RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 28/04/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA NUTRIÇÃO E MANEJO DE COLHEITA DE APITOXINA NO DESENVOLVIMENTO DE GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS EM ABELHAS *Apis mellifera* L.

Thaís de Souza Bovi

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

BOTUCATU

Abril, 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA NUTRIÇÃO E MANEJO DE COLHEITA DE APITOXINA NO DESENVOLVIMENTO DE GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS EM ABELHAS *Apis mellifera* L.

Thaís de Souza Bovi

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof.Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS ANTONIO JUSTULIN JR.

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

BOTUCATU - SP

Abril, 2017

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

Bovi, Thaís de Souza, 1983-
B783e **Efeito da nutrição e manejo de colheita de apitoxina no desenvolvimento de glândulas hipofaringeanas em abelhas *Apis mellifera* L. / Thaís de Souza Bovi. – Botucatu : [s.n.], 2017**
xii, 63 f. : fots. color., ils., grafs. color., tabs.

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

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

1. Abelha - Criação. 2. Flavonoides. 3. Palinologia. 4. Geleia real. 5. Abelha – Veneno. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Justulin Junior, Luis Antonio. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio 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".

"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho
original" (Albert Einstein)

Dedico

À minha amada família pelo amor e educação recebidos desde o início de minha vida, por todo apoio e compreensão que me deram nesses anos de estudo. Sérgio, Sérgio Alexandre, Cleide, Gabriela, Juninho, Amanda, Fernando, Murillo e Davi amo vocês com todo meu coração.

Ao meu marido por ser meu alicerce de todos os dias e pela ajuda fundamental para a realização desta pesquisa.

Agradeço

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade de estudar em um curso de excelência.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (Número de Processo Fapesp 2013/25492-9.

Ao meu orientador e amigo, Professor Doutor Ricardo de Oliveira Orsi, por sua amizade, por ter me dado à oportunidade de ser sua orientada, por ter confiado e acreditado em mim, por todos os ensinamentos, pelo tempo a mim dedicado, atenção, incentivos e paciência. Muito obrigada pela dedicação e compreensão, por me ajudar crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao meu Co-Orientador Professor Doutor Luis Antônio Justulin Junior pela amizade, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, disponibilidade de uso de equipamentos e ensinamentos sobre morfologia.

A minha orientadora em Coimbra/Portugal (Universidade de Coimbra – Faculdade de Farmácia) Professora Maria da Graça Ribeiro Campos, pela generosidade em me receber mesmo estando em um momento difícil, pela oportunidade de trabalhar em seu

laboratório, disponibilidade do uso de equipamentos, ensinamentos sobre o pólen e elucidações sobre este trabalho.

Ao meu amigo e companheiro de laboratório em Coimbra, André Caeiro, por todos os ensinamentos, ajuda com os equipamentos e apoio em Portugal.

A todos os Professores da FMVZ/UNESP-Botucatu que participaram da minha formação durante a graduação e pós-graduação.

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

Aos funcionários do Departamento de Morfologia-Instituto de Biociências de Botucatu por todos os serviços prestados

Aos alunos do LabMec- Instituto de Biociências de Botucatu pela amizade, companheirismo e ajuda durante o trabalho com a morfologia das glândulas hipofaringeanas.

Aos amigos do Néctar pela amizade e companheirismo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram no acontecimento desta pesquisa e contribuíram para conclusão do doutorado.

"A vida das abelhas é como um poço mágico. Quanto mais se tira, mais há para tirar."

(Kar von Frisch).

SUMÁRIO

Resumo Geral..... xi

CAPÍTULO I - Considerações Iniciais..... 1

1. Abelhas *Apis mellifera*..... **2**

2. Glândulas hipofaringeanas..... **4**

3. Apitoxina..... **7**

4. Pólen..... **12**

4.1. Importância do pólen para as plantas e abelhas..... **12**

4.2. Composição química do pólen apícola..... **13**

4.3. Compostos Fenólicos..... **14**

Referências..... **17**

CAPÍTULO II – "Efeito da Sazonalidade no Desenvolvimento de Glândulas Hipofaringeanas em Abelhas *Apis mellifera* L."..... 23

Resumo..... **24**

1. Introdução..... **25**

2. Material e Métodos..... **26**

3. Resultados..... **29**

4. Discussão..... **36**

Referências..... **38**

CAPÍTULO III – "Apitoxin harvesting impairs hypopharyngeal gland structure in *Apis mellifera* L. honey bees"..... 42

Abstract..... **43**

1. Introduction..... **44**

2. Material and Methods..... **45**

3. Results..... **47**

4. Discussion..... **50**

Acknowledgements..... **52**

References..... **52**

CAPÍTULO IV - Implicações..... 56

ANEXO 1..... **58**

ÍNDICE DE FIGURAS
CAPÍTULO I

Figura 1: Pintura rupestre na Cova da Aranha, Valência – Espanha..... **2**

Figura 2: Castas da colônia de abelhas *Apis mellifera* L.: Rainha, Operária e Zangão..... **4**

Figura 3: Corte histológico de glândula hipofaringeana de abelhas *Apis mellifera* L..... **5**

Figura 4: Aparelho de Ferroar..... **8**

Figura 5: Grãos de polens observados em microscópio..... **12**

ÍNDICE DE FIGURAS
CAPÍTULO II

Figura 1. Número médio (1-A) e área média (μm2) (1-B) de ácinos das glândulas hipofaringeanas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas colhidas nos períodos do outono, inverno, primavera e verão. Os valores expressam as médias seguidas de seus desvios padrões. Letras diferentes nas barras indicam diferença estatística (P < 0,05). **30**

Figura 2. Fotomicrografias da glândula hipofaringeana de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com seis dias de idade (fase de nutriz) coradas pela hematoxilina e eosina. **A:** outono; **B:** inverno; **C:** primavera; **D:** verão. Área tracejada: ácino pluricelular; *: musculatura; **: ducto excretor. Aumento: 200X. **31**

Figura 3. Média do teor de flavonoides totais em μg/g encontrados no pólen apícola nas diferentes estações do ano. Os valores expressam as médias seguidas de seus respectivos desvios-padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P < 0,05). **32**

Figura 4. A - Tipos polínicos encontrados: a) Poaceae; b) Rubiaceae; c) Myrtaceae sp.1; d) Asteraceae; e) Mimosaceae sp1; f) Mimosaceae sp.2; g) Myrtaceae sp.2; h) Tipo polínico 1; i) Poaceae sp.2; j) Fabaceae sp.1; l) Bignoniaceae; m) Tipo polínico 2; n) Tipo polínico 3; o) Sapindaceae; p) Amaranthaceae; q) Fabaceae sp.2; r) Caryophyllaceae. B - Frequência, em porcentagem, das famílias botânicas dos polens encontrados ao longo das estações do ano. **34**

Figura 5. Frequência, em porcentagem, das famílias botânicas dos polens encontrados ao longo das estações do ano. **35**

ÍNDICE DE FIGURAS
CAPÍTULO III

Figure 1. Hypopharyngeal glands of 6-day-old Africanized honey bees *Apis mellifera*. (T1: beehives without apitoxin harvesting and T2: beehives subjected to apitoxin harvesting). **A:** October, T1; **B:** October, T2; **C:** November, T1; **D:** November, T2; **E:** December, T1; **F:** December, T2. Gain: 200×. **48**

Figure 2. Mean number of acini for treatments T1 and T2, in Africanized honeybees *Apis mellifera* (October, November, and December 2014). (T1: beehives without apitoxin harvesting and T2: beehives subjected to apitoxin harvesting). The graphics show the mean and the standard deviation. Asterisks indicate significant differences between groups T1 and T2 for the same month ($p < 0.001$). **49**

Figure 3. Mean area of acini (μm^2) for treatments T1 and T2, in Africanized honeybees *Apis mellifera* (October, November, and December 2014). (T1: beehives without apitoxin harvesting and T2: beehives subjected to apitoxin harvesting). The graphics show the mean and standard deviation. Asterisks indicate significant differences between groups T1 and T2 for the same month ($p < 0.001$). **50**

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Número de compostos e percentuais dos ácidos fenólicos, flavonóis e flavonas encontradas nas amostras de pólen de abelhas *Apis mellifera* africanizadas nas estações primavera, verão, outono e inverno. **33**

Tabela 2. Compostos fenólicos identificados ao longo das estações do ano nas amostras de pão de abelhas e tempo de retenção. **59**

Resumo Geral

As glândulas hipofaringeanas das abelhas *Apis mellifera* L. possuem diversas funções importantes para o desenvolvimento das colônias, sendo a mais importante delas a produção da fase proteica da geleia real, a qual é o ponto de partida das diferentes rotas de desenvolvimento das abelhas. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivos estudar possíveis variáveis que possam afetar, ao longo do tempo, a morfologia das glândulas hipofaringeanas (área e número de seus ácinos). Em vista disso, no Capítulo II, foram investigados se os nutrientes e origem botânica do pólen podem afetar o desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas ao longo das estações do ano. A qualidade deste recurso floral é determinante para o crescimento das glândulas hipofaringeanas em abelhas operárias e, cada tipo polínico oferece aporte nutricional específico, o qual pode variar de acordo com a origem botânica dos vegetais estações do ano. Dessa maneira, foi realizado estudo morfológico das glândulas hipofaringeanas de abelhas com seis dias de idade ao longo de um ano. O "pão de abelhas" foi colhido durante um ano e, foram feitas análises de proteína total, cinzas, flavonoides totais, compostos fenólicos e análises palinológicas. Verificou-se que a GH teve maior área e número de ácinos na estação do verão ($P < 0,05$). O teor de proteína bruta e cinzas não mostraram variações ao longo do ano. O teor de flavonoides totais do pólen foi maior no verão ($P < 0,05$). Foram identificados três grupos de compostos fenólicos e polifenólicos no pólen: ácidos fenólicos, flavonóis e flavonas; os quais apareceram predominantemente no inverno, verão e outono, respectivamente. Os grãos de pólen das famílias botânicas Poaceae, Rubiaceae, Myrtaceae e Asteraceae foram encontrados em todas as estações do ano. Conclui-se que a glândula hipofaringeana teve maior desenvolvimento durante a estação do verão, e sugere-se que o teor de flavonoides do pólen pode ter influenciado este resultado. No Capítulo III, estudou-se se a colheita de apitoxina pode afetar as mesmas estruturas das glândulas. Este manejo é considerado estressante para as abelhas *Apis mellifera* L, devido à liberação de ferômonios de alarme que alteram a comunicação e comportamento, modificando suas atividades, e, consequentemente, pode interferir em sua fisiologia, como por exemplo, no desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas. Esta questão foi abordada neste trabalho. Durante três meses (outubro, novembro e dezembro) a apitoxina foi colhida de cinco colmeias, por meio de coletor elétrico, outras cinco foram mantidas como

controle. Mensalmente, foram realizadas análises morfológicas das glândulas hipofaringeanas de abelhas com seis dias de idade e, verificou-se que aquelas abelhas que passaram pelo manejo de colheita de apitoxina apresentaram menor área e número de ácinos em todos os meses analisados ($P < 0,05$). Assim, o Capítulo III mostrou que a colheita de apitoxina prejudica o desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas de abelhas *Apis mellifera* com seis dias de idade.

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES

Graças às nossas condições climáticas e ambientais, a apicultura tem crescido e se desenvolvido ao longo dos anos no Brasil. Além da polinização, muitos são os produtos que podem ser explorados por meio da apicultura e, que trazem benefícios à natureza e aos seres humanos. Em vista disso, o conhecimento da atuação da sazonalidade, nutrição e estressores sob a fisiologia das abelhas, pode melhorar as tecnologias de manejo e alimentação nos apiários, beneficiando apicultores e consumidores.

Neste trabalho, levantamos a hipótese de que a sazonalidade pode alterar o valor nutricional do pólen e, consequentemente, afetar o desenvolvimento de glândula hipofaringeana (GH), assim como a colheita de apitoxina pode prejudicar essa glândula em abelhas *Apis mellifera*.

A integridade das GHs para a colônia é imprescindível à produção adequada de geleia real, alimento utilizado para alimentar todas as larvas jovens e rainhas, interferindo de forma indireta na nutrição de todo enxame.

Este trabalho demonstrou que as GHs das abelhas *Apis mellifera* sofrem alterações entre as estações do ano, e que essas podem estar associadas aos diferentes teores de flavonoides do pólen. Dessa forma, elaborar uma dieta para abelhas com nível adequado de flavonoides é fundamental para otimizar o crescimento dessas glândulas e, consequentemente, garantir o bom desenvolvimento das colônias.

Verificamos também que a colheita de apitoxina diminuiu significativamente o número e a área dos ácinos das GH, comprovando, que o estresse provocado por este manejo é prejudicial às colônias, devendo ser repensado os métodos de colheita e os intervalos de tempo em que são realizados.

Os dados deste trabalho contribuem para a área da Apicultura, pois esclarecem que a qualidade do pólen e a colheita de apitoxina podem afetar a fisiologia das abelhas e o desenvolvimento das colônias. Sugerem-se novos estudos nesta área, como por exemplo, se a colheita de apitoxina pode afetar a produção e qualidade geleia real, ou ainda, como a qualidade do pólen pode modular o desenvolvimento das glândulas mandibulares, as quais também estão envolvidas na produção de geleia real. Há muito para ser feito ainda objetivando desvendar os segredos que envolvem a vida das abelhas.