

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/04/2023

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

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

GABRIEL MORENO MARTINELI

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

BOTUCATU – SP

Abril - 2021

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

**SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO E INORGÂNICO NO
DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA HIPOFARINGEANA DE ABELHAS *Apis
mellifera* L**

GABRIEL MORENO MARTINELI
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Prof. Dr. Samir Moura Kadri

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

BOTUCATU – SP

Abril - 2021

M385s	Martineli, Gabriel Moreno Suplementação de zinco orgânico e inorgânico no desenvolvimento da glândula hipofaríngea de abelhas <i>Apis mellifera</i> L. / Gabriel Moreno Martineli. -- Botucatu, 2021 40 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi Coorientador: Samir Moura Kadri 1. Apicultura. 2. Nutrição. 3. Suplementação mineral com ênfase em zinco. 4. Ácinos. 5. Morfologia da glândula hipofaríngea de abelhas africanizadas. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Gabriel Moreno Martineli – nascido em 12 de julho de 1988, na cidade de Castanhal/PA, filho de Luiz Otávio Martineli e Terezinha Moreno Segundo Martineli. Passou toda a infância e adolescência nas cidades de Descalvado e Rio Claro. Aprovado nos cursos de Economia da UEM e UFSCar, Engenharia Agrícola na Unicamp e Zootecnia na Unesp em 2008. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, em março de 2009, onde foi bolsista de iniciação científica, realizou estágios e cursos nas áreas de nutrição e produção animal, incluindo 6 meses na Universidade de Auburn, em Auburn/AL nos Estados Unidos, formando-se em dezembro de 2013. Em agosto de 2014 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia da Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, atuando nas áreas de nutrição, produção e automação animal, além de ser um dos responsáveis pelo desenvolvimento e publicação de uma patente de invento, defendendo seu mestrado em fevereiro de 2017. Em janeiro de 2018 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia da Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, atuando nas áreas de nutrição e produção animal.

DEDICO

Primeiramente aos meus pais, Luiz Otávio Martineli e Terezinha Moreno Segundo Martineli, pela educação e pelos princípios, que me deram força para concluir o presente estudo, e mesmo com a distância, sempre apoiaram meu crescimento profissional e pessoal, dando todo apoio necessário.

Ao meu irmão, Tiago Moreno Martineli, pelo imenso estímulo e carinho que sempre me ofereceu, e apesar da distância e ausência em alguns momentos em que gostaria de estar os acompanhando, todo nosso esforço futuramente será recompensado para nossa família prosperar sempre mais.

Agradeço à minha namorada, Aimê de Almeida Longuini, que jamais me negou apoio, carinho e incentivo. Obrigado, amor da minha vida, por aguentar tantas crises de estresse e ansiedade. Sem você do meu lado esse trabalho não seria possível.

Aos meus Avós Lurdes Moreno, Doraci Moraes Martineli e Otávio Martineli pelos melhores anos de minha vida.

Aos meus cães, Shiva, Cindy, Gudula e Zulema, pois independente do dia, lá estavam elas, felizes da vida por me verem.

Muito obrigado por tudo, amo vocês.

AGRADEÇO

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

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

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

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

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

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

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

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

RESUMO GERAL

As abelhas *A. mellifera* possuem necessidades específicas de nutrientes para que possam desenvolver todo o seu potencial produtivo e reprodutivo, visando a sobrevivência e manutenção da colônia. Neste projeto avaliamos duas fontes de zinco (orgânico e inorgânico), em diferentes concentrações, na morfologia das glândulas hipofaringeanas de abelhas nutrizas de seis dias de idade. Foram utilizadas 28 colônias de abelhas *A. mellifera*, distribuídas aleatoriamente nos seguintes tratamentos (04 colmeias por tratamento): controle: xarope de açúcar sem suplementação de zinco; I25: xarope de açúcar suplementado com 25 ppm de Zn inorgânico; I50: xarope de açúcar suplementado com 50 ppm de Zn inorgânico; I75: xarope de açúcar suplementado com 75 ppm de Zn inorgânico; O25: xarope de açúcar suplementado com 25 ppm de Zn orgânico; O50: xarope de açúcar suplementado com 50 ppm de Zn orgânico; O75: xarope de açúcar suplementado com 75 ppm de Zn orgânico. A fonte de zinco inorgânico foi o sulfato de zinco monohidratado (37,4% de zinco) e a fonte orgânica de zinco metionina (16% de zinco), diluída em xarope de açúcar. Os níveis reais de zinco foram determinados por espectrometria de absorção atômica (FAAS). As abelhas *A. mellifera* recém-emergidas foram marcadas ao final de 30 dias de suplementação com caneta atóxica, na região pronoto e suas coletas para análise morfológica das glândulas hipofaringeanas foram realizadas aos 6 dias de idade em sua fase de nutriz, com exatamente 36 dias de experimento. Observou-se durante o experimento que a área média ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$) das glândulas hipofaringeanas das abelhas *A. mellifera* apresentou modulação positiva na área da glândula hipofaringeana (AGH) para os tratamentos suplementados com 50 e 75 ppm de zinco orgânico, com $11,60 \pm 1,1$ e $12,40 \pm 1,6$, respectivamente, quando comparado ao tratamento controle $9,78 \pm 3,7$. Quando os tratamentos suplementados com zinco foram comparados entre si isolando o tratamento controle, podemos observar que os tratamentos suplementados com zinco orgânico apresentam uma maior área média de ácinos ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$) do AGH em *A. mellifera* quando comparados com os tratamentos suplementados com zinco inorgânico, apresentando esses valores $7,25 \pm 1,0$, $8,57 \pm 1,1$, $9,18 \pm 1,4$, para I25, I50, I75 respectivamente e $7,51 \pm 1,0$, $11,60 \pm 1,1$, $12,40 \pm 1,6$, para O25, O50, O75 respectivamente. Observando o número médio de ácinos ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$) do AGH em *A. mellifera*, podemos concluir que não foram encontradas diferenças significativas.

Ácinos / abelhas / minerais / morfologia / nutrição

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Pinturas rupestres encontradas na Caverna de Remigia, em Ares de Maestre, província de Castellón, Espanha (4.500 anos).....	10
Figura 2. Castas da colônia de <i>Apis mellifera</i> . Rainha, Operária, e Zangão.....	11
Figura 3. (A) Representação da glândula hipofaringeana (GH) e sua localização na cabeça da abelha. (B) Corte histológico da glândula, com destaque pontilhado no ácino. Corados com Hematoxilina e Eosina.....	15
Figura 4. Corte histológico da glândula hipofaringeana destacando o canal excretor e ácinos secretores	16

CAPÍTULO II

Figura 1. Fotomicrografias representativa das áreas dos ácinos das glândulas hipofaríngeanas de abelhas <i>Apis mellifera</i> . Controle (sem Zn), zinco inorgânico e zinco orgânico (25, 50 e 75 ppm). A cor preta representa a área dos ácinos das glândulas. Aumentada:10x.....	38
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Níveis reais de zinco determinados por espectrometria de absorção atômica (FAAS) 28

Tabela 2. Área e número médio dos ácinos nas glândulas hipofaríngeas ($\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-4}$). Fontes inorgânicas x orgânicas. Os valores representam as médias seguidas de seus desvios padrão. Controle (sem Zn), zinco inorgânico e zinco orgânico (25, 50 e 75 ppm). 37

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	9
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	10
1. As abelhas <i>Apis mellifera</i>	10
2. Exigências nutricionais de abelhas <i>Apis mellifera</i>	12
2.1. Mineral Zinco (Zn).....	14
3. Glândula mandibular de abelhas <i>Apis mellifera</i>	14
4. Referências Bibliográficas	17
CAPÍTULO II.....	24
Abstract	25
1. Introduction	26
2. Materials and Methods	28
Treatments.....	28
Collection and storage of bees.....	29
Histological analysis.....	29
Morphometry of hypopharyngeal glands.....	30
3. Results	30
4. Discussion.....	31
5. References	33
CAPÍTULO III	39
Implicações.....	40

Organic and inorganic zinc supplementation in the development of hypopharyngeal glands of the *Apis mellifera* honeybee

Gabriel M. Martineli¹; Aimê A. Longuini¹; Daniel C. B. de Barros¹; Marcelo P. Camilli¹;
Samir M. Kadri¹; Luis A. Justulin²; Ricardo O. Orsi^{1*}

¹Center of Education, Science and Technology in Rational Beekeeping (NECTAR), College of Veterinary Medicine and Animal Sciences, UNESP – São Paulo State University, São Paulo, Botucatu, Brazil.

²Department of structural and functional Biology, morphology sector, UNESP - São Paulo State University, São Paulo, Botucatu, Brazil.

*Corresponding author: Ricardo de Oliveira Orsi, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus Botucatu Distrito de Rubião Junior s/n Caixa Postal 560, CEP: 18618-970. Tel.: +55 (14) 3880-2946, e-mail: ricardo.orsi@unesp.br.

Short title: Effect of zinc on hypopharyngeal glands in *Apis mellifera*

Abstract

In this project we evaluated two sources of zinc (organic and inorganic), in different concentrations, in the morphology of the hypopharyngeal glands, of six-day old nurse bees. For this, 28 beehives were used randomly distributed into following seven treatments: Control: no zinc supplementation and zinc organic or inorganic sources treatments (25, 50 and 75 ppm). The source of inorganic zinc was the zinc sulphate monohydrate (37.4% zinc) and organic source zinc methionine (16% zinc), diluted in sugar syrup. The morphology of glands collected from six-day-old nurse bees from each group was analyzed after sectioning them and visualizing the sections under a microscope. The results were compared by ANOVA followed by Tukey test ($P < 0.05$). It was observed that the treatments supplemented with organic zinc 50

and 75 ppm modulated positively the hypopharyngeal gland area (HPG) in comparison to all other treatments and control. The organic source zinc shows better results in the HPG development in comparison the inorganic source. Regarding the average acini number in the gland, no significant differences were found in all treatments. It was concluded that organic zinc supplementation positively modulates the average acini area in concentrations above 50 ppm.

Acini /bees/mineral/morphology/nutrition

1. INTRODUCTION

Honey bees *A. mellifera* have specific nutrient needs so that they can develop their full productive and reproductive potential, aiming at colony survival and maintenance (Haydak, 1970; Crailsheim, 1992; Ahmed et al., 2020). Honey bees *A. mellifera* collect and store food in the form of honey (nectar) and “bee bread” (pollen stored in combs), in order to reserve enough food to meet nutritional larvae requirements (Haydak, 1970; Crailsheim, 1992; Lamontagne-Drolet et. al., 2019). In times of scarcity of nectar and pollen, many beekeepers lose part of their colonies due to the decrease in population, due to the lack of food resources; thus, the understanding of nutrients that complement the nutritional deficiencies of bees becomes a fundamental tool to increase and maintenance their population (Hendriksma 2016; Wright; Nicolson; Shafir, 2018).

Although the feeding of honey bees *A. mellifera* is focused on energy and protein foods, other nutrients such as vitamins and minerals are essential for the development of colonies (Haydak 1970; Eyer 2016; Omar et al. 2017). Zinc is one of the main protectors of the immune system, participates in 300 enzyme systems, involved in the anabolism and catabolism of many nutrients, such as proteins, carbohydrates and nucleic acids, and collaborates in the production

of deoxyribonucleic (DNA) and ribonucleic acids (RNA) with the formation of so-called zinc fingers, which allows adhesion between proteins and acids for good regulation and gene expression (Haragushi, 2004; Faa et al., 2008).

The source in which the mineral is offered can interfere with its bioavailability; minerals linked to organic molecules, called chelates, have advantages over the inorganic form, with better absorption and reduced competition for binding sites with other minerals (Chand et al., 2020). Therefore, the knowledge of factors that can affect the development of royal jelly producing glands is extremely important, assisting in dietary supplementation strategies and a better understanding of how management practices can affect honey bees.

The hypopharyngeal glands are located exclusively in the heads of the workers, and are part of the system of glands attached to the digestive tract, with opening in the oral region (Snodgrass, 1956; Deseyn and Billen, 2005). Therefore, they are considered as belonging to the salivary system or as salivary glands, which also comprises the labial and mandibular glands of adults (Snodgrass, 1956; Deseyn and Billen, 2005; Rahman et al., 2014). The development of glands in honey bees *A. mellifera*, reach their maximum size and weight when honey bees *A. mellifera* are between five and eight days old (nursing stage) (Snodgrass, 1956; Deseyn and Billen, 2005; Renzi et al., 2016).

The secretory cells of the hypopharyngeal gland produce enzymes that metabolize the nutrients released by the digestion of pollen; it also secretes part of the components of royal jelly, a protein-based substance, with a complex composition of sugars, water, proteins, cholesterol, amino acids and vitamins, responsible for the differentiation of varieties and also used in the feeding of young larvae and queens (Maghsoudlou et al., 2019; Dobritsch et al., 2019; Xun et al., 2020). Deseyn and Billen (2005) found that the amount of royal jelly secreted is directly related to the size of the glands, showing that well-developed glands produce more royal jelly.

50 ppm in the diet of *A. mellifera*, positively modulates the area of the hypopharyngeal gland.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), process 2018/00511-9.

This study was financed in party by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – “Finance Code 001”

AUTHORS CONTRIBUTION

All authors have contributed equally to the work.

CONFLICT OF INTEREST

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

REFERENCES

Ahmed, Z. H., Tawfik, A. I., Abdel-Rahman, M. F., Moustafa, A. M. (2020) Nutritional Value and Physiological Effects of Some Proteinaceous Diets on Honey Bee Workers (*Apis mellifera*). Bee World, 97(1), 26-31.

Akhavan-Salamat, H., Ghasemi, H. A. (2019) Effect of different sources and contents of zinc on growth performance, carcass characteristics, humoral immunity and antioxidant status of broiler chickens exposed to high environmental temperatures. Livestock science, 223, 76-83.

Bovi, T. D. S., Caeiro, A., dos Santos, S. A. A., Zaluski, R., Shinohara, A. J., Lima, G. P. P., Orsi, R. O. (2020). Seasonal variation of flavonoid content in bee bread: Potential impact on hypopharyngeal gland development in *Apis mellifera* honey bees. Journal of Apicultural Research, 59(2), 170-177.

Brodschneider, R., Crailsheim, K. (2010) Nutrition and health in honey bees.

Apidologie, 41, 278–294.

Carrillo, M.P., Kadri, S.M., Veiga, N., Orsi, R.O. (2015) Energetic feedings influence beeswax production by *Apis mellifera* honeybees. *Acta Scientiarum*, 37(1).

Chand, N., Khan, R. U., Shah, M., Naz, S., Tinelli, A. (2020) Zinc source modulates zootechnical characteristics, intestinal features, humoral response, and paraoxonase (PON1) activity in broilers. *Tropical Animal Health and Production*, 52(2), 511-515.

Crailsheim, K., Schneider, L. H. W., Brassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R. & Schöffmann, B. (1992) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *Journal of insect Physiology*, 38(6), 409-419.

De Grande, A., Leleu, S., Delezie, E., Rapp, C., De Smet, S., Goossens, E., Ducatelle, R. (2020). Dietary zinc source impacts intestinal morphology and oxidative stress in young broilers. *Poultry Science*, 99(1), 441-453.

Dekani, L., Johari, S. A., Joo, H. S. (2019). Comparative toxicity of organic, inorganic and nanoparticulate zinc following dietary exposure to common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of The Total Environment*, 656, 1191-1198.

Deseyn, J., Billen, J. (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 36, 49-57.

Dobritsch, D., Aumer, D., Fuszard, M., Erler, S., Buttstedt, A. (2019). The rise and fall of major royal jelly proteins during a honeybee (*Apis mellifera*) workers' life. *Ecology and Evolution*, 9(15), 8771-8782.

Eşanu, D., Pop, I. M., Simeanu, D. (2018) The Influence of Some Supplementary Feeds on Food Consumption and BodyWeight of Caged Honeybees. *Animal Science*, 51(1).

Eyer, M., Neumann, P., Dietemann, V. (2016) A look into the cell: honey storage in

honey bees, *Apis mellifera*. PloS one, 11(8).

Faa, G.; Nurchi, V.M.; Ravarino, A.; Fanni, D.; NEmolato, S.; Gerosa, C.; Eyken, P. V.; Geboes, K. (2008) Zinc in gastrointestinal and liver disease. Coordination Chemistry Reviews, 252, 1257-1269.

Haragushi, H. (2004) Metallomics as integrated biometal science. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 19(1), 5-14.

Haydak, M. H. (1970) Honeybee nutrition. Annual Review Entomology, 15, 143-156.

Hendriksma, H. P., Shafir, S. (2016) Honey bee foragers balance colony nutritional deficiencies. Behavioral ecology and sociobiology, 17, 70-509.

Kazemi, E., Sourinejad, I., Ghaedi, A., Johari, S. A., Ghasemi, Z. (2020) Effect of different dietary zinc sources (mineral, nanoparticulate, and organic) on quantitative and qualitative semen attributes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 515, 734529.

Kohshahi, A. J., Sourinejad, I., Sarkheil, M., Johari, S. A. (2019). Dietary cosupplementation with curcumin and different selenium sources (nanoparticulate, organic, and inorganic selenium): influence on growth performance, body composition, immune responses, and glutathione peroxidase activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish physiology and biochemistry, 45(2), 793-804.

Lamontagne-Drolet, M., Samson-Robert, O., Giovenazzo, P. Fournier, V. (2019) The Impacts of Two Protein Supplements on Commercial Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies. Journal of Apicultural Research, 58(5), 800-813.

Maghsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mohebodini, H., Toldra, F. (2019). Royal jelly: Chemistry, storage and bioactivities. Journal of Apicultural Science, 63(1), 1-24.

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

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

Rahman, S., Thangkhiew, I., Hajong, S. R. (2014) Hypopharyngeal gland activity in task-specific workers under brood and broodless conditions in *Apis cerana indica*. *Journal of Apicultural Science*, 58, 61–70.

Renzi, M. T., Rodríguez-Gasol, N., Medrzycki, P., Porrini, C., Martini, A., Burgio, G., Maini, S., Sgolastra, F. (2016) Combined effect of pollen quality and thiamethoxan on hypopharyngeal gland development and protein content in *Apis mellifera*. *Apidologie*, 47, 779–788.

Snodgrass, Robert E. (1956) *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press.

Wright, G. A., Nicolson, S. W., Shafir, S. (2018) *Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees*. *Annual Review of Entomology*, 63.

Xun, L., Huang, X., Li, Q., Yang, S., Wang, Y. (2020) Effects of different bee pollens on expression of major royal jelly protein genes and yield, quality and composition of royal jelly of *Apis mellifera*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 32(2), 856–869.

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

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

Zhang, Y. (2015). Why do we study animal toxins? *Zoological research*, 36(4), 183.