

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/08/2023

At the author's request, the full text of this thesis / dissertation will not be available online until August 20, 2023

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO E INORGÂNICO
NO DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE ABELHAS**
Apis mellifera L.

DANIEL CAVALCANTE BRAMBILA DE BARROS

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

BOTUCATU – SP

2021

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO E INORGÂNICO
NO DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MANDIBULAR DE ABELHAS**
Apis mellifera L.

DANIEL CAVALCANTE BRAMBILA DE BARROS
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Dr. Samir Moura Kadri

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

BOTUCATU – SP

2021

B277e

Barros, Daniel Cavalcante Brambila de

Efeito da suplementação de zinco orgânico e inorgânico no desenvolvimento da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera* L. / Daniel Cavalcante Brambila de Barros. -- Botucatu, 2021
39 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Samir Moura Kadri

1. Apicultura. 2. Nutrição. 3. Suplementação mineral. 4. Morfologia.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

“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, pela criação e pelos princípios, que me deram suporte para alcançar meus objetivos pessoais e profissionais e para concluir o presente estudo, sempre apoiando meu crescimento profissional e pessoal, dando todo apoio necessário.

Aos meus irmãos, Danilo Cavalcante Brambila de Barros e Felipe Cavalcante Brambila de Barros, pelo imenso estímulo e carinho que sempre me ofereceram, e apesar da distância e ausência em alguns momentos em que gostaria de estar os acompanhando, todo nosso esforço futuramente será recompensado para nossa família prosperar sempre mais.

Muito obrigado por tudo, amo vocês.

AGRADEÇO

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi e ao meu coorientador Dr. Samir Moura Kadri, pela oportunidade da orientação, amizade e por me proporcionarem 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.

Ao Professor Doutor Luis Antônio Justulin Junior, pela oportunidade de ter realizado as análises histológicas no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências da UNESP.

Ao Prof. Dr. Marcos Livio Panhoza Tse e ao Doutor Sergio Alexandre Alcântara dos Santos, pela participação e enorme contribuição na banca do exame de qualificação.

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.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

Deixo aqui meu muito obrigado a 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

2018 – 2021: Doutorado em Zootecnia (área: Nutrição e Produção Animal); Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil.

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	10
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	11
1. As abelhas <i>Apis mellifera</i>.....	11
1.1. Histórico de abelhas <i>Apis mellifera</i>	12
1.2. Exigências nutricionais de abelhas <i>Apis mellifera</i>	13
1.3. Zinco (Zn)	14
1.4. Glândula mandibular de abelhas <i>Apis mellifera</i>.....	16
2. Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO II.....	23
Abstract.....	24
1. Introduction.....	25
2. Materials and methods	27
2.1. Treatments	27
2.2. Collection and storage of bees.....	28
2.3. Histological analysis	29
2.4. Morphometry of mandibular glands	29
3. Results	30
4. Discussion.....	31
5. References	34
CAPÍTULO III	38
Implicações.....	39

LISTA DE TABELAS

Tab. I. Area of the mandibular gland (μm^2). Values represent the means followed by their standard deviations. Zn0 (without zinc addition); ZnI25 (supplemented with 25 ppm zinc inorganic); ZnI50 (supplemented with 50 ppm zinc inorganic); ZnI75 (supplemented with 75 ppm zinc inorganic); ZnO25 (supplemented with 25 ppm zinc organic); ZnO50 (supplemented with 50 ppm zinc organic); ZnO75 (supplemented with 75 ppm zinc organic).....	30
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Representative photomicrographs of the area of the mandibular gland of *Apis mellifera* bees. Zn0: control; ZnI25: 25 ppm of inorganic zinc; ZnI50: 50 ppm of inorganic zinc; ZnI75: 75 ppm of inorganic zinc; ZnO25: 25 ppm of organic zinc; ZnO50: 50 ppm of organic zinc; ZnO75: 75 ppm of organic zinc. The black line represents the area of the gland. Scale bars 200 μ m.**31**

Capítulo I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. As abelhas *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* (Classe: Insecta; Ordem: Hymenoptera; Família: Apidae), são insetos eussociais 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). As abelhas *Apis mellifera* vivem em colônias muito bem organizadas onde os indivíduos se dividem em castas, possuindo funções bem definidas que são executadas visando sempre à sobrevivência e manutenção do enxame. Numa colônia, em condições normais, existe uma rainha, cerca de 5.000 a 100.000 operárias e de 0 a 400 zangões (GUPTA, 2014).

São insetos que fornecem benefícios para os seres humanos, como o mel e outros produtos apícolas, polinização de culturas alimentares e serviços ecológicos. A apicultura é praticada em todo o mundo e pode fornecer uma valiosa fonte de renda para as pessoas em regiões em desenvolvimento com relativamente pouco investimento (FAO, 2016). Segundo Bacaxixi et al. (2011) as abelhas possuem grande importância na polinização cruzada, aumentando a variabilidade genética das espécies e aumentando a produção de frutos e sementes, que são responsáveis por fecundar 73% dos vegetais da nossa flora.

A riqueza e variedade de abelhas são notáveis, chegando a 20.000 espécies em todo o mundo. Destas, aproximadamente 2.500 espécies são encontradas no Brasil, onde estão distribuídas em cinco famílias, sendo que dentro de cada uma muitos gêneros e espécies são representados com características próprias e papéis na natureza de crucial importância (SILVA et al., 2014).

Um desses papéis é a manutenção da variabilidade genética dos vegetais por meio da reprodução sexuada. Este processo chamado de serviço ecossistêmico de polinização vem sendo muito valorizado atualmente, principalmente os prestados pelas abelhas no que diz respeito a plantas silvestres e cultivadas (CASTRO et al., 2006).

Exemplo deste serviço é evidenciado pelo agronegócio, que atualmente é responsável por 21,3% de todo rendimento gerado pela economia brasileira, em que a contribuição econômica dos polinizadores nas principais culturas comercializadas, tanto para exportação, como para o mercado interno é substancialmente elevada (CEPEA, 2014). De acordo com Giannini (2015), de 141 culturas avaliadas no país, 85 delas

dependem de polinizadores. Além disso, o valor atribuído a esse serviço ecossistêmico, prestado de forma gratuita é de U\$\$ 12 bilhões ao ano.

As paisagens se tornam cada vez mais caracterizadas pela agricultura intensiva de monoculturas, portanto a polinização das abelhas é influenciada de maneira negativa, bem como suas necessidades nutricionais (NAUG, 2009). As abelhas de todos os tipos desempenham um papel importante na produção agrícola, na silvicultura. Atualmente, no entanto, os serviços de polinização estão mostrando tendências declinantes em todo o mundo, principalmente pelo uso indiscriminado de inseticidas, queimadas, desmatamento, e grandes áreas de monoculturas, o que tem efeitos diretos no rendimento produtivo e na nutrição das abelhas (FAO, 2016).

1.1. Histórico de 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; GUPTA, 2014).

Existem 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 em enxames selvagens instalados em frestas rochosas, sendo que essa extração era bastante primitiva, o que prejudicava a longevidade dos enxames (CRANE, 1999). A criação e o manejo de abelhas pelo ser humano, no entanto, culminou em diferentes subespécies por meio de diferentes acasalamentos naturais (hibridação), especialmente em regiões como o continente Americano, onde a *Apis mellifera* não era endêmica (PARKER et al., 2010).

No Brasil, as abelhas chegaram no século XIX, foi no ano de 1839 que Padre Antônio Carneiro conseguiu autorização do rei Dom Pedro II e trouxe para o Rio de Janeiro as primeiras abelhas europeias da subespécie *Apis mellifera mellifera* (abelhas pretas), com o objetivo de produzir mel para a alimentação da família real e a fabricação de velas de cera, dando início as atividades apícolas no país (GONÇALVES, 2001). Em 1879, imigrantes alemães trouxeram para o Rio Grande do Sul as colmeias de abelhas *Apis mellifera ligustica*. Outras subespécies também foram trazidas por imigrantes

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no potential conflict of interest concerning the study in this paper.

REFERENCES

- Brodschneider, R., Crailsheim, K. (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*. 41, 278-294
- Butler, C.G. (1946) The provision of supplementary food to hive bees. *Annals of Applied Biology*. 33(3), 307-309
- Cruz-Landim, C., Abdalla, F.C. (2009) Bees: morphology and function of systems. 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
- Eşanu, D., Pop, I.M., Simeanu, D. (2018) The Influence of Some Supplementary Feeds on Food Consumption and Body Weight of Caged Honeybees. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies/Lucrari Stiintifice: Zootehniesi Biotehnologii*. 51(1)
- 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
- Feng, M., Fang, Y., Li, J. (2009) Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics*. 10, 645–657
- Gupta, R.K. (2014) Taxonomy and distribution of different honeybee species. *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security*. Netherlands. 1, 63-103

Haraguchi, H. (2014) Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 19(1), 5-14

Herbert, E.W., Shimanuki, H. (1978) Mineral Requirements for Brood-Rearing by Honeybees Fed a Synthetic Diet. *Journal of Apicultural Research*. 17(3), 118-122

Indorf A., Rickli M., Kilchenmann V., Bogdanov S., Wille H. (1998) Nitrogen and mineral constituents of honey bee worker brood during pollen shortage. *Apidologie*. 29, 315–325

Ingraham, T.R., Kellogg, H.H. (1963) Thermodynamic properties of zinc sulfate, zinc basic sulfate, and the system Zn-SO. Queen's Printer.

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

Labadi, I., Parkanyi, L., Kenessey, G., Liptay, G. (1993) Thermal stability and crystal structure of bis (1, 2 ethanediol) zinc sulfate. *Journal of crystallographic and spectroscopic research*. 23(4), 333-338.

Legg, S.P., Sears, L. (1960) Zinc sulphate treatment of parakeratosis in cattle. *Nature*. 186(4730), 1061-1062

Li, J., Wu, J., Rundassa, D.B., Song, F., Zheng, A., Fang, Y. (2010) Differential protein expression in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: underlying caste differentiation. *PLoS One*. 5(10), e13455

Longuini, A. A., Martineli, G. M., Camilli, M. P., Barros, D. C. B., Vieira, J. C. S., Padilha, P., Orsi, R. O. (2021). Supplementation with an Inorganic Zinc Source in the Metalloproteomic Profile of Royal Jelly in *Apis mellifera* L. *Biological Trace Element Research*, 1-11.

Maage, A., Julshamn, K., Berge, G.E. (2001) Zinc gluconate and zinc sulphate as dietary zinc sources for Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition*. 7(3), 183-187

Maret, W. (2017) Zinc in cellular regulation: The nature and significance of “zinc signals”. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(11), 2285

Omar, E., Abd-Ella, A., Khodairy, M., Moosbeckhofer, R., Crailsheim, K., Brodschneider, R. (2017) Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 48(4), 425-436

Pankiw, T., Winston, M.L., Robinson, G.E. (1998) Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *Journal of insect physiology*. 44(7-8), 685-692

Penick, C.A., Crofton, C.A., Holden Appler, R., Frank, S.D., Dunn, R.R., Tarpy, D.R. (2016) The contribution of human foods to honey bee diets in a mid-sized metropolis. *Journal of Urban Ecology*. 2(1)

Peters, L., Zhu-Salzman, K., Pankiw, T. (2010) Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 56, 132–137

Salles, H.C., Cruz-Landim, C. (2004) Effect of the juvenile hormone on the development of the mandibular gland in workers' pupae of *Apis mellifera* L. *Braz J Biol.* 64(3), 691–695

Shi, W., Chance, M. R. (2011) Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. *Current opinion in chemical biology*. 15(1), 144-148.

Smodiš-Škerl, 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

Yu, Z.P., Le, G.W., Shi, Y.H. (2005) Effect of zinc sulphate and zinc methionine on growth, plasma growth hormone concentration, growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I gene expression in mice. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 32(4), 273-278

Zaluski, R., Justulin Jr., L.A., Orsi, R.O. (2017) Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* 7(1), 15217

Zar, J.H. (1996) *Biostatistical 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

Há uma grande escassez de informações sobre os minerais na nutrição de abelhas *Apis mellifera*, pouco se sabe sobre os níveis adequados de suplementação, efeitos e fontes minerais que podem ser oferecidas às colônias. Minerais como o zinco são fundamentais como componentes estruturais e funcionais, constituem as metaloproteínas e atuam como cofator enzimático, participando do metabolismo, regulação da expressão gênica, manutenção estrutural de biomembranas, imunidade e proteção contra radicais livres, síntese de proteínas, entre outras.

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 Zn para a dieta durante o período de entressafra. Novas pesquisas devem ser realizadas com objetivo de determinar níveis nutricionalmente seguros de minerais na dieta das abelhas, e sugerem-se novas pesquisas com maiores proporções do mineral Zn na dieta.