado com 11% das respostas. Segundo dados do Programa Apícola Nacional de 2015, existem cerca de 11 mil apicultores registados no país, correspondendo a 33 mil apiários e 626 mil colmeias. A distribuição dos apiários, segundo o inquérito obtido, pode ser vista na Figura 11, e verifica-se que existe uma forte dispersão e consequentemente representatividade no território nacional, sendo que o Norte é a região onde se situa o maior número de colónias (50%), o centro do país vem em seguida com (33%), o Algarve e o Alentejo são as regiões com menor número de apicultores inquiridos, porém estes são os de maior dimensão.

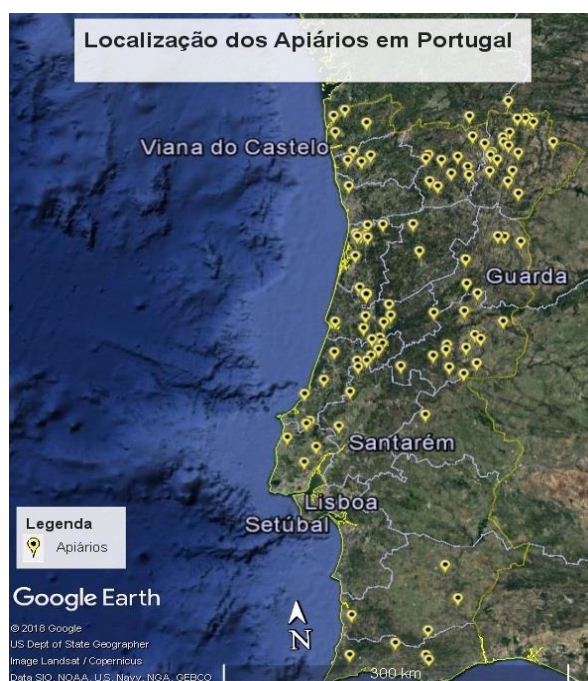


Figura 11: Localização dos apiários dos inquiridos

O uso de alimentação artificial no manejo habitual das colónias é uma prática realizada pela maior parte dos apicultores (81%), que optam por fornece-las

principalmente nos meses de inverno entre novembro (52%) e fevereiro (61%) com o pico de maior aplicação em janeiro (71 %). Este resultado indica que a principal causa para a aplicação da alimentação artificial é a escassez de floração devido ao período do inverno e conseqüentemente a suplementação é a ferramenta para garantir a sobrevivência das colmeias nestes períodos. Há, no entanto, alguns apicultores que utilizam a alimentação artificial para outros fins como a multiplicação de colmeias (28%) ou para fortalecer a colmeia em situações de ataque de predadores como a Vespa Velutina. É também de salientar que todos os apicultores inquiridos se dedicam à exploração à produção de mel seguindo-se a venda de enxames (30%) e exploração de pólen com 21%. No momento de decidir que tipo de alimentação a aplicar, a maioria opta por produtos comerciais (62%) mas não despreza a aplicação de xaropes caseiros de água e açúcar (58%). Aquisição destes produtos é realizada maioritariamente em lojas da especialidade e organizações de produtores, mas verifica-se que mais da metade dos apicultores disseram não obter informações sobre o modo de aplicação, época de aplicação, composição e a situação em que deve ser aplicado e (22%) deles já observou efeitos indesejáveis resultantes. Entre esses inconvenientes advindos da alimentação artificial foram citados: afogamento das abelhas, incapacidade de consumir o xarope se mais seco, dependência da alimentação artificial, diarreias, pilhagem. O impacto da aplicação de alimentação artificial às abelhas permite essencialmente reduzir em 75% o número de colónias perdidas por exploração, para além de aumentar a produção de enxames em mais de 50 % e também contribuir significativamente para o aumento da produção de mel (60%).

4.2 DESCRIÇÃO DA COMPOSIÇÃO ANUNCIADA DOS SUPLEMENTOS

A informação encontrada sobre a composição dos diversos suplementos em estudo, seja através do rótulo, da informação disponibilizada pela entidade que comercializa o produto ou recolhida em plataformas digitais, é muito variável e de uma forma geral pouco clara e descritiva. Verifica-se algumas situações em que a informação é totalmente inexistente o que evidencia claramente a desregulação deste segmento de mercado. Na Tabela 4 apresenta-se um resumo de toda a informação disponível sobre a composição dos alimentos. Na generalidade, a informação não discrimina a quantidade

dos componentes individuais presentes. A composição dos suplementos E06 e E08 e constante da Tabela 4 foi obtida exclusivamente através da plataforma digital.

Tabela 4: Composição anunciada dos suplementos alimentares para abelhas, em estudo.

Composição	Suplementos					
	E06	E08	E09	P05	P06	EP01
Ácidos	-	Sumo de limão	Ácido cítrico (E330)	-	-	-
Açúcares	Pres.	Pres.	Frutose (44%) Glucose (42%) Sacarose (13%)	-	-	11%
Aditivos	-	-	Sorbato de potássio (E200)	-	-	-
Água	-	Pres.	18%	4,80%	-	-
Gorduras	-	-	-	6,50%	0,2%	0,5%
Minerais	-	-	Óxido de zinco, cloreto de sódio, iodeto de potássio, óxido de manganês	Cálcio (0,5%) Fósforo (1%) Sódio (0,5%) Potássio (0,5%)	Sódio (0,4%)	Cálcio (0,3%), Fósforo (11%) Sódio (0,4%)
Proteínas	-	-	0,03%	79%	9,9%	45%
Vitaminas	-	-	B1, B2, B3, B5, B6, C, Biotina	-	A, D3, K, B1, B2, B6, Cloridrato de piridoxina, B12, Biotina, Niacina, D – Pantotenato de cálcio	B1, B2, B6, B12, Ácido nicotínico, Ácido Fólico, Biotina, Ácido Pantoténico

Pres.: Presença. *E06: Bee food; *E08: Baniaia; *E09: Abejapi; *P05: AlbuPower; *P06: Energéticos V.A.; *EP01: Energético proteico.

Entre os suplementos energéticos, é evidente a presença de açúcares, porém o único que traz uma informação mais detalhada do perfil é o suplemento E09, que possui 44% de Frutose, 42% de glucose e 13% de sacarose. Para os suplementos E08 e E09 é referida a presença de ácidos na composição o que poderá estar associado com a adição de agentes para evitar a formação de microrganismos. Entre os suplementos proteicos verifica-se uma variação significativa do teor de proteína, observando-se que o suplemento EP01 possui adicionalmente uma composição rica em hidratos de carbono

(11%). Outra das características comuns na composição destes suplementos é a presença de uma ampla gama de vitaminas, com exceção do suplemento P05 onde não se observa qualquer referência. Em contrapartida este produto apresenta uma quantidade elevada de gordura (6,5%), quando comparado com os demais, P06 (0,2%) e EP01 (0,5%). A presença de minerais é também características dos produtos proteicos, e inclusive de um dos produtos energéticos, com quantidades altas de sódio, mas também, nalguns dos produtos, cálcio, fosforo e potássio.

4.3 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

Para avaliar o valor nutricional dos diferentes suplementos em estudo efetuou-se a análise centesimal, nomeadamente o teor em cinzas, proteínas, gorduras, hidratos de carbono e humidade, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados da análise centesimal para os suplementos artificiais em estudo.

Amostra	Cinzas (%)	Humidade (%)	Proteínas (%)	Gordura (%)	Hidratos de carbono (%)
E06	-	2,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	61 ± 2
E08	-	8,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	85 ± 0
E09	-	13,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	62 ± 0
P05	4,6 ± 0,1	-	66 ± 6	3,1 ± 0,4	4 ± 1
P06	7,2 ± 0,0	22,0 ± 0,0	57 ± 3	17 ± 1	-
EP01	5,2 ± 0,0	-	52 ± 0	1,2 ± 0,2	34 ± 1

***E06:** Bee food; ***E08:** Baniaia; ***E09:** Abejapi; ***P05:** Alupower; ***P06:** Energéticos V.A.; ***EP01:** Energético proteico.

Conforma se pode verificar pela tabela anterior, os suplementos energéticos possuem na sua composição principalmente hidratos de carbono, sendo que o que possui a maior percentagem é o E08 (85%) seguido do E06 e E09 com quantidades muito semelhantes (61-62%). Para estes produtos os teores de proteínas, gorduras e os valores em cinzas são praticamente insignificantes. Já ao nível da humidade, o E09 é entre os suplementos energéticos o que apresenta valores mais elevados, isto também porque se encontra em forma líquida, enquanto o E06 e E08 são suplementos pastosos.

Já para os suplementos proteicos observa-se uma quantidade superior de proteínas do P05 em relação aos demais. O suplemento P06 além de possuir uma maior quantidade de humidade por ser um produto líquido, destaca-se pela quantidade de gordura elevada (17%) em comparação aos demais, que ficam próximos aos 3%. Estes valores estão em desacordo com a informação descrita para os produtos, Tabela 4. O suplemento EP01 evidencia-se dos restantes por integrar simultaneamente uma quantidade significativa de proteínas e hidratos de carbono, significativamente superior ao disponibilizado na informação, possuindo assim uma dupla funcionalidade.

Aos resultados apresentados na Tabela 5 foi aplicada a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*), e os resultados estão dispostos nas Figuras 12 e 13. Para a análise foram utilizadas 3 componentes principais (PCs) que, somados, explicaram 98,54% da variância total dos dados. A Figura 12 traz informações sobre as amostras (*scores*), enquanto que a Figura 13 traz informações sobre as variáveis (*loadings*). Em outras palavras, a Figura 12 apresenta a separação entre as amostras enquanto a Figura 13 as razões pelas quais as amostras se assemelham/diferem. Observando-se a Figura 12, nota-se que a PC1 classifica as amostras 1, 2 e 3 (1: Bee food; 2: Baniaia; 3: Abejapi) como semelhantes, diferenciando-as das amostras 4, 5 e 6 (4: AlbuPower; 5: Energéticos V.A.; 6: Energético proteico). De acordo com a Figura 13, pode-se observar que a razão da semelhança entre as amostras 1, 2 e 3 é o teor de hidratos de carbono (variável 5). As amostras 4, 5 e 6 assemelham-se com relação aos teores de cinzas, humidade, proteínas e gorduras. Mais detalhadamente, nota-se que as amostras estão dispostas em quadrantes diferentes, de modo que a amostra 5 se encontra no quadrante positivo para PC1 e PC2, sendo, portanto, influenciada pelos teores de humidade e gordura. As amostras 4 e 6 estão localizadas no quadrante positivo para PC1 e negativo para PC2, de modo que, de acordo com a Figura 13, são influenciadas pelos teores de cinzas e proteínas. As amostras 2 e 3 estão localizadas no quadrante negativo para PC1 e positivo para PC2, sendo, portanto, influenciadas pelo teor de Hidratos de carbono. A amostra 1 está localizada sob a linha que divide os quadrantes positivo/negativo de PC2. No entanto, todas as amostras que se apresentam dispostas em PC1 negativo são influenciadas pelo teor em hidratos de carbono.

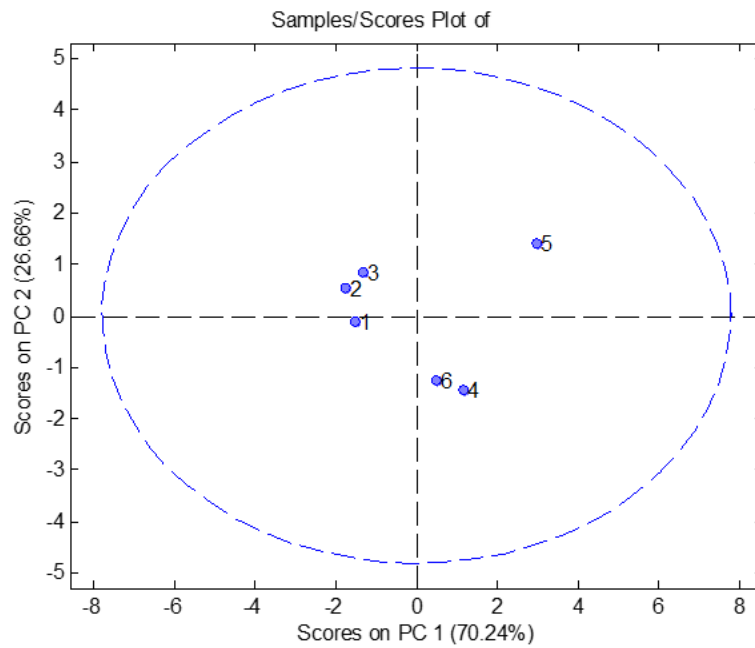


Figura 12: Gráfico dos scores obtidos por *análise de componentes principais* dos resultados de análise centesimal dos suplementos alimentares para abelhas. PC1 x PC2. **1:** Bee food; **2:** Baniaia; **3:** Abejapi; **4:** Albupower; **5:** Energéticos V.A.; **6:** Energético proteico.

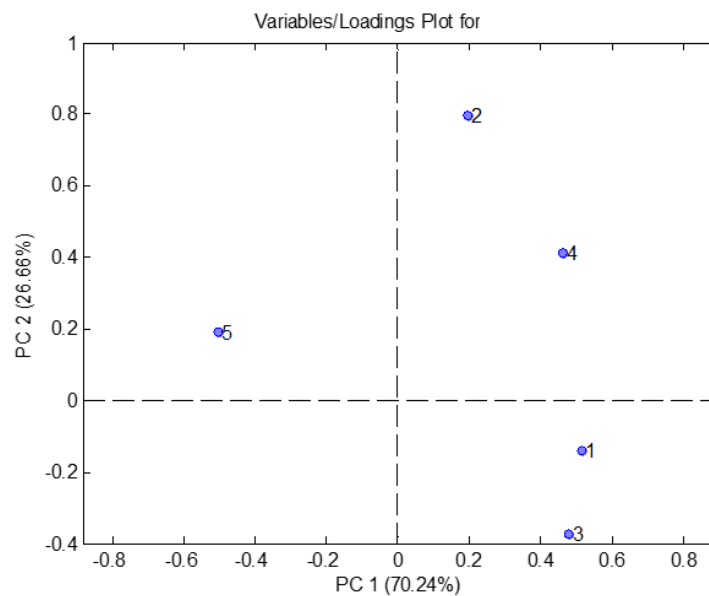


Figura 13: Gráfico dos loadings obtidos por *análise de componentes principais* dos resultados de análise centesimal de suplementos alimentares para abelhas. Variáveis x PC1 PC2. **1:** Cinzas (%); **2:** Humidade (%); **3:** Proteínas (%); **4:** Gordura (%); **5:** Hidratos de carbono (%)

4.4 AVALIAÇÃO COMPOSICIONAL

Neste âmbito, foi efetuada a análise específica de alguns dos componentes individuais que constituem os suplementos artificiais para abelhas, em particular no que se refere ao perfil de açúcares, quantificação do aminoácido prolina e teor em minerais.

4.4.1 Composição em açúcares

A identificação e quantificação de açúcares livres presentes nos suplementos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a um detetor de índice de refração (HPLC-RI) e os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 6.

Na Figura 14 podemos ver o cromatograma obtido por HPLC para uma mistura dos padrões de açúcares ensaiados, nomeadamente os monossacarídeos frutose e glucose e os dissacarídeos maltose e sacarose.

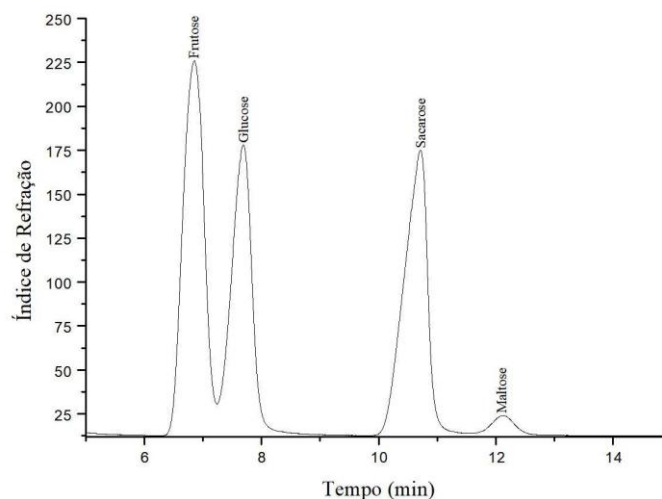


Figura 14: Cromatograma de padrões de açúcares: Frutose; Glucose; Sacarose; Maltose.

Na Figura 15 pode-se observar um cromatograma característico dos suplementos, em particular para o E09. No cromatograma é possível detetar a presença dos açúcares frutose, glucose e sacarose, com exceção do dissacarídeo maltose, o qual não foi detetado em nenhum dos suplementos.

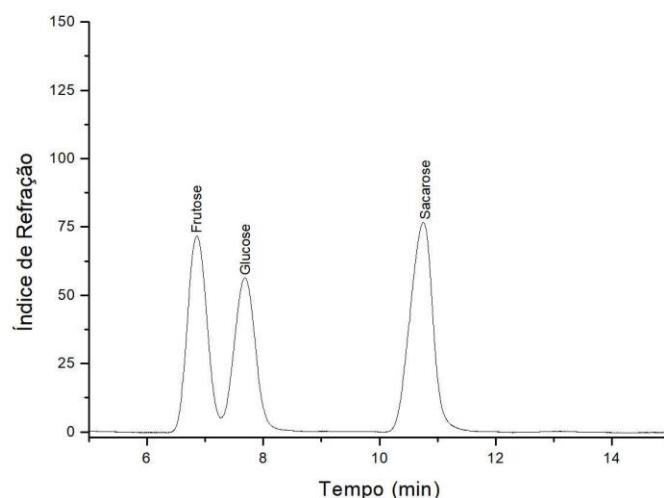


Figura 15: Perfil de açúcares do suplemento E09: Frutose; Glucose; Sacarose.

A análise quantitativa, Tabela 6, indica uma quantidade superior de glucose que oscila entre os 43% para o suplemento E06 e 15% para o suplemento E09. O suplemento E08 apresentou somente sacarose na sua composição (75%). Os suplementos proteicos não possuem açúcares, exceto o EP01 que apresentou 3% de glucose. Segundo Khan et al. (2018), entre os açúcares que já foram encontrados no mel, independente da variedade os que estão em maior quantidade são frutose com 39% e glucose com 30%, sendo que o suplemento que mais se aproxima dessa composição é o E06.

Tabela 6: Quantificação de açúcares livres realizada por cromatografia líquida (HPLC-RI).

Suplemento	Frutose (%)	Glucose (%)	Sacarose (%)
E06	18 ± 0	43 ± 1	-
E08	-	-	75 ± 0
E09	17 ± 2	15 ± 1	26 ± 3
P05	-	-	-
P06	-	-	-
EP01	-	3 ± 0	-

4.4.2 Prolina

Um dos aminoácidos frequentes na composição dos alimentos é a prolina, considerando a apetência das abelhas por este composto. Para identificar e avaliar a sua

presença nos suplementos efetuou-se uma análise por espectrofotometria e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Quantidade de Prolina nos suplementos alimentares

Suplemento	Prolina (mg/g)
E06	-
E08	-
E09	-
P05	2 ± 0
P06	8 ± 1
EP01	2 ± 0

Analisando os valores encontrados desse aminoácido para as amostras de suplementos, é possível observar a sua presença em todos os alimentos proteicos e em maior quantidade na amostra P06 com valores de 8 mg/g. Segundo Campos et al. (2008) a prolina, os ácidos glutâmico e aspártico, a lisina e a leucina são aminoácidos predominantes no pólen, constituindo aproximadamente 55% aminoácidos totais. Os valores encontrados para os suplementos estão de acordo com os encontrados no pólen de alfafa por Taha, Al-kahtani e Taha (2017) com 0,68 mg/g de prolina e por Lengler (2002) que encontrou de 0,35 a 4,95g em 100 g de pólen.

4.4.3 Análise de minerais

Os resultados para os minerais: potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram obtidos através de espectrofotômetro de absorção atômica com ionização por chama por chama, já a determinação dos elementos manganês (Mn), Cobre (Cu), e Cádmiio (Cd) os resultados foram obtidos por espectrofotometria de absorção atômica em câmara de grafite e estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8: Composição dos suplementos em minerais.

Amostras	Potássio (mg/kg)	Sódio (mg/kg)	Cálcio (mg/kg)	Magnésio (mg/kg)	Manganês (mg/kg)	Cobre (mg/kg)	Cádmio (ppb)
E06	1152±7	21±2	35±2	7±2	nd	nd	nd
E08	2,8±0,2	14±2	23,1±0,1	0,6±0,2	nd	nd	nd
E09	14±1	30,0±0,1	31±2	23±2	nd	nd	nd
P05	3892±24	450±17	738±37	680±5	7±2	0,33±0,02	0,03±0,00
P06	3521±103	53670±4865	74125±2558	631±28	4±1	0,23±0,02	nd
EP01	4649±38	599728±11205	2208±9	67,9±0,0	0,66±0,03	nd	nd

nd. Não detetado

Como se pode verificar pela Tabela 8, os alimentos proteicos são significativamente mais ricos em micronutrientes, o que está de acordo com os resultados da análise nutricional refletindo o alto teor de cinzas desses alimentos. De uma forma geral, os elementos mais comuns são o sódio, potássio e cálcio e em menor quantidade o magnésio. Já o manganês e o cobre aparecem em pequenas quantidades e num número limitado de suplementos. O cádmio, um elemento associado frequentemente com a contaminação por metais pesados surge num dos alimentos em pequenas quantidades, P05, o que poderá por em causa a segurança da sua utilização. Uma das observações mais evidentes é a diferença entre os resultados obtidos e a descrição disponibilizada nos rótulos dos produtos, observando-se quer a presença de um número mais elevado de minerais quer valores discordantes dos apresentados. No suplemento E09 além da indicação dos minerais zinco, potássio, sódio e manganês (não detetado) encontrou-se a presença de 22,60 mg de Magnésio. Por outro lado, o suplemento P06 que segundo a informação contida no rótulo possuía somente sódio na composição, apresentou quantidades elevadas de potássio, cálcio e magnésio. Torna-se evidente um maior controlo de qualidade destes produtos existentes no mercado e da veracidade das indicações da composição.

4.5 AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO

4.5.1 Análise de hidroximetilfurfural (HMF)

A presença de hidroximetilfurfural nos alimentos para abelhas é um fator de risco pela toxicidade deste composto, podendo estar presente devido a processos de fabrico dos suplementos mas também devido às condições de armazenamento destes

produtos, os quais estão sujeitos a processos de fermentação que podem provocar o aparecimento do composto. A análise nos suplementos em estudo foi obtida por espectroscopia e os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Teor de hidroximetilfurfural (HMF) nos suplementos.

Suplemento	HMF (mg/kg)
E06	76 ± 6
E08	8 ± 0
E09	67 ± 7
P05	0,0
P06	0,0
EP01	0,0

De acordo com os resultados encontrados a presença de hidroximetilfurfural é comum em todos os suplementos energéticos com quantidades mais significativas para o E06 e E09. Segundo Silva (2016) o teor desse composto pode sofrer variações de acordo com alguns fatores como o perfil de açúcares, a presença de ácidos orgânicos, o pH, o teor de humidade e pode representar toxicidade para as abelhas em quantidades elevadas. No entanto, os resultados obtidos ficaram dentro dos limites encontrados por LeBlanc (2009) o qual verificou que num intervalo de concentrações de 57 a 200 mg/kg este composto não afetou a sobrevivência das abelhas.

4.5.2 Detecção da presença de OGM

A presença de OGM nos alimentos para abelhas não é por si só um fator de risco, no entanto, e considerando a imagem que o mel ostenta, a possibilidade de contaminação dos produtos da colmeias com resíduos de OGM pode condicionar a perceção do consumidor, sendo por isso importante evitar a sua introdução na colónia. Assim, com o objetivo de avaliar a possibilidade da presença de OGM nos suplementos efetuou-se numa fase inicial a deteção de ADN, através de um gel de agarose, o resultado obtido pode ser visto na Figura 16.

Como se pode verificar na figura, as únicas amostras que apresentaram vestígios de ADN na sua composição foram a EP01 e P06. Para avaliar se este ADN encontrado é geneticamente modificado é necessário agora dar continuidade na análise, por meio de ensaios de despistagem por PCR, pois a preparação de substitutos de pólen pode facilmente ter origem em produtos geneticamente modificados como sejam a soja ou o milho, e assim introduzir na colónia potenciais contaminantes dos produtos apícolas.

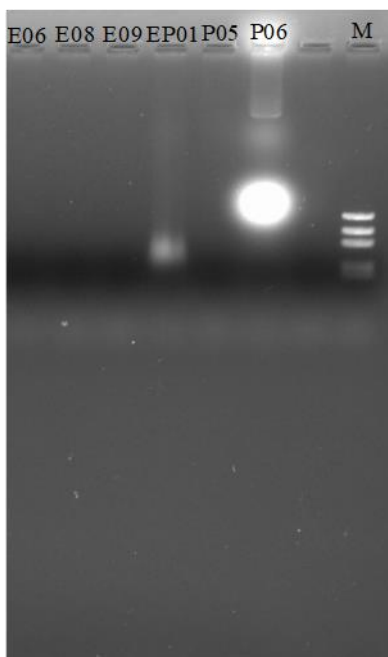


Figura 16: Detecção da presença de ADN nas amostras de suplementos analisados.

4.6 DESEMPENHO DOS SUPLEMENTOS NO DESENVOLVIMENTO DAS COLÓNIAS DE *APIS MELLIFERA*

Para analisar o desempenho dos suplementos efetuou-se um conjunto de ensaios com abelhas jovens em sob condições específicas em ambiente controlado. Estes ensaios permitiram aferir da variação do consumo dos diferentes alimentos proteicos e energéticos em função da idade das abelhas, bem como avaliar a longevidade das abelhas sob determinado regime de dieta e consequências da mesma no seu comportamento.

4.6.1 Consumo dos suplementos

Os consumos dos suplementos analisados foram registados de 24 em 24 horas durante 45 dias do ensaio, e os resultados médios das sete réplicas podem ser visto na Figura 17. Os resultados obtidos evidenciam alguma variabilidade dos consumos, demarcando-se o comportamento particular obtido para a albumina. Efetivamente o consumo deste suplemento proteico é bastante reduzido em todos os ensaios, verificando-se com frequência valores negativos. Este comportamento poderá ser explicado pelo fato da mesma ser uma proteína altamente higroscópica, e conseqüentemente absorver humidade do ambiente, ocultando qualquer pequeno consumo que possa ser verificado. De referir ainda que o aumento da variabilidade dos resultados ao longo do ensaio reflete também o decréscimo do número de abelhas vivas conforme se poderá verificar no ponto seguinte da mortalidade.

Os suplementos energéticos registaram um consumo desde o primeiro dia de ensaio, com valores médios próximos de 0,015 g por abelha para o E06 e E08 e valores um pouco mais baixos para o E09. Estes valores são aproximadamente estáveis até ao 16 dia, a partir do qual se inicia uma maior variabilidade no consumo resultante do aumento significativo da mortalidade observada em alguns ensaios. Para os ensaios de controlo com a sacarose a 50%, verifica-se um consumo diário superior, em redor de 0,05 g por abelha, o que poderá estar relacionado com o maior fator de diluição do açúcar, e conseqüentemente a necessidade de maior ingestão.

Para os suplementos proteicos foi evidente um comportamento diferente entre o, EP01 e os restantes, observando-se para o EP01 um consumo muito negligenciável, enquanto para os dois restantes verificou-se um consumo, apesar de reduzido, em redor dos 0,01 g por abelha. A diferença para a maior apetência pela P05 e P06 pode estar associada com a maior quantidade de gordura neste suplementos e conseqüentemente ser mais atrativo para elas. Segundo Pernal e Currie (2002), na busca pelo pólen, as abelhas dependem de estímulos visuais e olfativos e o odor desses grãos está relacionado com a camada de gordura que eles possuem. No entanto, não será de desconsiderar o fato de estes dois suplementos, apesar de não possuírem na sua composição os açúcares comuns, Tabela 6, serem fornecidos em combinação com açúcar e conseqüentemente o consumo associado poder refletir mais a procura de alimento energético do que proteico.

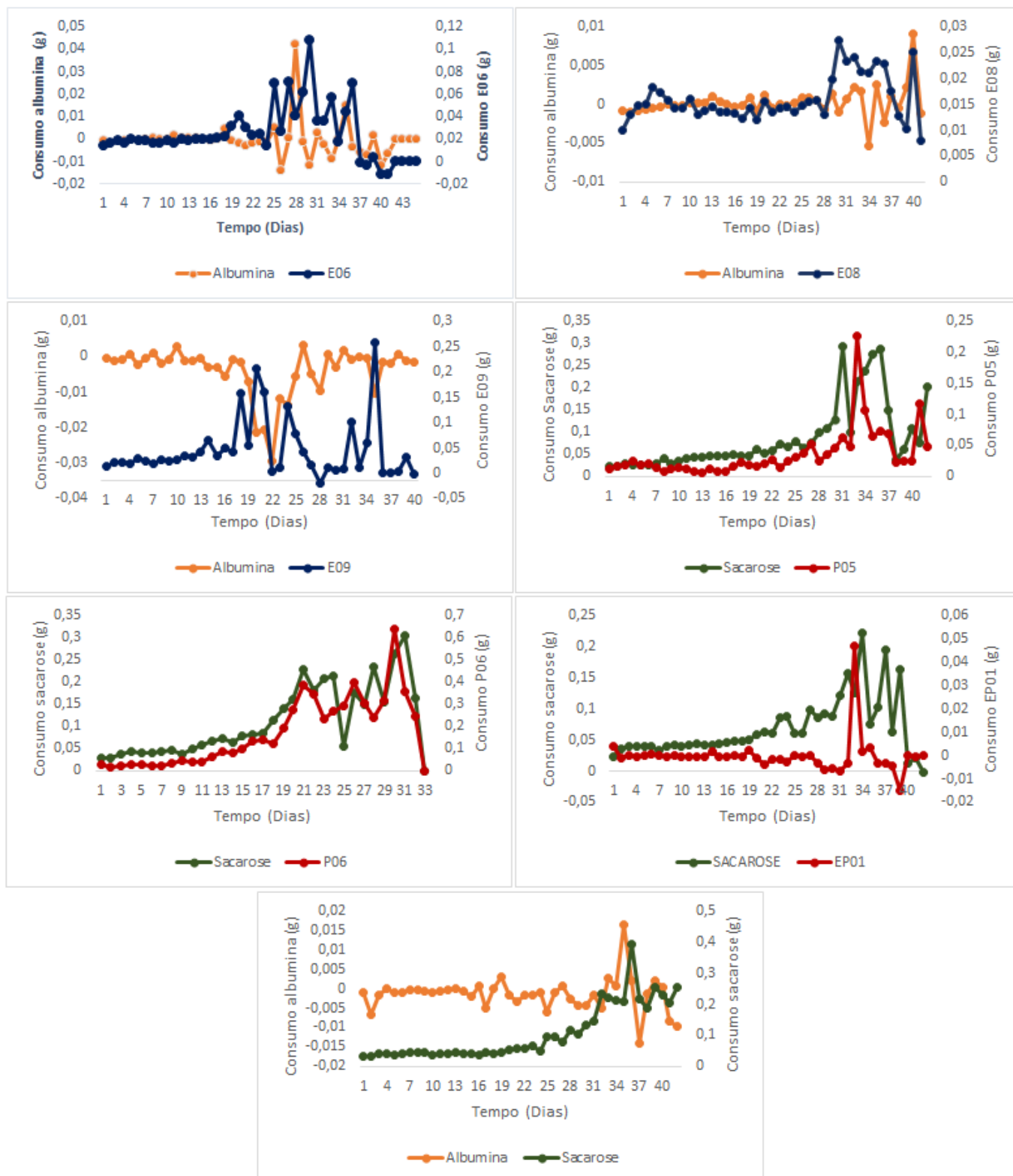


Figura 17: Consumo diário por abelha dos suplementos analisados e substâncias de controlo (sacarose e albumina).

4.6.2 Taxa de mortalidade

Para avaliar o desempenho dos diferentes suplementos efetuou-se o registo da média do número de abelhas mortas por dia, de acordo com a representação da Figura 18. Os gráficos apresentados estão divididos de acordo com o tipo de dieta aplicada, nomeadamente, controlos, suplementos energéticos e suplementos proteicos. No caso das energéticas foi incluída a taxa de mortalidade das abelhas alimentadas exclusivamente com sacarose e com o controle de sacarose e albumina, enquanto nas proteicas foi incluída a taxa de mortalidade dos ensaios exclusivamente com albumina e o controle de sacarose e albumina.

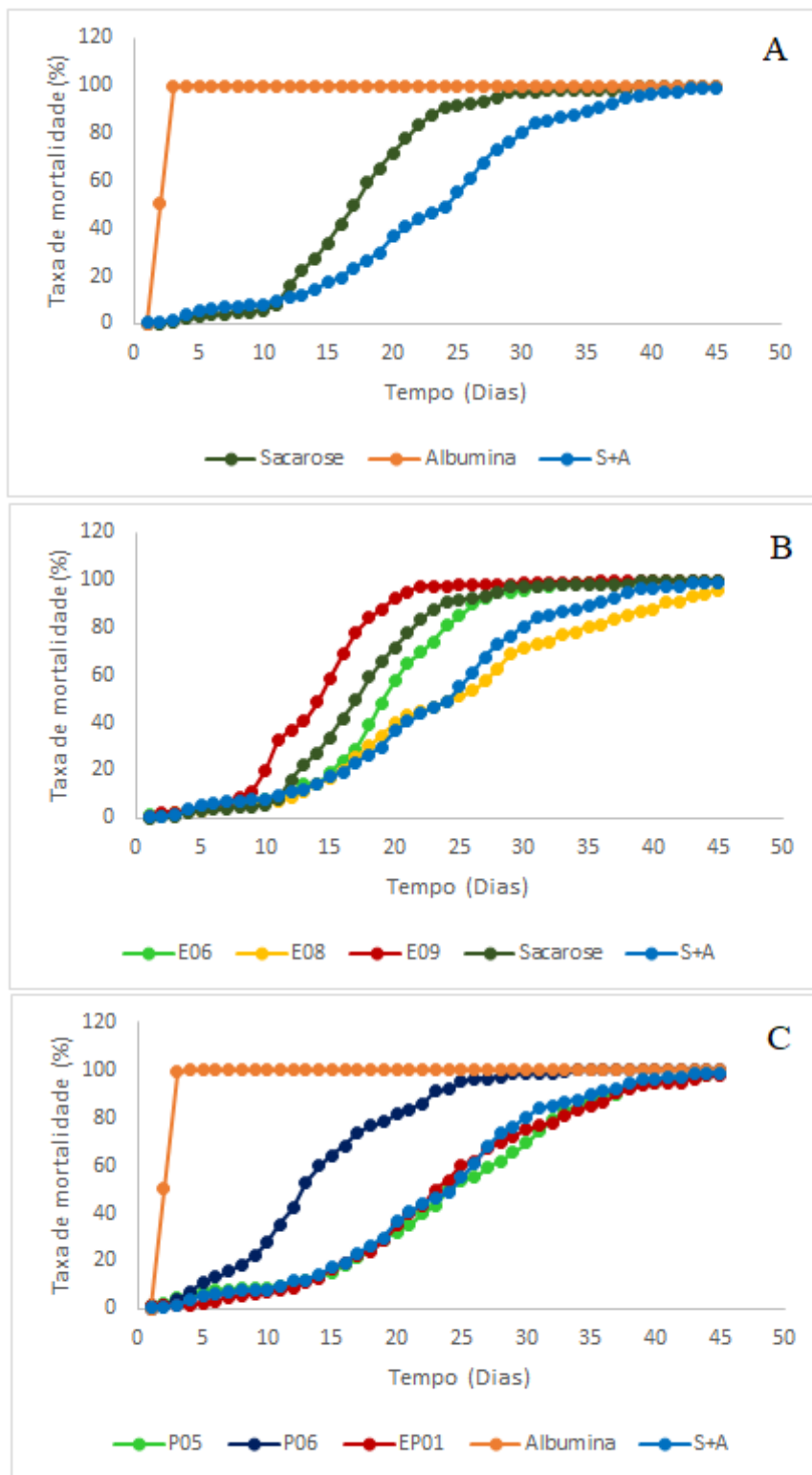


Figura 18: Taxa de mortalidade (%) por dia do ensaio. A- Controlos; B- Energéticos; C- Proteícos.

Como se pode verificar pela Figura 18A, a alimentação exclusiva com proteína não responde às necessidades das abelhas, causando a morte total logo após o segundo dia de ensaio, como aliás seria de esperar considerando que é a partir dos hidratos de carbono que as abelhas obtêm toda a energia para exercer as atividades musculares, gerar calor para o corpo, manter as funções vitais de órgãos e glândulas (DEGIRMENCI, et al., 2017). Por outro lado, a ausência de proteína, não sendo crucial para a sobrevivência provoca uma redução aproximada de 20 a 25% da longevidade média das abelhas, passando de 24 dias, quando a dieta é composta por sacarose e albumina, para 17 dias quando apenas são alimentadas por sacarose. Esta comparação permite também confirmar o efeito positivo do consumo de albumina, apesar de, e como se refere no ponto 4.6.1, não ser possível identificar pelas variações do peso o seu consumo.

A comparação entre os diversos alimentos energéticos, Figura 18B, permite verificar que o suplemento E08 além de ser bem aceite pelas abelhas, apresenta a menor taxa de mortalidade comparado aos demais suplementos energéticos, e com um registo muito similar ao verificado para o controlo. Este resultado poderá ser surpreendente considerando o seu perfil em açúcares, constituído apenas por sacarose, é o que apresenta maior disparidade da composição natural do mel, no entanto, é um resultado em linha com o verificado por outros estudos realizados com abelhas confinadas (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

Apesar de as abelhas demonstrarem também apetência pela ingestão dos suplementos E06 e E09 é possível verificar que o seu consumo continuado provoca sinais de intoxicação, causando disenteria, Figura 19, e um aumento significativo na taxa de mortalidade das mesmas a partir do 10º dia de ensaio. A presença de quantidades elevadas de frutose e conseqüentemente de hidroximetilfurfural (HMF) nestes dois suplementos pode ser o fator responsável pelo desencadear deste acontecimento. Segundo Silva, et al., (2008) o HMF é um aldeído cíclico que se origina principalmente da desidratação da frutose em meio ácido e foi considerado tóxico para abelhas por Leblanc, et al., (2009) que observou que as abelhas alimentadas com dieta contendo HMF apresentaram dificuldade de se alimentar, ulceração, danos no intestino médio e disenteria. Adicionalmente, Brodschneider e Crailsheim, (2010) referem que valores de 150 ppm causam uma mortalidade de 60% ao final de 20 dias em abelhas confinadas, propondo um valor máximo de 30 ppm nos suplementos para garantir a segurança alimentar. O

suplemento E09 é o que apresenta um maior taxa de mortalidade verificando-se que mais de 50% das abelhas morrem antes de atingir os 15 dias de idade, uma performance inferior aos ensaios apenas com sacarose.



Figura 19: Gaiolas dos tratamentos E06 e E09 no 27º dia de ensaio.

Os ensaios com alimentos proteicos, Figura 18C, demonstram um comportamento muito semelhante entre os suplementos EP01 e P05 e o controlo, com uma longevidade média de 23 a 24 dias. Já o suplemento P06 apresentou uma alta taxa de mortalidade logo após o 8º dia de ensaio, verificando-se uma mortalidade total após o 25º dia. A ingestão deste suplemento de uma forma continuada é claramente desaconselhada, considerando a elevada toxicidade observada. A presença de alguns minerais em doses elevadas, nomeadamente sódio e cálcio, poderão ser alguns dos fatores que contribuem para os efeitos observados.

5 CONCLUSÃO

As necessidades nutricionais das abelhas *Apis mellifera* variam de acordo com a fase de desenvolvimento em que se encontra: as abelhas nutrizes são responsáveis por alimentar as larvas mais novas com geleia-real, produto rico em proteínas e que elas próprias sintetizam, já as larvas mais velhas são alimentadas com mel e pólen. Na vida adulta e passados os cinco primeiros dias de vida, as abelhas são capazes de sobreviver exclusivamente com uma dieta baseada em hidratos de carbono e na ausência de proteínas. A alimentação artificial das abelhas é um processo de manejo utilizado pelos apicultores nos períodos de escassez de floração de modo a garantir a sobrevivência da colónia, no entanto, são cada vez mais os apicultores que recorrem à suplementação das abelhas como estimulante visando o aumento de criação, produção de rainhas, multiplicação de colmeias, entre outros fatores de interesse.

O presente estudo teve como objetivo identificar as práticas e avaliar a qualidade e impacto de alguns suplementos alimentares comercializados em Portugal, contribuindo com informação que permita apoiar a decisão dos apicultores com base no conhecimento da composição qualitativa dos produtos e de acordo com as necessidades da colónia.

A identificação das práticas de alimentação artificial, aferida através de inquéritos aos apicultores, permitiu reconhecer o tipo de produtos mais utilizados bem como as razões para o recurso a esta prática e a sua adequabilidade aos objetivos visados. Dos inquiridos, a maioria deles faz uso de alimentos comerciais para manutenção e estímulo da colmeia (81%) e recorre à sua aplicação para garantir a sobrevivência das colmeias particularmente nos períodos de inverno. A aquisição destes produtos é realizada maioritariamente em lojas da especialidade e organizações de produtores, mas verifica-se que mais da metade dos apicultores sentem a necessidade de maior informação sobre os modos de aplicação, as dosagens e a composição dos produtos. O impacto da aplicação de alimentação artificial às abelhas permite essencialmente reduzir em 75% o número de colónias perdidas por exploração, para além de aumentar a produção de enxames em mais de 50 % e também contribuir significativamente para o aumento da produção de mel.

Através dos dados recolhidos pelas análises nutricionais e por meio de uma análise de componentes principais (PCA), foi possível classificar os suplementos em estudo de acordo com as suas semelhanças e diferenças. Os suplementos energéticos, *Bee food*; *Baniaia* e *Abejapi*, assemelham pelo teor em hidratos de carbono e diferiram dos suplementos proteicos, *Albupower*, *Energéticos V.A.* e *Energético proteico*, que apresentaram na sua composição valores elevados de proteínas e cinzas. O suplemento *Energéticos V.A.* destacou-se dos demais por possuir valores elevados de humidade e gorduras. O valor de gordura encontrado para esse suplemento (17%) difere daquele indicado pelo rótulo (6,5%), assim como os teores de proteínas, gordura e hidratos de carbono encontrados para o suplemento *Energético proteico* que apresentou valores menores ao indicado nas especificações.

Apesar dos suplementos energéticos se assemelharem pelo teor em hidratos de carbono, a análise composicional para o perfil de açúcares permitiu ver as diferenças entre eles, uma vez que o suplemento que mais se aproximou da composição de açúcares presente no mel foi o *Bee food* apresentando frutose (18%) e glucose (43%), enquanto que o suplemento *Baniaia* possui apenas sacarose (75%) e o *Abejapi* mostrou ter frutose, glucose e sacarose. No que se refere à presença de prolina, um aminoácido essencial na vida das abelhas, apenas foi identificado nas dietas proteicas e em maior quantidade no *Energéticos V.A.* (8 mg/kg), porém em todos eles, a quantidade excedeu os níveis de prolina comumente encontrados no pólen apícola. A quantificação dos minerais permitiu verificar discrepâncias com a indicação contida no rótulo para a maioria dos suplementos, por exemplo para o suplemento *Energético proteico* não se indentificou manganês na sua composição, ao contrário do indicado nas especificações, mas obtiveram-se valores significativos de cálcio e magnésio para além dos minerais esperados potássio e sódio.

No que se refere aos fatores de risco em estudo, verificou-se a presença de hidroximetilfurfural em todos os alimentos energéticos, com teores considerados significativos para os suplementos *Bee food* e *Abejapi*, potencialmente causadores de alguma toxicidade nas abelhas. A ausência de OGM nos suplementos não foi possível confirmar tendo-se detetado vestígios de ADN em dois dos suplementos proteicos. A associação destes vestígios a origem de OGM terá de ser posteriormente avaliada por PCR.

Para avaliar o desempenho dos diferentes suplementos em estudo foi realizado um ensaio com abelhas confinadas em ambiente artificial. Estes ensaios permitiram avaliar o impacto dos suplementos na longevidade das abelhas, bem como identificar os níveis de consumo de cada um dos alimentos. Com a utilização de controlos, contendo sacarose e albumina, foi possível confirmar a importância dos hidratos de carbono para a sobrevivência das abelhas, mas também o impacto que o consumo de proteínas nas fases iniciais de desenvolvimento das abelhas após o nascimento provoca no aumento da sua longevidade. No que se refere aos produtos em estudos, verificou-se que apesar de todos os suplementos energéticos serem consumidos abelhas, o único que não apresentou nenhum risco à saúde das abelhas quando fornecido de forma continuada foi o *Baniaia*, provocando um incremento na longevidade das abelhas comparativamente aos controlos. Os demais suplementos energéticos demonstraram que o seu uso continuado em abelhas confinadas provoca a sua intoxicação e um aumento na taxa de mortalidade a partir do 10º dia de vida.

Relativamente aos suplementos proteicos, os produtos *Albupower* e *Energético proteico* constituíram fontes atrativas de alimento, provavelmente por apresentarem uma composição química rica em minerais, gorduras e vitaminas, que possivelmente induziram a ocorrência de todas as fases de alimentação das abelhas: consumo, digestão e aproveitamento dos nutrientes, expressos no consumo significativo e redução na taxa de mortalidade. Em relação ao consumo pode-se perceber o mesmo para o suplemento *Energéticos V.A.*, porém este deve ser administrado de forma diferente, uma vez que fornecido continuamente, a sua toxicidade excede os benefícios das substâncias que ali estão presentes.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a necessidade de mais informação sobre a eficácia dos produtos em situações reais, mas também demonstram as lacunas existentes no que se refere ao controlo dos produtos alimentares para abelhas, seja no controlo da sua qualidade e composição, seja na clarificação das condições de aplicação. É por isso recomendável que se regule o mercado de produtos para a alimentação artificial das abelhas.

Não obstante a informação produzida ao longo deste trabalho a sua continuidade deverá ser explorada nas seguintes vertentes:

- Estudo do perfil de aminoácidos, ácidos gordos, esteroides e vitaminas presentes nos suplementos, com a finalidade de aprofundar o entendimento no impacto que os mesmos estão causando na longevidade das abelhas.

- Continuar os estudos relacionados a presença de OGM nas dietas proteicas efetuando ensaios de despistagem por PCR, baseados numa sequência alvo característica de um grupo a analisar ex: promotor 35S do vírus do mosaico da couve flor (P-35S) e nos terminadores do *Agrobacterium tumefaciens*, presentes na maioria dos OGMs no mercado.

- Realizar estudos de campo para validar os ensaios realizados em ambiente laboratorial.

6 REFERÊNCIAS

- AOAC. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: Va: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- ARES, A. M.; VALVERDE, S.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 147, p.110-124, 2018.
- BARBOSA, A. de L.; PEREIRA, F. de M.; NETO, J. M. V.; REGO, J. G. De S.; LOPES, M. T. Do R.; CAMARGO, R. C. R. de **Criação de abelhas: apicultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Embrapa Meio-Norte, 113 p., 2007.
- BLACK, J. L. **Honeybee Nutrition**: Review of research and practices. Aus: Rural Industries Research And Development Corporation, 79 p., 2006.
- BOGDANOV, S. Harmonised methods of the international honey commission. **Swiss Bee Research Centre**, Liebefeld, p.1-62, 2002.
- BONOAN, R. E.; O'CONNOR, L. D.; STARKS, P. T. Seasonality of honey bee (*Apis mellifera*) micronutrient supplementation and environmental limitation. **Journal of Insect Physiology**, [s.l.], v. 107, p.23-28, 2018.
- BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, [s.l.], v. 41, n. 3, p.278-294, 2010.
- CAMARGO, R. C. R. de; PEREIRA, F. de M.; LOPES, M. T. do R. **Sistemas de Produção**: Produção de Mel. 21. ed. Teresina: Embrapa Meio-norte, 136 p., 2002.
- CAMPOS, M. G. R.; FRIGERIO, C.; LOPES, J.; BOGDANOV, S. What is the future of Bee-Pollen? **Journal of Apiproduct and Apimedical Science**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.131-144, 2010.
- CANDY, D.j; BECKER, A; WEGENER, G. Coordination and Integration of Metabolism in Insect Flight. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 117, n. 4, p.497-512, 1997.

CASACA, J. D. **Manual de Produção de Pólen e Própolis**. Lisboa: Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 24 p., 2010.

CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A. de; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, [s.l.], v. 77, n. 4, p.274-281, 2014.

CORBY-HARRIS, V.; MEADOR, C. A.; SNYDER, L. A.; SCHWAN, M. R.; MAES, P.; JONES, B. M.; WALTON, A.; ANDERSON, K. E. Transcriptional, translational, and physiological signatures of undernourished honey bees (*Apis mellifera*) suggest a role for hormonal factors in hypopharyngeal gland degradation. **Journal of Insect Physiology**, [s.l.], v. 85, p.65-75, 2016.

CRAILSHEIM, K. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, [s.l.], v. 34, n. 9, p.839-845, 1988.

DE GROOT, A. P. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.). **Laboratory of Comparative Physiology**, Utrecht, p.1-89, 1953.

DEĞIRMENCI, L.; THAMM, M.; SCHEINER, R. Responses to sugar and sugar receptor gene expression in different social roles of the honeybee (*Apis mellifera*), **Journal of Insect Physiology**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.09.009>, 2017.

ENGEL, M. S. The taxonomy of Recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*). **Journal of Hymenoptera Research**, New York, v. 8, n. 2, p.165-196, 1999.

FRATINI, F.; CILIA, G.; MANCINI, S.; FELICIOLI, A. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 192, p.130-141, 2016.

FRIOL, P. S.; CATAE, A. F.; TAVARES, D. A.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, [s.l.], v. 185, p.56-66, 2017.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10 v., 2002.

GHOSH, S.; JUNG, C.; MEYER-ROCHOW, V. B. Nutritional value and chemical composition of larvae, pupae, and adults of worker honey bee, *Apis mellifera ligustica* as a sustainable food source. **Journal of Asia-pacific Entomology**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.487-495, 2016.

GIRI, S.; RULE, D. C.; DILLON, M. E. Fatty acid composition in native bees: Associations with thermal and feeding ecology. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 218, p.70-79, 2018.

GONÇALVES, W. G.; FERNANDES, K. M.; SANTANA, W. C.; MARTINS, G. F.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Post-embryonic changes in the hindgut of honeybee *Apis mellifera* workers: Morphology, cuticle deposition, apoptosis, and cell proliferation. **Developmental Biology**, [s.l.], v. 431, n. 2, p.194-204, 2017.

HUANG, Z. Honey Bee Nutrition. **American Bee Journal**, Michigan, p. 1-6, 2010.

JARA, L.; CEPERO, A.; BAILÓN, G.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; HIGES, M.; RÚA, P. D. Linking evolutionary lineage with parasite and pathogen prevalence in the Iberian honey bee. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 110, n. 1, p.8-13, 2012.

KHAN, S. U.; ANJUM, S. I.; RAHMAN, K.; ANSARI, M. J.; KHAN, W. U.; KAMAL, S.; KHATTAK, B.; MUHAMMAD, A.; KHAN, H. U. Honey: Single food stuff comprises many drugs. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.320-325, 2018.

KOHSAKA, R.; PARK, M. S.; UCHIYAMA, Y. Beekeeping and honey production in Japan and South Korea: past and present. **Journal of Ethnic Foods**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.72-79, 2017.

KRAINER, S.; BRODSCHNEIDER, R.; VOLLMANN, J.; CRAILSHEIM, K.; RIESSBERGER-GALLÉ, U. Effect of hydroxymethylfurfural (HMF) on mortality of artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). **Ecotoxicology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.320-328, 2015.

LANGSTROTH, L. **The hive and the honey bee**. Hamilton: Dadant & Sons, 1057 p., 1975.

LEBLANC, B. W.; EGGLESTON, G.; SAMMATARO, D.; CORNETT, C.; DUFAULT, R.; DEEBY, T.; CRY, E. S. Formation of Hydroxymethylfurfural in Domestic High-Fructose Corn Syrup and Its Toxicity to the Honey Bee (*Apis mellifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 16, p.7369-7376, American Chemical Society (ACS), 2009.

LENGLER, S. Pólen Apícola. 2002. 18 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, **Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, 2002.

LIRA, T. S. Suplemento proteico artesanal para abelhas africanizadas. 38 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, **Universidade Federal de Alagoas**, Rio Largo, 2014.

LUZ, D. R.; WALDREN, G. C.; MELO, G. A.r. Bees as hosts of mutillid wasps in the Neotropical region (Hymenoptera, Apidae, Mutillidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s.l.], v. 60, n. 4, p.302-307, 2016.

MORETI, A.C.C.C. Pólen: Alimento protéico para as abelhas: Complemento alimentar para o homem. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/Polen/index.htm>. Acesso em: 21/5/2018.

OSTWALD, M. M.; SMITH, M. L.; SEELEY, T. D. The behavioral regulation of thirst, water collection and water storage in honey bee colonies. **The Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 219, n. 14, p.2156-2165, 2016.

PAOLI, P. P.; DONLEY, D.; STABLER, D.; SASEENDRANATH, A.; NICOLSON, S. W.; SIMPSON, S. J.; WRIGHT, G. A. Nutritional balance of

essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. **Amino Acids**, [s.l.], v. 46, n. 6, p.1449-1458, 2014.

PERNAL, S.F.; CURRIE, R.W. Discrimination and preferences for pollen-based cues by foraging honeybees, *Apis mellifera* L. **Animal Behaviour**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.369-390, 2002.

PETERS, R. S.; KROGMANN, L.; MAYER, C.; DONATH, A.; GUNKEL, S.; MEUSEMANN, K.; KIZLOV, A.; PODSIADLOWSKI, L.; PETERSEN, M.; LANFEAR, R.; DIEZ, P. A.; HERATY, J.; KJER, K. M.; KLOPFSTEIN, S.; MEIER, R.; POLIDORI, C.; SCHMITT, T.; LIU, S.; ZHOU, X.; WAPPLER, T.; RUST, J.; MISOF, B.; NIEHUIS, O. Evolutionary History of the Hymenoptera. **Current Biology**, [s.l.], v. 27, n. 7, p.1013-1018, 2017.

POTRICH, M.; SILVA, R. T. L. da; MAIA, F. M. C.; SILVA, E. R. L. da; ROSSI, R. M.; COLOMBOA, F. C.; TEDESCOA, F. G.; GOUVEAA, A. de. Effect of entomopathogens on Africanized *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.23-28, 2018.

RAMOS, J. M.; CARVALHO, N. C. de. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, 2007.

RICIGLIANO, V. A.; FITZ, W.; COPELAND, D. C.; MOTT, B. M.; MAES, P.; FLOYD, A. S.; DOCKSTADER, A.; ANDERSON, K. E. The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 96, n. 2, p.1-14, 2017.

ROY, R.; SCHMITT, A. J.; THOMAS, J. B.; CARTER, C. J. Review: Nectar biology. **Plant Science**, [s.l.], v. 262, p.148-164, 2017.

SAMMATARO, D.; WEISS, M. Comparison of Productivity of Colonies of Honey Bees, *Apis mellifera*, Supplemented with Sucrose or High Fructose Corn Syrup. **Journal Of Insect Science**, [s.l.], v. 13, n. 19, p.1-13, 2013.

SANTOS, D. E.; ALBERICI, L. C.; HARTFELDER, K. Mitochondrial structure and dynamics as critical factors in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste

development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 73, p.1-11, 2016.

SILVA, P. M. da. Caracterização e estabilidade de compostos químicos em méis de abelhas *Apis mellifera* L. Produzidos no estado de Santa Catarina. 248 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência dos Alimentos, **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2016.

SILVA, S. J. N. Da; SCHUCH, P. Z.; VAINSTEIN, M. H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. **Redalyc**, Campinas, v. 28, p.46-50, 2008.

SOMERVILLE, D. **Fat bees skinny bees: a manual on honey bee nutrition for beekeepers**. Australian: Rural Industries Research and Development Corporation, 150 p., 2005.

STAROSTA, P. **Paul Starosta photographe naturaliste**. 2007. Disponível em: <<http://www.paulstarosta.com/>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

TAHA, E. A.; AL-KAHTANI, S.; TAHA, R. Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s.l.], p.1-6, 2017.

VAUDO, A. D.; TOOKER, J. F.; GROZINGER, C. M.; PATCH, H. M. Bee nutrition and floral resource restoration. **Current Opinion in Insect Science**, [s.l.], v. 10, p.133-141, 2015.

VILLAR, G.; GROZINGER, C. M. Primer effects of the honeybee, *Apis mellifera*, queen pheromone 9-ODA on drones. **Animal Behaviour**, [s.l.], v. 127, p.271-279, 2017.

WINSTON, M. L. **The Biology of the Honey Bee**. Cambridge: Harvard University Press, 294 p., 1991.

ANEXO I

Projecto ApisCibus

O projeto ApisCibus - “A alimentação artificial para abelhas: rastreio da qualidade, digestibilidade e impacto nas colónias”, resulta de uma cooperação entre o IPB, UTAD e a FNAP, com o suporte do Programa Apícola Nacional 2017-2019. Este projeto pretende aprofundar o conhecimento sobre a importância da alimentação artificial para abelhas disponíveis no mercado nacional. Incluído no estudo, este inquérito irá identificar as causas, a eficácia e o impacto das práticas atuais de alimentação artificial na Apicultura em Portugal, pelo que a sua colaboração como apicultor é fundamental.

*Required

Idade:

1. *

Escolaridade:

2. *

Mark only one oval.

- Ensino Básico
- Ensino Secundário
- Ensino Superior
- Other: _____

1. Número de colónias que possui na sua exploração?

3. *

2. Localização do apiário. No caso de possuir vários locais indique apenas o apiário com mais colónias.

4. *

a) Concelho

5. *

b) Freguesia

3. Na sua exploração dedica-se à produção de que produtos?

6. *

Tick all that apply.

- Mel
- Pólen
- Própolis
- Geleia real
- Veneno
- Enxames
- Rainhas
- Other: _____

4. No maneiio habitual da exploração, recorre normalmente à alimentação artificial das colónias?

7. *

Mark only one oval.

- Sim
- Não

Se respondeu sim, quando (meses)?

8. *Tick all that apply.*

- janeiro
- fevereiro
- março
- abril
- maio
- junho
- julho
- agosto
- setembro
- outubro
- novembro
- dezembro

5. Por que é que decidiu utilizar a alimentação artificial?

9. *

Tick all that apply.

- Decisão própria
- Aconselhamento técnico
- Aconselhamento comercial
- Não aplicável
- Other: _____

6. Por que motivo(s) usa a alimentação artificial?

10. *

Tick all that apply.

- Manutenção da colmeia: fome
- Manutenção da colmeia: Inverno prolongado
- Manutenção da colmeia: primavera seca
- Manutenção da colmeia: predação de Vespa velutina
- Estimular a colmeia
- Reprodução de colmeias
- Criação de rainhas
- Produção de pólen
- Não aplicável
- Other: _____

7. Que alimento(s) utiliza?

11. *

Tick all that apply.

- Mel
- Xaropes de água com açúcar (não comerciais)
- Alimentos comerciais
- Pólen
- Outro(s) produto(s)
- Não aplicável

12. Se seleccionou Alimentos Comerciais: Quais?

13. Se seleccionou Outro(s) produto(s): Quais?

8. Classifique os alimentos de acordo com a sua eficácia (0 - Não aplicado, 4 - Muito eficaz)

14. *

Mark only one oval per row.

	0	1	2	3	4
Mel	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Xaropes de água com açúcar (não comerciais)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alimentos comerciais	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pólen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outro(s) produto(s)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

9. Onde adquire normalmente o alimento comercial?

15. *

Tick all that apply.

- Lojas especializadas
- Organizações de apicultores
- Internet (compras on-line)
- Não aplicável
- Other: _____

10. Qual o motivo para essa escolha?

16. *

Tick all that apply.

- Disponibilidade de entrega
- Variedade de produtos
- Preço
- Proximidade da exploração
- Facilidade de transporte
- Não aplicável
- Other: _____

11. Quando compra os alimentos, é lhe dada informação?

17. *

Tick all that apply.

- Modo de aplicação
- Época de aplicação
- Situação em que deve ser aplicado
- Composição
- Não aplicável

12. Qual o consumo anual em alimentação artificial para toda a exploração (kg ou L)?

18. **Mel**

19. **Xaropes de água com açúcar (não comerciais)**

20. **Alimentos comerciais**

21. **Pólen**

22. **Outro(s) produto(s)**

13. Qual o gasto anual em alimentação artificial para toda a exploração? (euros)

23. **Mel**

24. **Xaropes de água com açúcar (não comerciais)**

25. **Alimentos comerciais**

26. **Pólen**

27. **Outro(s) produto(s)**

14. Qual o impacto da alimentação artificial na exploração?

28. *

Mark only one oval per row.

	0%	10%	25%	50%	75%	100%	>100%
Aumento da produção de mel.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Aumento da produção de pólen.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Aumento da produção de enxames.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Aumento da produção de rainhas.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Aumento da produção de outros produtos.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Diminuição de perdas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

15. Já observou efeitos indesejáveis resultantes da alimentação artificial?

29. *

Mark only one oval.

- Sim
- Não

30. Se respondeu Sim, quais?

Powered by

