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-ORITENTADOR: 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 TRATAMEN-TO 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. Universidade 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 analises estatística.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS iv
LISTA DE FIGURAS v
LISTA DE TABELAS vi
CAPÍTULO I 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS 2
HISTÓRICO 2
AS ABELHAS *Apis mellifera* 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 *Apis mellifera* L. 19
RESUMO 19
ABSTRACT 20
Introdução 21
Material e Métodos 22
Local do Experimento 22
Grupos experimentais 22
Coleta de Geleia Real 23
Colheita das abelhas 23
Extração e Precipitação das Proteínas da Geleia Real 24
Separações eletroforéticas das frações proteicas 24
Análise de Fe por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS) 25
Digestão tríptica dos spots proteicos para identificação por ESI MS/MS 26
Identificação das proteínas por ESI MS/MS 27
Análise dos resultados 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^{-1} de Ferro diluído em xarope de açúcar;

T50Fe - Suplementação com 50 mg L^{-1} de Ferro diluído em xarope de açúcar;

T100Fe - Suplementação com 100 mg L^{-1} 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 *eletrospray*;

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 (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 proteina 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^{-1}Fe), Tratamento T2 (50 mg L^{-1}Fe) e Tratamento T3 (100 mg L^{-1}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^{-1} Fe), Tratamento T2 (50mg L^{-1} Fe) e Tratamento T3 (100mg L^{-1} Fe).....29

Tabela 3. Identificação dos *spots* proteicos que apresentaram diferença de expressão (ANOVA; $p < 0.05$) na geléia real de abelhas nutrizes alimentadas com 25 mg L^{-1}Fe (T25Fe), 50 mg L^{-1}Fe (T50Fe) e 100 mg L^{-1}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

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

HISTÓRICO

As abelhas originaram-se de vespas, semelhantes às atuais, possivelmente ligadas à evolução das plantas angiospermas. Durante o desenvolvimento da vida na terra, havia insetos, que visitavam as flores para coletar néctar, sua principal fonte de energia, e caçavam pequenos animais para suprir sua necessidade de proteínas. Porém, em determinado momento algumas dessas vespas substituíram a proteína animal da sua dieta pela proteína vegetal, isto é, passaram a consumir o pólen das flores, evoluindo para abelhas (PIRANI; CORTOPASSI-LAURINO, 1993).

A relação homem e abelha acontece há muito tempo. Há registros de pinturas/ desenhos paleolíticos em cavernas, aproximadamente 7.000 anos a.C., mostrando o homem colhendo mel e seu contato com as abelhas. Diferente de hoje, quando a apicultura é desenvolvida de maneira racional buscando a longevidade aliada à produção dos enxames, eles extraiam o mel sem qualquer preocupação ou cuidado (de forma bastante primitiva), prejudicando a vida dos enxames (CRANE, 1999).

Há aproximadamente 2.400 anos a.C., os egípcios, pioneiros na criação de abelhas, colocavam as abelhas em potes de barro podendo transportar os enxames de um lugar para outro. Porém, esta prática era primitiva. Os gregos colocavam seus enxames em recipientes com forma de sino, feitos de palha trançada chamada de colmo, dando origem ao termo "colmeia". Naquela época, as abelhas eram consideradas sagradas para muitas civilizações e com o tempo, elas também passaram a assumir grande importância. Em 1851 o Reverendo Lorenzo Lorraine Langstroth verificando o comportamento das abelhas e estruturas dos enxames, criou a colmeia de quadros móveis, permitindo a criação racional de abelhas, favorecendo o avanço tecnológico da atividade como a conhecemos hoje (EMBRAPA, 2002).

No Brasil, com o objetivo de fornecer mel para alimentação da corte real e fabricação de velas à partir da cera, a atividade apícola nacional teve início em 1839 com a vinda do Padre Antônio Carneiro, que trouxe para o estado do Rio de Janeiro as primeiras abelhas europeias da subespécie *A. m. mellifera*, vindo da cidade de Porto em Portugal. Posterior a isso, entre os anos de 1870 e 1880, imigrantes alemães e italianos trouxeram para o Rio Grande do Sul as abelhas *Apis mellifera ligustica.* Além dessas, diferentes subespécies também foram trazidas por imigrantes europeus, disseminando-se, as abelhas *Apis mellifera* L. por todo território brasileiro (WIESE, 2005).

Diante da baixa produtividade das abelhas europeias no Brasil, em 1956 o professor Warwick Estevam Kerr, com ideia de estabelecer um programa de melhoramento genético, buscava abelhas mais adaptadas ao clima tropical. Assim trouxe abelhas africanas *A. m. scutellata*, mais produtivas e resistentes à doenças (GONÇALVES, 2006). Porém, em 1957 alguns enxames, com suas rainhas africanas, escaparam e acasalaram de forma natural no ambiente com as abelhas europeias, dando origem as abelhas africanizadas. Diante da capacidade de voos longos e facilidade de enxameação deste híbrido, essas abelhas dispersaram-se por grande parte da América do Sul e Central, chegando ao México em 1986 e ao sul da Califórnia em 1994 (MELLO; SILVA; NATAL, 2003; MITCHELL, 2006).

Os híbridos advindos dessa "africanização" apresentavam comportamento defensivo, trazendo dificuldade para o Brasil. Isto porque, no início houve susto e temor por boa parte da população frente à vários incidentes como ataques seguidos de mortes de pessoas e animais, ficando assim conhecidas como "abelhas assassinas" ou "abelhas brasileiras", e passaram a ser tratadas como pragas no mundo todo. Apesar desses problemas iniciais, o Brasil viu-se forçado a modernização da apicultura em decorrência da produtividade e rusticidade dessas novas abelhas em relação às abelhas europeias, pesquisando e criando assim novas tecnologias que melhorassem esta atividade no país, que se tornou um dos maiores exportadores de produtos apícolas (PEREIRA; LOPES, 2011). Essa produção também foi favorecida pela extensão da área brasileira, floradas diversificadas e clima propício que possibilitou elevada produção e manejo durante o ano todo (COUTO, N.; COUTO, L., 2006).

AS ABELHAS *Apis mellifera* L.

A *A. mellifera* é uma das principais espécies de abelhas pertencentes à ordem *Hymenoptera*, classificada em duas subordens e várias superfamílias, como a *Apoidea*, sendo inserida na família, *Apidae* (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

As abelhas são os insetos sociais mais bem estudados, vivem em colônias organizadas em que os indivíduos se dividem em castas, possuindo funções bem definidas que são executadas visando sempre a sobrevivência e manutenção do enxame. Em condições normais, em uma colônia, existem milhares de indivíduos divididos em três castas: uma rainha, responsável pela coesão do enxame, cópula com o zangão durante o voo nupcial e a postura diária de milhares de ovos garantem o nascimento de novos indivíduos; de 0 a 400 zangões, responsáveis por fecundar a abelha rainha e cerca de 5.000 a 100.000 operárias (WEISE, 2005).

Dentre estas três castas, as abelhas operárias são em maior numero e é delas a responsabilidade de grande parte dos trabalhos realizados na colmeia, definindo suas tarefas de

acordo com sua idade fisiológica, ou necessidades dos enxames. Do 1° ao 3°dia de vida fazem a limpeza de qualquer sujidade que exista dentro da colmeia e são denominadas “abelhas faxineiras”. Do 4° ao 12° dia, são chamadas de “abelhas nutrizes” e alimentam as larvas, produzem geleia real (GR) e alimentam a rainha, providenciam a criação de novas rainhas, caso seja necessário. Do 13° ao 18° dia de vida, são conhecidas como “abelhas engenheiras” por produzirem cera e construírem os favos. Do 19° ao 20° dia ficam de guarda no alvado, defendendo seu território contra qualquer invasão e, finalmente, a fase de “abelhas campeiras” do 21° dia em diante quando fazem os serviços externos no campo, colhem resinas, pólen, néctar e água (WEISE, 2005; AMDAM, 2010).

As abelhas *Apis mellifera* durante a escassez de alimento (geralmente no período de inverno/ ou entressafra), enxameiam (migram) a procura da oferta de néctar e pólen, essenciais a sua alimentação. Elas, tanto na fase larval quanto na adulta possuem necessidades específicas de nutrientes para que possam desenvolver todo o seu potencial produtivo e reprodutivo (MARCHINI; REIS; MORETI, 2006).

A importância das abelhas não é observada apenas pelo valor comercial dos seus produtos, mas também pela a ação desses insetos como agentes polinizadores. Ao forragearem as plantas em busca de alimento (pólen e néctar), as abelhas promovem a reprodução cruzada dos vegetais, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e melhorando a produção de frutos e sementes. Elas são responsáveis por realizar a polinização de 70% de todas as espécies vegetais cultivadas no mundo. Dentre seus produtos, o mel é o mais conhecido e apreciado; mas, além dele, outros produtos podem ser obtidos por meio do manejo racional apícola, como a própolis, pólen, geleia real, cera e apitoxina (COUTO, N.; COUTO, L., 2006; RICKETTS et al., 2008).

GELEIA REAL

Produzida pelas glândulas mandibulares e hipofaringeanas, substâncias complementares que se misturam formando a geleia real (GR), sendo esse alimento, uma complexa composição de açúcares, água, proteínas, colesterol, aminoácidos e vitaminas, sendo que 90% de suas proteínas pertencem ao mesmo grupo químico (DESEYN; BILLEN, 2005), ácidos orgânicos, hormônios esteróides, fenóis, vitaminas, minerais e outros componentes ainda não identificados (PAMPLONA; KOHNO et al., 2004). As glândulas hipofaringeanas estão presentes na cabeça da operária e suas células 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 da rainhas (FENG; FANG; LI et al., 2009).

Por não ser um alimento que fica estocado nos enxames como é o caso do mel e o pólen, para obtenção da geleia real, é utilizado o método para a produção de geleia real ou rainhas inicialmente proposto por Doolittle (1899), que consiste na transferência simples de larvas jovens (menos de 24 horas de idade) dos favos das colônias para cúpulas acrílicas contendo uma gota de geleia real diluída em água. Essas cúpulas são fixadas em quadros porta-cúpulas e introduzidas na parte central dos enxames, induzindo as abelhas a criarem uma nova rainha, momento no qual estocam a geleia real no enxame. Entretanto, a produção é interrompida 72 horas após a transferência para a colheita da geleia real.

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 nutrizes com idade de 4 a 14 dias, a partir das secreções das glândulas hipofaringeanas e mandibulares localizadas na região da cabeça (CRUZ-LANDIM; ABDALLA, 2009).

Além das larvas jovens, a rainha tem a alimentação rica em geleia real, que está diretamente relacionada com sua longevidade e fertilidade. Pela hipótese desse produto causar efeito semelhante em seres humanos, tem despertado muito interesse das pessoas, tanto para alimentação quanto em pesquisas (PUTTKAMMER, 1994). A geleia real tem em sua composição antioxidantes, compostos capazes de inibir ou retardar a formação e a ação deletéria provocados por substâncias provenientes do metabolismo do oxigênio molecular, popularmente conhecidos como radicais livres (BEZERRA et al., 2008). Nesse contexto, a geleia apresenta também outros compostos que auxiliam na reprodução e longevidade. Wang et al. (2014) estudaram genes como *hdac1* , *Sir2* , Superóxido dismutase (*Sod*), superóxido dismutase 2 (*Sod2*), tioredoxina redutase 1 (*Trxr-1*) e Vitellogenina (*Vg*), que estão presentes na geleia real, atuando na regulação da vida, longevidade e reprodução de abelhas, podendo ser afetadas diretamente de acordo com a alimentação.

Os teores de proteína no pólen são extremamente importantes para a nutrição da colmeia, pois durante os primeiros cinco ou seis dias de vida adulta, as abelhas operárias consomem grandes quantidades de pólen para obter o nível adequado de proteínas e aminoácidos necessários para completar seu crescimento e desenvolvimento. Da mesma forma, se as abelhas operárias jovens não consomem quantidade ideal de proteínas, suas glândulas hipofaringeanas não se desenvolvem completamente e a produção de geleia real pode ficar prejudicada (STANDIFER, 1980; SOMERVILLE, 2000).

O tamanho da glândula responsável pela produção de geleia real está relacionado com a atividade da mesma, sendo que indivíduos recém emergidos apresentaram-na pouco desenvolvida e com 15 dias de idade, pode observar-se redução no tamanho dos ácinos. Em abelhas na fase nutriz, fase correspondente às abelhas com seis dias de idade, apresentam a glândula mais desenvolvida, subentendendo que esta idade seja o pico de seu desenvolvimento/ produção, diferente das abelhas com 0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 dias de vida (DESEYN; BILLEN, 2005).

Diversos estudos têm identificado e caracterizado as proteínas da geleia real podendo chegar de 9 a 15% do seu peso total. Dentre essas proteínas, destacam-se a família das MRJPs (Major royal jelly proteins/ Principais proteínas da geleia real) ou apalbuminas. Essas proteínas representam 82% do total das proteínas hidrossolúveis e cerca de 90% do total de proteínas da GR (SCHMITZOVÁ et al., 1998). Variados fatores podem influir na composição da geleia real, como por exemplo, o estado fisiológico e metabólico da abelha nutriz, a idade da larva, a espécie da abelha, as condições sazonais e regionais (SCARSELLI et al., 2005).

EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS

Embora a alimentação artificial de abelhas seja focada em alimentos energéticos e proteicos (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010), outros nutrientes como vitaminas e minerais são essenciais para o desenvolvimento das colônias (HAYDAK, 1970). As abelhas obtêm minerais do pólen coletado, néctar e água. Herbert e Shimanuki (1979) sugerem dieta com 1000 ppm de potássio, 500 ppm de cálcio, 300 ppm de magnésio e 50 ppm de sódio, zinco, manganês, ferro e cobre. Entretanto, pouco se conhece das reais necessidades de micronutrientes ou suas influências na fisiologia das abelhas (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

Dentro deste contexto, o consumo de pólen para as colônias de *Apis mellifera* L. é inquestionável, por ser a principal fonte de proteínas, sais minerais, lipídeos e vitaminas (MARCHINI; REIS; MORETI, 2006). Além disso, o pólen possui funções fundamentais no desenvolvimento adequado de crias e nutrição de abelhas jovens, funcionamento de glândulas e ovários e formação de gorduras corporais (CAMPANA; MOELLER, 1977; MARCHINI; REIS; MORETI, 2006). Seu constituinte mais importante é a proteína, cujo conteúdo pode variar de 4 a 34%, sendo a única fonte natural disponível deste nutriente para as abelhas (WINSTON, 2003; ESTEVINHO et al., 2011).

O pólen também é reconhecido por ser fonte proteica de importância nutricional para seres humanos, apresentando também carboidratos, lipídeos e minerais em sua composição.

Possui, ainda vitaminas antioxidantes (β-caroteno como pró-vitamina A, vitaminas C e E) e também as vitaminas D e do complexo B (Riboflavina (Vitamina B_2), e Niacina (Vitamina B_3)) fundamentais no processo metabólico de proteínas, carboidratos, lipídeos, carboidratos. Nutrientes esses, necessários para a formação de hemácias, produção de anticorpos, respiração celular, para o crescimento de forma geral, ajudam no funcionamento do sistema nervoso, e na produção de ácido clorídrico para o sistema digestivo (MELO et al., 2009).

A deficiência de proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e água podem prejudicar o desenvolvimento, manutenção e reprodução das colônias, reduzir a vida das abelhas, provocar estresse e facilitar o aparecimento de doenças, afetar a capacidade das abelhas de cuidarem das crias novas, como também a composição corporal bromatológica das pupas, diminuindo os níveis de proteínas e sais minerais em até 8,4 e 38,5%, respectivamente (FUNARI et al., 1998; SOMERVILLE, 2005).

Mesmo que os íons metálicos constituam pequena porção do tecido corporal dos seres vivos (4%), estes são essenciais como componentes estruturais e em diversos processos vitais, com funções estruturais e funcionais (SILVA et al., 2013). Na parte estrutural, destaca-se seu papel como integrantes de compostos orgânicos corporais. Na parte funcional, como catalisador de sistemas enzimáticos, por exemplo.

Minerais como ferro são importantes para o funcionamento celular normal, atuando 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 (FAA et al., 2008).

O ferro destaca-se pela importância no desenvolvimento de insetos. Várias enzimas que contem ferro como ribonucleotídeos redutase, RNA polimerase I, que juntamente com a fenilalanina e tirosina, tem a função importante na síntese de DNA e RNA e no processo de melanização (desenvolvimento do sistema imunológico) (NICHOL; LAW; WINZERLING, 2002). Além disso, algumas enzimas que contem ferro são responsáveis para formação de energia. Essas também são presente em grande quantidade no músculo do voo das abelhas (enzima citocromo oxidase e NADPH oxidase) (CRABTREE; NEWSHOLME, 1972).

Além de mais resistentes às doenças, a colônia saudável consegue gerar indivíduos bem nutridos capazes de realizar suas tarefas e produzir descendentes saudáveis, consequentemente obtendo colônias mais produtivas, resistentes e longevas (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010). Assim, durante a escassez de pasto apícola, deve ser feito o fornecimento de alimento que possa auxiliar na manutenção da colônia (PEREIRA et al., 2006).

FERRO

O ferro é um metal de transição e sua utilidade biológica está relacionada com a capacidade que ele apresenta de existir em diversos estados de oxidação e de formar muitos complexos diferentes. Esse mineral pode ser considerado como oligoelemento necessário em quantidades relativamente pequenas como cofator de enzimas (WORWOOD, 1996).

Na natureza, a maioria do ferro apresenta-se na forma férrica (Fe^{3+}), que é amplamente indisponível para a maioria dos sistemas biológicos devido a sua insolubilidade na água, exceto quando em solução ácida. Em pH 7,0 os sais ferrosos (Fe^{2+}) são relativamente solúveis, mas na presença de oxigênio são rapidamente oxidados à forma férrica, quase insolúvel (WORWOOD, 1996; ANDREWS; SMITH, 2000).

No organismo dos animais, o ferro está presente principalmente sob a forma de complexos ligados a proteínas, como os compostos heme (hemoglobina ou mioglobina), enzimas heme (citocromos, catalases e peroxidases) ou compostos não- heme (enzimas flavina – Fe, transferrina, e ferritina) (NIMEH; BISHOP, 1980; HAYS; SWENSON,1996).

Essa combinação do ferro com diversas proteínas se caracteriza por ser importante mecanismo de defesa orgânica, visto que o ferro livre é capaz de catalisar a formação de espécies reativas do oxigênio, podendo trazer consequências graves para membranas celulares e DNA. Portanto, o ferro intracelular está ligado ou incorporado a várias proteínas ou quelatos para reduzir sua toxicidade. Estas proteínas ou quelatos são responsáveis pela absorção, estoque e atividade biológica do ferro (SMITH, 1997; ANDREWS; SMITH, 2000).

A quantidade de ferro disponível para absorção pelo intestino depende da quantidade de ferro na dieta e da sua biodisponibilidade (ANDERSON et al., 1990). Após a ingestão, o alimento chega ao estômago, onde sofre digestão péptica e libera o ferro, seja na sua forma heme, seja na forma de ferro iônico, que rapidamente forma complexos de ferro solúveis ou insolúveis (WORWOOD, 1996). O ferro liberado do alimento liga-se a quelatos de alto peso molecular. Esses quelatos em conjunto com o ácido clorídrico estabilizam o ferro em uma forma solúvel (Fe^{2+}), evitando a formação de complexos férricos insolúveis, indisponíveis para o organismo (NIMEH; BISHOP, 1980).

Posteriormente, finalizada a fase de digestão, a absorção processa-se em duas etapas: captação e transferência (MELO, 1984). O transporte do ferro através da célula é possivelmente realizado por uma proteína intracelular solúvel, chamada mobiliferrina. Ela liga-se não só ao ferro, mas também ao zinco, cobalto e chumbo, podendo ser justificativa para a concorrência pela absorção entre o ferro e esses metais (WORWOOD, 1996). A etapa final da absorção

ocorre nos capilares da submucosa intestinal, onde o ferro é captado pela transferrina após sofrer oxidação.

A transferrina é uma proteína específica do ferro, responsável pelo seu transporte entre alguns compartimentos (plasma e líquidos extravasculares) (WORWOOO, 1996; SMITH, 1997). Além de solubilizar o ferro, a transferrina (Tf) atenua sua reatividade e facilita a sua liberação para as células. Quando a capacidade de ligação da Tf está totalmente saturada (normalmente 44,4% não saturada), o ferro pode circular livremente pelo soro, na forma não ligada à Tf (NTBI), que é facilmente internalizada por célula ou bactérias, contribuindo para o dano celular nos casos de sobrecarga de ferro (PONKA, BEAUMONT, RICHARDSON, 1998).

Para os processos respiratórios, a funcionalidade do ferro ocorre por meio da sua atividade de oxidação e redução, e capacidade para o transporte de elétrons. Essa propriedade intensifica-se significativamente quando o ferro está combinado à proteína (HAYS; SWENSON, 1996). A cadeia respiratória mitocondrial, com suas diversas subunidades envolvidas no transporte de elétrons, é importante na conversão do ferro férrico em ferroso, única forma química reconhecida pela ferroquelatase (proteína). (ALCINDOR; BRIDGES, 2002).

Em casos de deficiência de ferro, o organismo todo pode sofrer consequências, sendo a anemia a manifestação mais relevante em alguns animais. Por outro lado, o acúmulo ou excesso de ferro é extremamente nocivo para os tecidos, uma vez que o ferro livre promove a síntese de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas e lesam proteínas, lipídeos e DNA. Portanto, é de extrema importância que haja equilíbrio no metabolismo do ferro, de modo que não haja falta ou excesso do mesmo. Sua homeostase vai possibilitar a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evitar possíveis danos teciduais. Dentro da homeostase do ferro, os mecanismos de excreção são menos desenvolvidos e eficazes do que aqueles que regulam a absorção e distribuição, e nesses processos várias células, hormônios e proteínas transportadoras do ferro estão envolvidas (BEAUMONT; VAILONT, 2006; DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2006).

Normalmente o ferro é eliminado do organismo pelas secreções corpóreas, e descamação das células intestinais. O organismo não possui um mecanismo específico para eliminar o excesso de ferro absorvido ou acumulado. Assim, o controle do equilíbrio do ferro requer a comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque. Essa comunicação é feita pela hepcidina, um hormônio peptídeo circulante que teria papel regulatório fundamental na homeostase do ferro, coordenando o uso e o estoque do ferro com a sua aquisição (PARK, 2001; KRAUSE, 2000).

PROTEÔMICA E METALÔMICA

A proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas, como o nível de expressão, modificações pós-transducionais e interações, de modo a favorecer a visão geral dos processos celulares (BINNECK, 2014). Já a metalômica está relacionada com genômica e proteômica, pois a síntese e funções metabólicas dos genes e proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos. As metaloproteínas podem ser definidas como aquelas proteínas que contém um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas são dependentes de um íon metálico para exercer sua atividade biológica (ROMANOWSKI; MANGRICH; NEVES, 2001; GARCIA; MAGALHÃES; ARRUDA, 2006; SILVA et al., 2013).

Diferente do genoma, o proteôma não é estático, podendo mudar com o desenvolvimento do organismo ou ser influenciado pelo ambiente externo. Definido como o conjunto de todas as proteínas existentes em um fenótipo molecular específico,o proteôma é dinâmico, sofre mudanças influenciadas pelo ambiente, portanto é possível obter-se mais informação do organismo estudando o seu proteôma (LANÇAS et al., 2003).

Possuindo diversos campos de pesquisa, a análise proteômica pode ser classificada em diferentes eixos; a proteômica descritiva, podendo envolver a identificação de proteínas expressas pelo organismo exposto a determinada condição; proteômica comparativa, identificando alterações de expressão das proteínas associadas com alterações nas condições dos organismos; proteômica funcional, identificando grupos funcionais de proteínas, ou grupos de proteínas que operam em mutua interação; desenvolvimento de um mapa metabólico, identificando proteínas que formam uma organela (VISPO, 2004).

Enquanto a proteômica visa mais os estudos de fenótipos bioquímicos das células (as proteínas das células), a metalômica segue outra vertente, buscando informações de conexões e interações funcionais de metais com genes, proteínas e outras biomoléculas. Esta nova área do conhecimento científico tem contribuído para o entendimento dos aspectos fisiológicos e funcionais das metaloproteínas responsáveis pelo transporte de íons metálicos nos organismos vivos (MOUNICOU; SZPUNAR; LOBINSKI, 2009).

Relacionada com a genômica e proteômica, a metalômica estuda a síntese e funções metabólicas dos genes e proteínas que não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas, que são metaloproteínas que atuam como catalisadores biológicos na regulação das reações biológicas e funções fisiológicas em células e órgãos (NEVES et al., 2012).

O mesmo organismo pode apresentar diferentes proteômas, pelo fato de muitos genes não terem funções definidas, ou seja, não se pode prever a lista completa de proteínas a partir da

expressão do gene e, ainda que as proteínas codificadas pelo RNAm sejam conhecidas e o RNAm tenha sido quantificado, as correlações entre RNAm e concentrações de proteínas são fracas. De acordo com o que o organismo é exposto, pode variar a expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-tradução das proteínas sintetizadas, em resposta às condições ambientais definidas (CELIS et al., 2000; HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Grande parte de todas as proteínas/enzimas requerem um íon metálico para serem capazes de realizarem suas funções. Esses desempenham papel funcional em numerosos processos bioquímicos e celulares. A interação metal/proteína determina suas propriedades químicas e atividades biológicas. As interações relevantes envolvem tanto a esfera de coordenação do íon metálico quanto interações mais distantes, ou seja, interações entre a macromolécula e os resíduos de coordenação do metal (*metal-bindingprotein*) (ROSATO; VALASATAVA; ANDREINI, 2016).

Muitos metais têm funções essenciais para a vida em organismos e exercem uma diversidade de papéis em muitos processos biológicos. Um bom exemplo dessa interação é o grupo prostético que consiste de um átomo de ferro (Fe), contido no centro de um largo anel orgânico heterocíclico chamado porfirina da hemoglobina. Existem funções nas quais o balanço de íons é importante, por exemplo, a atividade muscular (relação entre cálcio e potássio no fluido extracelular). No aspecto funcional, pode-se destacar seu papel catalisador nos sistemas enzimáticos, por meio da ligação desses íons a substratos, orientando assim a reação e a mediação nas reações de óxido-redução por de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. Os metais mais comuns que fazem parte das cadeias das metaloproteínas são o ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), magnésio (Mn), cobalto (Co), entre outros. Eles atuam na estabilização de biomoléculas por meio da proteção de cargas negativas (VIEIRA et al., 2015; SAGHIRI; ASATOURIAN; ORANGI,2015).

Na apicultura, essa técnica vem sendo bastante explorada. Peiren et al. (2005) analisaram em eletroforese bidimensional a composição proteica do veneno de *A. mellifera*, visando identificar novos componentes com potencial alergênico, um total de 49 *spots* foi recortado e submetido à espectrometria de massa. Desses, trinta e nove *spots* resultaram na identificação de seis diferentes proteínas de abelha e três ainda não descritas, sendo a melitina e a PLA2 as mais predominantes.

Chan, Howes e Foster (2006), analisando zangões, rainha e operaria na fase larval e adulta, encontraram diferenças significativas na composição proteica da hemolinfa, por meio do estudo proteômico quantitativo e qualitativo, utilizando Q-TOF (que identificaram a seqüência de aminoácidos de um neuropeptídeo).

O desenvolvimento da colmeia está diretamente ligado à nutrição, e o mineral ferro pode se ligar às metaloproteínas presentes na geleia real influenciando sua produção e composição, afetando o desenvolvimento populacional do enxame. Diante deste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com diferentes concentrações fonte de ferro inorgânico na qualidade da geleia real produzida por abelhas *A. mellifera*, por meio de análises proteômicas. Assim, identificar as proteínas da geleia real, o número de *spots* proteico e suas ligações ao elemento ferro (Fe).

A presente pesquisa resultará no capítulo II, intitulado **"Suplementação com fonte de ferro inorgânica afeta o perfil metaloproteômico da geleia real produzida por abelhas *Apis mellifera* L.",** o qual será submetido à revista **"Food Chemistry"**, conforme as suas regras de publicação.

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: Lippincolt 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. **Biotecnologia, 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., KRUHOFFER 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.; 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**, 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**. ln: 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. Genomica, Proteômica e Abordagens Fisiologicas 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. Florianopolis: 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.; FELICIOLI, R.; PINZAUTI, M.; SABATINI, A.G.; FELICIOLI, 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. **lron metabolism and its diseases**. ln: 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.

CAPÍTULO II

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^{-1}. 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^{-1} de Fe apresentou maior numero 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 influência 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^{-1} 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^{-1} 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

Introdução

Um importante fator que afeta a saúde animal, resistência a doenças, e sobrevivência é a nutrição (Li et al., 2007). Dentro deste contexto, os minerais são importantes por exercerem papel fundamental como componentes estruturais e atuarem como co-fatores enzimáticos (Haragushi, 2004). Dentre os minerais essenciais, o ferro destaca-se pela importância no desenvolvimento de insetos. Várias enzimas que contem ferro como ribonucleotídeos redutase, RNA polimerase I, que juntamente com a fenilalanina e tirosina, têm função importante na síntese de DNA e RNA, e no processo de melanização (desenvolvimento do sistema imunológico) (Nichol et al., 2002). Além disso, algumas enzimas que contem ferro são responsáveis para formação de energia e estão presente em grande quantidade no músculo do voo das abelhas (enzima citocromo oxidase e NADPH oxidase) (Crabtree & Newsholme, 1972).

Entretanto, em determinadas épocas do ano a disponibilidade de recursos florais no entorno do apiário, pode se encontrar reduzido, o que poderia afetar a nutrição dos enxames. A principal fonte de proteínas e minerais para o enxame é o pólen (Brodschneider & Crailsheim, 2010); além disso, as abelhas operárias precisam de proteínas em quantidade e qualidade suficientes para o desenvolvimento de suas glândulas mandibulares e hipofaringeanas, principalmente nos seis primeiros dias de vida, para produzir uma geleia real nutricionalmente completa (Deseyn & Billen, 2005; Brodschneider & Crailsheim, 2010). Desta forma, deficiências nutricionais podem ocasionar a produção de uma geleia real com baixa qualidade, influenciando a saúde da rainha e, consequentemente, o desenvolvimento do enxame.

Uma forma de verificar a qualidade protéica da geleia real, correlacionando com a nutrição mineral, é o uso de técnicas como separação de proteínas pela técnica 2D PAGE e a caracterização por Espectrometria de Massas (MS). Essas representam uma estratégia de análise consolidada para avaliação de alterações no proteoma de insetos (Zhao et al., 2006; Sun et al., 2007; Zhang et al., 2012). Sendo assim, as modulações nas dietas fornecidas às abelhas podem alterar o proteoma da geleia real, auxiliando em estratégias de suplementação alimentar e melhor entendimento de como práticas de manejo podem afetar o enxame de abelhas.

Desta forma, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de 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, no período de entressafra.

Material e Métodos

Local do Experimento

O estudo foi desenvolvido no Setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Fazenda Experimental Lageado-UNESP, Câmpus de Botucatu. Coordenadas geográficas do local do experimento: 22° 49´de latitude sul e 48° 24´de longitude Oeste, com clima tipo Cfa e altitude média de 623 metros.

Grupos experimentais

Foram utilizadas 12 colmeias de abelhas *A. mellifera* africanizadas, padronizadas quanto ao número de quadros de cria e alimento, distribuídas em três tratamentos (03 colmeias por tratamento):

T0Fe: Tratamento controle, sem suplementação de ferro;

T25Fe: Suplementação com 25 mg L^{-1} de Ferro diluído em xarope de açúcar;

T50Fe: Suplementação com 50 mg L^{-1} de Ferro diluído em xarope de açúcar;

T100Fe: Suplementação com 100 mg L^{-1} de Ferro diluído em xarope de açúcar.

Esses valores foram baseados na recomendação de Herbert e Shimanuki (1979), onde sugere a suplementação de 50 mg L^{-1} de ferro.

A fonte de ferro utilizada foi o sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4$.7H2O 20% 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 os meses de junho, julho e agosto de 2016. Para confirmar os níveis fornecidos, foi realizado análise de Fe por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS), obtendo os seguintes valores: T25Fe - 25,695 mg L^{-1}; T50Fe - 47,796 mg L^{-1} e T100Fe - 104,175 mg L^{-1}.

Os dados climáticos durante o período experimental foram: Temperatura °C média de 16,1±3,0; 18,4±3,8 e 19,1±3,8 para os meses de junho, julho e agosto,

respectivamente. Para Precipitação Pluvial (mm) 4,2; 0,0 e 2,8 para os meses de junho, julho e agosto respectivamente. Umidade Relativa do ar (%)76,8; 62,2 e 63,2 para os meses de junho, julho e agosto respectivamente. Insolação (hora decimal) 6,6; 8,7 e 7,4 para os meses de junho, julho e agosto respectivamente. Para Velocidade do vento (km/dia) 60,8; 70,7 e 94,4 para os meses de junho, julho e agosto respectivamente.

Coleta de Geleia Real

A produção de geleia real foi realizada segundo Doolittle (1899), pelo método de transferência de larvas. Para isto, as rainhas das colmeias mini-recrias foram retiradas, aprisionadas em gaiolas e mantidas nas colmeias de apoio, com o objetivo de aumentar a necessidade de criação de nova rainha e assim existir maior aceitação das cúpulas e produção de geleia real. Após 48 horas, estas rainhas foram devolvidas às suas colmeias de origem.

Para a produção de geleia real, cada mini recria recebeu dois quadros porta-cúpulas, contendo um sarrafo, com aproximadamente 25 cúpulas acrílicas cada. Para padronizar a idade das larvas a serem transferidas para as cúpulas artificiais, outras duas colmeias tiveram suas rainhas aprisionadas em um quadro de ninho, contendo as laterais fechadas com tela excluidora. Este processo garantiu a postura da rainha no quadro desejado e a padronização da idade das larvas. Estas larvas foram então transferidas para as cúpulas artificiais contendo uma gota de geleia real diluída em água (na proporção de 1:1), sendo uma larva para cada cúpula, com auxílio de pincel apropriado para a transferência. Após a montagem do quadro porta-cúpulas, este foi introduzido na mini recria sem a rainha. A produção de geleia real foi colhida após 48 horas da transferência e armazenada em *vials* e em *freezer* (abaixo de 0°C) até o momento das análises.

Colheita das abelhas

Mensalmente foram coletadas 180 abelhas operárias com seis dias de idade, provenientes das doze colmeias. Para isso, foram retirados doze quadros com cria operculada, sendo um quadro por colmeia; em seguida, foram envolvidos 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 ±60% até a emergência dos adultos. As operárias que emergiram foram marcadas no pronoto com caneta atóxica enquanto estiveram presas ao quadro. Depois de marcadas as abelhas foram reintroduzidas em suas colmeias de origem, e utilizada fumaça para disfarçar os hidrocarbonetos de reconhecimento da colônia que pudessem dificultar a aceitação das abelhas que estavam retornando. Após 06 dias, cada abelha foi coletada com auxílio de uma pinça entomológica e imediatamente armazenadas em potes plásticos com circulação de ar até o momento de serem anestesiadas e retirada do abdômen para análise.

Extração e Precipitação das Proteínas da Geleia Real

Para extrair as proteínas da geleia real foram pesados 250 mg desta em tubos tipo eppendorf e adicionado em cada, 500 µL de água ultrapura, agitado no vórtex e submetido à centrifugação a 7000 rpm, 4ºC por 30 min. O sobrenadante foi recolhido e submetido a mais seis centrifugações a 14 000 rpm, 4ºC com duração de 5 min cada, afim de descartar toda impureza da amostra.

Para precipitação das proteínas, foi adicionado aos microtubos contendo 100 µL de sobrenadante, 400 µL de acetona 80%, repousado por 2h e centrifugado novamente por 14000 rpm, 4ºC por 5 min. Após esse processo, foi descartado o sobrenadante e obtido os *pellets* proteicos, sendo esses submetidos a três lavagens com 200 µL de acetona 80%.

A concentração de proteínas totais nos extratos de geleia real foram determinadas de acordo com o método do Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão (Braga et al., 2015).

Separações eletroforéticas das frações proteicas

Para corridas dos géis, os *pellets* proteicos obtidos anteriormente foram solubilizados, em solução contendo ureia 7 mol L^{-1}; tioureia 2 mol L^{-1}; CHAPS (sulfato de 3-[(3-cloroaminopropil) dimetilamónio]-propan-1) 2% (m/v); anfólitos 0,5% (v/v) com pH variando de 3 a 10; 0,002% de azul de bromofenol (m/v) e 2,8 mg de DTT (Braga et al., 2015; Vieira et al., 2015), obtendo-se a concentração final de 1,5 µg μL^{-1}

de proteína. Um volume de 250 µL dessa solução foi aplicado em cada tiras de tampão immobiline pH 3-10, 13 cm e mantido em repouso por 12h. Após esse período, foi realizado a focalização isoelétrica (IEF) - Ettan IPGphor (primeira dimensão). Etapa essa onde as proteínas são separadas de acordo com o pI (ponto isoelétrico) e, em seguida as tiras foram reequilibradas em duas soluções: redutora, utilizando 10 mL de solução contendo ureia 6 mol L^{-1}, SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L^{-1} (pH 8,8), 0,002% de azul de bromofenol (m/v) e 2% (m/v) DTT, a fim de manter as proteínas nas suas formas reduzidas; alquilante: utilizou-se uma solução de composição semelhante, substituindo o DTT por iodoacetamida a 2,5% (m/v) para alquilação dos grupos tiol das proteínas e, assim, prevenir a possível re-oxidação. As duas etapas foram mantidas sob agitação com duração de 15 minutos cada. Em seguida, as fitas foram aplicadas a géis de poliacrilamida 12,5% (m/v), adicionados padrões de massa molecular 14 a 97 ao lado de cada gel, ambos selados com uma solução de agarose (0,5% m/v) (Braga et al., 2015) e realizado a corrida 2D-PAGE em duas etapas: 30 min a 100V e 2.35h a 250V.

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel durante 1 h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). As proteínas foram coradas com Coomassie coloidal em contato com o gel durante 72 horas. Em seguida, os géis foram lavados com agua ultrapura, digitalizados e analisados utilizando o *software* *ImageMaster platinum*, versão 7.0 para se obter número de *spots* e *matching*, (Moraes et al., 2012; Braga et al., 2015).

Análise de Fe por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS)

Para determinação do ferro, os *spots* proteicos recortados dos géis foram transferidos para tubos de digestão de 5 mL, sendo adicionado a cada frasco alíquotas de 500 µL de ácido sulfúrico concentrado ultrapuro e 100 µL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de frascos foi colocado em bloco digestor até a completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram avolumados para 5 mL com água ultrapura (18,2 MΩ cm^{-1}) (adaptado de Moraes et al., 2012).

Para determinação do ferro no abdômen, foram separados 15 abdomens de abelhas nutrizes, por tratamento; esses abdômenes foram macerados com auxilio de um

pistilo e almofariz até obter mistura homogênea. Dessa mistura foram pesadas triplicatas com cerca de 100 mg das amostras, adicionando 3 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio e as amostras digeridas por 30 minutos em forno de micro-ondas. Após a digestão, estas foram avolumadas em balões volumétricos de 10 mL com água ultrapura (18,2 MΩ cm^{-1}).

Para a construção das curvas analíticas, soluções padrão de ferro em meio de H_2SO_4 0,10 mol L^{-1} foram preparadas a partir da diluição dos padrões Titrisol contendo 1000 mol L^{-1} dos analíticos. As faixas ótimas de concentração das curvas analíticas foram as sugeridas no manual do equipamento. Para cada curva analítica foi preparado um branco. As condições operacionais utilizadas para as determinações de Fe por FAAS foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (Cookbook, Shimadzu AA – 6800, 2000).

Digestão tríptica dos spots proteicos para identificação por ESI MS/MS

Os *spots* foram recortados dos géis em segmentos de aproximadamente 1 mm^3, transferidas para tubos de 2,0 mL contendo 200 μL de ácido acético 5% e armazenados a -4°C até o passo seguinte. Posteriormente, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes em uma solução descorante contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 25 mM por 30 min. Posteriormente, os mesmos foram desidratados duas vezes em ACN 100% por 10 min. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente.

Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos à redução com DTT 20 mM em AmBic 50 mM incubados por 40 min a 56ºC. O excesso de líquido foi removido e substituído por IAA 55 mM em AmBic 50 mM. Após 30 min no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AmBic 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados em 15 μL de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, EUA) em AmBic 25 mM por 15 min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionou-se 50 μL de AmBic 25 mM para total cobertura dos *spots*

e incubou-se a 37°C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v).

Os peptídeos foram separados em partículas da acrilamida com duas lavagens de 15 min com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 min com solução de eluição B (metanol 60 % v/v e ácido fórmico 1 % v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação em banho (Ultracleaner 1600A, Unique, Brasil) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em temperatura ambiente, por 6-8 h e armazenada a -20°C até a realização do sequenciamento (Shevchenko et al., 2006).

Identificação das proteínas por ESI MS/MS

As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando Plataforma LCMS em espectrômetro de massa com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA). Os dados obtidos para sequência de proteínas foram processados pelo banco de dados teórico *Uniprot* (www.uniprot.org).

A análise de bioinformática foi realizada por meio do programa Blast2GO, sendo as sequências dos peptídeos trípticos de cada proteína digeridas e utilizadas para analisar a função expressada pelas proteínas junto ao banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Conesa et al., 2005).

Análise dos resultados

Os resultados foram avaliados por ANOVA, seguida do teste de Tukey para verificar diferenças entre as médias ($P<0,05$) (Zar, 2010).

Resultados

No mês de agosto observou-se aumento significativo no extrato proteico da GR em todos os enxames alimentados no tratamento T50Fe e T100Fe, em comparação com o T0Fe e T25Fe. Para os meses de junho e julho não foram observadas diferenças significativas (Tabela 1).

Com relação aos tratamentos, observou-se aumento significativo no extrato proteico da geleia real para o tratamento T50Fe no mês de agosto, em comparação com os demais meses. Para os outros tratamentos não foram observadas diferenças ao longo dos meses (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração de proteina total (g L^{-1}) obtida nos *pellets* dos extratos de geleia real coletadas nos meses de junho, julho e agosto de 2016. T0Fe (sem adição de Fe), Tratamento T25Fe (25 mg L^{-1}Fe), Tratamento T50Fe (50 mg L^{-1}Fe) e Tratamento T100Fe (100 mg L^{-1}Fe).

Concentração de proteina total (g L^{-1})				
Médias	**Junho**	**Julho**	**Agosto**	**Média geral**
T0Fe	15,6±1,5 A a	25,7±1,5 A a	18,4±1,5 A a	19,9±1,3 A
T25Fe	18,3±1,5 A a	20,3±1,5 A a	23,1±1,5 AB a	20,6±1,3 A
T50Fe	20,2±1,5 A a	19,9±1,5 A a	28,7±1,5 B b	22,9±1,3 A
T100Fe	21,1±1,5 A a	20,4±1,5 A a	21,8±1,5 AB a	21,1±1,3 A
Média geral	18,8±1,0 a	21,6±1,0 a	22,9±1,0 a	----------

Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os meses para o mesmo tratamento (P<0,05).
Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos para o mesmo mês (P<0,05).

Com relação ao número de *spots* proteicos, observou-se redução significativa nos meses de julho e agosto, em comparação com o mês de junho, para o tratamento controle (Tabela 2). Observou-se aumento significativa no número de *spots* no mês de agosto para os enxames alimentados com 50 mg L^{-1} Fe, em comparação com os demais meses. Houve redução significativa no mês de julho para os enxames alimentados com 25 e 50 mg L^{-1} Fe (Tabela 2).

No mês de junho, observa-se redução significativa no número de *spots* no tratamento T25Fe, em relação aos demais tratamentos; no mês de julho redução

significativa no tratamento T0Fe em relação aos demais tratamentos. Para o mês de agosto não foram observadas diferenças significativas entre o número de *spots* nos diferentes tratamentos, exceto para o tratamento T50Fe que diferiu dos demais, apresentando numero de spots significativamente maior (Tabela 2).

Tabela 2: Número médio de *spots* proteicos da geleia real coletada nos meses de junho, julho e agosto de 2016. T0Fe (sem adição de Fe), Tratamento T25Fe (25mg L^{-1} Fe), Tratamento T50Fe (50mg L^{-1} Fe) e Tratamento T100Fe (100mg L^{-1} Fe).

Número de *spots* proteicos na geleia real

Médias	Junho	Julho	Agosto	Média geral
T0Fe	127,0±1,4 A a	79,2±1,4 A b	80,2±2,4 A b	95,5±1,8 AC
T25Fe	90,2±1,4 B a	92,2±1,4 B a	85,7±1,4 A a	89,4±1,4 A
T50Fe	125,2±1,4 A a	94,7±1,4 B b	120,5±1,4 B a	113,5±1,4 B
T100Fe	109,0±1,4 C a	110,7±1,4 C a	84,5±1,4 A b	101,4±1,4 C
Média geral	112,8±1,6 a	94,2±1,6 b	92,7±2,0 b	----------

Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os meses para o mesmo tratamento (P<0,05).
Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os tratamentos para o mesmo mês (P<0,05).

Com relação à presença do mineral ferro nos *spots* proteicos dos diferentes tratamentos, observou-se que o tratamento T50Fe, apresentou maior número de *spots* proteicos contendo o mineral ferro (17), para o mês de junho. Nos meses de julho e agosto foram encontrados *spots* contendo o mineral ferro apenas nos tratamentos T100Fe e o T50Fe. O T100Fe apresentou numero de *spots* crescente ao longo dos meses, diferentemente do T50Fe, que apresentou numero de *spots* decrescente ao longo dos meses (Figura 1).

Observa-se a presença do mineral ferro no abdômen das abelhas para todos os tratamentos e meses analisados. Com destaque para o T100Fe que apresentou comportamento crescente ao longo dos meses. O T25Fe apresentou valores próximos ao T0Fe, e o T50Fe inicialmente com valores próximos do T100Fe, apresentou maior concentração de ferro no abdômen das abelhas (9,957 mg kg^{-1}) no mês de julho e uma baixa no mês de agosto (Figura 1).

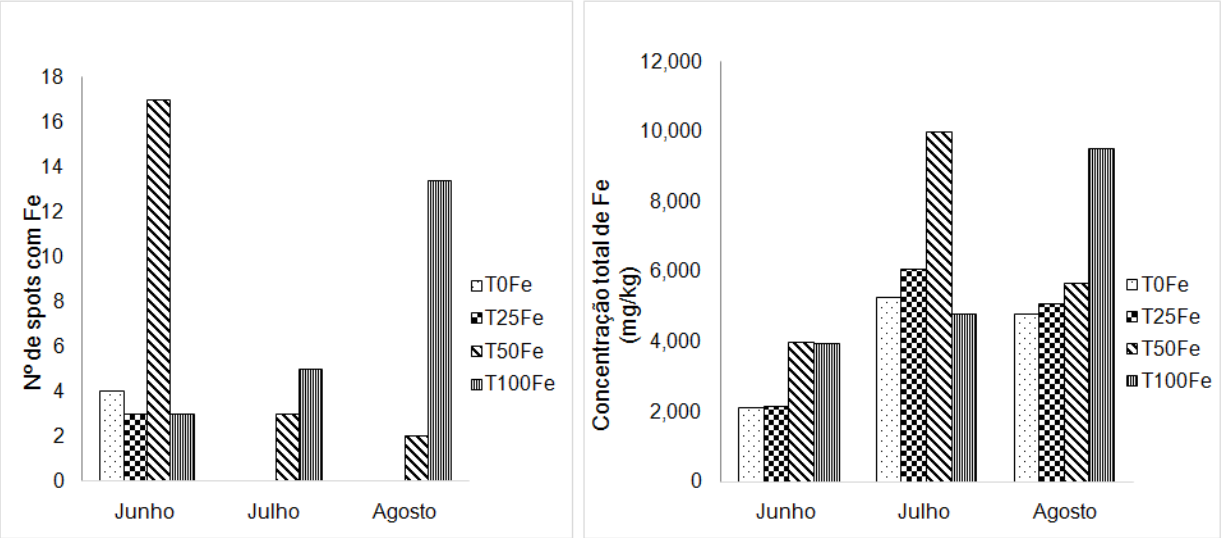


Figura 1: Numero de *spots* protéicos apresentando o mineral ferro na geleia real e concentração total de Fe (mg kg^{-1}) no abdômen de abelhas alimentadas com diferentes doses de ferro nos meses de Junho, Julho e Agosto.

Não houve diferença significativa na concentração do ferro presente no abdômen das abelhas nutrizes em todos os tratamentos no mês de junho. Entretanto, ao longo dos meses esse comportamento difere entre os tratamentos e entre os meses. No mês de julho, apenas o T50Fe difere dos demais, apresentando um aumento significativo na presença do ferro. O mesmo acontece para o T100Fe no mês de agosto. Em relação aos meses, observa-se aumento na concentração media desse mineral (Figura 1).

A alimentação das abelhas nutrizes com o mineral ferro também refletiu na expressão de proteínas importantes para manutenção de vida das abelhas (Figura 1 e 2).

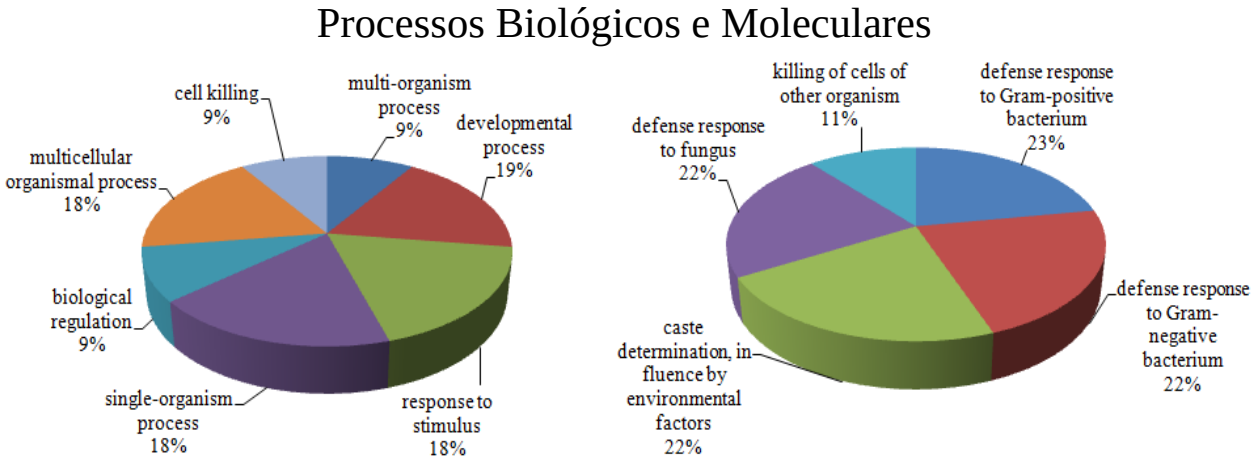


Figura 2: Proteínas analisadas consideradas componentes extracelulares da geleia real. A análise de processos biológicos e molecular efetuada pelo programa "Blast2Go" mostrou as proteínas *Major royal jelly protein 1 Major royal jelly protein 8.*

Os diferentes níveis de ferro no xarope, interferiram diretamente na expressão de proteinas. O tratamento T50Fe e T100Fe influenciaram na expressão do maior número de *spots* proteicos comparados com o controle. O T25Fe influenciou apenas em 4 *spots*, enquanto o T100Fe e T50Fe respectivamente expressou 10 e 12 *spots* contento diferentes proteínas do grupo MRJPs (Tabela 3 anexo).

Discussão

Observou-se que a composição da geleia real produzida por abelhas *A. mellifera* alimentadas com xarope suplementado com fonte de ferro inorgânico variou nos meses e tratamentos estudados; este fato sugere que suplementação com o mineral modulou o estado nutricional e fisiológico das abelhas operárias (fase de nutriz), evidenciado no teor proteico e numero *spots* proteicos obtido na geleia real.

Na natureza, as necessidades de minerais das abelhas são supridas pela colheita de recursos florais, como o néctar e pólen, com concentrações que podem variar dependendo da região e variabilidade vegetal presente nas proximidades do apiário, com concentrações entre 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 apícola (Zhang et al., 2015).

Neste estudo, verificou-se que a suplementação dietética de ferro aumentou de forma significativa o teor proteico e o número de *spots* na geleia real no mês de julho,

para todos os tratamentos analisados. Ao avaliarmos os *spots* proteicos que possuíam o ferro, tanto o controle quanto os tratamentos apresentaram este mineral no mês de junho. Por outro lado, para os meses de julho e agosto, apenas os tratamentos com 50 e 100 mg L^{-1} Fe apresentaram *spots* contendo o ferro, sugerindo que a suplementação apresentou efeito positivo na nutrição dos enxames, uma vez que não foram identificados *spots* contendo este mineral para controle nestes meses avaliados.

Entretanto, o número de *spots* foi menor ao final do experimento para todos os tratamentos analisados. Uma explicação para tal fato poderia ser a maior disponibilidade deste mineral na dieta das abelhas, ocorrendo seu deslocamento para os trofócitos presentes no corpo gorduroso do abdômen. Os grânulos ricos em ferro são importantes por auxiliar as abelhas na orientação em relação ao eixo magnético da Terra, o qual é importante para a orientação durante o forrageamento (Manning, 2016). Este fato foi evidenciado neste estudo, pois com o aumento de ferro na dieta, ocorreu aumento na concentração deste mineral no abdômen das abelhas nutrizes. A quantidade de ferro disponível para absorção pelo intestino depende da quantidade de ferro na dieta e da sua biodisponibilidade (Anderson et al., 1990).

Embora a recomendação de ferro seja de 50 mg L^{-1} (Herbert e Shimanuki, 1979), observa-se aqui que a suplementação com 100mg L^{-1} promoveu maior numero de *spots* contendo ferro, bem como maior concentração de ferro no abdômen, sugerindo melhor distribuição deste mineral no corpo das abelhas. Alem disso, não foi observado nenhum efeito tóxico deste mineral e não ocorreu a perda de nenhum enxame experimental.

Verificou-se, ainda, que todos os *spots* onde foram encontrados o ferro, pertencem ao grupo de proteínas denominadas Major Royal Jelly Protein (MRJPs), que se caracterizam por possuírem padrão de aminoácidos com 68% contendo pelo menos uma cisteína e 65% contendo pelo menos uma histidina, sendo estes aminoácidos responsáveis por formar um sítio de ligação aos metais (Schmitzova et al., 1998). A variação no número de *spots* obtidos também pode ser explicada pela presença de isoformas de proteínas do grupo principal (Major Royal Jelly Proteins – MRJPs), que ocorrem naturalmente, sendo resultado de processos como fosforilação, acetilação e glicosilação (Yu et al., 2010).

Dentre essas proteínas, pode-se destacar a MRJP1 e MRJP8, importantes na defesa do organismo contra fungos; determinação de castas, regulação de processos biológicos, dentre outros, processos estes importantes para o desenvolvimento das abelhas.

A MRJP1 está envolvida na diferenciação de larvas em rainhas, por meio de um mecanismo de sinalização mediada por Egfr (receptor de Fator de Crescimento Epidérmico). Promove o aumento do tamanho do corpo ao ativar a p70 S6 quinase, estimula o desenvolvimento dos ovários, por atuar na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose (Carvalheira et al., 2002), aumentando o título de vitelogenina (principal proteína de reprodução dos insetos, com provável influência sobre o sistema imunológico) e hormônio juvenil (diretamente ligado na diferenciação de casta e características morfológicas externas da abelha), sendo que seu nível em fase de desenvolvimento larval que determina as características das fêmeas das abelhas (Hartfelder et al., 2006; UniProt, 2017).

Desta forma, a maior disponibilidade de ferro na dieta aumenta a expressão deste grupo de proteínas, auxiliando de forma direta no melhor equilibro orgânico das abelhas.

Conclusão

Diante dos resultados, pode-se concluir que a suplementação mineral com ferro inorgânico influenciou a ligação deste metal as proteínas da geleia real, aumentando a expressão de proteínas envolvidas em processos biológicas e moleculares. Além disso, também influenciou sua presença no abdômen de abelhas nutrizes. Diante dos resultados, recomenda-se a suplementação com a concentração de 100mg L^{-1} de Ferro na dieta no período da entressafra.

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.

Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294.

Carvalheira, 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.

CAPÍTULO III

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 proteinas associadas com um determinado mineral, neste caso, o ferro (Fe), importantes para o funcionamento celular normal.

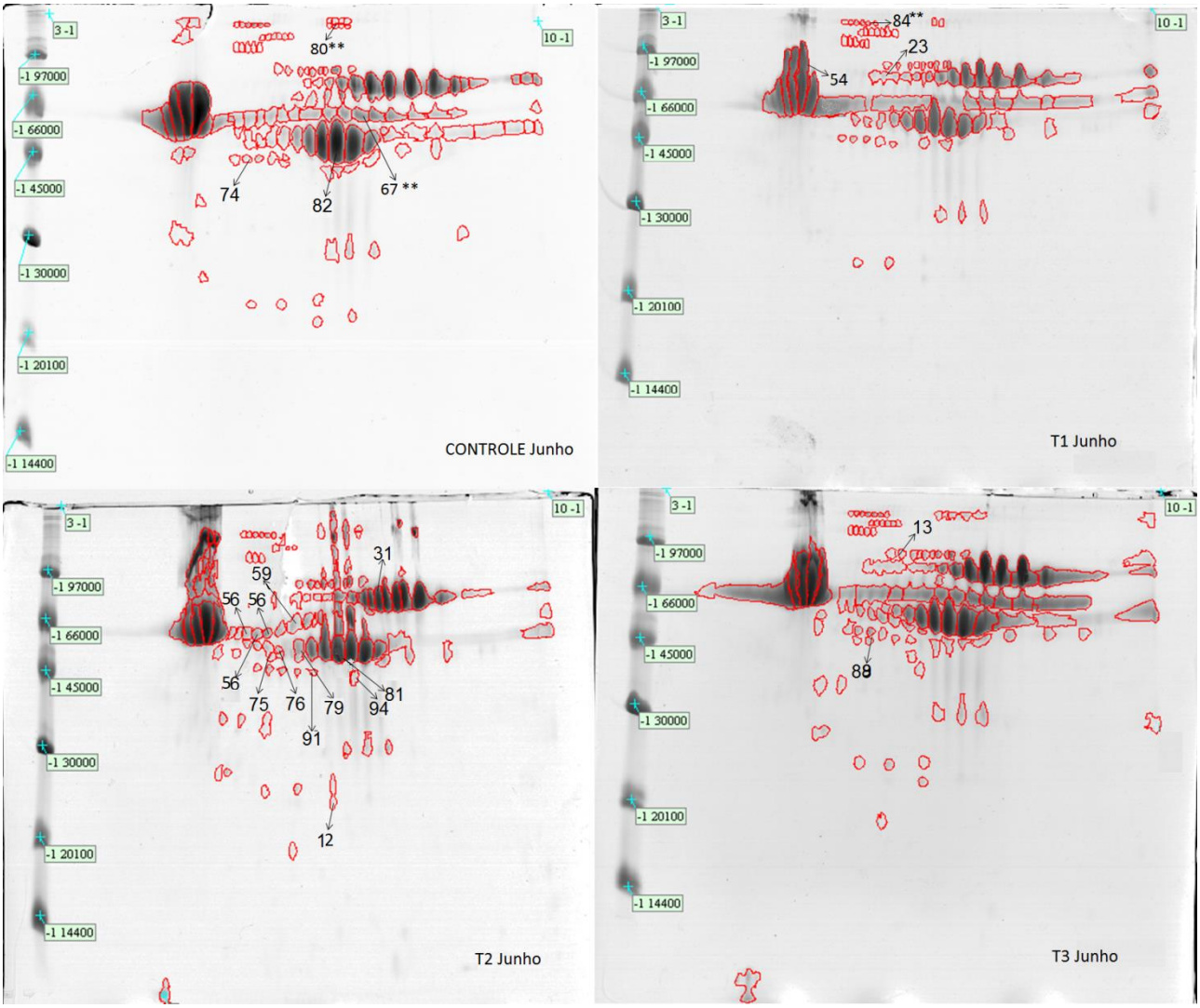
Neste estudo verificou-se que durante o período de entressafra (onde se destaca a baixa em pastos apícolas) o mineral Fe é muito importante para nutrição das abelhas *Apis mellifera*, melhorando a qualidade mineral da geleia real e sua expressão no número de *spots* proteicos. Sendo assim, espera-se 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.

ANEXOS

1. Géis dos tratamentos Controle, T1, T2 e T3 para os meses analisados

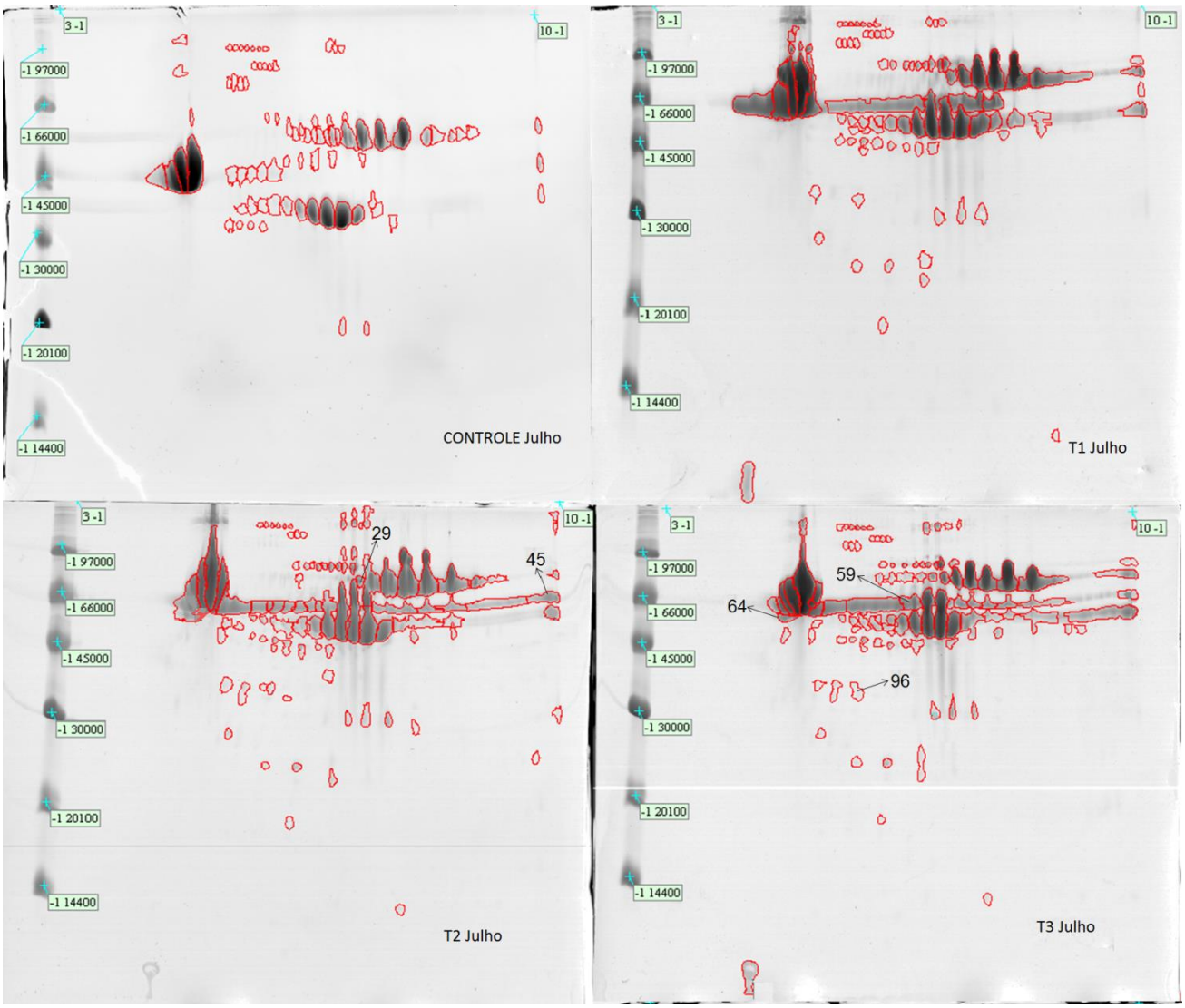
Tratamento Controle: sem suplementação do mineral Ferro;
Tratamento T1: Suplementação com 25mg L^{-1} Fe diluído em xarope de açúcar;
Tratamento T2: Suplementação com 50mg L^{-1} Fe diluído em xarope de açúcar;
Tratamento T3: Suplementação com 100mg L^{-1} Fe diluído em xarope de açúcar.

a) Junho



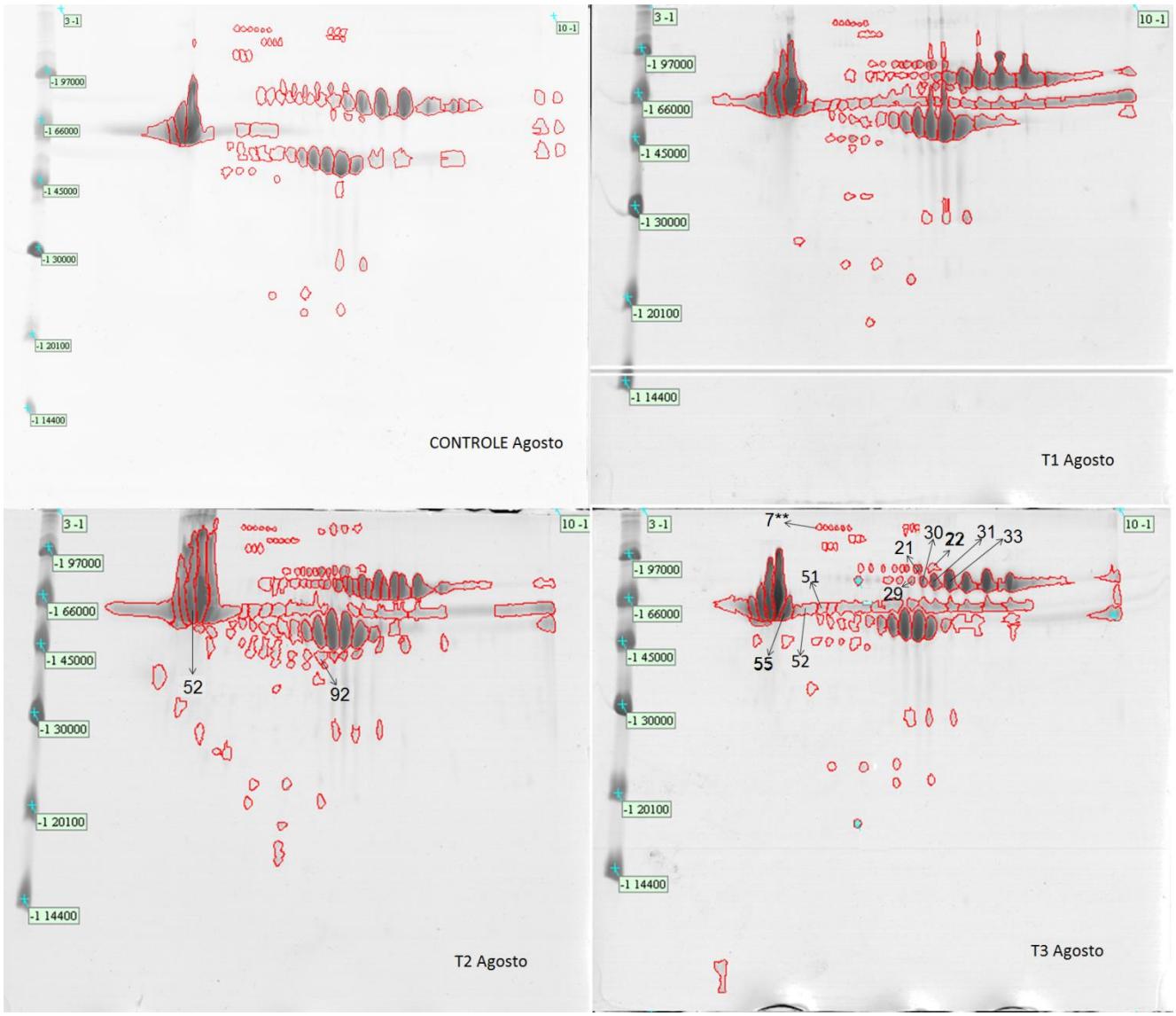
Fotos dos géis de poliacrilamida 12,5%, contendo os *spots* proteicos da geleia real. Os *spots* que apresentam Ferro (Fe) estão identificados com um número.

b) Julho

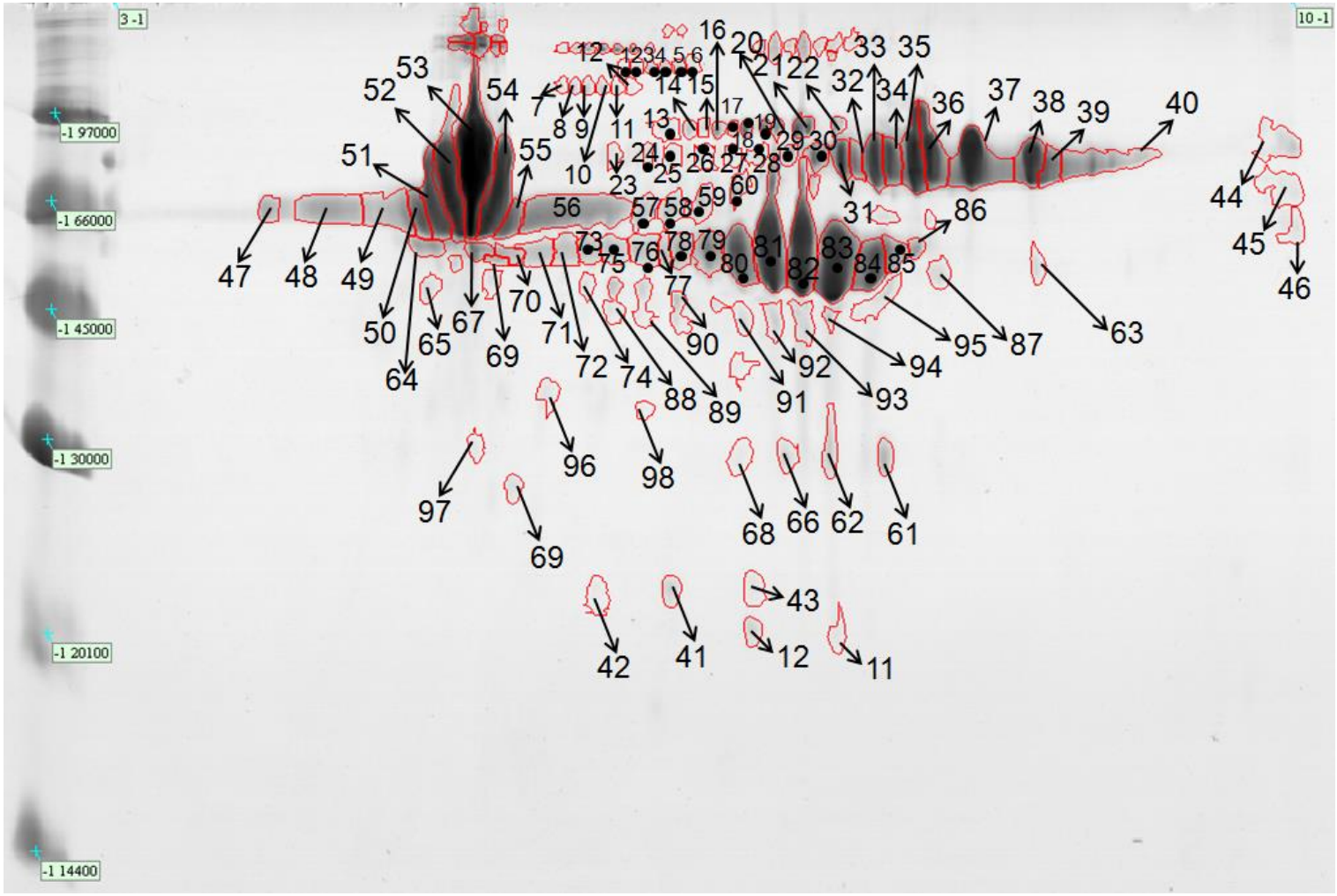


Fotos dos géis de poliacrilamida 12,5%, contendo os *spots* proteicos da geleia real. Os *spots* que apresentam Ferro (Fe) estão identificados com um número.

c) Agosto



Fotos dos géis de poliacrilamida 12,5%, contendo os *spots* proteicos da geleia real. Os *spots* que apresentam Ferro (Fe) estão identificados com um número.



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”.

Tabela 3. Identificação dos *spots* proteicos que apresentaram diferença de expressão (ANOVA; $p < 0.05$) na geléia real de abelhas nutrizes alimentadas com 25 mg L^{-1}Fe (T25Fe), 50 mg L^{-1}Fe (T50Fe) e 100 mg L^{-1}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.

Proteinas do grupo Major Royal Jelly Proteins (MRJPs)								
Spot ID	Diferenca de expressao 25mg	Diferenca de expressao 50mg	Diferenca de expressao 100mg	Score	**pI/MM theoretical (kDa)**	**pI/MM of *spot***	Coverage (%)	Molecular function
Major royal jelly protein 1 (MRJP1_APIME**)**								
2	Ø	+	Ø	1250.186	5.10/ 48.886	6.11/119.402	33.56	Caste determination. influence by environmental factors; defense response to fungus; defense response to Gram-negative bacterium; defense response to Gram-positive bacterium; killing of cells of other organism.
18	Ø	+1.94812	Ø	456.5145		6.74/90.140	2.55	
29	Ø	Ø	+1.52058	251.91		7.01/80.257	19.91	
30	Ø	+120024	+1.55906	501.6089		7.19/79.768	5.56	
31	+1.22142	Ø	+1.22369	491.475		7.32/79.282	9.95	
40	+1.99982	Ø	Ø	431.7213		8.83/77.842	14.35	
51	Ø	+1.47294	+1.85887	31827.8		4.81/62.877	87.5	
55	Ø	+1.85756	Ø	28404.01		5.37/61.669	86.81	
57	-2.55231	Ø	-1.47789	18367.16		6.15/63.182	82.18	
60	Ø	Ø	+1.67512	1939.648		6.70/69.307	57.64	
72	Ø	Ø	+1.64625	5635.091		5.68/54.895	47.45	
78	+1.8773	Ø	Ø	609.1385		6.39/55.700	33.56	
79	Ø	+3.1334	Ø	390.1548		6.51/54.895	35.88	
88	Ø	+1.99606	Ø	791.8389		5.96/45.219	22.92	
90	Ø	Ø	-1.7777	4240.72		6.33/45.438	44.91	
91	Ø	+	Ø	1000.618		6.73/44.040	14.58	

96	Ø	+	Ø	1105.396		5.59/34.739	27.08	
97	Ø	Ø	+	520.2998		5.15/29.405	5.79	
Major royal jelly protein 2 (MRJP2_APIME**)**								
2	Ø	+	Ø	772.3647		6.11/119.402	28.76	
12	Ø	+1.2178	+1.17586	5634.004		6.79/20.158	27.65	
18	Ø	+1.94812	Ø	232.9604		6.74/90.140	9.29	
29	Ø	Ø	+1.52058	1145.331		7.01/80.257	31.19	
30	Ø	+120024	+1.55906	1316.419		7.19/79.768	28.32	
31	+1.22142	Ø	+1.22369	1654.335		7.32/79.282	33.41	
40	+1.99982	Ø	Ø	923.2422		8.83/77.842	2.43	
51	Ø	+1.47294	+1.85887	565.1975		4.81/62.877	28.76	
55	Ø	+1.85756	Ø	452.3523		5.37/61.669	34.29	May play an important role in honeybee nutrition. It is found in the royal jelly which is the food of the queen honey bee larva. The royal jelly determines the development of the young larvae and is responsible for the high reproductive ability of the honeybee queen.
57	-2.55231	Ø	-1.47789	1263.83		6.15/63.182	32.74	
60	Ø	Ø	+1.67512	340.8711	6.83/ 51.074	6.70/69.307	5.53	
72	Ø	Ø	+1.64625	8203.482		5.68/54.895	50	
78	+1.8773	Ø	Ø	19879.68		6.39/55.700	73.23	
79	Ø	+3.1334	Ø	29195.79		6.51/54.895	82.96	
81	Ø	+1.9963	Ø	35123.59		6.89/55.162	80.97	
83	Ø	-1.18911	Ø	24688.01		7.28/53.064	87.17	
88	Ø	+1.99606	Ø	2878.376		5.96/45.219	51.77	
90	Ø	Ø	-1.7777	2511.513		6.33/45.438	36.95	
91	Ø	+	Ø	7088.205		6.73/44.040	40.49	
96	Ø	+	Ø	453.9771		5.59/34.739	3.1	
97	Ø	Ø	+	462.7139		5.15/29.405	3.1	
Major royal jelly protein 3 (MRJP3_APIME**)**								
2	Ø	+	Ø	217.0687	6.47/ 61.662	6.11/119.402	2.02	May play an important role in honeybee nutrition. It is found in the royal jelly which is the food of the queen
12	Ø	+1.2178	+1.17586	53.5031		6.79/20.158	5.33	

18	Ø	+1.94812	Ø	226.6308		6.74/90.140	15.44	honey bee larva. The royal jelly determines the development of the young larvae and is responsible for the high reproductive ability of the honeybee queen.
29	Ø	Ø	+1.52058	3600.925		7.01/80.257	40.99	
30	Ø	+120024	+1.55906	5111.236		7.19/79.768	43.57	
31	+1.22142	Ø	+1.22369	14304.13		7.32/79.282	53.49	
40	+1.99982	Ø	Ø	7073.305		8.83/77.842	56.43	
51	Ø	+1.47294	+1.85887	338.8433		4.81/62.877	35.29	
55	Ø	+1.85756	Ø	447.538		5.37/61.669	24.82	
57	-2.55231	Ø	-1.47789	5068.479		6.15/63.182	44.3	
60	Ø	Ø	+1.67512	3044.792		6.70/69.307	23.35	
72	Ø	Ø	+1.64625	3453.177		5.68/54.895	29.6	
78	+1.8773	Ø	Ø	5033.249		6.39/55.700	46.14	
79	Ø	+3.1334	Ø	3839.867		6.51/54.895	39.89	
81	Ø	+1.9963	Ø	1748.998		6.89/55.162	15.07	
83	Ø	-1.18911	Ø	965.265		7.28/53.064	11.21	
88	Ø	+1.99606	Ø	2705.881		5.96/45.219	38.42	
90	Ø	Ø	-1.7777	2298.726		6.33/45.438	31.8	
91	Ø	+	Ø	995.7019		6.73/44.040	12.13	
Major royal jelly protein 5 (MRJP5_APIME**)**								
2	Ø	+	Ø	323.7334		6.11/119.402	3.18	May play an important role in honeybee nutrition. It is found in the royal jelly which is the food of the queen honey bee larva. The royal jelly determines the development of the young larvae and is responsible for the high reproductive ability of the honeybee queen.
18	Ø	+1.94812	Ø	1378.618		6.74/90.140	24.08	
29	Ø	Ø	+1.52058	241.4208		7.01/80.257	10.37	
30	Ø	+120024	+1.55906	454.4326		7.19/79.768	6.69	
31	+1.22142	Ø	+1.22369	479.9936	5.95/ 70.236	7.32/79.282	21.07	
40	+1.99982	Ø	Ø	680.1434		8.83/77.842	1.84	
51	Ø	+1.47294	+1.85887	2764.774		4.81/62.877	19.9	
55	Ø	+1.85756	Ø	2833.157		5.37/61.669	4.85	
57	-2.55231	Ø	-1.47789	2258.642		6.15/63.182	4.85	
60	Ø	Ø	+1.67512	1121.026		6.70/69.307	5.35	

72	Ø	Ø	+1.64625	1311.2		5.68/54.895	4.85	
78	+1.8773	Ø	Ø	439.6962		6.39/55.700	9.7	
79	Ø	+3.1334	Ø	353.3265		6.51/54.895	4.85	
88	Ø	+1.99606	Ø	488.6366		5.96/45.219	3.18	
90	Ø	Ø	-1.7777	1037.41		6.33/45.438	3.18	
91	Ø	+	Ø	680.5983		6.73/44.040	8.36	
96	Ø	+	Ø	387.703		5.59/34.739	1.84	
Major royal jelly protein 8 (Q6TGR0_APIME**)**								
18	Ø	+1.94812	Ø	83.9246		6.74/90.140	4.33	
30	Ø	+120024	+1.55906	125.507		7.19/79.768	1.44	
31	+1.22142	Ø	+1.22369	165.1709		7.32/79.282	1.44	
40	+1.99982	Ø	Ø	98.415		8.83/77.842	1.44	
57	-2.55231	Ø	-1.47789	157.2602	6.00 /46.956	6.15/63.182	1.44	–
60	Ø	Ø	+1.67512	64.9534		6.70/69.307	1.44	
72	Ø	Ø	+1.64625	167.3247		5.68/54.895	1.44	
78	+1.8773	Ø	Ø	195.6348		6.39/55.700	7.45	
88	Ø	+1.99606	Ø	115.0591		5.96/45.219	1.44	
90	Ø	Ø	-1.7777	150.0824		6.33/45.438	1.44	
Major royal jelly protein 9 (Q4ZJX1_APIME**)**								
72	Ø	Ø	+1.64625	104.178		5.68/54.895	1.65	
78	+1.8773	Ø	Ø	149.1095	8.70 /48.688	6.39/55.700	1.65	–
79	Ø	+3.1334	Ø	109.9423		6.51/54.895	1.65	
90	Ø	Ø	-1.7777	4.6604		6.33/45.438	1.65	
Major royal jelly protein (D3Y5T0_APIME**)**								
2	Ø	+	Ø	217.0687		6.11/119.402	2.02	
12	Ø	+1.2178	+1.17586	53.5031	6.65/ 61.645	6.79/20.158	5.33	–
18	Ø	+1.94812	Ø	226.6308		6.74/90.140	15.44	

29	Ø	Ø	+1.52058	3596.791	7.01/80.257	38.24
30	Ø	+120024	+1.55906	5111.236	7.19/79.768	43.57
31	+1.22142	Ø	+1.22369	14465.21	7.32/79.282	64.34
40	+1.99982	Ø	Ø	7073.305	8.83/77.842	56.43
51	Ø	+1.47294	+1.85887	338.8433	4.81/62.877	35.29
55	Ø	+1.85756	Ø	447.538	5.37/61.669	24.82
57	-2.55231	Ø	-1.47789	5068.479	6.15/63.182	44.3
60	Ø	Ø	+1.67512	3044.792	6.70/69.307	23.35
72	Ø	Ø	+1.64625	3453.177	5.68/54.895	29.6
78	+1.8773	Ø	Ø	5033.249	6.39/55.700	46.14
79	Ø	+3.1334	Ø	3839.867	6.51/54.895	39.89
81	Ø	+1.9963	Ø	1748.998	6.89/55.162	15.07
83	Ø	-1.18911	Ø	953.2056	7.28/53.064	7.72
88	Ø	+1.99606	Ø	2705.881	5.96/45.219	38.42
90	Ø	Ø	-1.7777	2298.726	6.33/45.438	31.8
91	Ø	+	Ø	995.7019	6.73/44.040	12.13