

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,  
o texto completo desta dissertação  
será disponibilizado somente a partir  
de 26/01/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTE INORGÂNICA DE FERRO NO  
PERFIL METALOPROTEÔMICO DA GELEIA REAL PRODUZIDA POR  
ABELHAS *Apis mellifera* L.**

WELLINGTON LUIZ DE PAULA ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte  
dos requisitos para obtenção ao título de  
Mestre

BOTUCATU – SP

Janeiro 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTE INORGÂNICA DE FERRO NO  
PERFIL METALOPROTEÔMICO DA GELEIA REAL PRODUZIDA POR  
ABELHAS *Apis mellifera* L.**

WELLINGTON LUIZ DE PAULA ARAÚJO

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

CO-ORIENTADOR: Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte  
dos requisitos para obtenção ao título de  
Mestre

BOTUCATU – SP

Janeiro–2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA  
INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO -  
BOTUCATU (SP)

Araújo, Wellington Luiz de Paula, 1991-  
A663e Efeito da suplementação de fonte inorgânica de ferro  
no perfil metaloproteômico da geleia real produzida por  
abelhas *Apis mellifera* L. / Wellington Luiz de Paula  
Araújo. - Botucatu: [s.n.], 2018  
vi, 48 p.: fots. color., grafs. color., tabs.  
  
Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,  
2018  
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi  
Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha  
Inclui bibliografia  
  
1. Abelhas - Nutrição. 2. Minerais na nutrição. 3.  
Proteínas - Metabolismo. 4. Proteômica. I. Orsi, Ricardo  
de Oliveira. II. Padilha, Pedro de Magalhães. III. Uni-  
versidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
(Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária  
e Zootecnia. IV. Título.

Elaborada Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

“Os leitores extraem dos livros, consoante o seu caráter, a exemplo da abelha ou da aranha que, do suco das flores retiram, uma o mel, a outra o seu veneno”. (Friedrich Nietzsche)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Vicente e Maria pela criação, educação e princípios que me ajudam a caminhar; e por mais que a vontade fosse ter eu por perto e mesmo sem compreender muito bem esse caminho que estou trilhando, sempre incentivaram meu crescimento pessoal e profissional, dando todo suporte. Obrigado por TUDO!

À minha irmã Uli e minha sobrinha Ana Julia pelo carinho incondicional de sempre  
As amizades construídas.

Amo vocês!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me iluminar e por me ajudar a superar todos os obstáculos.

A CNPQ - Conselho Nacional de Pesquisa (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa concedida.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade concedida de estudar em um programa de excelência.

Ao meu orientador Professor Doutor Ricardo de Oliveira Orsi, pela oportunidade de orientação, paciência, amizade, por todos os ensinamentos. Muito obrigado pelo apoio em cada decisão, pelos momentos de conversa e pelo “calma Mineiro, vai dar certo”...

Ao professor Pedro Padilha a ao pessoal do laboratório de química, José, Vânia, Alis e João pela ajuda no laboratório para realização das análises.

A minha namorada Ana Barbara e sua família; a minha prima Cléo, por toda a ajuda e terem se consolidado minha família em Botucatu, estando presente sempre que precisei.

A todos os Professores da FMVZ/UNESP-Botucatu pelos ensinamentos e participaram da minha formação.

Aos meus colegas da pós-graduação, NECTAR; Adriana, Thais, Marcela, Cinthia, Samir, Rodrigo, Alex, Roney, Daniel, Marcelo, Maurice e Mauricio pela amizade, ajudas e risadas.

Ao Professor Luciano Barbosa do Departamento de Bioestatística do IB pela ajuda com as análises estatística.

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vi
CAPÍTULO I.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	2
HISTÓRICO .....	2
AS ABELHAS <i>Apis mellifera</i> L. ....	3
GELEIA REAL.....	4
EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS .....	6
FERRO.....	8
PROTEÔMICA E METALÔMICA .....	10
REFERÊNCIAS .....	13
CAPÍTULO II.....	18
Suplementação com fonte de ferro inorgânica afeta o perfil metaloproteômico da geleia real produzida por abelhas <i>Apis mellifera</i> L. ....	19
RESUMO .....	19
ABSTRACT.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	22
<i>Local do Experimento</i> .....	22
<i>Grupos experimentais</i> .....	22
<i>Coleta de Geleia Real</i> .....	23
<i>Colheita das abelhas</i> .....	23
<i>Extração e Precipitação das Proteínas da Geleia Real</i> .....	24
<i>Separações eletroforéticas das frações proteicas</i> .....	24
<i>Análise de Fe por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS)</i> .....	25
<i>Digestão tríplica dos spots proteicos para identificação por ESI MS/MS</i> .....	26
<i>Identificação das proteínas por ESI MS/MS</i> .....	27
<i>Análise dos resultados</i> .....	27
Resultados .....	28
Discussão.....	31
Conclusão .....	33
Referências .....	34
CAPÍTULO III .....	37
ANEXOS.....	39



## LISTA DE SIGLAS

Fe – Ferro;

MRJPs - Major royal jelly protein;

*Sod* - Superóxido dismutase;

*Sod2* - Superóxido dismutase 2;

*Trxr-1* - Tioredoxina redutase 1;

Vg – Vitellogenina;

ppm – Partes por milhão;

Tf – Transferrina;

2D-PAGE - eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida;

T0Fe - Tratamento controle, sem suplementação de ferro;

T25Fe - Suplementação com 25 mg L<sup>-1</sup> de Ferro diluído em xarope de açúcar;

T50Fe - Suplementação com 50 mg L<sup>-1</sup> de Ferro diluído em xarope de açúcar;

T100Fe - Suplementação com 100 mg L<sup>-1</sup> de Ferro diluído em xarope de açúcar;

rpm – rotações por minuto;

μL – micro litros;

DTT – dithiothreitol;

SDS - dodecilsulfato de sódio;

ESI-MS - Espectrometria de massas com ionização por *electrospray*;

FAAS - Espectrometria de Absorção Atômica com chama;

EGFR - Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Numero de *spots* proteicos analisados por tratamento, apresentando o mineral Fe em comparação ao controle e concentração total de Fe ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) no abdômen de abelhas alimentadas com diferentes doses de ferro nos meses de Junho, Julho e Agosto.....30
- Figura 2:** Proteínas analisadas consideradas componentes extracelulares da geleia real. A análise de processos biológicos e molecular efetuada pelo programa “Blast2Go” mostrou as proteínas *Major royal jelly protein 1* *Major royal jelly protein 8*.....31
- Figuras Anexo:** Fotos dos géis de poliacrilamida 12,5%, contendo os *spots* proteicos da geleia real. Cada *spots* esta identificado de acordo com a composição protéica apresentado na “Tabela 3”.....39

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO II

**Tabela 1:** Concentração de proteína total (g/L) obtida nos *pellets* dos extratos de geleia real coletadas nos meses de junho, julho e agosto de 2016. Controle (sem adição de Fe), Tratamento T1 (25 mg L<sup>-1</sup>Fe), Tratamento T2 (50 mg L<sup>-1</sup>Fe) e Tratamento T3 (100 mg L<sup>-1</sup>Fe)..... 28

**Tabela 2:** Número médio de *spots* proteicos da geleia real coletada nos meses de junho, julho e agosto de 2016. Controle (sem adição de Fe), Tratamento T1 (25mg L<sup>-1</sup> Fe), Tratamento T2 (50mg L<sup>-1</sup> Fe) e Tratamento T3 (100mg L<sup>-1</sup> Fe).....29

**Tabela 3.** Identificação dos *spots* proteicos que apresentaram diferença de expressão (ANOVA; p < 0.05) na geléia real de abelhas nutrizas alimentadas com 25 mg L<sup>-1</sup>Fe (T25Fe), 50 mg L<sup>-1</sup>Fe (T50Fe) e 100 mg L<sup>-1</sup>Fe (T100Fe). A análise de expressão dos *spots* foi realizada utilizando o programa ImageMaster Platinum, tendo como referência o proteoma de abelhas não alimentadas com o mineral ferro (T0Fe) com identificação das proteínas por ESI-MS/MS. Valores positivos (+) indicam potencial aumento de expressão e valores negativos (-) indicam potencial redução de expressão. O sinal Ø demonstra ausência de expressão do *spot* nos grupos alimentados com o ferro.....44

## REFERÊNCIAS

- ALCINDOR T, BRIDGES KR. **Sideroblastic anaemias**. Br J Haematol. 2002;116(4):733-43.
- AMDAM, G.V. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. **Animal Behavior**, v. 79, p.973–980, 2010.
- ANDERSON, L. et al. **Metabolismo mineral**. In: Nutrição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 63-92.
- ANDREWS, G. A.; SMITH, J. E. **Iron metabolism**. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2000. p. 129-34.
- BEAUMONT C, VAILONT S. **Iron homeostasis**. In: Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C, editors. Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis. Genova, Italy: Forum Service Editore; 2006, p.393-406.
- BEZERRA, J. S; TEIXEIRA, W; VATTIMO, FERNANDES, M. F. **Efeito protetor da Vitis Vinifera na lesão renal aguda isquêmica em ratos**. *J Bras Nefrol*, 2008, 30.2: 99-104.
- BINNECK, E. As ômicas – Integrando a Bioinformação. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v.32, p.28-37, 2014.
- BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v.41, p.278-294, 2010.
- CAMPANA, B.J.; MOELLER, F.F. Honeybee preference for and nutritive value of pollen from five plants sources. **Journal of Economy Entomology**, v.70, p.39-41, 1977.
- CELIS J. E., KRUIHOFFER M., GROMOVA I., FREDERIKSEN C., OSTERGAARD M., THYKJAER T., GROMOV P., YU J., PÁLSDÓTTIR H., MAGNUSSON N. ORNTOFT T. F. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. **FEBS Lett**. v.480, p. 2-16, 2000.
- CHAN, Q. W.; HOWES, C. G.; FOSTER, L. J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. **Mol. Cell Proteomics**. v. 5, n. 12, p. 2252-2262, dezembro 2006.
- COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: UNEP, p.193, 2006. BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. **Bee World**, v.60, p.24-39, 1979.
- CRABTREE, B.; NEWSHOLME, E. A. Comparative aspects of fuel utilization and metabolism by muscle. **Insect Muscle (ed. P. N. R. Usherwood)**, p.405-500, 1972.
- CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1.ed. New York: Routledge, 1999. 682p.
- CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F.C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, 416p. 2009.

- DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v.36, p.49-57, 2005.
- DONOVAN A, ROY CN, ANDREWS NC. **The ins and outs of iron homeostasis**. Physiology (Bethesda). 2006;21:115-23.
- DOOLITTLE, G.M. **Scientific queen-rearing**. Chicago: T.G. Newman, Chicago III, 1899.
- EMBRAPA (2002). **Produção de mel**. Teresina, PI: Embrapa Meio-Norte. Sistema de Produção; 3. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80709/1/sistemaproducao-3.PDF>>. Acesso em 20 de setembro de 2017.
- ESTEVINHO, L.M.; RODRIGUES, S.; PEREIRA, A.P.; FEÁS, X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**, p.1365-2621, 2011.
- FAA, G.; NURCHI, V.M.; RAVARINO, A.; FANNI, D.; NEMOLATO, S.; GEROSA, C.; EYKEN, P.V.; GEBOES, K. Zinc in gastrointestinal and liver disease. **Coordination Chemistry Reviews**, v.252, p.1257-1269, 2008.
- FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. **BMC Genomics**, v.10, p.645-657, 2009.
- FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; CURTI, P.R.; PEROSA, J.M.Y. Coleta de pólen e produção de mel e própolis em colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Boletim da Indústria Animal**, v.55, p.189-193, 1998.
- GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, p.1-15, 2006.
- GONÇALVES, L.S. Desenvolvimento e expansão da apicultura no Brasil com abelhas africanizadas. **Revista SEBRAE**, n.3, p.14-16, 2006.
- HAYDAK, M.H. Honeybee nutrition. **Ann. Rev. Ent.**, v.15, p.143-156, 1970.
- HAYS, V. W; SWENSON, M. J. **Minerais**. In: SWENSON, M. 1.; REECE, W O. Dukes fisiologia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 471-487.
- HERBERT JR., E.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, v.9, n.1, p.33-40, 1979.
- HILL, R.W.; WYSE, G.A.; ANDERSON, M. Genômica, Proteômica e Abordagens Fisiológicas Afins. In: **Fisiologia Animal**. 2a Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 68-77.
- KOHNO, K.; OKAMOTO, I.; SANO, O. et al. **Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages**. Biosci. Biotechnol. Biochem., v.68, p.138-145, 2004.
- KRAUSE A, NEITZ S, MÄGERT HJ, et al. LEAP-1, **A novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity**. FEBS Lett. 2000;480(2-3):147-50.

- LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, B. M. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v.6, p.60-66, 2003.
- MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria,v.36, n.3, p. 949-953, 2006.
- MELLO, M.H.S.H.; SILVA, E.A.; NATAL, D. Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. **Revista de Saúde Pública**, v.37, n.2, p.237-241, 2003.
- MELO, I.L.P.D.; FREITAS, A.S.D.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.D. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.3, p.346-353, 2009.
- MELO, L. N. Aspectos **fisiopatológicos do metabolismo de ferro em pacientes portadores de síndrome anêmico**. 1984. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1984.
- MITCHELL, A. Africanized killer bees: a case study. **Critical Care Nurse**, v.26, n.3, p. 23-32, 2006.
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concepts and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 1119-1138, 2009.
- NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.;CASTRO, G. R.; PADILHA P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. **Química Nova**, v.35, p.493-498, 2012.
- NICHOL, H.; LAW, J.H.; WINZERLING, J.J. Iron metabolism in insects. **Annuary Review Entomology**, v.47, p.535-552, 2002.
- NIMEH, N.; BISHOP, R. C. **Distúrbios do metabolismo do ferro**. Clínicas Médicas da América do Norte, p. 633-648,jlll. 1980.
- PAMPLONA, L.C.; AZEDO, R.A.B.; OLIVEIRA, K.C.L.S. et al. **Physicochemical analyses indicated to the quality control of royal jelly with honey**. Cienc. Tecnol. Alim., v.24, p.608-612, 2004.
- PARK CH, VALORE EV, WARING AJ, GANZ T. HEPCIDIN, **A urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver**. J Biol Chem. 2001; 276(11):7806-10.
- PEIREN, N.; VANROBAEYS, F.; DE GRAAF, D. C.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; JACOBS, F. J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1752, n. 1, p. 1-5, agosto 2005.
- PEREIRA, F. D. M., FREITAS, B. M., VIEIRA NETO, J. M., LOPES, M. D. R., BARBOSA, A. D. L., & DE CAMARGO, R. C. R. (2006). Desenvolvimento de colônias de abelhas com diferentes alimentos protéicos. *Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.

- PEREIRA, F. M.; LOPES, M.T.R. **O início da Apicultura no Brasil**. Página Rural, 6 jan 2011. Disponível em: < <http://www.paginarural.com.br/artigo/2189/o-início-da-apicultura-no-brasil>> . Acesso em: 20 setembro 2017.
- PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. 1.ed. São Paulo:Edusp/Fapesp, p.17, 1993.
- PONKA P, BEAUMONT C, RICHARDSON DR. **Function and regulation of transferrin and ferritin**. *Semin Hematol*. 1998;35(1):35-54.
- PUTTKAMMER, E. **Geleia real: métodos e técnicas de produção, coleta e armazenamento**. Florianópolis: EPAGRI, 1994. 30p.
- RICKETTS, T.H.; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; BOGDANSKI, A.; GEMMILL-HERREN, B.; GREENLEAF, S.S.; KLEIN, A.M.; MAYFIELD, M.M.; MORANDIN, L.A.; OCHIENG', A.; VIANA, B.F. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns?. **Ecology Letters**, Oxford, v.11, n.5, p.499-515, 2008.
- ROMANOWSKI, S.M.; MANGRICH, A.S.; NEVES, A. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não simétricos N,Odoadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, v.24, p.592-598, 2001.
- ROSATO, A; VALASATAVA, Y; ANDREINI, C. Minimal Functional Sites in Metalloproteins and Their Usage in Structural Bioinformatics. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, p. 671, 2016.
- SAGHIRI MA, ASATOURIAN A, ORANGI J, et al (2015) Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis-Part I: N, Fe, Se, P, Au, and Ca. *Crit Rev Oncol Hematol*. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.05.010
- SCARSELLI, R.; DONADIO, E.; GIUFFRIDA, M.G.; FORTUNATO, D.; CONTI, A.; BALESTRERI, E.; FELICOLI, R.; PINZAUTI, M.; SABATINI, A.G.; FELICOLI, A. **Towards royal jelly proteome**. *Proteomics*. v. 5, p. 769-776, 2005.
- SCHMITZOVÁ, J.; KLAUDINY, J.; ALBERT, S.; HANES, J.; SCHRODER W.; SCHROCKENGOST, V. **A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L.** *Cell Mol. Life Sci*. v. 54, p. 1020-1030, 1998.
- SILVA, F.A.; CAVECCI, B.; BALDASSINI, W.A.; LIMA, P.M.; MORAES, P.M.; ROLDAN, P.S.; PADILHA, C.C.F.; PADILHA, P.M. Selenium fractionatio from plasm, muscle and liver of Nile tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.7, p.158–165, 2013.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte: s.n., 2002. 253p.
- SMITH, J. E. **Iron metabolism and its diseases**. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J. W; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animais*. New York: Academic Press, 1997. p. 223-240.
- SOMERVILLE, D. Honey bee nutrition and supplementary feeding. *Agnote DAI/178*. NSW *Agriculture*, 2000, 1034-6848.

- SOMERVILLE, D.C. Fat bees, Skinny bees – a manual on honey bee nutrition for beekeepers. Australian Government: Rural Industries Research and Development Corporation, p.150, 2005.
- STANDIFER, L. N. Honey bee nutrition and supplemental feeding. *Beekeeping in the United States Agriculture Handbook*, 1980, 335, 39-45.
- VIEIRA JCS, CAVECCI B, QUEIROZ J V., Braga, C. P., Padilha, C. C., Leite, A. L (2015) Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol* 69:422–430. doi: 10.1007/s00244-015-0160-9
- VISPO, N.S. Proteômica. In: **Combinatoria Molecular**. Cuba: Elfos Scientiae, 2004. p. 367-404.
- WANG H, ZHANG SW, ZENG ZJ, YAN WY (2014) Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie (Celle)* 45(5):618–625.
- WIESE, H. **Apicultura Novos Tempos**, 2ª Ed. – Guaíba: Agrolivros, p.17, 2005.
- WINSTON, M. L. **A Biologia da Abelha**. Porto Alegre: Magister, 2003. 276 p.
- WORWOOD, M. Regulação do metabolismo do ferro. *Anais Nestlé*, V. 52, p. 1-10, 1996.



## **Suplementação com fonte de ferro inorgânica afeta o perfil metaloproteômico da geleia real produzida por abelhas *Apis mellifera* L.**

### **RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de suplementação com fonte de ferro inorgânico na qualidade da geleia real produzida por abelhas *A. mellifera*, por meio de análises proteômicas. Foram utilizadas 12 colônias de abelhas *A. mellifera* africanizadas, alimentadas com xarope de açúcar (proporção de 1:1 de água e açúcar cristal) suplementado ou não com sulfato ferroso heptahidratado (contendo 20% de ferro), nas concentrações de 0, 25, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup>. A produção de geleia real foi realizada por meio da técnica de transferência de larvas, colhida, armazenada em *vials* estéreis e mantidas sob congelamento. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE) foi usada para fracionamento das proteínas da geleia real e o ferro quantificado por técnica de espectroscopia de absorção atômica de chama (FAAS), com identificação das proteínas por Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS). Os resultados foram avaliados por ANOVA, seguido do teste de Tukey para verificar diferenças entre as médias (P<0,05). Observou-se que a suplementação da dieta com o mineral ferro afetou o teor proteico e o número de *spots* em quase todos os tratamentos e meses analisados. Observa-se ainda que a dieta contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de Fe apresentou maior número de *spots* contendo este mineral, bem como no abdome das abelhas. As principais proteínas contendo Fe foram classificadas como do grupo MRJPs (Major Royal Jelly Proteins). Os resultados encontrados mostram que o ferro influencia na qualidade da geleia real, sugerindo que sua presença na alimentação pode melhorar as condições nutricionais e modular seu valor nutritivo.

**Palavras chaves:** suplementação mineral; abelhas; proteína; metalômica; absorção atômica.

**Effect of supplementation with inorganic iron source affect the metalloproteomic profile of the royal jelly produced by *Apis mellifera* L. bees**

**ABSTRACT**

The goal of the present study was to evaluate the effect of supplementation with inorganic iron source in the quality of the royal jelly produced by *A. mellifera* bees by means of proteomic analysis. Twelve colonies of *A. mellifera* africanized bees fed sugar syrup (1: 1 proportion of water and crystal sugar) supplemented or not with ferrous sulfate heptahydrate (containing 20% iron) at the concentrations of 0, 25, 50 and 100 mg L<sup>-1</sup> were used. The production of royal jelly was performed by means of the technique of larvae transfer, which was harvested, stored in sterile *vials* and kept under freezing. Two-dimensional electrophoresis - 2D-PAGE was used for fractionation of the proteins of the royal jelly and the iron was quantified by flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) technique, with identification of proteins by ESI-MS / MS (Mass spectrometry with ionization by eletrospray). The results were evaluated by ANOVA, followed by the Tukey test to verify differences between the means ( $P < 0,05$ ). It was observed that the supplementation of diet with the iron mineral affected the protein content and the number of spots in almost all treatments and months analyzed. It was also observed that the diet containing 100 mg L<sup>-1</sup> of Fe presented a greater number of spots containing this mineral, as well as in the abdomen of the bees. The major proteins containing Fe were classified as from the MRJPs group (Major Royal Jelly Proteins). The results show that the iron influences in the quality of the royal jelly, suggesting that its presence in the food can improve nutritional conditions and modulate their nutritional value.

**Key words:** mineral supplementation; bees; protein; metallomics; atomic absorption

## Referências

- Anderson, L. et al. (1990). Metabolismo mineral. In: *Nutrição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, p. 63-92.
- Braga, C. P., Bittarello, A. C., Padilha, C. C. F., Leite, A. L., Moraes, P. M., Buzalaf, M. A. R., Zara, L.F., & Padilha, P. M. (2015). Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta*, 132, 239-244.
- Brodtschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294.
- Carvalho, J.B.C., Zecchin, H.G., & Saad, M.J.A. (2002). Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 46(4), 419-425.
- Chang, Y.N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., & Xing, G. (2012). The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5(12), 2850-2871.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.
- Crabtree, B., & Newsholme, E. A. (1972). Comparative aspects of fuel utilization and metabolism by muscle. *Insect Muscle (ed. P. N. R. Usherwood)*, 405-500.
- Deseyn, J., & Billen, J. (2005). Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 36(1), 49-57.
- Doolittle, G.M. Mr. (1899). Doolittle's queen rearing methods. *American Bee Journal*, 39(28), 435-436.
- Haragushi, H. (2004). Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19(1), 5-14.
- Hartfelder, K, Makert, G.R., Judice, C.C., Pereira, G.A.G., Santana, W.C., Dallacqua, R., & Bitondi, M.M.G. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying castes development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*. 37(2), 144-163.
- Herbert Jr., E.W., & Shimanuki, H. (1979). Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9(1), 33-40.

- Li, P., Yin, Y.L., Li, D., Woo, K.S., & Wu, G. (2007) Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 98(2), 237–252.
- Manning, R. (2016). Artificial feeding of honeybees based on an understanding of nutritional principles. *Animal Production Science*. DOI: 10.1071/AN15814
- Moraes, P. M., Santos, F. A., Padilha, C. C., Vieira, J. C., Zara, L. F., & Padilha, P. D. M. A. (2012). preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. *Biological trace element research*, 150(1-3), 195-199.
- Nichol, H., Law, J.H., & Winzerling, J.J. (2002).Iron metabolism in insects. *Annuary Review Entomology*, 47, 535-552.
- Schmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, Š., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova J., & Šimúth, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, .54(9), 1020-1030.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856-2860.
- Sun, Y., An, S., Henrich, V.C., Sun, X., & Song, Q. (2007). Proteomic identification of PKC-mediated expression of 20E-induced protein in *Drosophila melanogaster*. *J. Proteome Res.*, 6(11), 4478–4488.
- UniProt (2017) Universal Protein Resource (UniProt). In: 2017. <http://www.uniprot.org/>. Accessed 10 dezembro 2017.
- Vieira, J. C., Cavecci, B., Queiroz, J. V., Braga, C. P., Padilha, C. C., Leite, A. L., Figueiredo, W., Buzalaf, M., Zara, L. F., & Padilha, P. M. (2015). Determination of the Mercury Fraction Linked to Protein of Muscle and Liver Tissue of Tucunaré (*Cichla* spp.) from the Amazon Region of Brazil. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 69(4), 422-430.
- Yu, F., Mao, F., & Jianke, L. (2010). Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. *Journal of proteome research*, 9(5), p.2207-2215.
- Zar, J.H. (2010). *Bioestatistical analysis*. New Jersey: Pretince Hall, p. 944.

- Zhang, G.E., Zhang, W., Qui, X., & Baohua, X. (2015). Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 156(3), 201-210.
- Zhao, X. F., He, H. J., Dong, D. J., & Wang, J. X. (2006). Identification of differentially expressed proteins during larval molting of *Helicoverpa armigera*. *Journal of proteome research*, 5(1), 164–169.

## Implicações

Por ser estritamente importante para sobrevivência do enxame, a geleia real tem destaque dentre os produtos apícolas, auxiliando em funções como reprodução e longevidade. A atenção a esse produto também ocorre pelos benefícios que ele pode trazer ao ser humano, sendo rica em antioxidantes, proteínas e minerais.

As informações sobre minerais na nutrição de abelhas é escassa e pouco se sabe sobre esse tipo de suplementação e os níveis adequados ao fornecimento. Assim, sua composição pode ser afetada diretamente de acordo com a alimentação das abelhas. Nesse âmbito, a metaloproteômica mostrou-se como ferramenta adequada na pesquisa, destacando as proteínas associadas com um determinado mineral, neste caso, o ferro (Fe), importantes para o funcionamento celular normal.

Neste estudo verificou-se que durante o período de entressafra (onde se destaca a baixa em pastos apícolas) o mineral Fe é muito importante para nutrição das abelhas *Apis mellifera*, melhorando a qualidade mineral da geleia real e sua expressão no número de *spots* proteicos. Sendo assim, espera-se que esse trabalho possa contribuir com informações para suplementação mineral de abelhas, permitindo a mensuração de níveis de Fe apropriados para dieta durante o período com pouca disponibilidade de recursos florais.