

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 19/05/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA NUTRIÇÃO NO PERFIL METALOPROTEÔMICO DA GELEIA
REAL PRODUZIDA POR ABELHAS *Apis mellifera* L.**

ADRIANA FAVA NEGRÃO

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

BOTUCATU – SP

Maio – 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA NUTRIÇÃO NO PERFIL METALOPROTEÔMICO DA GELEIA
REAL PRODUZIDA POR ABELHAS *Apis mellifera* L.**

ADRIANA FAVA NEGRÃO

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

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

BOTUCATU – SP

Maio – 2017

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

N385e Negrão, Adriana Fava, 1988-
 Efeito da nutrição no perfil metaloproteômico da
 geleia real produzida por abelhas *Apis mellifera* L. /
 Adriana Fava Negrão. - Botucatu : [s.n.], 2017
 vii, 62 f. : fots. color., grafs. color., tabs.

 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botu-
 catu - 2017

 Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
 Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha
 Inclui bibliografia

 1. Abelha - Criação. 2. Minerais. 3. Metaloprotei-
 nas. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Padilha, Pedro
 de Magalhães. III. Universidade Estadual Paulista "Jú-
 lio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade
 de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

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

Dedico

Ao meu avô, Durval (in memoriam), pelo amor que recebi desde sempre. Por me fazer querer sempre ser uma pessoa melhor. Onde estiver espero que se orgulhe de mim, como me orgulho de ser sua neta. Saudades enormes Durvalina.

Aos meus pais, Maria Amália e Antonio Carlos, por serem as pessoas mais maravilhosas da minha vida. Por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Por terem me incentivado a perseguir todos os meus sonhos fazendo sacrifícios para que eu os alcançasse. Pessoas por quem eu faço o meu melhor para que sempre tenham orgulho de mim. Amo-os incondicionalmente.

A minha irmã, Alíne, pelo companheirismo, carinho e amizade que só fizeram aumentar ao longo das nossas vidas. Mesmo os chlíques são momentos que irei apreciar sempre... (depois de passar é claro!!!)

A minha tia, Eliza por sempre estar ao meu lado, desde quando saí de casa para buscar meus objetivos, e ao meu primo/irmão mais novo Lucas por me ensinar um amor tão enorme e maternal. Você ilumina minha vida de muitas maneiras Lukeete.

Aos meus padrinhos, Cida e Jorge, e meus primos Danilo e Marcelo, por todo carinho recebido durante todos os momentos da minha vida. Obrigada por me apoiarem em mais esta jornada. Adoro vocês.

Agradeço

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.

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

Ao meu orientador e amigo, Professor Doutor Ricardo de Oliveira Orsi, por ter me mostrado o mundo da apicultura, e me despertado a paixão pelas abelhas. Por ter me dado à oportunidade de ser sua orientada, de ter confiado e apostado em mim. Por todos os ensinamentos, pela dedicação e paciência. Obrigado por me ajudar a crescer tanto pessoalmente, como profissionalmente.

Ao professor Pedro Padilha, por ter aceitado ser meu co-orientador e aberto as portas de seu laboratório para realização da minha pesquisa.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ, Seila e Ellen, e ao secretário do Departamento de Produção Animal, Renato, pelos serviços prestados.

Ao pessoal do laboratório de química do IB, José, Camila, João, Bruna, Vânia Alís, pelas conversas e ajuda prestada para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do NECTAR, Thaís, Marcela, Melina, Cíntia, Edson, Samir e Rodrigo, e aos novos integrantes Alex, Wellington, Roney, e Daniel pelo companheirismo, atenção, ajuda e descontração.

A todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram nesta pesquisa e contribuíram para a conclusão deste Doutorado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	01
Considerações iniciais	02
1. As Abelhas <i>Apis mellifera</i> L.	02
1.1. Histórico da apicultura no Brasil	02
1.2. Castas	04
1.3. Importância do pólen para as abelhas <i>Apis mellifera</i> L.	05
2. A geleia real	06
3. Propriedades funcionais da geleia real.....	08
4. Proteômica	09
5. Metalômica	10
6. As metaloproteínas e proteínas ligadas a metais	11
Referências Bibliográficas	13
CAPÍTULO II	20
Resumo	21
Abstract	22
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	24
2.1. Origem das amostras	24
2.2. Coleta de geleia real	25
2.3.Extração e precipitação das proteínas da geleia real.....	25
2.4.Separações eletroforéticas das frações proteicas.....	26
2.5. Análise de Zn e Fe por espectrometria de absorção atômica com chama	27
2.6. Digestão trípica dos spots proteicos para identificação por ESI MS/MS	27
2.7. Identificação das proteínas por ESI MS/MS	28

2.8. Análise de Resultados	29
3. Resultados	29
4. Discussão	32
5. Referências	32
CAPÍTULO III	40
Implicações	41
ANEXO I	42
ANEXO II	56

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Concentração de proteína total (g L^{-1}) obtida nos extratos proteicos de geleia real coletada ao longo do ano; média total de spots proteicos por gel; % de match entre géis e número de spots encontrados contendo zinco, ferro ou ambos. Os dados representam a média seguida dos respectivos desvios-padrão.	29
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Número total de spots analisados com presença de zinco, ferro ou ambos (zinco/ferro).	30
Figura 2. Gráfico de participação em processos biológicos das MRJPs analisadas pelo Blast2Go	32

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. As abelhas *Apis mellifera* L.

1.1. Histórico da apicultura no Brasil

Acredita-se que as abelhas surgiram há cerca de 30 milhões de anos, e que este fato esteja intimamente ligado à evolução das plantas angiospermas (Pirani e Cortopassi-Laurino, 1993; Tautz, 2010). Durante o desenvolvimento da vida na terra haviam insetos, semelhantes às vespas atuais, que visitavam as flores para coletar néctar, sua principal fonte de energia, e caçavam pequenos animais para suprir sua necessidade de proteínas. Quando algumas destas vespas substituíram a proteína animal de sua dieta pela proteína vegetal, isto é, passaram a consumir pólen, também iniciaram uma história de vida própria. Dessas vespas originaram-se as abelhas (Pirani e Cortopassi-Laurino, 1993).

As abelhas *Apis mellifera* L. originaram-se no continente africano e, migraram para a Ásia e Europa diferenciando-se em pelo menos duas dúzias de subespécies fisiologicamente, comportamentalmente e morfológicamente distintas (Parker et al., 2010). Ao longo destas áreas, elas ocuparam os mais variados ambientes, como desertos, florestas tropicais, altas montanhas, savanas, dentre outros (Smith, 1961).

Devido ao processo da expansão territorial europeia e a colonização das novas terras descobertas, o Padre Antônio Carneiro trouxe para o estado do Rio de Janeiro (em 1839), proveniente da cidade de Porto em Portugal, as primeiras abelhas europeias da subespécie *Apis mellifera*. Imigrantes alemães, entre os anos de 1870 e 1880, trouxeram para o Rio Grande do Sul as abelhas *Apis mellifera ligustica*. Outras subespécies também foram trazidas por imigrantes europeus, disseminando-se, assim, as abelhas *Apis mellifera* L. por todo território brasileiro (Wiese, 2005).

Em meados de 1950, a produção nacional de mel era muito baixa (cerca de 4 a 6 mil toneladas/ano), a maioria dos equipamentos apícolas eram importados (centrifugas, decantadores, mesas desoperculadoras etc.) e o associativismo era praticamente inexistente (De Paula, 2008). Esta baixa produtividade apícola no Brasil causou um descontentamento, pois não era um fato condizente com o tamanho do país e com suas

características tropicais, propícias à exploração da apicultura e esta situação chamou a atenção de algumas autoridades brasileiras. (Kerr, 1967).

Devido ao interesse do governo brasileiro em mudar a situação da apicultura nacional, o Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr dirigiu-se a África, trazendo e introduzindo em 1956, na cidade de Rio Claro no estado de São Paulo, as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* (Gonçalves, 2006). Mas em 1957, 26 enxames, com suas respectivas rainhas africanas, escaparam e se estabeleceram como colônias selvagens. Iniciou-se então uma rápida expansão das abelhas *Apis mellifera scutellata* por todo o Brasil realizando um inter cruzamento com as varias subespécies europeias aqui existentes originando um descendente polihíbrido, denominado abelha africanizada, tendo predominância das características das abelhas africanas (De Jong, 1996; Gonçalves, 2006).

As abelhas africanizadas rapidamente se espalharam pelas Américas, colonizando inicialmente o Brasil, seguindo por quase toda a América do Sul, exceto as regiões abaixo do paralelo 35° na Argentina, onde o limite foi provavelmente imposto pelas baixas temperaturas de inverno encontradas nesta região (Sheppard et al., 1999). Ao Oeste, sua expansão foi limitada pela presença da Cordilheira dos Andes, que impediu a passagem dos enxames em razão das baixas temperaturas. Segundo Del Lama et al. (2004), devido as Cordilheiras, o Chile é o único país da América do Sul que não apresenta abelhas africanizadas em seu território até os dias de hoje.

A América Central foi rapidamente colonizada, mesmo com as tentativas de se criar barreiras que impedissem o avanço dos enxames na região do Panamá. Atualmente, ocupam grande parte ou totalidade dos Estados do Texas, Califórnia, Arizona, Novo México e Nevada, no Sul dos Estados Unidos (Alice Pinto et al., 2007).

O surgimento das abelhas africanizadas no Brasil e as suas consequências para a vida dos produtores apícolas, comerciantes e pesquisadores, causaram grande modificação no cenário apícola brasileiro, uma vez que este novo híbrido apresentou desempenho superior as abelhas europeias no continente, pois além da alta capacidade de produção, essa nova abelha apresentou importantes características como rápida adaptação, desenvolvimento populacional, rusticidade, resistência a doenças, prolificidade, eficiência na polinização e maior capacidade de identificação de fonte de

alimento, o que causou uma marco divisório na história da apicultura brasileira (Couto e Couto, 2006; Nogueira-Couto e Couto, 2006).

1.2. Castas

As abelhas *Apis mellifera* L. são insetos sociais que vivem em colônias organizadas onde os indivíduos se dividem em três castas, possuindo funções bem definidas que são executadas visando sempre à sobrevivência e manutenção do enxame. A abelha rainha (fêmea fértil) tem a função de manter a coesão do enxame através da liberação de feromônios, a cópula com o zangão durante o vôo nupcial e a postura diária de milhares de ovos, garantindo o nascimento de novos indivíduos. O zangão (macho fértil) é responsável pela fecundação da abelha rainha durante o vôo nupcial.

A manutenção dos trabalhos da colmeia é realizada pelas abelhas operárias (fêmeas inférteis), que dividem as tarefas de acordo com sua idade fisiológica. Do 1º ao 3º dia de vidas, realizam a limpeza de quaisquer sujidades existentes na colônia. Do 4º ao 12º dia, cuidam da nutrição das larvas, produzem geleia real alimentando a rainha e providenciam a criação de novas rainhas, caso seja necessário. Do 13º ao 18º dia são responsáveis pela produção de cera e construção dos favos. Do 19º ao 20º dia ficam de guarda no alvado defendendo seu território contra qualquer invasão. E, finalmente, do 21º dia em diante as abelhas operárias fazem os serviços externos no campo, coletando néctar, pólen, resinas e água, os quais são recursos de manutenção dos enxames e tornam-se produtos importantes para a produção apícola (Wiese, 2005). Destes, o pólen e o néctar constituem a maior parte da atividade de forrageamento das abelhas campeiras, exceto em períodos de estresse por calor em que a coleta de água pode ser muito mais intensiva (Johnson, 2010).

Atualmente, além do mel, outros produtos também podem ser obtidos por meio da exploração racional apícola, como a própolis, o pólen, a geleia real, a cera e a apitoxina. Além de fornecerem os produtos citados, as abelhas ainda contribuem ao meio ambiente com seus serviços de polinização. Ao forragear as plantas em busca de alimento (pólen e néctar), as abelhas operárias campeiras promovem a reprodução cruzada dos vegetais, aumentando o vigor das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e melhorando a produção de frutos e sementes (Couto e Couto, 2006). De acordo com Ricketts et al., (2008) em torno de 75% das

espécies vegetais existentes são dependentes de agentes polinizadores (água, vento, animais, etc.), no entanto, as abelhas são responsáveis por polinizar cerca de 73% de todas as espécies vegetais cultivadas no mundo.

1.3. Importância do pólen para as abelhas *Apis mellifera* L.

As abelhas *Apis mellifera*, tanto na fase larval quanto na adulta, possuem necessidades específicas de nutrientes para que possam desenvolver todo o seu potencial produtivo e reprodutivo. Em épocas de escassez de néctar e pólen, é comum os apicultores perderem seus enxames que, enfraquecidos em razão da falta de alimento na região, migram à procura de maior oferta de alimento (Marchini et al., 2006).

As operárias adultas são dependentes dos estoques de alimentos na colônia (pólen e mel), e não sobrevivem a longos períodos sem alimentação, uma vez que não possuem quantidades consideráveis de reservas lipídicas, carboidratos e proteínas em seus corpos (Hrassnigg and Crailsheim, 2005). Quando existe a necessidade de fontes de energia (por exemplo, antes do forrageamento), as operárias consomem os açúcares presente no mel estocado ou por meio da trofalaxia (troca de substâncias entre operárias através de regurgitação) (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

Já o pólen representa a principal fonte de proteínas, gordura (lipídeos), vitaminas e minerais e possui funções fundamentais no desenvolvimento adequado das crias e nutrição de abelhas jovens, no funcionamento das glândulas e ovários e formação das gorduras corporais, além de servir como fonte de nitrogênio (Schäfer et al., 2006; Brodschneider e Crailsheim, 2010). O 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 (Estevinho et al., 2011; Silveira, 2012). Além disto, alguns minerais são considerados macronutrientes essenciais como o cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre; e como micronutrientes essenciais o cobre, cobalto, ferro, iodo, manganês, selênio e zinco (Brodschneider e Crailsheim, 2010), sendo necessários às abelhas, e também obtidos do pólen. Embora o pólen coletado pelas abelhas apresente minerais em sua composição, em determinadas épocas do ano, em função da disponibilidade de recursos florais ao entorno do apiário, este teor pode encontrar-se reduzido, afetando o desenvolvimento da colmeia (Marchini et al., 2006; Modro et al., 2007).

O pólen que é coletado por abelhas forrageiras e transportado em suas patas traseiras, em estruturas chamadas de corbículas, e estocada nos alvéolos da colmeia, recebendo adição de néctar e secreções salivares, sendo então denominado “pão de abelhas” (De Grandi-Hoffman et al., 2013).

Segundo Funari et al. (1998) e Somerville (2005), a deficiência de proteínas e outros nutrientes 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 bromatológica das pupas, diminuindo os níveis de proteínas brutas e sais minerais em até 8,4 e 38,5%, respectivamente.

Além disso, os teores proteicos presente 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 um nível adequado de proteínas e aminoácidos necessários para completar o seu crescimento e desenvolvimento glandular. Da mesma forma, se as abelhas operárias jovens não consomem quantidade ideal de proteínas, suas glândulas hipofaríngeas (responsáveis pela produção de geleia real) não se desenvolvem completamente e o fornecimento deste alimento para as larvas e abelha rainha pode ficar prejudicado (Standifer, 2003).

2. A Geleia Real

A geleia real é composta a partir de uma mistura de secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares (que compõem o sistema glandular cefálico), localizadas na cabeça das operárias de *A. mellifera* (Coelho et al., 2008). Estas secreções glandulares são produzidas pelas abelhas nutrizas entre o 5º e o 15º dia, possuindo características distintas, sendo que, a glândula mandibular secreta um componente branco leitoso e a hipofaríngea produz uma secreção de coloração clara e rica em proteínas (Zheng et al., 2010). De modo geral, a geleia real pode ser descrita como um creme branco-amarelado de aspecto leitoso, fortemente ácido, altamente nitrogenado e com odor e sabor característicos (Melliou e Chinou, 2005; Liu et al., 2008).

A importância da geleia real para as abelhas se dá uma vez que esta é utilizada na alimentação das larvas de operárias de até 3 dias após sua eclosão e de zangões

durante toda sua fase larval, e especialmente na alimentação da rainha durante todas as fases (larval e adulta). Desse modo a dieta larval possui uma importante função no polifenismo da abelha *A. mellifera*, sendo importante para a diferenciação das castas e pelas características exclusivas da rainha como o aumento da massa corporal, longevidade e desenvolvimento de estruturas relacionadas à reprodução (Ohashi et al., 1999; Evans e Wheeler, 2001).

A glândula hipofaringeana inicia seu pico de desenvolvimento a partir do 6º dia de vida da operária, sendo que a atividade e a taxa de síntese de proteínas na secreção desta glândula variam de acordo com a idade da operária, tendo maior atividade entre o 10º e o 12º dias de idade (Naiem et al., 1999). Após esse período, sua atividade e volume decrescem rapidamente, passando a secretar enzimas como a invertase quando as abelhas tornam-se campeiras (Deseyn e Billen, 2005).

Segundo Qu et al., 2008, a composição da geleia real varia com a idade e subespécie das abelhas nutrizas, bem como o tipo de alimento consumido e a condição sazonal, sendo então encontrados vários compostos como água (50-70%), proteínas (9-18%), carboidratos (7-18%), lipídios (3-8%, principalmente o 10-hidroxi-2-decenoico), sais minerais (0,8-3%, sendo encontrados em ordem decrescente : K, Ca, Na, Mg, Zn, Fe, Cu e Mn) e vitaminas (principalmente tiamina, niacina, e riboflavina) (Ramadan e Al-Ghamdi, 2012).

Entre as proteínas destacam-se as hidrossolúveis (Water Soluble Proteins - **WSP**). As WSP melhor caracterizadas são denominadas de principais proteínas da geleia real (Major Royal Jelly Proteins - **MRJPs**). Estas proteínas representam 82% do total das proteínas hidrossolúveis e cerca de 90% do total de proteínas da geleia real (Schmitzova et al., 1998), com massa molecular relativa de 49 a 87kDa (Scarselli et al., 2005). Até o presente momento, foram identificadas nove proteínas das MRJPs em *A. mellifera* (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5, MRJP6, MRJP7, MRJP8, MRJP9), além de um polipeptídio incompleto, MRJP ψ , codificado por um pseudogene (Drapeau et al., 2006).

A MRJP1 é estimada a glicoproteína dominante da geleia real, representando 48% do total de proteínas solúveis (Simuth et al., 2004), e juntamente com a MRJP2, MRJP3 (que existe em cinco isoformas) e MRJP5 são consideradas as reservas biológicas de nitrogênio e aminoácido para o rápido desenvolvimento das abelhas.

Acredita-se que as MRJP6, 7, 8 e 9, não possuem funções nutricionais bem definidas, uma vez que não são exclusivamente encontradas neste alimento secretado (Biliková et al., 2002; Majtan et al., 2006).

3. Propriedades funcionais da geleia real

A geleia real é um dos produtos mais atraentes dentre os considerados alimentos naturais, sendo utilizada tanto na indústria de cosméticos como suplemento alimentar. Este produto tem demonstrado possuir várias propriedades funcionais tais como: atividade antibacteriana, anti-inflamatória, atividades vasodilatadoras e hipotensores, ação desinfetante, atividade antioxidante e atividade anti tumoral, sendo particularmente atribuída ao conteúdo lipídico e proteico com a presença do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) e das MRJPs (Ramadan e Al Ghamdi, 2012).

Recentemente o mecanismo da atividade antitumoral da geleia real foi atribuído à presença do 10-HDA, e ao seu efeito inibitório no fator de crescimento do endotélio vascular, induzindo a angiogênese e consequentemente bloqueando a proliferação e migração das células cancerígenas. Por outro lado verificou-se também que as MRJPs estimulam a regressão de tumores em ratos (Pavel, et al., 2011).

Nagai e Inoue (2004) investigaram as propriedades funcionais e antioxidantes do extrato aquoso e alcalino preparado a partir da geleia real fresca. Os rendimentos foram cerca de 8,3% e 6,3% numa base de peso seco, respectivamente. Os níveis totais de compostos fenólicos foram de 21,2 e 22,8 µg/mg de geleia real. As atividades antioxidantes, em ambos extratos, aumentaram dependendo da concentração da amostra, assim como as atividades de sequestro de radicais superóxidos. Isso demonstra que as frações de proteínas e compostos fenólicos na geleia real possuem alta atividade antioxidante e capacidade de eliminação contra espécies ativas de oxigênio.

A maioria dos efeitos imunomoduladores da geleia real têm sido atribuídas aos seus componentes proteicos, especialmente para a principal proteína MRJP3 (Fang, et al., 2010) e apalbumina 1 (Majtan, et al., 2006). A MRJP3 tem sido descrita como o componente dominante anti-inflamatório e imunossupressor da geleia real que promove a resposta antialérgica (Okamoto et al., 2003).

Apesar de não existirem dados oficiais sobre o mercado de geleia real o maior produtor e exportador deste produto é a China, seguindo a mais de 30 anos um trabalho

de melhoramento genético visando o aumento anual da produtividade em abelhas *Apis mellifera*. Na China a produção média de geleia real por colônia/ano é de 8 kg (ou 300 mg por cúpula a cada três dias). É estimada uma produção de duas mil toneladas por ano, o que representa mais de 60% da produção mundial e quase toda produção é exportada para Japão, Estados Unidos e União Europeia. Países como Coreia, Taiwan e Japão também são importantes produtores e exportadores. Outros locais do mundo como a Europa Oriental e o México nas Américas se destacam como grandes produtores (Sabatini, 2009; Faquinello, 2010).

4. Proteômica

Com a codificação do genoma humano, o qual consiste no conjunto de todos os genes, os cientistas voltaram suas pesquisas ao sequenciamento de proteínas. Uma pesquisa está diretamente ligada à outra, pois são as proteínas que carregam as mensagens dos genes para controlar as funções do organismo (Wilkins et al., 2013). Um dos grandes desafios do século 21, segundo *Walter Gilbert*, será codificar as proteínas que os genes produzem e suas funções biológicas exercidas ao longo da vida, viabilizando novas drogas e terapias (Kazmi e Krull, 2001).

O termo proteoma foi inicialmente usado por *Wilkins* e *Williams* em 1993, para descrever o complemento proteico total do genoma (Belizario, 2000). Segundo Lanças et al., (2003) o genoma de um organismo é essencialmente estático e o DNA, do qual pode ser extraído em princípios de uma única célula, contém toda informação. Em contraste, o proteoma observável de uma única célula, definido como a coleção de todas as proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico é dinâmico e dependente do estado da célula. Portanto, o proteoma não é estacionário, mas muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente. Uma vez que o proteoma muda mais que o genoma, é possível então se obter mais informação do organismo estudando-se o proteoma.

O proteoma é mais complexo que o genoma, não apenas devido ao número de proteínas mas também devido às inúmeras possibilidades de interações entre elas e a estrutura tridimensional que a mesma possui, indo interferir decisivamente no papel que ela realiza. Desse modo, o principal objetivo da ciência do proteoma é fazer uma análise abrangente e em alta escala das proteínas, a proteômica. Com área de atuação ampla, a

proteômica abrange identificação e quantificação de proteínas nas células, tecidos, fluidos biológicos, análises de mudança de expressão normal das proteínas verso a expressão em células doentes, caracterização de modificações pós-traducionais, estudo de interação entre proteínas, entre outras funções (Beranova-Giorgianni, 2003).

Diante disso análise de proteomas possui várias aplicações e a demanda de trabalhos nessa área tem crescido nos últimos anos (Góes e Oliveira, 2014).

5. Metalômica

A metalômica é um campo de pesquisa que deve estar relacionada com a genômica e a proteômica, pois a síntese e funções metabólicas dos genes e proteínas 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).

A metalômica tem como objetivos a verificação da distribuição das espécies metálicas e metalóides, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas, tais como as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais (Mounicou et al., 2009). Na metalômica, são definidos como “metalomas” os íons metálicos ou espécies metalóides presentes em um sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos), na forma livre ou complexado (Garcia et al., 2009).

Uma das mais importantes tecnologias analíticas para estabelecer a metalômica como ciência dos biometais é a especiação química para a identificação específica de metalomas bioativos, uma vez que a identificação dos metalomas e a elucidação de funções bioquímicas ou fisiológicas nos sistemas biológicos são alvos da metalômica (Garcia et al., 2009). O estudo do metaloma pode fornecer informações tais como: (a) elemento (espécie metálica ou metalóide) distribuído entre os compartimentos celulares de determinado tipo de célula; (b) seu meio de coordenação (qual biomolécula está incorporada ou a qual bioligante está complexada); (c) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes e (d) a estrutura da biomolécula (Garcia et al., 2009; Brandão et al., 2010).

A confirmação de uma proteína como metaloproteína e a identificação do metal intrínseco podem, juntamente com análise por bioinformática da sua sequência, fornecer pistas importantes da sua função e estrutura do sítio ativo (Shi e Chance, 2011).

6. As metaloproteínas e proteínas ligadas a metais

Os íons metálicos constituem uma pequena porção (4%) do tecido corporal dos seres vivos, contudo, possuem um papel muito importante como componente estrutural e em muitos processos vitais. Os principais papéis desses íons metálicos podem ser descritos como estrutural e funcional. No aspecto funcional, destaca-se o papel catalisador nos sistemas enzimáticos, por meio da ligação desses íons a substratos, e a mediação nas reações óxido-redução, através de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, destaca-se o papel como integrantes dos compostos orgânicos do corpo, tais como ferro na hemoglobina, iodo na tiroxina, cobalto na vitamina B12 e o enxofre na tiamina e biotina, atuando na estabilização dessas moléculas através da proteção de cargas negativas (Romanowski et al., 2001; Voet et al., 2002).

Os íons metálicos ligados às proteínas e as metaloproteínas representam uma grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas requerem a presença de um íon metálico para realizar atividade biológica (Romanowski et al., 2001; Garcia et al., 2006). Esses íons são responsáveis por muitos processos metabólicos, como conversão de energia na fotossíntese e respiração, expressão e regulação gênica, além de processos catalíticos, como ligação a um substrato e ativação do mesmo, transporte e armazenamento (Romanowski et al., 2001)

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas de metal ligante (do inglês metal-binding). A primeira constitui um grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. Já as proteínas ligadas a metais constituem um grupo de proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da ligação metal-proteína. Assim, essa ligação é facilmente quebrada (Romanowski et al., 2001; Voet et al., 2002). Fracamente ligados às proteínas estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio.

De intensidade moderada temos o magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais frequentemente estão os metais de transição, tais como o ferro, o cobre, o zinco, o manganês, o molibdênio e o cobalto. Estes, devido às suas propriedades (densidade, pequeno raio atômico e interação via eletromagnética e forças eletrostáticas) estão ligados à maioria das metaloproteínas (Arnesano et al.,2006).

O zinco ligado às proteínas participa no estabelecimento permanente e na modulação transitória das interações entre proteínas, exercendo funções catalíticas e inibitórias enzimáticas, arranjos e desarranjos de complexos de subunidades macromoleculares e formação de proteína/receptor complexo (Maret, 2004). Participa também na estabilização de membranas e interage com outros cátions bivalentes, sendo um composto que forma a maioria das metaloproteínas. Estas, por apresentar uma ligação estável com proteínas, necessita de um ou mais átomos de zinco para exercer funções catalíticas, co-catalíticas e estruturais. Devido à grande versatilidade de suas características físico-químicas, o zinco tornou-se um foco de investigação nos processos de controle da expressão gênica e outros mecanismos biológicos (Maret, 2010).

Já o ferro desempenha um papel vital em praticamente todos os organismos vivos. Entre os papéis significativos do ferro, estão o transporte, armazenamento e ativação de oxigênio molecular, redução de ribonucleotídeos, ativação e decomposição de peróxidos e de transporte de elétrons através de uma ampla variedade de transportadores, abrangendo um potencial redox de 1V essencialmente (Pierre et al., 2002).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram analisar o teor proteico; número de *spots* e identificar as proteínas da geleia real produzida por abelhas *Apis mellifera* L, assim como suas ligações aos elementos zinco (Zn) e ferro (Fe).

Esta pesquisa resultará no artigo intitulado **Estudo do perfil metaloproteômico do zinco e ferro na geleia real produzida por *Apis mellifera* L.**, o qual será submetido à revista *Insect Molecular Biology*, conforme as suas regras de publicação.

Referências Bibliográficas

ALICE PINTO, M.; SHEPPARD, W.S.; JOHNSTON, J.S.; RUBINK, W.L.; COULSON, R.N.; SCHIFF, N.M.; KANDEMIR, I.; PATTON, J.C. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) of African origin exist in non-africanized areas of the southern United States: evidence from mitochondrial DNA. **Annals of the Entomological Society of America**, v.100, p.289-295, 2007.

ARNESANO, F.; BANCI, L.; BERTINI, I.; CAPOZZI, F.; CIOFI-BAFFONI, S.; CIURLI, S.; LUCHINAT, C.; MANGANI, S.; ROSATO, A.; TURANO, P.; VIEZZOLI, M. S. An Italian contribution to structural genomics: understanding metalloproteins. **Coordination chemistry reviews**, v. 250, n. 11, p. 1419-1450, 2006.

BELIZÁRIO, J. E. Proteoma: o desafio tecnológico do século 21. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 27, n. 162, p. 78-81, 2000.

BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.

BILIKOVÁ, K.; HANES, J.; NORDHOFF, E.; SAENGER, W.; KLAUDINY, J.; ŠIMÚTH, J. Apisimin, a new serine–valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. **FEBS letters**, v. 528, n. 1, p. 125-129, 2002.

BRANDÃO, A. R.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **Journal of Proteomics**, v.73, p.1433-1440, 2010.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v.41, p.278-294, 2010.

COELHO, M. S.; DA SILVA, J. H. V.; OLIVEIRA, E. R.; ARAÚJO, J. A.; LIMA, M. R. Alimentos convencionais e alternativos para abelhas. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 1, 2008.

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

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.

DE GRANDI-HOFFMAN, G.; ECKHOLM, B.J.; HUANG, M.H. A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. **Apidologie**, v. 44, n.1, p.52-63, 2013.

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

DE PAULA, J. Mel do Brasil: as exportações brasileiras de mel no período de 2000/2006 e o papel do Sebrae. Brasília: **SEBRAE**, 2008.

DEL LAMA, M.A.; SOUZA, R.O.; DURAN, X.A.A.; SOARES, A.E.E. Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile. **Hereditas**, v.140, n.2, p.149-153, 2004.

DRAPEAU, M. D.; ALBERT, S.; KUCHARSKI, R.; PRUSKO, C.; MALESZKA, R. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Research**, v. 16, n. 11, p. 1385-1394, 2006.

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.

EVANS, J.D.; WHEELER, D.E. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. **Bioessays**, v. 23, n. 1, p. 62-68, 2001.

FAQUINELLO, P. Heterogeneidade de variâncias e interação genótipo-ambiente na avaliação genética em abelhas *Apis mellifera* africanizadas para produção de geleia real. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, p.77, 2010.

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.

GARCIA, J. S.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, M. A. 1 Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through 2 proteomic changes. **Metallomics**, v.1, p.107-113, 2009.

GÓES, A. C. D. S.; OLIVEIRA, B. V. X. D. The Human Genome Project: a portrait of scientific knowledge construction by the Ciência Hoje magazine. **Ciência & Educação (Bauru)**, v. 20, n. 3, p. 561-577, 2014.

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

HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 36, n. 2, p. 255-277, 2005.

JOHNSON, B. R. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 64, n. 3, p. 305-316, 2010.

KAZMI, S.; KRULL, I. S. Proteomics and the current state of separations science, part one. **PharmaGenomics August**, p. 14-29, 2001.

KERR, W.E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**. v.39, n.2, p.3-5, 1967.

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.

LIU, J. R.; YANG, Y. C.; SHI, L. S.; PENG, C. C. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 23, p. 11447-11452, 2008.

MAJTÁN, J.; KOVÁČOVÁ, E.; BÍLIKOVÁ, K.; ŠIMÚTH, J. The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1–major honeybee royal jelly protein–on TNF α release. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 269-278, 2006.

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) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MARET, W. Exploring the zinc proteome. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 1, p. 15-19, 2004.

MARET, W. Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. **Metallomics**, v. 2, n. 2, p. 117-125, 2010.

MELLIOU, E.; CHINOU, I. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 23, p. 8987-8992, 2005.

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

MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n.4, p.1119-1138, 2009.

NAGAI, T.; INOUE, R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. **Food chemistry**, v. 84, n. 2, p. 181-186, 2004.

NAIEM, E.S.; HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Nurse bees support the physiological development of young bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 169, n. 4-5, p. 271-279, 1999.

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.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3ª ed., Jaboticabal:FUNEP, p.194, 2006.

OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). **European Journal of Biochemistry**. v. 265, n. 1, p. 127-133, 1999.

OKAMOTO, I.; TANIGUCHI, Y.; KUNIKATA, T.; KOHNO, K.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. **Life sciences**, v. 73, n. 16, p. 2029-2045, 2003.

PARKER, R.; MELATHOPOULOS, A.P.; WHITE, R.; PERNAL, S.F.; GUARNA, M.M.; FOSTER, L.J. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. **PloS One**, v.5, n.6, p.1-12, 2010.

PAVEL, C. I.; MĂRGHITAȘ, L. A.; BOBIȘ, O.; DEZMIREAN, D. S.; ȘAPCALIU, A.; RADOI, I.; MĂDAȘ, M. N. Biological activities of royal jelly-review. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, n. 2, p. 108-118, 2011.

PIERRE, J. L.; FONTECAVE, M.; CRICHTON, R. R. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. **Biometals**, v. 15, n. 4, p. 341-346, 2002.

PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. 1.ed. São Paulo:Edusp/Fapesp, p.49, 1993.

QU, N., JIANG, J., SUN, L., LAI, C., SUN, L., WU, X. Proteomic characterization of royal jelly proteins in Chinese (*Apis cerana cerana*) and European (*Apis mellifera*) honeybees. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 6, p. 676-680, 2008.

RAMADAN, M. F.; AL-GHAMDI, A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 39-52, 2012.

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**, 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,O-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, v.24, p.592-598, 2001.

SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; CABONI, M. F.; BOGDANOV, S.; MURADIAN, L. B. A. Quality and standardisation of royal jelly. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2009.

SCARSELLI, R.; DONADIO, E.; GIUFFRIDA, M. G.; FORTUNATO, D.; CONTI, A.; BALESTRERI, E.; FELICOLI R.; PINZAUTI M.; SABATINI A.G. Towards royal jelly proteome. **Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 769-776, 2005.

SCHÄFER, M.O.; DIETEMANN, V.; PIRK, C.W.W.; NEUMANN, P.; CREWE, R.M.; HEPBURN, H.R.; TAUTZ, J.; CRAILSHEIM, K. Individual versus social pathway to honeybee worker reproduction (*Apis mellifera*): pollen or jelly as protein source for oogenesis. **Journal of Comparative Physiology**, v.192, p.761–768, 2006.

SCHMITZOVA J.; KLAUDINY J.; ALBERT S.; SCHRODER W.; SCHRECKENGOST W.; HANES J.; JUDOVA J.; SIMUTH J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 54, n. 9, p. 1020-1030, 1998.

SHEPHERD, A.J.; GORSE, D.; THORNTON, J.M. Prediction of the location and type of β -turn types in proteins using neural networks. **Protein Science**, v.8, n.5, p.1045-1055, 1999.

SHI, W; CHANCE, M.R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, n.1, p. 144-148, 2011.

SILVEIRA, T.A. Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental.

Dissertação Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.66, 2012.

ŠIMÚTH, J.; BÍLIKOVÁ, K.; KOVÁČOVÁ, E.; KUZMOVÁ, Z.; SCHRODER, W. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α release is a regular component of honey. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2154-2158, 2004.

SMITH, F. G. The races of honeybees in Africa. **Bee World**, v. 42, p. 255-260, 1961.

SOMERVILLE, D.C. **Fat bees, Skinny bees – a manual on honey bee nutrition for beekeepers**. Australian Government: Rural Industries Research and Development Corporation, p.150, 2005.

STANDIFER, L.N. Honey bee nutrition and supplemental feeding. **Agriculture Handbook**, 2003. Disponível em: <http://www.beesource.com/resources/usda/honey-bee-nutrition-and-supplemental-feeding/> Acesso em: 12/09/2016

TAUTZ, J. **O fenômeno das abelhas**. 1.ed. Porto Alegre: Atmed, p.288, 2010.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentals of biochemistry. Upgrade edition, John Wiley & Sons, Inc., p.931, 2002.

WIESE, H. **Apicultura Novos Tempos**, 2ª Ed. – Guaíba: Agrolivros, p.17, 2005.

WILKINS, M.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. **Proteome research: new frontiers in functional genomics**. Springer Science & Business Media, 2013.

YU, F.; MAO, F.; JIANKE, L. Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2207-2215, 2010.

ZHENG, H. Q.; HU, F. L.; DIETEMANN, V. Changes in composition of Royal jelly harvested at different times: consequences for quality Standards. **Apidologie**, 2010.