

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTE INORGÂNICA DE FERRO NO
DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE
ABELHAS *Apis mellifera* L.**

DANIEL CAVALCANTE BRAMBILA DE BARROS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre.

BOTUCATU – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE FONTE INORGÂNICA DE FERRO NO
DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE
ABELHAS *Apis mellifera* L.**

DANIEL CAVALCANTE BRAMBILA DE BARROS

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

COORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS ANTÔNIO JUSTULIN JUNIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU – SP

2018

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

D277e Barros, Daniel Cavalcante Brambila de, 1993-
Efeito da suplementação de fonte inorgânica de ferro no desenvolvimento da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera* L. / Daniel Cavalcante Brambila de Barros. - Botucatu: [s.n.], 2018
32 f.: fots. color., tabs.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Coorientador: Luis Antônio Justulin Junior
Inclui bibliografia

1. Apicultura. 2. Suplementação mineral. 3. Glândula mandibular. 4. Nutrição. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Justulin Junior, Luis Antônio. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

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

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

“Se as abelhas desaparecerem da face da Terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais, não haverá raça humana” (Albert Einstein)

DEDICO

Primeiramente aos meus pais, Marcos Cezar Brambila de Barros e Elda Cavalcante Brambila de Barros, pelo estímulo, carinho, educação e princípios, os quais sempre apoiaram meu crescimento pessoal e acadêmico, o que me deu forças na conclusão deste estudo.

Aos meus irmãos Felipe Cavalcante Brambila de Barros e Danilo Cavalcante Brambila de Barros, apesar da distância e ausência, sempre desejei estar presente, porém, nosso esforço será recompensado e nossa família prosperará.

Muito obrigado por tudo, amo vocês.

AGRADEÇO

Primeiramente à Deus, por me ajudar em todos os momentos, me dando saúde e inspiração para que eu pudesse realizar o presente estudo.

Ao meu orientador Professor Doutor Ricardo de Oliveira Orsi, pela oportunidade da orientação, amizade e por me proporcionar o conhecimento sobre esses animais incríveis que são as abelhas, que admiro e respeito cada dia mais, por ter me permitido conhecer pessoas maravilhosas, aprendi muito, tanto profissionalmente como pessoalmente.

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, 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, que tenho muito orgulho de fazer parte.

Ao Professor Doutor Luis Antônio Justulin Junior, pela oportunidade de ter realizado as análises histológicas no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, e ao doutor Sérgio Alexandre Alcântara dos Santos pela ajuda no laboratório para realização das análises.

Ao funcionário do Setor de Apicultura, Maurício Silva, pela ajuda e paciência durante toda a execução do trabalho.

Aos meus amigos de pós-graduação do NECTAR (Núcleo de Ensino, Ciência e Tecnologia em Apicultura Racional), pela ajuda, companheirismo, risadas e estímulo profissional e pessoal, tenho muito orgulho de fazer parte deste grupo onde conheci pessoas maravilhosas.

Deixo aqui meu muito obrigado á todos que me ajudaram nessa conquista.

BIOGRAFIA DO AUTOR

DANIEL CAVALCANTE BRAMBILA DE BARROS

Data de nascimento: 03 de Junho de 1993

Naturalidade: São Paulo – SP

E-mail: daniel.barros@unesp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016 – 2018: Mestrado em Zootecnia (área: Nutrição e Produção Animal); Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil.

2011 – 2015: Graduação em Zootecnia; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil.

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5006929892440604>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
1. Histórico das abelhas <i>Apis mellifera</i>.....	2
1.1. As abelhas <i>Apis mellifera</i>	3
1.2. Glândula mandibular de abelhas <i>Apis mellifera</i>	5
1.3. Exigências nutricionais de abelhas <i>Apis mellifera</i>	7
1.4. Mineral ferro (Fe).....	9
2. Referências Bibliográficas	11
CAPÍTULO II.....	18
Resumo	19
Abstract	20
1. Introdução.....	21
2. Material e Métodos.....	22
Tratamentos	22
Coleta das abelhas e armazenamento	23
Análise Morfológica.....	24
Morfometria da glândula mandibular.....	24
Análise Estatística	25
3. Resultados	25
4. Discussão	27
5. Conclusão	29
6. Referências Bibliográficas	29
CAPÍTULO III	31
Implicações.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera* (μm^2) nos meses de junho, julho e agosto. Os valores representam as médias seguidas de seus desvios padrões. Fe0 (sem adição de Fe); Fe25 (25 mg L⁻¹ Fe); Fe50 (50 mg L⁻¹ Fe) e Fe100 (100 mg L⁻¹ Fe).....25

Tabela 2. Altura da célula secretora da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera* (μm) nos meses de junho, julho e agosto. Os valores representam as médias seguidas de seus desvios padrões. Fe0 (sem adição de Fe); Fe25 (25 mg L⁻¹ Fe); Fe50 (50 mg L⁻¹ Fe) e Fe100 (100 mg L⁻¹ Fe).....26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias representativas da área da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera*. Fe0: controle; Fe: 25 mg L⁻¹ de Ferro; Fe50: 50 mg L⁻¹ de Ferro e Fe100: 100 mg L⁻¹ de Ferro. A cor preta representa a área da glândula. Aumento: 10x.....26

Figura 2. Fotomicrografias representativas da altura da célula secretora da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera*. Fe0: controle; Fe25: 25 mg L⁻¹ de Ferro; Fe50: 50 mg L⁻¹ de Ferro e Fe100: 100 mg L⁻¹ de Ferro. As linhas pretas representam a altura da célula secretora da glândula. Aumento: 10x.....27

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Histórico das abelhas *Apis mellifera*

As abelhas evoluíram de um grupo de vespas semelhantes às atuais (família Sphecidae). Existiam insetos que coletavam o néctar das flores (fonte de energia), e caçavam pequenos animais como pequenas moscas e aranhas (fonte proteica); com o passar do tempo e seleção natural, algumas dessas vespas abandonaram totalmente o hábito predatório e substituíram a proteína animal pela proteína vegetal, passando a se alimentar de pólen (DANFORTH, 2007; HU et al. 2008; GUPTA, 2014).

Há muito tempo o homem iniciou a exploração dos produtos apícolas, existindo registros de pinturas rupestres em cavernas no continente Africano e Europeu no período paleolítico, aproximadamente 6.000 anos a.C.; essas pinturas representavam a extração do mel realizada pelo homem de enxames selvagens instalados em frestas rochosas, sendo que essa extração era bastante primitiva, o que prejudicava a longevidade dos enxames (CRANE, 1999).

No Egito antigo e em outras regiões mediterrânicas, em aproximadamente 2.400 anos a.C., há registros da criação de abelhas de forma primitiva em potes de argila, assim, era possível realizar o transporte dos enxames, dando início a prática de apicultura migratória. As abelhas eram consideradas animais sagrados para muitas civilizações e com o tempo passaram a assumir grande importância através de seus produtos, como o mel, que era utilizado como adoçante natural (CRANE, 1999).

Atualmente, por meio de pesquisas e desenvolvimento de diferentes técnicas ao redor do mundo, a apicultura evoluiu sendo desenvolvida de forma racional, visando o bem-estar animal aliado à produção. Isto foi possível pois em 1851, o americano Reverendo Lorenzo Lorain Langstroth, ao longo de anos de estudo verificando o comportamento das abelhas e as estruturas dos enxames, criou a colmeia de madeira com dimensões apropriadas e quadros móveis (permite o manejo dos mesmos sem que os danifiquem), denominada colmeia “Padrão Langstroth”, que obedecia o “espaço abelha” – um espaço livre que permite a circulação das abelhas, impedindo que construam favos fora dos quadros, tendo o manejo facilitado, permitindo assim, a

criação racional de abelhas, ocorrendo um avanço na apicultura mundial (CRANE, 1999; EMBRAPA, 2002).

No Brasil, com o objetivo de produzir mel para a alimentação da família real e cera para fabricação de velas para a igreja católica, a atividade apícola teve seu início em março de 1839, quando o Padre Antônio Carneiro conseguiu autorização do rei Dom Pedro II, para importar para o estado do Rio de Janeiro as primeiras colmeias de abelhas europeias da subespécie *A. mellifera mellifera* (vindas de Porto, Portugal). Após, em 1870 imigrantes alemães trouxeram para o Rio Grande do Sul a subespécie *A. mellifera ligustica*. Diferentes subespécies também foram trazidas por imigrantes europeus, disseminando as abelhas *A. mellifera* por todo território nacional (GONÇALVES, 2001; WIESE, 2005).

Com a baixa produtividade das abelhas européias e alta susceptibilidade á doenças, em 1956, o pesquisador Warwick Estevam Kerr, com objetivo de melhorar a produção nacional de mel, buscou abelhas mais adaptadas ao clima tropical. Então, importou as abelhas africanas da subespécie *A. mellifera scutellata*, bastante produtivas, defensivas e resistentes a doenças (GONÇALVES, 2006). Porém, no ano seguinte 26 enxames com suas rainhas africanas, escaparam da área experimental e acasalaram de forma natural no ambiente, com as várias subespécies européias existentes, dando origem á um poli-híbrido, denominado “abelha africanizada”, visto que predominaram as características das abelhas africanas (KERR, 1967; DE JONG, 1996; GONÇALVES, 2006).

As abelhas africanizadas possuem alta capacidade de produção, autonomia de vôo e enxameação (deixar a colmeia para instituir outra colônia); essas abelhas dispersaram-se por grande parte da América do Sul e Central, chegando ao sul dos Estados Unidos em 1994 (STORT; GONÇALVES, 1994; MELLO et al., 2003; COUTO; COUTO, 2006; MITCHELL, 2006).

1.1. As abelhas *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* (Classe: Insecta; Ordem: Hymenoptera; Família: Apidae), são insetos eusociais e estão presentes em todos os continentes do globo

terrestre, com exceção da Antártida; são insetos de grande importância, seja por fatores econômicos (produção), ou por seus serviços ambientais (polinização) (SHEPPARD; MEIXNER, 2003; WINSTON, 2003; GUPTA, 2014).

As abelhas são insetos que vivem em sociedade complexa e muito organizada, com alta capacidade de comunicação, dividida em três castas, representadas pela rainha, operárias e zangões. As castas possuem funções bem definidas visando à sobrevivência e reprodução do enxame. Em condições ambientais normais, em um enxame, podem existir em torno de 100 mil abelhas operárias, 400 zangões que exercem funções somente reprodutivas e somente 1 rainha, que irá acasalar uma vez na vida com vários zangões durante o “voo nupcial”, sendo responsável pela postura diária média de até 2 mil ovos (PAGE; PENG, 2001; WIESE, 2005; DANFORTH, 2007; AMDAM, 2010).

Dentro do enxame, as abelhas operárias são responsáveis pelo trabalho e bom funcionamento da colônia, possuindo suas funções relacionadas com sua idade e desenvolvimento fisiológico. Entre o 1° e 3° dia de vida realizam a limpeza dos favos sendo denominadas “faxineiras”. Entre o 4° e 12° dia alimentam as larvas e produzem a geleia real (alimento exclusivo da rainha) tendo nesta fase suas glândulas mandibulares e hipofaríngeas mais desenvolvidas, sendo denominadas “nutrizes”. Entre o 13° e 18° dia, possuem as glândulas cerígenas mais desenvolvidas, assim, produzem cera e constroem os favos, sendo conhecidas como “engenheiras”. Entre o 19° e 20° dia são “guardiãs”, ficando no alvado (entrada da colmeia) defendendo seu território e ferrendo caso se sintam ameaçadas. Após os 21 dias de idade são denominadas “campeiras”, e saem à campo para coleta de recursos naturais (néctar e pólen) para manutenção do enxame (AMDAM, 2010).

As abelhas são importantes não só pelo fato de produzirem diversos alimentos de alto valor nutricional e econômico, mas também pelo papel ecológico que desempenham, por meio da polinização. Ao buscarem alimento (néctar e pólen) de uma planta à outra, as abelhas auxiliam na reprodução de frutos e sementes. As abelhas são responsáveis por mais de 63% da polinização de todas as espécies vegetais do mundo (COUTO; COUTO, 2006; DANFORTH, 2007; KLEIN et al., 2007; RICKETTS et al., 2008; OLLERTON et al., 2011).

Além da produção de mel, as abelhas *A. mellifera* produzem outros produtos de excelente valor comercial e nutricional para o consumo humano; o pólen (alimento

completo rico em proteínas e vitaminas), a própolis composta de resinas vegetais (ação terapêutica), geleia real (alimento rico em proteínas, lipídios e vitaminas do complexo B) e a apitoxina (veneno da abelha, utilizado na medicina e outras indústrias) (FORMICKI et al., 2013; CUNHA, 2013).

1.2. Glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera*

As glândulas mandibulares das abelhas *A. mellifera* são estruturas pares, localizadas na cabeça, em íntima relação com as mandíbulas e constituídas por um conjunto de células secretoras, que revestem o reservatório (CRUZ-LANDIM, 1967).

As células secretoras das glândulas mandibulares produzem enzimas que metabolizam os nutrientes liberados pela digestão do pólen, além de secretar parte dos componentes da geleia real, substância de base proteica, responsável pela diferenciação de castas e também utilizada na alimentação de larvas jovens e rainhas (FENG et al., 2009; LI et al., 2010). Essas glândulas são estimuladas pela presença de feromônios liberados pelas crias e para seu desenvolvimento completo dependem de um aporte protéico derivado do consumo do pólen (DESEYN; BILLEN, 2005). As glândulas mandibulares são menores em operárias e zangões, quando comparadas as glândulas da rainha (SALLES; CRUZ-LANDIM, 2004; LANDIM, 2009).

O tamanho da glândula das abelhas operárias está relacionado com sua atividade e nutrição, sendo que indivíduos recém emergidos possuem glândulas pouco desenvolvidas. Em abelhas na fase nutriz, correspondente às abelhas com seis dias de idade, apresentam a glândula mais desenvolvida (estima-se que esta idade seja o pico de seu desenvolvimento e produção de geleia real), diferentemente das abelhas com 0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 dias de vida (DESEYN; BILLEN, 2005).

As larvas escolhidas pelas abelhas operárias para a criação de novas rainhas são alimentadas com secreções produzidas inteiramente pela glândula mandibular nos três primeiros dias de vida, seguido de dois dias de alimentação de secreções produzidas pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas (proporção 1:1). Diferentemente, as larvas de abelhas operárias são alimentadas com secreções provenientes das glândulas mandibulares e hipofaríngeas (proporção 4:1 e 3:1, respectivamente) (JUNG-

HOFFMANN, 1966) e passam a receber uma mistura de ambas as secreções com pólen e mel a partir do terceiro dia (HAYDAK, 1970).

A secreção da glândula é lançada através de um ducto diretamente para a base das mandíbulas das abelhas. As glândulas mandibulares das abelhas nutrizas são responsáveis pela produção de uma secreção rica em ácido 10-hidroxidecenoico (10HDA) que é utilizado na alimentação de larvas no início do desenvolvimento. A capacidade de produção de secreção nessa glândula pode ser avaliada pelo tamanho do reservatório e das células secretoras que a compõe (LANDIM, 2009). As glândulas mandibulares e hipofaríngeas secretam geleia real, de coloração esbranquiçada, tornando-se mais clara e menos abundante após a fase de nutriz (MICHENER, 1974).

A alimentação larval exerce papel fundamental na diferenciação de castas, uma vez que promove a mudança no perfil hormonal e a manutenção da integridade do ovário nas rainhas. Essa grande diferença no desenvolvimento é atribuída a sua dieta exclusiva e rica em geleia real, produzida pelas abelhas operárias nutrizas com idade entre 4 e 12 dias, a partir das secreções proteicas das glândulas mandibulares e hipofaríngeas localizadas na região da cabeça (CRUZ-LANDIM; ABDALLA, 2009; PINTO et al., 2012). Dentre as diversas fases de vida das abelhas operárias, as nutrizas apresentam maior capacidade de digerir o pólen, devido à alta produção de enzimas proteolíticas que ocorrem durante essa fase, isto faz com que sejam responsáveis pela produção da geleia real (CRAILSHEIM, 1992).

Deseyn e Billen (2005) verificaram que a quantidade de geleia real secretada está diretamente relacionada ao tamanho das glândulas, mostrando que glândulas bem desenvolvidas produzem mais geleia real.

Vale ressaltar que avaliações das glândulas mandibulares e hipofaríngeas em abelhas *A. mellifera* mantidas em colônias são mais precisas quando comparadas as realizadas em laboratório, devido às interações que ocorrem no enxame e promovem completo desenvolvimento dessas glândulas em abelhas nutrizas (LASS; CRAILSHEIM, 1996).

Diante deste contexto, o estudo da suplementação do micromineral ferro na nutrição das abelhas *A. mellifera* e seu reflexo no desenvolvimento da glândula mandibular são de extrema importância, pois o desenvolvimento do enxame está diretamente ligado ao

fator nutricional, o nível de consumo do mineral Fe pode influenciar no desenvolvimento das glândulas mandibulares, afetando a nutrição e o desenvolvimento do enxame.

1.3. Exigências nutricionais de abelhas *Apis mellifera*

A produção e a reprodução das abelhas são influenciadas principalmente pela disponibilidade de alimento e pelo clima da região. Portanto, durante períodos de escassez, os apicultores devem fornecer alimentação artificial, para assegurar a manutenção e reprodução da colônia, além de preparar o enxame para que esteja saudável, e com seus estoques de alimento completos no início da florada, para que esteja apto à produção (WOLFF, 2007).

Durante períodos de escassez de alimento (entressafra), as abelhas enxameiam á procura de alimento (néctar e pólen, fonte de energia e proteína, respectivamente). Ao longo da vida, possuem exigências específicas de nutrientes para que possam desenvolver todo o seu potencial produtivo. As abelhas coletam e estocam alimento na forma de mel (néctar) e o “pão de abelhas” (pólen estocado nos favos), com o intuito de reservar alimento suficiente para atender suas exigências nutricionais e das crias. Em épocas de escassez de néctar e pólen, muitos apicultores perdem parte de seus enxames, em razão da diminuição da população, devido a falta de alimento (MARCHINI et al., 2006).

Os nutrientes requeridos pelas abelhas *A. mellifera* são os mesmos requeridos por outras espécies animais: carboidratos, proteínas, vitaminas, lipídeos, minerais e água. As abelhas são dependentes de recursos naturais para a sua sobrevivência, visto que todos os nutrientes requeridos à sua dieta provêm apenas do néctar, pólen e água. O néctar é a fonte de carboidratos e o pólen é a fonte de proteínas, minerais, lipídeos e vitaminas; e a água participa do transporte e dissolução de substâncias, servindo de meio para várias reações químicas (COUTO; COUTO, 2006).

O pólen é um dos alimentos consumido pelas abelhas, é encontrado na antera das flores e, quando coletado pelas abelhas operárias para sua alimentação, é umedecido com néctar e saliva para serem aglutinados formando grãos, e assim serem

transportados até a colmeia, por meio de estruturas denominadas “corbículas”, localizadas no último par de patas das abelhas (BARRETO et al., 2005).

Embora o pólen coletado pelas abelhas contenha minerais em sua composição, em determinadas épocas do ano, em função da disponibilidade de recursos florais ao entorno do apiário, este teor pode encontrar-se reduzido, afetando o desenvolvimento da colmeia (COUTO; COUTO, 2006 ; MARCHINI et al., 2006; MODRO et al., 2007). O pólen possui funções fundamentais no desenvolvimento adequado das crias, funcionamento de glândulas e formação de gorduras corporais (CAMPANA; MOELLER, 1977; MARCHINI et al. 2006). Seu nutriente mais importante é a proteína, cujo conteúdo pode variar de 4 a 34%, sendo a única fonte natural disponível deste constituinte para as abelhas (WINSTON, 2003; ESTEVINHO et al., 2011).

O pólen é uma fonte proteica de importância nutricional também para os seres humanos, possui em sua composição vitaminas antioxidantes (β -caroteno, pró-vitamina A, vitaminas C e E) e também vitaminas D e do complexo B (MELO et al., 2009).

A deficiência de proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e até mesmo da água, podem prejudicar o desenvolvimento e a reprodução do enxame, reduzir a longevidade das abelhas, provocar estresse, e assim, facilitar o aparecimento de doenças, pode afetar a capacidade das abelhas de cuidar das crias novas, como também alterar a composição bromatológica das pupas, diminuindo os níveis de proteínas brutas e sais minerais em até 8,4 e 38,5%, respectivamente (FUNARI et al., 1998; SOMERVILLE, 2005).

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes da natureza e possuem funções importantes em todos os seres vivos. A quantidade de proteína no pólen é extremamente importante para a boa nutrição da colmeia, pois durante os primeiros seis dias de vida adulta, as abelhas operárias consomem quantidades consideráveis de pólen para obter um nível nutricional adequado de proteínas e aminoácidos necessários para completar o seu desenvolvimento. Se as abelhas operárias jovens não consumirem a quantidade correta de proteína, suas glândulas mandibulares e hipofaríngeas podem não se desenvolver completamente e a produção de geleia real ficará prejudicada (SOMERVILLE, 2000; STANDIFER, 2003).

Deste modo, o consumo de pólen para as abelhas *A. mellifera* é imprescindível, por ser a principal fonte de proteínas, gordura (lipídeos), vitaminas e sais minerais (MARCHINI et al., 2006).

1.4. Mineral ferro (Fe)

Micronutrientes como os minerais são essenciais para o desenvolvimento das colônias (HAYDAK, 1970). Alguns minerais são considerados macroelementos essenciais, como o cálcio, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre, e microelementos essenciais, como o cobre, cobalto, iodo, manganês, selênio, zinco e ferro (WECKWERTH, 2007).

Em condições naturais, as necessidades de minerais das abelhas *Apis mellifera* são supridas exclusivamente pela colheita de recursos florais, como o pólen, com concentrações que podem variar dependendo da região e variabilidade vegetal presente nas proximidades do apiário (ZHANG et al., 2015). As abelhas obtêm sua fonte de minerais principalmente do pólen coletado, Herbert e Shimanuki (1978) a partir da média de minerais encontrados no pólen de diferentes regiões sugerem uma dieta com: 1000 ppm de potássio, 500 ppm de cálcio, 300 ppm de magnésio e 50 ppm de sódio, zinco, manganês, cobre e ferro.

Os íons metálicos constituem uma pequena porção do tecido corporal dos seres vivos (4%), porém, são essenciais como componentes estruturais e atuam em diversos processos, com funções estruturais e funcionais. Na parte estrutural, destaca-se seu papel como integrante de compostos orgânicos corporais. Na parte funcional, como catalisador de sistemas enzimáticos (SILVA et al., 2013).

O ferro (Fe) é um elemento químico que desempenha papel fundamental nas funções de manutenção fisiológica no cérebro, participando de muitas funções celulares, atuando como co-fator enzimático, participando do metabolismo, regulação da expressão gênica, proteção contra radicais livres, síntese de proteínas e auxiliando também em funções importantes no transporte de oxigênio e respiração mitocondrial (FAA et al., 2008; COZZOLINO, 2012; BELAIDI; BUSH, 2016).

Dentro deste contexto, o Fe destaca-se com grande importância no desenvolvimento de insetos, várias enzimas que contêm ferro na sua composição como a RNA polimerase I, fenilalanina e tirosina, possuem funções importantes na síntese de DNA e RNA, e no processo de desenvolvimento do sistema imunológico. Além disso, algumas enzimas que contêm ferro em sua composição são responsáveis pela formação de energia, e também estão presentes em grande quantidade na musculatura torácica das abelhas, auxiliando no vôo (enzima citocromo oxidase e NADPH oxidase) (NICHOL et al., 2002).

O microelemento Fe existe em abundância na crosta terrestre, mas sua absorção é dificultada pelo mecanismo protetor da intoxicação celular. O Fe não é excretado normalmente, sendo reaproveitado em grande parte, deste modo, a necessidade de Fe deve ser suficiente para repor as perdas do organismo (CUNHA et al., 1998).

Assim, não há mecanismo fisiológico no organismo para a remoção do excesso de Fe e há várias condições que podem causar acúmulo perigoso de reservas do metal no organismo (COZZOLINO, 2012). Em geral, mesmo uma dieta que inclua alimentos enriquecidos, não representa nenhum risco especial de toxicidade por Fe (HEATH et al., 2003). As abelhas *A. mellifera* suprem suas necessidades de ferro por meio de recursos ambientais, com concentrações que podem variar de 0,08 a 233,0 mg Kg⁻¹ de Fe no mel e de 11,1 a 520,0 mg/Kg⁻¹ no pólen (ZHANG et al., 2015).

Além de mais resistentes a doenças, uma colônia bem nutrida consegue gerar indivíduos capazes de realizar suas tarefas e produzir descendentes saudáveis, assim, obtendo uma colônia mais produtiva, resistente e longeva (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010). Assim, durante a escassez de flora apícola, deve ser realizado o fornecimento de um alimento suplementar que possa auxiliar na manutenção da colônia, porém, dados na literatura referentes à recomendação de níveis ideais de minerais para as abelhas são escassos (PEREIRA et al., 2006). Deste modo, ainda pouco se conhece sobre as reais necessidades de micronutrientes e suas influências na fisiologia das abelhas (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com diferentes concentrações de fonte inorgânica de Fe e sua influência no desenvolvimento das glândulas mandibulares, por meio de análises morfológicas. Para

isso, foi mensurada a área e altura das células secretoras da glândula mandibular, sendo analisada a influência do mineral Fe para diferentes níveis de inclusão.

O presente estudo resultará no capítulo II, artigo intitulado “**Mineral ferro (Fe) afeta o desenvolvimento de glândula mandibular em abelhas *Apis mellifera* L.**”, o qual será submetido à revista “**Apidologie**”, conforme suas regras de publicação.

2. Referências Bibliográficas

AMDAM, G. V. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. **Animal Behavior**, Aliso Viejo, v.79, p.973–980, 2010.

BARRETO, L. M. R. C.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O. Composição e Qualidade do Pólen Apícola Proveniente de sete Estados Brasileiros e do Distrito Federal. **Boletim Indústria Animal**. Nova Odessa, v.62, n.2, p.167-175, 2005.

BELAIDI, A. A.; BUSH, A. I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **Journal of neurochemistry**, v.139, n.1, p. 179-197, 2016.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, Paris, 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**, Cary, v.70, p.39-41, 1977.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, p.193, 2006.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4. ed. Barueri: SP. Manole, p. 645- 673, 2012.

CRAILSHEIM, K. The flow of jelly within a honeybee colony. **Journal of Comparative Physiology B**, Heidelberg, v.162, p. 681-689, 1992.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1.ed. New York: Routledge, p.682, 1999.

CRUZ-LANDIM, C. Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v.15, n.3, p.177-290, 1967.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, p.416, 2009.

CUNHA, D. F. et al. **Microminerais**. Ciências Nutricionais. São Paulo: Savier Editora de Livros Médicos Ltda, p. 142-143, 1998.

CUNHA, J. **Mortandade disseminada das abelhas devido o uso de agrotóxicos**. Brasília, DF: Câmara de Deputados, 2013. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cmads/audiencias-publicas/audiencia-publica-2013/4-7-2013>>. Acesso em: 07 fev 2018.

DANFORTH, B. Primer - Bees. **Current Biology**, Cambridge, v. 17, n.5, p.156-161, 2007.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, Abingdon, v.77, p.67-70, 1996.

DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, Paris, v.36, p.49-57, 2005.

EMBRAPA. **Produção de mel**. Teresina, PI: Embrapa Meio-Norte. Sistema de Produção, 2002. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80709/1/sistemaproducao-3.PDF>>. Acesso em: 06 fev 2018.

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**, Chichester, v.47, n.2, p.429-435, 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**, Amsterdam, v.252, p.1257-1269, 2008.

FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. **BMC Genomics**, London, v.10, p.645-657, 2009.

FORMICKI, G.; GREŃ, A.; STAWARZ, R.; BARTŁOMIEJ, Z.; ANNA, G. Metal Content in Honey, Propolis, Wax, and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v.22, n.1, p.99-106, 2013.

FUNARI, S. R. C.; ROCHA, H. C.; SFORCIN, J. M.; CURI, 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**, Nova Odessa, v.55, p.189-193, 1998.

GONÇALVES, L. S. Africanized honey bee: introduction, adaptation and benefits: In: International Apicultural Congress, 2011, Durban. **Proceedings...**Durban, p.1-3, 2011.

GONÇALVES, L. S. Desenvolvimento e expansão da apicultura no Brasil com abelhas africanizadas. **Revista SEBRAE**, São Paulo, n.3, p.14-16, 2006.

GUPTA, R. K. Taxonomy and distribution of different honeybee species. **Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security**. Netherlands: Springer, p.63-103, 2014.

HAYDAK, M. H. Honeybee nutrition. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.15, p.143-156, 1970.

HEATH, A. M.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Health implications of iron overload: the role of diet and genotype. **Nutrition reviews**, v. 61, n. 2, p. 45-62, 2003.

HERBERT JR., E. W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, Paris, v.9, n.1, p. 33-40, 1978.

HU, S. et al. Early steps of angiosperm pollinator coevolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Kirksville, v. 105, n.1, p.240-245, 2008.

JUNG-HOFFMANN, I. Die determination von konigin and arbeiterin der honigbiene. **Z. Bienenforsch**, v.8, p.296-322, 1966.

KERR, W. E. The history of the introduction of Africanized bees to Brazil. **South African Bee Journal**, Modderfontein, v.39, p.3-5, 1967.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society (Biological Sciences)**, London, v. 274, p.303-313, 2007.

LANDIM, C. C. **Abelhas**: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Ed. UNESP, p.408, 2009.

LASS, A.; CRAILSHEIM, K. Influence of age and caging upon protein metabolism, hypopharyngeal glands and trophallactic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Insects Sociaux**. Basel, v.43, p.347-358, 1996.

LI, J. et al. Differential protein expression in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: underlying caste differentiation. **PLoSOne**, San Francisco, v.5, n.10, p.e13455, 2010.

MARCHINI, L. C.; REIS, V. D. A.; MORETI, A. 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 - USP**, São Paulo, 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**, São Paulo, v.68, n.3, p.346-353, 2009.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Cambridge: Harvard University Press, p.404, 1974.

MITCHELL, A. Africanized killer bees: a case study. **Critical Care Nurse**, Aliso Viejo, v.26, n.3, p. 23-32, 2006.

MODRO, A. F. H.; MESSAGE, D.; LUZ, C. F. P.; MEIRA NETO, J. A. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.1057-1065, 2007.

NICHOL, H.; LAW, J. H.; WINZERLING, J. J. Iron metabolism in insects. **Annuary Review of Entomology**, Palo Alto, v.47, p.535-552, 2002.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, Chichester, v.120, n.3, p.321-326, 2011.

PAGE JR.; PENG, C. Y. S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**, Philadelphia, v.36, n.4, p.695-711, 2001.

PEREIRA, F. D. M.; FREITAS, B. M.; VIEIRA NETO, J. M.; LOPES, M. D. R.; BARBOSA, A. D. L.; DE CAMARGO, R. C. R. Desenvolvimento de colônias de

abelhas com diferentes alimentos protéicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.1-7, 2006.

PINTO, F. A. et al. Nutritional and temporal effects on hypopharyngeal glands of Africanized honeybees (Hymenoptera – Apidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, v.59, n.2, p.447-456, 2012.

RICKETTS, T. H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, Oxford, v.11, n.5, p.499-515, 2008.

SALLES, H. C.; CRUZ-LANDIM, C. Efeito do hormônio juvenil sobre o desenvolvimento da glândula mandibular em pupas de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.64, p.691-695, 2004.

SHEPPARD, W. S.; MEIXNER, M. D. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. **Apidologie**, Paris, v.34, n.4, p.367-375, 2003.

SILVA, F. A. et al. Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Food Measurement and Characterization**, New York, v.7, p.158–165, 2013.

SOMERVILLE, D. C. Honey bee nutrition and supplementary feeding. **NSW Agriculture**, Orange, p.1-8, 2000.

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**. Agriculture Handbook, 2003. Disponível em: <<http://www.beesource.com/resources/usda/honeybee-nutrition-and-supplemental-feeding>>. Acesso em: 06 abr 2018.

STORT, A. C.; GONÇALVES, L. S. A africanização das abelhas “*Apis mellifera*” nas Américas – I. In: BARRAVIERA, B. (Ed.). **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC, p.33-34, 1994.

WECKWERTH, W. **Metabolomics**: methods and protocols. New Jersey: Humana Press Inc., p.525-528, 2007.

WIESE, H. **Apicultura novos tempos**. 2. ed. Guaíba: Agrolivros, p.17, 2005.

WINSTON, M. L. **A Biologia da abelha**. Porto Alegre: Magister, p.276, 2003.

WOLFF, L. F. Alimentação de enxames em apicultura sustentável. Pelotas. Circular Técnica, 63. (online) Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/circulares/Circular_63.pdf>. Acesso em: 23 abr 2018.

ZHANG, G. E.; ZHANG, W.; QUI, X.; BAOHUA, X. Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. **Entomol. Exp. Appl**, v. 156, p.201-210, 2015.

CAPÍTULO II

Mineral ferro (Fe) afeta o desenvolvimento de glândula mandibular em abelhas

Apis mellifera L.

Resumo

A alimentação larval exerce papel fundamental na diferenciação das castas em abelhas *Apis mellifera*, uma vez que promove a mudança no perfil hormonal e manutenção da integridade do ovário de futuras rainhas. Essa diferença no desenvolvimento é atribuída a sua dieta exclusiva de geleia real, produzida pelas abelhas operárias nutrizas a partir das secreções das glândulas mandibulares e hipofaringeanas. Para essas abelhas, a quantidade e qualidade do pólen consumido são imprescindíveis ao desenvolvimento de suas glândulas, estando diretamente relacionados ao alimento consumido e nutrientes como proteínas, vitaminas e minerais. Dentro deste contexto, minerais como o ferro (Fe) são importantes para o funcionamento celular normal e podem interferir na função da glândula mandibular (produção de geleia real). Neste projeto propomos avaliar o efeito de suplementação de fonte inorgânica de Ferro na alimentação de abelhas e seus reflexos na morfologia da glândula mandibular. Para isto, foram utilizadas 12 colmeias (03 colmeias por tratamento) distribuídas de forma aleatória nos seguintes tratamentos: Fe0 (sem suplementação de Fe); Fe25 com suplementação de 25 mg L⁻¹ de Ferro; Fe50 com suplementação de 50 mg L⁻¹ de Ferro e Fe100 com suplementação de 100 mg L⁻¹ de Ferro. A fonte de ferro utilizada foi o Sulfato Ferroso heptahidratado (33,10% Fe) diluído em xarope de açúcar (proporção de 1:1 de água e açúcar cristal), e fornecido a cada 07 dias para os enxames (500 mL). Para a morfometria da glândula, foram coletadas 20 abelhas de cada tratamento com seis dias de idade, nos meses de junho, julho e agosto de 2016. Foram processados blocos de resina, os cortes foram dispostos em lâminas para serem analisados utilizando o software de análise de imagem Leica Qwin Plus®. Os resultados obtidos foram comparados por ANOVA, seguida do teste de Tukey (P<0,05). Observou-se redução significativa na área e altura das células secretoras da glândula mandibular, concluindo-se que os níveis de ferro inorgânico oferecidos na dieta das abelhas modularam negativamente esta glândula.

Palavras-chave: apicultura; suplementação mineral; glândula mandibular; nutrição.

Mineral iron (Fe) affects the development of mandibular gland in bees *Apis mellifera* L.

Abstract

Larval feeding plays a fundamental role on caste differentiation in *Apis mellifera* honeybee, since it promotes hormone profile changes and ovary integrity maintenance for future queens. This difference on the development is attributed to its exclusive royal jelly diet, produced by nurse bees into mandibular and hypopharyngeal glands. To these bees, the quantity and quality of pollen consumed is directly related to glands development, linked to nutrients such as proteins, vitamins and minerals from food consumption. In this context, minerals such as Iron (Fe) are important to the normal cell functioning and can affect mandibular glands (production of royal jelly). In this project we propose to evaluate the effects of inorganic Iron supplementation and their effects on mandibular gland morphology. For this, 12 beehives were used (03 hives each treatment) randomly distributed into four treatments: Fe0 (without iron supplementation); Fe25 supplemented with 25 mg L⁻¹ Iron; Fe50 supplemented with 50 mg L⁻¹ Iron and Fe100 supplemented with 100 mg L⁻¹ Iron. Was used Ferrous Sulfate heptahydrate (33.10% Fe) as Iron source, diluted in sugar syrup (1:1 water and sugar), the colonies were feed once a week (500 mL). For glands morphology analysis were collected 20 worker bees from each treatment with six days life along three months: June, July and August 2016. Resin blocks were processed, slices were arranged in slides for analysis using image analyses software Leica Qwin Plus[®]. Results were compared by ANOVA followed by Tukey test (P<0.05). Significant reduction was observed in the area and height of the secretory cell of the mandibular gland. It was concluded that the levels of inorganic iron offered in the bees diet negatively modulated the mandibular gland.

Key-words: Beekeeping, mineral supplementation, mandibular glands, nutrition.

1. Introdução

As exigências nutricionais das abelhas *Apis mellifera* devem ser supridas para que possam manifestar todo seu potencial produtivo e reprodutivo. As necessidades nutricionais das abelhas são supridas exclusivamente por néctar (carboidratos) e o pólen (proteínas, vitaminas, lipídeos e minerais) (Marchini et al. 2006; Potts et al. 2016).

O período conhecido como entressafra, em que ocorre escassez de alimento na natureza, prejudica a sobrevivência e a produção das abelhas devido à deficiência de nutrientes, o que compromete a manutenção das colônias, diminuindo o tempo de vida das abelhas e facilitando o aparecimento de doenças. Com o intuito de suprir esta deficiência de nutrientes, apicultores oferecem suplementação artificial proteica e energética, que pode ser disponibilizada de forma líquida, sólida ou pastosa, procurando atender as necessidades nutricionais das abelhas. A suplementação artificial visa suprir a falta ou escassez da alimentação natural coletada nas flores (Singh and Singh 1996; Carrillo et al. 2015).

O pólen possui funções importantes no desenvolvimento adequado das crias, nutrição de abelhas jovens e funcionamento de glândulas (Marchini et al. 2006). Seu constituinte mais importante é a proteína, cujo conteúdo apresenta alta variação, de 4 a 34% (Estevinho et al. 2011).

A alimentação larval exerce papel fundamental na diferenciação das castas, uma vez que promove a mudança no perfil hormonal e manutenção da integridade do ovário nas rainhas. Essa grande diferença no desenvolvimento é atribuída a sua dieta exclusiva e rica em geleia real, produzida pelas abelhas operárias nutrizas com idade de 4 a 12 dias, a partir das secreções das glândulas mandibulares e hipofaríngeas localizadas na região da cabeça (Feng et al. 2009; Cruz-Landim and Abdalla 2009; Kamakura 2011). Deseyn e Billen (2005) verificaram que a quantidade de geleia real secretada está diretamente relacionada ao tamanho das glândulas, mostrando que glândulas bem desenvolvidas produzem mais geleia real.

Embora a alimentação das abelhas *Apis mellifera* seja focada em alimentos proteicos e energéticos, outros nutrientes como vitaminas e minerais são importantes para o desenvolvimento das colônias (Brodschneider and Crailsheim 2010). Em condições naturais, as necessidades de minerais das abelhas *Apis mellifera* são supridas exclusivamente pela colheita de recursos florais (pólen, néctar e água) com

concentrações que podem variar dependendo da região e variabilidade vegetal presente nas proximidades do apiário (Zhang et al. 2015).

Herbert e Shimanuki (1978), sugerem uma dieta com 1000 ppm de potássio, 500 ppm de cálcio, 300 ppm de magnésio e 50 ppm de sódio, zinco, manganês, cobre e ferro. Dentre os minerais essenciais para o pleno desenvolvimento das abelhas, o ferro (Fe) se destaca, pois é importante para o funcionamento celular normal, atuando como co-fator enzimático, participando do metabolismo, regulação da expressão gênica, imunidade, proteção contra radicais livres, síntese de proteínas e manutenção fisiológica no cérebro (Faa et al. 2008; Belaidi and Bush 2016).

Dentro deste contexto, o Fe destaca-se com grande importância no desenvolvimento de insetos, várias enzimas que contêm ferro como a RNA polimerase I, fenilalanina e tirosina, possuem funções importantes na síntese de DNA e RNA, e no processo de desenvolvimento do sistema imunológico. Além disso, algumas enzimas que contêm ferro em sua composição são responsáveis pela formação de energia, e também estão presentes em grande quantidade na musculatura torácica das abelhas, auxiliando no voo (enzima citocromo oxidase e NADPH oxidase) (Nichol et al. 2002)

Entretanto, ainda pouco se conhece sobre as reais necessidades do mineral Fe e sua influência na fisiologia das abelhas (Brodschneider and Crailsheim 2010).

Neste sentido, é importante estudar nutrientes que podem afetar o desenvolvimento das glândulas mandibulares de operárias nutrizas, podendo assim, afetar a qualidade e quantidade de geleia real produzida, o que pode influenciar diretamente no desenvolvimento e manutenção do enxame.

2. Material e Métodos

Tratamentos

Foram utilizadas 12 colmeias de abelhas *Apis mellifera*, padronizadas quanto ao número de quadros de cria e alimento (3 e 2, respectivamente), distribuídas em 4 tratamentos com 3 repetições experimentais: Fe0: Tratamento controle, xarope de açúcar sem suplementação de ferro; Fe25: Suplementação com 25 mg L⁻¹ de Ferro diluído em xarope de açúcar; Fe50: Suplementação com 50 mg L⁻¹ de Ferro diluído em

xarope de açúcar e Fe100: Suplementação com 100 mg L⁻¹ de Ferro diluído em xarope de açúcar.

A fonte de Ferro utilizada foi o Sulfato Ferroso heptahidratado, marca Dinâmica Química Contemporânea (contendo 31,10% de ferro) diluído em xarope de açúcar (proporção de 1:1 de água e açúcar cristal), fornecido por meio de alimentador tipo Boardman (500 mL por semana), durante o período de entressafra (maio, junho e julho) de 2016. Dados de nosso laboratório mostram que nestes meses ocorrem as menores concentrações do mineral ferro nas amostras de pólen que as abelhas possuem para coleta nas proximidades do apiário.

Para a confirmação dos níveis de inclusão fornecidos em cada grupo experimental, foi realizada análise por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS) obtendo-se os seguintes valores: Fe25: 25,695 mg L⁻¹; Fe50: 47,796 mg L⁻¹ e Fe100: 104,175 mg L⁻¹.

Coleta das abelhas e armazenamento

A coleta das abelhas foi baseada na metodologia descrita por Oliveira (2013). Nos meses de entressafra (junho, julho e agosto) foram coletadas 20 abelhas operárias por enxame. Para isso, foram retirados 2 quadros com cria operculada de cada tratamento, em seguida, estes quadros foram envolvidos individualmente em tecido filó, para que os adultos permanecessem presos após a emergência das células de cria. Os quadros foram colocados em estufa com temperatura de 30° C e umidade de 60% até a emergência dos indivíduos. As abelhas operárias nascidas foram marcadas na região do pronoto com caneta atóxica (Posca Paint Pens, Lápis Mitsubishi, Japão). Depois de serem marcadas, as abelhas foram reintroduzidas em seus enxames de origem.

Após, as abelhas foram colhidas aos seis dias de idade (nutrizes) com auxílio de uma pinça entomológica e imediatamente foram armazenadas em tubo Falcon com furos para facilitar a entrada de ar. Logo após, foram eutanasiadas (anestesiadas com CO₂ e posteriormente decapitadas com bisturi) e suas cabeças fixadas em formaldeído a 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 24 horas.

Posteriormente, as cabeças das abelhas foram lavadas em água corrente por 24 horas, sendo então adicionado álcool etílico a 70%, permanecendo nessas condições até o processamento para análises histológicas.

Análise Morfológica

As análises histológicas foram realizadas e adaptadas de acordo com Smodiš-Škerl e Gregorc (2010). O material foi processado em séries crescentes de etanol (70, 80, 90 e 95%) e foram realizados cortes nas porções anteriores e posteriores das cabeças (eliminando cerca de 1 mm de quitina), posteriormente, as cabeças foram embebidas em resina metacrilato (HistoResin[®], Leica, Heidelberg, Alemanha).

Após a embebição em resina, as cabeças foram incluídas em moldes plásticos com a resina de montagem formando os blocos para produção de lâminas, em seguida os blocos foram colados em madeira.

Na sequência os blocos foram levados ao micrótomo rotativo automático (Leica RM2155, Alemanha) e cortes de 3 μ m foram produzidos com navalha de vidro. De cada bloco foram produzidos cortes em série, os quais foram imediatamente dispostos em lâminas de vidro, sendo colocados 12 cortes por lâmina com média de 13 lâminas por bloco.

As lâminas contendo os cortes foram coradas em hematoxilina-eosina, secas em estufa, e uma lamínula foi colocada sobre os cortes em cada lâmina, montada com Entellan[®].

Morfometria da glândula mandibular

Por meio de uma câmera digital (Leica DC300FX), acoplada ao microscópio (Leica DMLB80), os cortes foram fotomicrografados e analisados utilizando-se o software de análise de imagem (Leica Q-win versão 3 para Windows).

Para a mensuração da área do reservatório da glândula mandibular foram analisadas 10 abelhas (5 blocos) por tratamento, gerando 40 imagens por abelha, totalizando 80 imagens por bloco, dessa forma foram analisadas 400 imagens da glândula mandibular por tratamento. Para a mensuração da altura da célula secretora da glândula mandibular foram realizadas 10 medidas por imagem.

Assim, com auxílio do software de análise de imagem foi realizada a contagem da área do reservatório e da altura da célula secretora da glândula mandibular por animal para cada grupo experimental. Além disso, utilizando-se do mesmo software, a área e a altura da célula secretora da glândula mandibular foi medida para a determinação estatística da área e altura média (μ m).

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram comparados por ANOVA, seguida do teste de Tukey para verificar diferenças entre as médias. Foi considerado como estatisticamente diferente quando $p < 0,05$ (Zar 1996).

3. Resultados

Ao longo do período experimental, foi observada redução significativa no desenvolvimento da glândula mandibular nos tratamentos que continham ferro, independente do nível de inclusão, tanto para área (tamanho) como para a altura da célula secretora da glândula; o tratamento controle apresentou desenvolvimento superior em todos os meses e tratamentos analisados (tabela 1 e 2).

Tabela 1. Área da glândula mandibular (μm^2) nos meses de junho, julho e agosto. Os valores representam as médias seguidas de seus desvios padrões. Fe0 (sem adição de Fe); Fe25 (25 mg L⁻¹ Fe); Fe50 (50 mg L⁻¹ Fe) e Fe100 (100 mg L⁻¹ Fe).

Área média ($\mu\text{m}^2 \times 10^5$) da glândula mandibular de abelhas <i>Apis mellifera</i> L.			
	Junho	Julho	Agosto
Fe0	10,4±2,5aC	10,8±2,6aB	11,5±2,8aA
Fe25	7,8±2,9bB	8,5±2,8bA	7,8±2,7bB
Fe50	7,6±2,2bB	8,3±3,1bA	6,4±2,4cC
Fe100	7,5±2,5bB	8,4±2,6bA	7,5±2,6bB

Letras minúsculas indicam diferença estatística entre diferentes tratamentos no mesmo mês ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre o mesmo tratamento para meses diferentes ($P < 0,05$).

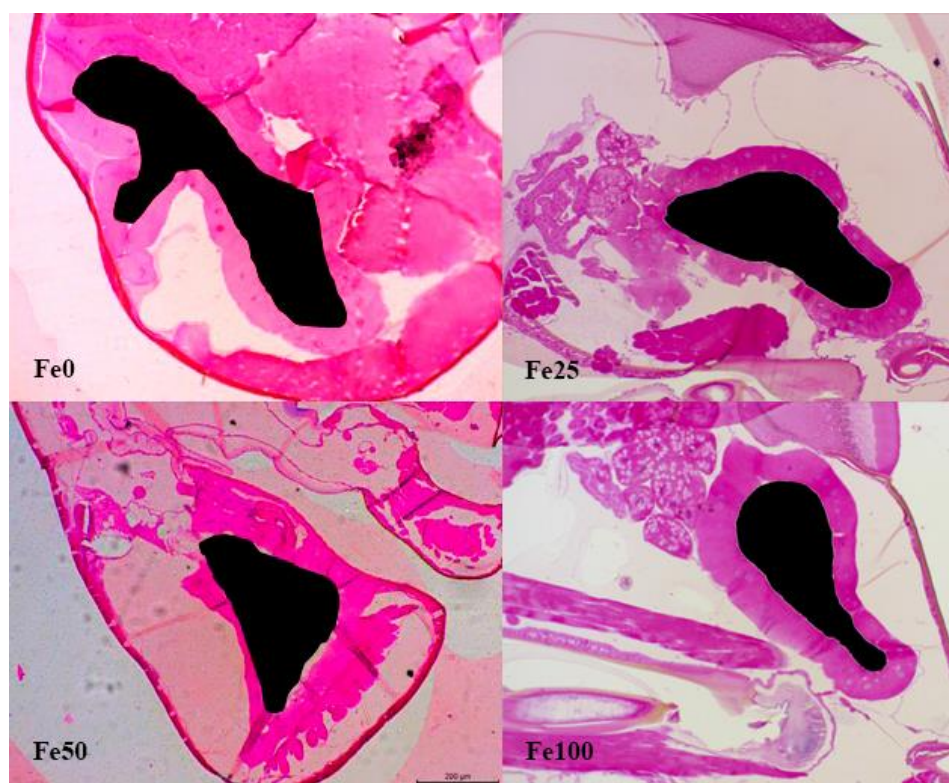


Figura 1. Fotomicrografias representativas da área da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera*. Fe0: controle; Fe25: 25 mg L⁻¹ de Ferro; Fe50: 50 mg L⁻¹ de Ferro e Fe100: 100 mg L⁻¹ de Ferro. A cor preta representa a área da glândula. Aumento: 10x.

Tabela 2. Altura da célula secretora da glândula mandibular (µm) nos meses de junho, julho e agosto. Os valores representam as médias seguidas de seus desvios padrões. Fe0 (sem adição de Fe); Fe25 (25mg L⁻¹ Fe), Fe50 (50mg L⁻¹ Fe) e Fe100 (100mg L⁻¹ Fe).

Altura média (µm x 10³) da glândula mandibular de abelhas <i>Apis mellifera</i> L.			
	Junho	Julho	Agosto
Fe0	124,0±10,6aC	126,9±7,4aB	128,5±5,7aA
Fe25	114,3±10,4bA	109,1±8,9bB	108,3±6,4bC
Fe50	112,5±9,1cA	107,9±6,7cB	107,5±5,9cB
Fe100	110,4±8,4dA	108,5±7,9cB	108,0±6,4bB

Letras minúsculas indicam diferença estatística entre diferentes tratamentos no mesmo mês (P<0,05).

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre o mesmo tratamento para meses diferentes (P<0,05).

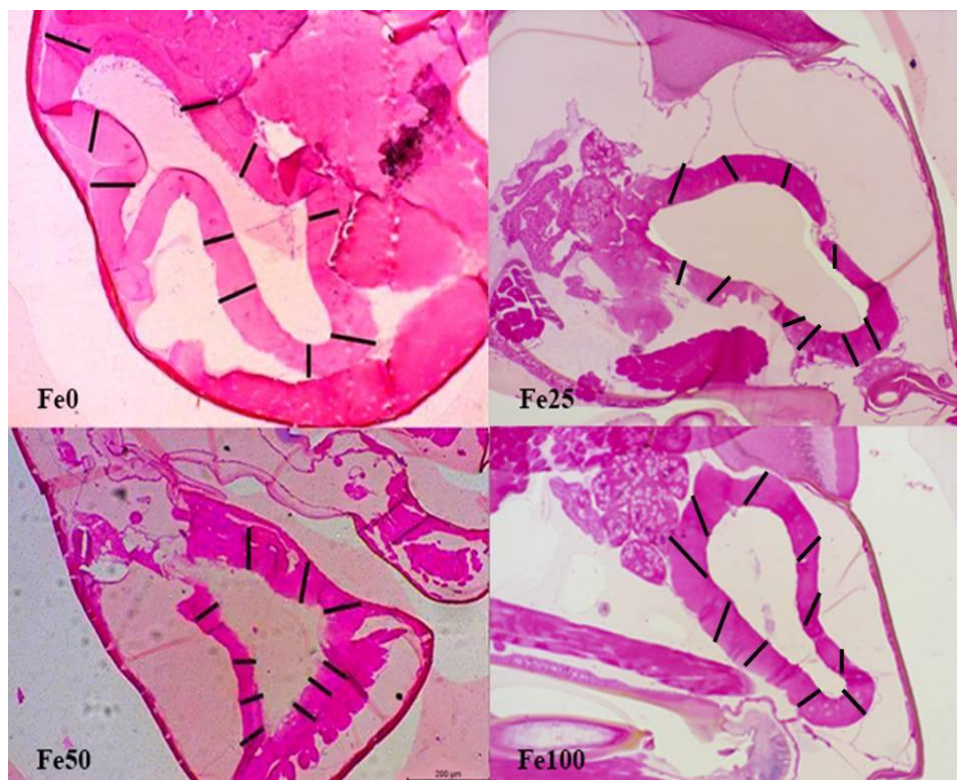


Figura 2. Fotomicrografias representativas da altura da célula secretora da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera*. Fe0: controle; Fe25: 25 mg L⁻¹ de Ferro; Fe50: 50 mg L⁻¹ de Ferro e Fe100: 100 mg L⁻¹ de Ferro. As linhas pretas representam a altura da célula secretora da glândula. Aumento: 10x.

4. Discussão

A suplementação das abelhas com o mineral Fe foi realizada no período de entressafra, quando pode ocorrer redução da atividade da glândula mandibular, devido à diminuição ou escassez de recursos florais disponíveis para as abelhas, o que pode acarretar em falta ou ausência de nutrientes, como minerais (Brodschneider and Crailsheim 2010). Em condições naturais, as necessidades de minerais na nutrição das abelhas *Apis mellifera* são supridas exclusivamente pela colheita de recursos florais, como o pólen, cujas concentrações que podem variar dependendo da região e variabilidade vegetal presente nas proximidades do apiário.

Com relação ao mineral ferro, foram testados neste trabalho níveis de inclusão acima e abaixo dos recomendados por Herbert e Shimanuki (1978), que sugerem uma dieta com 50 mg L⁻¹ de ferro para as abelhas, com base na quantidade de minerais disponíveis nos recursos alimentares, que pode variar de 0,08 a 233,0 mg kg⁻¹ de Fe no

mel e de 11,1 a 520,0 mg kg⁻¹ de Fe no pólen (Zhang et al. 2015). Entretanto, Herbert e Shimanuki (1978) sugeriram o valor de 50 mg L⁻¹ com base nos valores médios de ferro encontrados no pólen de diferentes localidades. Neste trabalho, foi fornecida a suplementação com fonte de ferro inorgânico diretamente para o enxame, no sentido de verificar os efeitos deste mineral na fisiologia glandular das abelhas operárias na fase de nutrizes.

Observou-se neste trabalho que a fonte de Fe inorgânico alterou o desenvolvimento da glândula mandibular nos meses e tratamentos estudados, fato este sugere que a suplementação modulou o estado nutricional e fisiológico das abelhas operárias nutrizes. Deseyn e Billen (2005) verificaram que a quantidade de geleia real secretada está diretamente relacionada ao tamanho das glândulas mandibulares, mostrando que glândulas bem desenvolvidas produzem mais geleia real, o que influenciará diretamente na nutrição e desenvolvimento do enxame. Entretanto, em todos os tratamentos suplementados com o mineral Fe foi observado efeito negativo, visto que a glândula mandibular não se desenvolveu na mesma proporção quando comparada ao grupo sem suplementação mineral.

A primeira hipótese poderia ser explicada pelo fato do mineral ferro ter sido deslocado e armazenado em grânulos presentes nos trofócitos do corpo gorduroso, principalmente em abelhas jovens, cujo acúmulo pode aumentar em função da dieta rica em ferro disponível para as abelhas. Os grânulos ricos em ferro são importantes para auxiliar as abelhas na orientação em relação ao eixo magnético da terra, o qual é importante para a orientação durante o forrageamento (Ferrari 2014; Liang et al. 2016; Lambinet et al. 2017).

Outra hipótese poderia estar relacionada a um possível efeito tóxico do mineral, promovido por um excedente do ferro livre no organismo das abelhas, uma vez que estas tinham acesso normal as suas atividades de forrageamento, como colheita de pólen.

Deste modo, a suplementação pode ter desencadeado um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e os sistemas de defesa do organismo (antioxidantes), ocasionando estresse oxidativo, prejudicando o desenvolvimento das glândulas mandibulares das abelhas *A. mellifera*. Níveis excedentes de ferro no organismo da abelha podem promover estresse oxidativo, como observado por Farooqui (2008), que aplicando citrato de amônio ferroso nos lóbulos antenais do

cérebro das abelhas, prejudicou a memória olfativa e a aprendizagem das abelhas, relacionando este fato ao estresse oxidativo promovido pelo mineral.

5. Conclusão

Conclui-se que os diferentes níveis de ferro inorgânico (sulfato ferroso) oferecidos na dieta de abelhas *Apis mellifera* modularam negativamente o tamanho da área e da altura da célula secretora da glândula mandibular.

6. Referências Bibliográficas

- Belaidi, A.A., Bush, A.I. (2016) Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. *Journal of neurochemistry*. 139, 179-197
- Brodtschneider, R., Crailsheim, K. (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*. 41, 278-294
- Carrillo, M.P., Kadri, S.M., Veiga, N., Orsi, R.O. (2015) Energetic feedings influence beeswax production by *Apis mellifera* L. honeybees. *Acta Scientiarum*. 37, 1
- Cruz-Landim, C., Abdalla, F.C. (2009) Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Ed. UNESP. 416
- Deseyn, J., Billen, J. (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*. 36, 9-57
- Estevinho, L.M., Rodrigues, S., Pereira, A.P., Feás, X. (2011) Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol*. 47(2), 429-435
- Faa, G., Nurchi, V.M., Ravarino, A., Fanni, D., Nemolato, S., Gerosa, C., Eyken, P.V., Geboes, K. (2008) Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coord. Chem. Rev*. 252, 1257-1269
- Farooqui, T. (2008) Iron-induced oxidative stress modulates olfactory learning and memory in honeybees. *Behav. Neurosci*. 122, 433-447
- Feng, M., Fang, Y., Li, J. (2009) Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics*. 10, 645–657

Ferrari, E.T. (2014) Magnets, magnetic field fluctuations and geomagnetic disturbances impair the homing ability of honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* 53(4), 452-465

Herbert, E.W., Shimanuki, H. (1978) Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. *Apidologie.* 9(1), 33-40

Kamakura, M. (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature.* 473, 478–483

Lambinet, V., Hayden, M., Reid, C., Gries, G. (2017) Honey bees possess a polarity-sensitive magnetoreceptor. *J. Comp. Physiol.* 203(12), 1029–1036

Liang, C.H., Chuang, C.L., Jiang, J.A., Yang, E.C. (2016) Magnetic Sensing through the Abdomen of the Honey bee. *Sci. Rep.* 6, 23657

Marchini, L.C., Reis, V.D.A., Moreti, A.C.C.C. (2006) Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ciênc. Rural.* 36 (3), 949-953

Nichol, H., Law, J.H., Winzerling, J.J. (2002) Iron metabolism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 535-552

Oliveira, M.E.C. (2013) Polietismo e detecção de vírus deformador de asas em abelhas *Apis mellifera scutellata* (Africanizada) e *Apis mellifera ligustica* (Europeia). Tese (Doutorado em Ciências/ Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 178

Potts, S.G. et al. (2016) Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature.* 540, 220–229

Singh, R.P., Singh, P.N. (1996) Amino acid and lipid spectra of larvae of honeybee (*Apis cerana*) feeding on mustard pollen. *Apidologie.* 27, 21-28

Smodis-Skerl, M.I., Gregorc, A. (2010) Heat shock protein and cell death in situ localization in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie.* 41, 73-86

Zar, J.H. (1996) *Bioestatistical analysis.* New Jersey: Prentice Hall. 718

Zhang, G.E., Zhang, W., Qui, X., Baohua, X. (2015) Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. *Entomol. Exp. Appl.* 156, 201-210

CAPÍTULO III

Implicações

Pelo fato de não existirem estudos sobre níveis ideais do mineral Fe diretamente na dieta das abelhas, foi realizada a suplementação com o Sulfato Ferroso (Fe) em diferentes níveis e procurou-se neste estudo avaliar o desenvolvimento das glândulas mandibulares, utilizando-se de análises morfométricas como ferramenta de mensuração.

No estudo constatou-se que durante o período de entressafra a suplementação pelo mineral Fe interferiu de forma negativa, prejudicando o desenvolvimento da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera* para os níveis de inclusão avaliados.

A falta de trabalhos na área de nutrição de abelhas foi a maior dificuldade encontrada no estudo, não havendo referências quanto à quantidade do mineral Fe para experimentos à campo. Novas pesquisas devem ser realizadas com objetivo de determinar níveis nutricionalmente seguros de minerais na dieta das abelhas; desta forma, sugerem-se novos estudos com menores proporções do mineral Fe.

Espera-se que futuramente sejam encontrados e recomendados níveis ideais de micronutrientes para dieta de abelhas, visando a real necessidade nutricional destes insetos, para que haja maior padronização quanto à suplementação artificial de abelhas *Apis mellifera*.

Deste modo, espera-se que esse trabalho possa contribuir com informações para a área de suplementação mineral de abelhas, permitindo contribuir com a mensuração da real exigência nutricional do Fe para dietas ofertadas em períodos de entressafra.