

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

**DIFERENTES MANEJOS NA PRODUÇÃO DE MEL EM ABELHAS**

*Apis mellifera* L. E SEU EFEITO NA EXPRESSÃO DE GENES

**RELACIONADOS AO ESTRESSE**

SAMIR MOURA KADRI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Botucatu-SP  
Junho-2012

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

**DIFERENTES MANEJOS NA PRODUÇÃO DE MEL EM ABELHAS**

*Apis mellifera* L. E SEU EFEITO NA EXPRESSÃO DE GENES

**RELACIONADOS AO ESTRESSE**

SAMIR MOURA KADRI

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia como parte  
das exigências para a obtenção do título  
de Mestre.

Botucatu-SP  
Junho - 2012

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

K11d Kadri, Samir Moura, 1986-  
Diferentes manejos na produção de mel de abelhas *Apis mellifera* F. e seu efeito na expressão de genes relacionados ao estresse / Samir Moura Kadri. - Botucatu : [s.n.], 2012  
vi, 40 f. : tabs.  
  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2012  
  
Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi  
Co-orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla  
Inclui bibliografia  
  
1. Abelha - Criação. 2. Bem-estar animal. 3. Genética - Expressão. 4. Mel de abelha. 5. Stress (Fisiologia).  
I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Ribolla, Paulo Eduardo Martins. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”*

Albert Einstein

## **DEDICO**

Aos meus pais, Assein Kadri e Maria das Neves Moura Fernandes, pessoas muito especiais pelas quais eu agradeço a Deus todos os dias. Pessoas que me fizeram ser quem eu sou, que me apóiam sem limites para que eu conquiste meus sonhos, alcance os meus objetivos e não medem esforços para me ver feliz. Pessoas que eu quero sempre encher de orgulho e dar o meu melhor. Amo vocês demais.

Meu Irmão, Nabil Moura Kadri, que esteve ao meu lado em todos os momentos, acreditando e apoiando, e o mais importante, sempre me lembrando de acreditar no que eu faço.

## **AGRADEÇO**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por iluminar minha vida e colocar pessoas especiais nos meus caminhos, que me ajudaram a conquistar este título.

A minha namorada Mariana Cassani de Oliveira pelo companheirismo em todas as horas de dificuldades e pelo incentivo na elaboração desta dissertação.

Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, amigo e orientador na vida profissional e pessoal. Muito obrigado pela confiança depositada em mim e principalmente pela oportunidade para realização desta dissertação.

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla pela co-orientação, pelos ensinamentos, oportunidades, disponibilidades de equipamentos e conhecimentos na área de genética molecular.

Dr. Diego Peres Alonso, pela ajuda nas reações de Real Time PCR, ensinamento na área de genética molecular e pela total dedicação a esta pesquisa.

Meus amigos de pós-graduação Melina Stoian Modanesi, Thaís Bovi, Edison Antônio de Souza, Fernando Salvador Parra, pelo companheirismo ao longo de toda esta etapa concluída em minha vida.

Meus amigos da República D.N.A, pela amizade e pelos momentos de descontração, em especial Samuel Menegethi Zoca, João Ricardo Ronchesel e Guilherme Arruda.

Demais professores dos Departamentos de Melhoramento e Nutrição Animal e de Produção Animal que trabalharam pela minha formação durante a graduação e pós-graduação.

Aos secretários (as) da seção de pós-graduação Seila Cristina Cassineli Vieira e Carlos Pazini Júnior, pela atenção e orientações nas questões burocráticas.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, pelos ensinamentos e oportunidades.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior - CAPES pela bolsa de estudo.

*“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”*  
Friedrich Nietzsche

## SUMÁRIO

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO I.....</b>                                            | <b>01</b> |
| Considerações Iniciais.....                                       | 02        |
| Mel: Origem e Composição.....                                     | 02        |
| Caracterização Físico-química do Mel.....                         | 04        |
| Estresse.....                                                     | 07        |
| Referências.....                                                  | 13        |
| <b>CAPÍTULO II.....</b>                                           | <b>22</b> |
| Resumo.....                                                       | 23        |
| Abstract.....                                                     | 24        |
| 1. Introdução.....                                                | 25        |
| 2. Material e Métodos.....                                        | 26        |
| 2.1. Local do Experimento.....                                    | 26        |
| 2.2. Abelhas utilizadas e tratamentos.....                        | 26        |
| 2.3. Desenvolvimento populacional dos enxames.....                | 27        |
| 2.4. Avaliação da produção do mel e análises físico-químicas..... | 27        |
| 2.5. Avaliação da expressão gênica.....                           | 27        |
| 2.6. Análise Estatística.....                                     | 29        |
| 3. Resultados.....                                                | 29        |
| 4. Discussão.....                                                 | 33        |
| Agradecimentos.....                                               | 35        |
| 5. Referências.....                                               | 35        |
| <b>CAPÍTULO III.....</b>                                          | <b>39</b> |
| Implicações.....                                                  | 40        |

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>TABELA 1:</b> Médias e desvio padrão da produção de mel (Kg) em função dos diferentes tratamentos em abelhas <i>Apis mellifera</i> | <b>29</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

africanizadas.....

**TABELA 2** Médias e desvio padrão da quantificação relativa (R) dos genes catalase, defensina e ERP60 em abelhas campeiras e internas, em função dos diferentes tratamentos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas..... **30**

**TABELA 3:** Médias e desvio padrão da área de cria aberta (CA) e cria fechada (CF), em cm<sup>2</sup>, em função dos diferentes tratamentos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas..... **31**

**TABELA 4:** Médias e desvio padrão da análise físico-química (acidez total - meq kg<sup>-1</sup>; pH, teor de umidade -%; cinzas - %; matéria seca - %) do mel em função dos diferentes tratamentos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas..... **32**

# CAPÍTULO I

## **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

### **MEL: ORIGEM E COMPOSIÇÃO**

Dos produtos fornecidos pelas abelhas, o mel é sem dúvida o mais conhecido e difundido. Foi um dos primeiros alimentos consumidos pelo homem e praticamente todas as civilizações antigas o utilizaram como alimento e recurso medicinal. O mel é utilizado desde a antiguidade, pois registros relatam que a apicultura e seus produtos

apícolas já eram utilizados pelos egípcios há cerca de cinco mil anos (JATI, 2007). O testemunho mais antigo que registra a atividade apícola foi encontrado em pinturas rupestres datadas de mais de 7000 anos a.C., encontradas na Cova da Aranha, em Valência, Espanha. Tais pinturas descreviam o processo de colheita de mel por humanos em cavidades rochosas (CRANE, 1999).

Segundo Crane (1987), em diversas partes do mundo, a “caça” ao mel, foi substituída pela apicultura. A partir da segunda metade do século passado ocorreu um grande desenvolvimento na atividade, o que transformou o mel em um produto conhecido mundialmente (PEREIRA et al., 1994).

Segundo Silva *et al.* (2006), o emprego do mel na medicina data da mais remota antiguidade. Celsius, um dos grandes vultos da medicina no primeiro século da era cristã, já afirmava que o mel tinha ação aglutinante sobre ferimentos.

Atualmente, o homem utiliza o mel como alimento, sem desconhecer suas qualidades medicinais e seu valor nutricional. É um alimento de elevado valor energético, consumido mundialmente e de extrema importância para a saúde do organismo humano por apresentar diversas propriedades, como antimicrobiana, curativa, calmante, regenerativo celular, estimulante, de ação no sistema imunológico, anti-inflamatório, analgésico, expectorante e hipersensibilizante (AZEREDO et al. 1999; WIESE, 2000; KOMATSU et al. 2002; BIZARRIA; FILGUEIRAS 2003; SILVA et al. 2004).

Segundo a Instrução Normativa N° 11 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, o mel é composto por uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, minerais, pigmentos, substâncias aromáticas e grãos de pólen, podendo conter cera de abelhas resultante do processo de extração (BRASIL, 2000).

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2000), o mel é definido como:

“[...] o produto alimentício produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores e de secreções procedentes de partes vivas de certas plantas ou de secreções de insetos sugadores de plantas que vivem sobre algumas espécies vegetais e que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia”.

Em quase todos os tipos de mel a frutose predomina, sendo a glicose o segundo açúcar principal. Esses dois açúcares constituem 85-95% dos carboidratos do mel. Açúcares mais complexos, compostos de duas ou mais moléculas de glicose e frutose, constituem os carboidratos restantes, com exceção de um traço de

polissacarídeos. O mel também contém substâncias voláteis, responsáveis pelas características de odor e sabor (FINOLA et al., 2007).

Sua produção é a partir do néctar das flores, açúcares dissolvidos secretados pelos nectários e colhidos pelas abelhas. Para sua elaboração o néctar sofre duas reações: uma física pela desidratação (eliminação da água), através da evaporação na colméia e absorção no papo (vesícula melífera) e outra química, que ocorre quando o néctar recebe adição de várias enzimas das abelhas melíferas, como a invertase, amilase e glicose-oxidase; o que ocorre na reação química é a inversão do açúcar composto em um açúcar simples (CRANE, 1987).

A enzima invertase, produzida pelas glândulas salivares das abelhas, hidrolisa a sacarose em glicose e frutose. A amilase age sobre o amido do néctar convertendo-o em maltose. Por sua vez, a glicose do “mel verde”, assim denominado quando ainda possui grande quantidade de água, é oxidada pela glicose-oxidase, produzindo ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Segundo Karabourniot; Zervalaki (2001), a quantidade de enzima depende da idade da abelha, do estado da colônia, do fluxo do néctar, das condições do ambiente e das condições de prática da apicultura.

Conforme relatado por Salamanca (2001), as enzimas são componentes dos mais importantes no mel, não pelo seu significado nutricional para o homem, mas pelo papel indispensável que desempenham na transformação do néctar em mel. Estudos realizados têm demonstrado que a rápida entrada de néctar produzido, por colméias com intensa atividade produtiva, apresentam baixo conteúdo de enzimas, ao contrário dos méis colhidos por abelhas em condições de pouco fluxo de néctar. A invertase, enzima que participa da maturação do mel e que transforma sacarose em frutose e glicose, sofre decomposição com grande rapidez a partir de 35°C, temperatura que em muitos países é facilmente alcançada durante o verão, podendo ser um indicativo de aquecimento do produto (KARABOURNIOTI; ZERVALAKI, 2001).

A maturação do mel tem início no organismo da abelha, continua durante sua deposição nos alvéolos e se finaliza com a operculação dos favos, tão logo a sua umidade seja reduzida aos 18% a 20%, o que permite a sua conservação por longo tempo (SORIA, 2000).

A composição exata de qualquer mel depende principalmente das fontes vegetais das quais ele é derivado, mas também do tempo, solo e outros fatores (CRANE, 1987; MENDONÇA, 2008). Segundo Montenegro et al. (2000) e Lengler (2002) o mel varia muito de uma região para outra, tanto em conteúdo polínico como em características físico-químicas, sendo explicado pela possibilidade de ter origem em mais de 2500 tipos de flores de plantas diferentes.

Atualmente, o manejo utilizado para a produção de mel consiste no preparo dos enxames para o início de secreção de néctar pelas plantas. É o preparo dos enxames que atraem grande número de abelhas operárias destinadas à colheita de alimento e manutenção das atividades do enxame, como a regulação térmica do ninho. Quando o enxame está pronto, melgueiras vazias sobressalentes devem ser adicionadas logo acima do ninho, para que as abelhas coloquem o excedente de néctar colhido no campo (COUTO; COUTO, 1996).

Entretanto, esta adição de melgueiras deve ser gradativa para que o estresse provocado nas abelhas possa ser minimizado ou evitado. Não existem trabalhos na literatura sobre o estresse em abelhas em função das práticas de manejo neste sentido.

## **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEL**

O estudo da composição físico-química é um instrumento para a sua caracterização. A determinação de intervalos de variação para cada parâmetro analisado estabelece um padrão físico-químico do mel em questão. De acordo com a literatura, os parâmetros mais utilizados para a caracterização físico-química do mel são: umidade, densidade, atividade de água, minerais, Lund (proteína), acidez, pH, açúcares redutores, atividade diastática, condutividade elétrica e cor (CRANE, 1987; CAMPOS, 1998; BOGDANOV, 1999; MARCHINI et al., 2000; BOGDANOV et al., 2004; FELSNER et al., 2004; YANNIOTIS et al., 2006).

Para Araujo et al. (2006), o fato do mel, mesmo após a colheita, continuar sofrendo modificações físicas, químicas e organolépticas, gera a necessidade de produzi-lo dentro de níveis elevados de qualidade, controlando todas as etapas de seu processamento, com o objetivo de garantir um produto com excelente qualidade para o consumidor.

Diversos autores têm caracterizado o mel brasileiro: SODRE (2002), RÉGO et al. (2002), STONGA et al. (2002), SODRE; MARCHINI (2004), MENDONÇA et al. (2004), MORETI et al. (2004) e BENDINI; SOUZA (2008).

Com relação à maturidade, a umidade é um dos principais parâmetros de análise da qualidade do mel, não sendo tolerados valores superiores a 20%, segundo normas firmadas pelo governo brasileiro (BRASIL, 2000). O teor de umidade pode ser alterado após a retirada do mel da colmeia, devido às condições climáticas durante o processo de extração, beneficiamento e armazenamento. Assim, no mel maduro, ou seja, devidamente desidratado e operculado pelas abelhas, o conteúdo de água é geralmente constante, ao redor de 18% (YANNIOTIS et al., 2006). A umidade pode

influenciar na viscosidade, peso específico, maturação, cristalização, sabor e conservação do mel, visto que microorganismos osmófilos podem provocar a fermentação quando a umidade for elevada (GLEITER et al., 2006). A literatura indica que a maioria dos méis avaliados no Brasil atende às exigências quanto ao teor de água. (ARRUDA et al., 2004; SILVA et al., 2004; BENDINI; SOUZA, 2008; MENDONÇA et al., 2008; WELKE et al., 2008; SILVA et al., 2009).

A densidade é uma propriedade que está intimamente relacionada ao conteúdo de água do mel, ou seja, sua massa por unidade de volume. Essa característica é influenciada pela temperatura e pela umidade, assim como pela presença de cristais e colóides no mel (YANNIOTIS et al., 2006).

A maior ou menor intensidade com que a água se liga ao alimento pode ser expressa pela chamada atividade de água (aw). O mel é um alimento altamente higroscópico, e o valor normal de sua atividade de água poderá sofrer um pequeno aumento, o que dará às leveduras que normalmente já estão presentes no mel, condições de se desenvolverem (VERÍSSIMO, 1987). Segundo Gleiter et al. (2006), os valores para a atividade de água no mel se apresentam entre 0,5 e 0,65 aw.

Sodré et al.(2007), ao analisarem sacarose aparente em amostras de mel do estado do Ceará, observaram que 10% das amostras apresentavam valores acima do permitido pela norma vigente. De acordo com Azeredo et al. (1999), o alto conteúdo de sacarose aparente no mel pode indicar um mel “verde”, isto é, quando o produto ainda não foi totalmente transformado em glicose e frutose pela ação da enzima invertase secretada pelas abelhas, além de poder indicar uma adulteração do produto.

Os açúcares redutores, que são calculados como açúcares invertidos, devem apresentar um valor mínimo de 65% (BRASIL, 2000). De acordo com Mendonça et al. (2008), valores abaixo de 65% podem ser um indicativo de que o mel ainda se encontrava em processo de amadurecimento no interior da colônia na ocasião da colheita.

Para Sodré et al. (2007), a sacarose aparente é uma característica de grande importância no mel, uma vez que está associada à sua qualidade. Na maioria dos méis de origem floral, os açúcares aparentes representam a maioria dos açúcares presentes (BOGDANOV et al., 2000). Pelas normas brasileiras, os valores não podem exceder 6% (BRASIL, 2000), pois podem ser indicativos de um mel muito fresco ou que tenha sido adulterado (SODRÉ et al. 2007).

Em relação à pureza, a exigência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é de que os sólidos insolúveis em água sejam de no máximo 0,1%, exceto no mel prensado, que tolera 0,5%, unicamente em produtos acondicionados e

vendidos diretamente ao público (BRASIL, 2000). Para Silva et al. (2009), este parâmetro está relacionado com a qualidade de sujeira presente no mel, oriunda do campo.

O conteúdo de minerais no mel é considerado como um dos principais fatores que influenciam diretamente em sua coloração, sendo maior nos méis escuros, em comparação com os claros. Dentre os fatores que influenciam o conteúdo de minerais do mel, podem ser citados a origem floral, o tipo de clima e de solo presente na região produtora do mel (MARCHINI et al., 2000).

O teor de cinzas, que expressa a riqueza do mel em minerais, é uma característica bastante utilizada para aferição da qualidade do mel (SOUZA et al., 2009) e como indicativo de origem botânica (BOGDANOV et al., 2000). O mel puro quando processado corretamente, apresenta baixos teores de cinzas. Portanto, é um parâmetro que permite identificar algumas irregularidades, como por exemplo, resíduos de tinta, insetos, pedaços de madeira e favos; ou seja, está diretamente ligado à falta de cuidados de higiene e não à falta de atenção nas etapas de beneficiamento, como decantação e/ou filtração (PAULINO; MARCUCCI, 2009). As quantidades de cinzas admitidas em méis de origem floral não podem exceder 0,6% (BRASIL, 2000). Adicionalmente a legislação brasileira estabelece que o mel deve conter grãos de pólen, porém não faz qualquer menção quantitativa.

Já com relação à deteriorização, o mel não deve apresentar quaisquer indícios de fermentação (BRASIL, 2000). A acidez apresentada é um critério importante de avaliação, pois influencia no flavor e na conservação (AROUCHA et al. 2008), uma vez que é fortemente alterada pela fermentação (BOGDANOV et al., 2000). O valor máximo admitido é de 50 miliequivalentes por quilograma (BRASIL, 2000).

Quanto à atividade diastática, uma maneira de verificar atividade enzimática no mel, indica procedimentos e/ou adulterações quando presente, tais como uso de temperatura superior a 60°C durante o beneficiamento, adição de açúcar invertido ou condições inadequadas de armazenamento (AROUCHA et al., 2008). O valor mínimo deve ser de 8 na escala de Göthe. Méis com baixo conteúdo enzimático devem ter como mínimo uma atividade diastática correspondente a 3 na escala Göthe, desde que o conteúdo de hidroximetilfurfural não exceda a 15mg Kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000). Entretanto, Bogdanov et al. (2000) ressaltam que alguns méis monoflorais possuem naturalmente uma baixa atividade diastática.

A condutividade elétrica tem sido proposta para determinar a origem botânica do mel, e atualmente já substitui a determinação de cinzas em análises de rotina. Existe uma relação linear entre o conteúdo de cinzas e a condutividade elétrica,

expressa pela equação  $CE = 0,14 + 1,74a$ , em que CE é a condutividade elétrica ( $mS\ cm^{-1}$ ) e  $a$  é o conteúdo de cinzas, em porcentagem. A condutividade elétrica deve apresentar um valor máximo para méis de origem floral, sendo esse valor importante para a identificação da origem floral do mel. Valores superiores a  $0,8\ mS\ cm^{-1}$  são indícios de que o mel não pode ser de origem floral (BOGDANOV, 2000).

Apesar de a legislação brasileira não incluir a análise de proteínas como índice de qualidade do mel, esse parâmetro pode auxiliar na identificação de méis adulterados. Os valores de proteínas relatados para méis são bastante variados, no entanto normalmente não ultrapassam de 1,00% (MENDONÇA et al., 2008).

O pH, junto com a acidez, é considerado um importante fator antimicrobiano, provendo maior estabilidade ao produto quanto ao desenvolvimento de microorganismos. Embora não haja valores de referências estabelecidos para aferição da qualidade do mel, Souza et al. (2009) e Venturini et al. (2007) informam que o pH ideal para o mel deve ser inferior a 4,0.

## **ESTRESSE**

Aristóteles e outros antigos sábios já tinham conhecimento do estresse e seus efeitos nos animais e humanos. Porém, o primeiro pesquisador a descrever o estresse em 1856 foi Claude Bernard em células e tecidos de organismos multicelulares. Pela primeira vez descreveu que o meio interno dos seres vivos não é apenas um veículo para o transporte de alimento para as células, e sim que as células são compostas por um meio que ameniza mudanças no equilíbrio ácido-base, gasoso ( $CO_2$  e  $O_2$ ) e concentração de íons, proporcionando assim um estado estacionário (FINK, 2009).

Após 50 anos Walter Bradford Cannon, da Universidade de Harvard, sugeriu a designação de homeostase para o processo fisiológico coordenado que mantém a maior parte dos estados estacionários do organismo. Cannon popularizou o conceito “homeostase” no livro Sabedoria do Corpo, em 1932. Este pesquisador também descreveu o termo “luta e fuga” como uma resposta do animal a uma ameaça com uma descarga geral do sistema nervoso simpático. Selye reconheceu esta reposta como aguda ao estresse, tornando-se uma resposta universal ao estresse entre os vertebrados e outros organismos (SELYE, 1936).

O termo estresse vem do inglês “stress” e foi utilizado para indicar tensão, pressão ou insistência (CABRAL et al., 1997; MAGALHÃES, 1998). Selye (1936) definiu o estresse como sendo o estado do organismo, que após a atuação de agentes de quaisquer naturezas, responde com uma série de reações não específicas de adaptação.

Segundo Fraser et al. (1975), um animal apresenta-se em estado de estresse quando necessita alterar de maneira extrema sua fisiologia ou seu comportamento para adaptar-se a aspectos diversos do seu ambiente e manejo. Essa adaptação envolve uma série de alterações neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais que funcionam para manter o equilíbrio de suas funções. O termo estresse é um termo geral que implica uma ameaça a qual o corpo precisa se ajustar (VON BOREL, 1995).

O estresse pode ser abordado de três maneiras (SMELTER *et al.*, 1996):

Primeira: resposta do corpo a situações desafiadoras.

Segunda: um estímulo ou a causa da resposta.

Terceira: uma transação, que segundo Lazarus (1984) seria como “uma relação particular entre o indivíduo e ambiente, que é avaliado como prejudicial e que põe em risco o seu bem-estar”.

Segundo Margis et al. (2003), o termo estresse denota o estado gerado pela percepção de estímulos que, ao perturbarem a homeostasia, disparam um processo de adaptação, caracterizado pelo aumento de adrenalina, produzindo diversas manifestações sistêmicas, com distúrbios fisiológicos; desta maneira, o estresse representa uma resposta fisiológica para um grande desvio do esperado, capaz de perturbar o equilíbrio homeostático (MAGALHÃES, 1998; ANDRADE, 2002; SMITH, 2003; WIELEBNOWSKI, 2003; LIMA et al., 2006).

De qualquer modo, é evidente que quando um indivíduo encontra-se em situação de estresse, reações orgânicas são provocadas com a finalidade de adaptação e, conseqüentemente, sobrevivência. Por outro lado, poderão ocorrer alterações patológicas e até a morte por incapacidade de resposta do indivíduo ou por esgotamento dessa capacidade (MAGALHÃES, 1998).

O estresse também pode ser classificado como agudo, que é o estado em que um organismo se apresenta após diminuição súbita na previsão e/ou controle de alterações relevantes. Nesse caso, os conflitos são curtos e de intensidade exagerada; ou ainda como estresse crônico, sendo esta a resposta de um organismo quando alterações relevantes têm baixa previsão ou não são bem controladas por um longo período de tempo (ANDRADE, 2002).

As causas que levam um indivíduo a uma situação de estresse foram denominadas por Hans Selye como sendo agentes estressores ou exigências que provocam uma resposta padronizada e não exclusivamente de natureza física. Os agentes estressores podem ser classificados de várias maneiras: Kindlovits (1999) classifica os estressores em somáticos (físicos), psicológicos e comportamentais.

Entre os somáticos estão incluídos sons, sinais visuais, odor estranho, contatos inesperados, calor, frio e pressão. Os efeitos de agentes químicos, dentre

aqueles chamados de estressores psicológicos, destacam-se: apreensão, ansiedade, medo, frustração, pavor, novidade e fatores sociais. Por fim estão os agentes comportamentais como isolamento, superpopulação, proximidade de animais de espécies antagônicas, fadiga de transporte, exercício muscular exaustivo, disputa territorial e/ou hierarquia entre animais de um mesmo grupo, modificação de ritmo biológico, jejum prolongado, presença ou não de fêmeas no grupo social e privação de água.

Harris; Woodring (1992) avaliaram o efeito do estresse de contenção nos níveis de octopamina, dopamina e serotonina, em tecido cerebral de abelhas *Apis mellifera* L., e verificaram alterações significativas após dez minutos, evidenciando a ligação destas aminas ao estresse. Lin et al. (2004), induziram estresse de aprisionamento e frio em abelhas nutrizas e campeiras, avaliando a concentração de hormônio juvenil (HJ). Foi observado que o estresse podia ou não alterar a concentração deste hormônio, concluindo que o HJ não funciona como um hormônio de estresse sob estas condições.

Stebentheiner et al. (2009) estudaram o estresse em abelhas expostas a mudanças de temperaturas ambientais, analisando a contribuição dos indivíduos para a homeostase da temperatura da colônia. Puderam constatar que o estresse causado por baixas temperaturas aumenta a intensidade de produção de calor pelos músculos de vôo das abelhas e o aumento de indivíduos endotérmicos próximos as ninhadas.

Os insetos apresentam um grande número de mecanismos de defesa. Muitos insetos, incluindo as abelhas *Apis mellifera*, apresentam comportamento adverso a predadores, patógenos, e agentes estressores do ambiente onde se encontra o enxame (HATANO et al. 2008; FRANCKE et al 2008).

A realização do genoma das abelhas *Apis mellifera* L. possibilitou o desenvolvimento de diversos estudos na área de genética molecular (NATURE, 2006). Ao longo dos anos, diversos estudos com expressão gênica em *Apis mellifera* foram desenvolvidos nas mais variadas áreas, mostrando ser uma técnica de grande valia e possível de ser aplicada na produção de mel (EVANS, 2004; BLOCH et al., 2004; HAGAI et al., 2007; MUSTRAD et al., 2010; FANG et al., 2012). Diversos genes estão relacionados ao estresse, e a expressão ocorre a partir de algum estímulo. Os principais genes responsáveis pelo estresse podem ser vistos na tabela a seguir:

---

| <b>Genes Responsáveis pelo Estresse</b> |
|-----------------------------------------|
|-----------------------------------------|

---

|          |
|----------|
| Hsp 70Aa |
|----------|

|          |
|----------|
| Hsc 70Cb |
|----------|

|     |
|-----|
| Hop |
|-----|

Tsp96F  
CG5001  
Hsc 70-4  
PeIII  
18w  
1(2)ef  
GP 93  
Hsp 83

---

**Fonte:** Sarma et al., 2007

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a técnica de PCR (Reação em Cadeia Polimerase) em Tempo Real está sendo largamente empregada no estudo de alteração na expressão de genes em abelhas *Apis mellifera*. A técnica de PCR em tempo real é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação (GINZINGER, 2002). Durante a reação, o acúmulo de amplicons é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específicas ou primers usados na reação (FARDEL et al., 2004).

O uso de transcrição reversa associada a PCR em tempo real tornou a quantificação de mRNA (Ácido ribonucleico mensageiro) mais simples e precisa (BARBANY et al., 2000). A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação (NOVAIS et al., 2004).

Scharlaken et al. (2008), utilizaram a técnica de PCR em Tempo Real e estudaram a expressão de sete genes, dentre eles ERp60 (proteína de resposta ao estresse) que é responsável pela resposta imune, em tecido cerebral de abelhas *Apis mellifera*. Verificaram que estes foram influenciados pela ativação do sistema imune após a infecção das abelhas por *Echerichia coli*.

Hranitz et al. (2010) induziram abelhas a diferentes concentrações de álcool, para estudar o quanto isto influencia o comportamento, provocando assim, um estresse mensurado pela concentração de heat shock protein 70 (HSP70) em tecido cerebral. A partir deste estudo pode-se concluir que intoxicação aguda por etanol causa um acréscimo na concentração de HSP 70, afetando o comportamento e a capacidade de aprendizagem associativa.

Boncristiane et al. (2012) desenvolveram uma pesquisa com o intuito de estudar o impacto que o ácaro *Varroa destructor* e os acaricidas utilizados em seu controle causam sobre as abelhas *Apis mellifera*. Para o estudo foram selecionados 50 genes que atuam na imunidade, desenvolvimento e desintoxicação. As colméias foram tratadas com cinco diferentes acaricidas (Apiguard, Apistan, Checkmite, Miteaway e

ApiVar) que alteraram a expressão dos genes relacionados a resposta imune, desenvolvimento e desintoxicação.

Zhang et al. (2010) estudaram genes relacionados aos processos metabólicos e sinalização nervosa em abelhas *Apis mellifera* e *Apis cerana* submetidas a infestação por *Varroa destructor*. Foram realizadas reações de Real time PCR, utilizando oligonucleotídeos para oito diferentes genes. O intuito desta pesquisa foi estudar a resposta molecular das abelhas diante da infestação por *Varroa destructor*. Foram encontrados diferentes níveis de expressão destes oito genes nas duas espécies de abelhas, possibilitando ter um desenho da resposta molecular relacionado a infestação por *Varroa destructor*.

O mel é o principal produto explorado pelo apicultor brasileiro. Entretanto, na prática, a maioria dos apicultores - por questão de desconhecimento técnico ou economia de tempo, acrescenta várias melgueiras simultaneamente sobre o ninho no início da florada, independente do tamanho da colônia, ocasionando um aumento de espaço interno e necessidade na manutenção de temperatura de conforto pelas abelhas. Esta prática de manejo poderia ocasionar estresse no enxame.

Este estresse provocado abruptamente, pode ocasionar um decréscimo significativo na produção de mel. Desta forma, o estudo de quanto esta prática errônea afeta a produtividade da colméia é de suma importância para um melhor desenvolvimento da apicultura nacional.

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o efeito do aumento do espaço interno da colméia (por meio da adição de melgueiras) na produção de mel, nas características físico-químicas (acidez total, pH, umidade, cinzas), desenvolvimento populacional e expressão de genes relacionados ao estresse em abelhas *Apis mellifera*.

De acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, esta dissertação será dividida em capítulos, sendo:

**Capítulo II: EFEITO DO ESTRESSE NA PRODUÇÃO DE MEL EM *Apis mellifera* L.**

O artigo será submetido à Revista Apidologie, conforme as suas regras de publicação.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. **Animais de laboratório:** criação e experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. 386 p.

ARAÚJO, D. R.; SILVA, R. H. D.; SOUSA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade do Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, João Pessoa, v. 6, n. 1, p. 51-55, 2006.

AROUCHA, E. M. M. et al. Qualidade do mel de abelha produzido pelos incubados da IAGRAM e comercializado no município de Mossoró/RN. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 1, p. 211-217, 2008.

ARRUDA, C. M. F. et al. Características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) da região da Chapada do Araripe, município de Santana do Cariri, Estado do Ceará. **Boletim de Industria Animal**, Nova Odessa, v. 61, n. 2, p. 141-150, 2004.

AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. C.; DAMASCENO, J. G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 3-7, 1999.

BARBANY, G. et al. Manifold-assisted reverse transcription-PCR with real-time detection for measurement of the BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia. **Clinical Chemistry**, New York, v. 46, n. 7, p. 913-920, 2000.

BENDINI, J. N.; SOUZA, D. C. Caracterização físico-química do mel de abelhas proveniente da folrada do cajueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 565-567, 2008.

BIZZARIA, D. K.; FILGUEIRAS, C. T. Análise microbiológica de mel de abelhas, consumido no Município de Campo Grande – MS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 104-105, 2003.

BLOCH, C. D. G.; RUBINSTEIN, B. G. E.; ROBINSON, G. E. Period expression in the honey bee brain is developmentally regulated and not affected by light, flight experience, or colony type. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Cambridge, v. 34, p. 879-891, 2004.

BOGDANOV, S. Honey quality and international regulatory standard. **Bee World**, Cardiff, v. 80, n. 2, p. 61-69, 1999.

BOGDANOV, S.; ROUFF, K.; PERSANO ODDO, L. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. **Apidologie**, London, v. 35, p. 4-17, 2004.

BOGDANOV, S. **Calidad de la miel de abejas y estándares de control**: revision realizada por la Comision Internacional de la Miel. 2000. Disponível em:

<[http://www.beekeeping.com/articulos/calidad\\_miel.htm](http://www.beekeeping.com/articulos/calidad_miel.htm)>. Acesso em: 03 abr. 2010.

BONCRISTIANI, H. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels of honey bee *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, New York, v. 58, p. 613-620, 2012.

BRASIL. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Instrução Normativa nº11, de 20 de Outubro de 2000, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasília, 1997. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 out. 2000. Seção I, p. 16 A.

CABRAL, A. P. T.; LUNA, J. F.; SOUZA, K. N. O. estresse e as doenças psicossomáticas. **Revista de Psicofisiologia**, Belo Horizonte, n. 1, p. 4, 1997.

CAMPOS, G. **Melato no mel e sua determinação através de diferentes metodologias**. 1998. 178 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 1998.

COUTO, R. H. N.; COUTO L. A. **Apiculura**: manejo e produtos. Jaboticabal: Funep, 1996.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1987.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. New York: Routledge, 1999.

EVANS, J.D.; JAY, D. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 85, n. 2, p. 105-111, 2004.

FANG, Y. et al. Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera* L.). **Journal of Proteomics**, New York, v. 75, p. 756-773, 2012.

FARDEL, S.; HONCHHAUS, A.; HUGHES, M. D. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.**, Philadelphia, v.18, p. 657-670, 2004.

FELSNER, M. L. et al. Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 17, n. 6, p. 737-747, 2004.

FINK, G. **Stress**: definition and history. The Mental Health Research Institute of Victoria, Melbourne, Australia, 2009.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 4, p. 1649-1653, 2007.

FRANCKE, D. L.; HARMON, J. P.; HARVEY, C. T.; IVES, A. R. Pea aphid dropping behavior diminishes foraging efficiency of a predatory ladybeetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p.118-124, 2008.

FRASER, D.; RITCHIE, J. S. D.; FRASER, A. F. The term stress in a veterinary context. **Animal Behavior Science**, Amsterdam, v. 131, p. 653-662, 1975.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 30, p. 503-512, 2002.

GLEITER, R.A.; HORN, H.; ISENGARD, H.D. Influence of type and state of crystallization on the water activity of honey. **Food Chemistry**, London, v. 96, n. 3, p. 441-445, 2006.

HAGAI, T.; COHEN, M.; BLOCH, G. Genes encoding putative Takeout/juvenile hormone binding proteins in the honeybee (*Apis mellifera*) and modulation by age and juvenile hormone of the takeout-like gene GB19811. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, New York, v. 37, p. 689-701, 2007.

HARRIS, J. W.; WOODRING, J. Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. **Journal of Insect Physiology**, New York, 38, n. 1, p. 29-35, 1992.

HATANO, E. et al. Do aphid colonies amplify their emission of alarm pheromone? **Journal of Chemical Ecology**, Lexington, v. 34, n. 9, p. 1149-1152, 2008.

Honey bee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. **Nature**, New York, v. 443, p. 931-949, 2006.

HRANITZ, J. M.; ABRAMSON, C. I.; CARTER, R. P. Ethanol increases HSP70 concentrations in honeybee (*Apis mellifera* L.) brain tissue. **Alcohol**, England, v. 44, p. 275-282, 2010.

JATI, S. R. Qualidade do mel de abelha no estado de Roraima, Brasil. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, Boa Vista, v. 2, n. 1 p. 5-15, 2007.

KARABOURNIOTI, S.; ZERVALAKI, P. Efecto del calentamiento em el HMF y la invertasa de la miel. **Apiacta**, Bucharest, n. 36, p. 177-181, 2001.

KINDLOVITS, A. **Clínica e terapêutica em primatas neotropicais**. Juiz de Fora: Editora UFJF, 1999. v. 7, p. 31-32.

KOMATSU, S. S.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e de proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 143-146, 2002.

LAZARUS, R. S. On the primacy of cogniti. **American. Psychology**, Washington, v. 2, n. 39, p.124-129, 1984.

LENGLER, S. **Apicultura**: manejo, nutrição, sanidade e produtos das abelhas. 6 ed. Santa Maria, 2002.

LIMA, L. C. et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n.3/4, p.113-117, 2006.

LIN, H.; DUSSET, C.; HUANG, Z. Y. Short-term changes in juvenile hormone titers in honey bee workers due to stress. **Apidologie**, Boulevard, v. 35, n. 3, p. 319-327, 2004.

MAGALHÃES, H. M. **Farmacologia veterinária: temas escolhidos**. Guaíba : Agropecuária, 1998. 34p.

MARCHINI, L. C. Um padrão nacional para o mel. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, v. 59, p. 58-60, 2000.

MARGIS, R.; PICON, P ; COSNER, A. F. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria**, Porto Alegre, p. 65-74, 2003.

MENDONÇA, K.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. Parâmetros físico-químicos de méis de *Apis mellifera* provenientes do município de Cárceres – Mato Grosso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 15., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Confederação Brasileira de Apicultura, 2004.

MENDONÇA, K. et al. Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por *Apis mellifera* L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1748-1753, 2008.

MONTENEGRO, S. B.; BIANCHI, E.; AVALLONE, C. M. **Caracterización de mieles del Parque Chaqueño: determinación de Hidroximetilfurfural, plomo y antibióticos**. 2000. Facultad de Agroindustrias, Chaco, 2000. Disponível em: <[http://www.beekeeping.com/\\_menu\\_sp/articulos.htm](http://www.beekeeping.com/_menu_sp/articulos.htm)>. Acesso em: 21 mar. 2003.

MORETI, A. C. C. C. et al. Viscosidade e umidade em amostras de méis de *Apis mellifera* L. proveniente de cinco estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 15., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Confederação Brasileira de Apicultura, 2004.

MUSTARD, A. J. et al. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. **Journal of Insect Physiology**, New York, v. 56, p. 422-430, 2010.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Curitiba, v. 33, p.121, 2004.

PAULINO, R. S.; MARCUCCI, M. C. Análises físico-químicas de méis do Ceará. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 63-78, 2009.

PEREIRA, P. C. M.; VALERIO, M. A. R. N.; FUNARI, S. R. C. Perspectivas da utilização do mel, própolis, geléia real e pólen na área médica. IN: BARRAVIEIRA, P. (Org). **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Pedagógica e Universitária, p. 65-80, 1994.

RÊGO, J. G. S.; XIMENES, R. S. S.; CARNEIRO, J. G. M. Qualidade de méis de *Apis mellifera* através de métodos físico-químicos. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 5., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.

SALAMANCA, G. G.; PÉREZ, F. C.; SERRA, B. J. A. Determinación de la actividad de água em mieles colombianos de las zonas de Bocayá y Tolima. 2001. Disponível em: <[http://www.beekeeping.com/\\_menu\\_sp/articulos.htm](http://www.beekeeping.com/_menu_sp/articulos.htm)>. Acesso em: 16 mai. 2003.

SARMA, M. S.; WHITFIELD, C.W.; ROBINSON, G. E. Species differences in brain gene expression profiles associated with adult behavioral maturation in honey bees. **BMC Genomics**, London, v.202, n.8, p. 1-14, 2007.

SCHARLAKEN, B; DE GRAAF, D. C.; GOOSSENS, K.; PEELMAN, L. J.; JACOBS, F. J. Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsford, v. 32, n.8, p. 883-889, 2008.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, New York, v. 138, n. 32, p. 230-231, 1936.

SILVA, G. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIQUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzida no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia química Ambiental**, Campina Grande, v. 8, n. 2/3, p. 260-265, 2004

SILVA, R.A.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; COSTA, J.M.C. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelhas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 1, p. 113-120, 2006.

SILVA, K.F.N.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; SILVA, C.T.S.; MELO, K.S. Caracterização físico químicas de mel produzido em Limoeiro do Norte durante o armazenamento. **Caatinga**, Mossoró, v.22, n. 4, p. 246-254, 2009.

SMELTER, S. C.; BARE, B. G.; BRUNNER, S. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. v. 1.

SMITH, T. **Monitoring stress in zoo Animals, zoo research guidelines**. London: Federation of Zoological Gardens of Great Britain and Ireland, 2003.

SODRÉ, G. da SILVA Análises multivariadas com base nas características físico-químicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (HYMENOPTER:APIDAE) da região litoral norte da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Confederação Brasileira de Apicultura, 2002.

SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L.C. Composição físico-química de méis de *Apis mellifera* provenientes de diferentes municípios do Estado do Ceará. In: CONGRSSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 15., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Confederação Brasileira de Apicultura, 2004.

SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; OTSUK, I.P.; CARVALHO, C.A.L. Physical-chemical characterization of honey samples of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from Ceará State. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1623-1624, 2007.

SORIA, R.F. **Levantamento parcial do mel comercializado na cidade de Santa Maria –RS**. 2000. 26 f. Tese - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

SOUZA, B.A.; MARCHINI, L.C.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C.A.L.; ALVES, R.M.O. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona Illiger*, 1806

(Apidae: Meliponini) da região Nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 303-308, 2009.

STEBENTHEINER, A.; KOVAC, H.; BRODSCHENEIDER, R. Honeybee colony thermoregulation – regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. **Plos One**, Boston, v. 5, n. 1, p. 8967, 2009.

STONGA, V. I. et al. Caracterização dos méis de laranjeira e capixingui. (análise físico-química e sensorial) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTUR, 14., 2002. Campo Grande. **Anias...** Campo Grande: Confederação Brasileira de Apicultura, 2002.

VENTURINI, K. S.; SCARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características do mel**. Vitória: UFES, Boletim Técnico – PIE-UFES:01107, p 1-8, 2007.

VERÍSSIMO, M.T.L. Por que o mel fermenta? **Apicultura no Brasil**, v. 4, n. 20, p. 34-45, 1987.

VON BOREL, E. Neuroendocrine integration of stress and significance of stress for the performance of farm animals. **Applied Animal Behavior Scienci**, Amsterdam, v.44, p.219-227, 1995.

WELKE, J.E.; REGINATTO, S.; FERREIRA, D.; VICENZI, R.; SOARES, J. M. Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1737-1741, 2008.

WIELEBNOWSKI, N. Stress and distress: evaluating their impact for the wellbeing of zoo animals, **Journal American of Veterinary Association**, New York, v. 223, n.7, p. 973–977, 2003.

WIESE, H. **Apicultura: Novos Tempos**. Guaíba: Agropecuária, 424 p., 2000.

YANNIOTIS, S.; SKALTSI, S.; KARABURNIOTI, S. Effects of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. **Journal of Food Engineering**, New York, v. 72, p. 372-377, 2006.

ZHANG, Y.; LIU, X.; ZHANG, W.; HAN, R. Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. **Journal of Insect Physiology**, New York, v. 56, p. 1207–1218, 2010.

## CAPITULO II

### **EFEITO DO ESTRESSE NA PRODUÇÃO DE MEL *Apis mellifera* L.**

**RESUMO:** Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o efeito do aumento do espaço interno da colmeia (por meio da adição de melgueiras) na produção e nas características físico-químicas (acidez total, pH, umidade, cinzas), desenvolvimento populacional do enxame e expressão de genes relacionados ao estresse em abelhas *Apis mellifera*. Foram selecionadas e padronizadas vinte colmeias, divididas em quatro tratamentos, sendo T1: controle, adição de uma melgueira e acréscimo de outras ao

longo da florada, conforme a necessidade; T2, T3 e T4: duas, três e quatro “melgueiras” acrescentadas de forma simultânea, respectivamente, no início da florada. Os resultados foram comparados por ANOVA, seguida do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Pode-se concluir que o T1 apresentou produção de mel significativamente maior em comparação aos demais tratamentos e que o acréscimo de espaço interno nas colmeias promoveu aumento da expressão de genes relacionados ao estresse, sem interferir com o desenvolvimento populacional do enxame e qualidade físico-química do mel produzido.

**Palavras-chaves:** apicultura/bem-estar/expressão gênica

## **STRESS EFFECTS IN *Apis mellifera* L. HONEY PRODUCTION**

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate different management in honey production, by analyzing physicochemical honey properties such as acidity, pH, moisture, ash and lund; the population development in *Apis mellifera* bees. Twenty beehives were selected and standardized, and five were used for each honey production management, T1: control, when supers were added according to storage necessity throughout the period of nectar secretion, T2, T3 and T4 had two, three and

four supers added respectively. It is worth mentioning that all the supers were added at the same time. The results were compared by ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0,05$ ). We can conclude that T1 showed higher honey production compared with the other treatments and the increase of internal space in hives promoted and in the expression of genes related to stress, but not interfering in the population development and in honey physico-chemical quality.

**Keywords:** apiculture/gene expression/welfare

## **1. INTRODUÇÃO**

Segundo a Instrução Normativa N° 11, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, o mel é composto por uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, minerais,

pigmentos, substâncias aromáticas e grãos de pólen, podendo conter cera de abelhas resultantes do processo de extração (Brasil, 2000).

O mel é o principal produto explorado pelo apicultor brasileiro. Entretanto, na prática, a maioria dos apicultores - por questão de desconhecimento técnico ou economia de tempo, acrescenta várias melgueiras simultaneamente sobre o ninho no início da florada, independente do tamanho da colônia, ocasionando aumento de espaço interno e necessidade de manutenção de temperatura de conforto pelas abelhas.

Esta prática poderia ocasionar estresse no enxame, com decréscimo na produção de mel. Desta forma, o estudo de quanto esta prática pode afetar a produtividade da colmeia é de suma importância para um melhor desenvolvimento da apicultura.

A realização do genoma das abelhas *Apis mellifera* possibilitou uma gama de trabalhos na área de genética molecular (Nature, 2006). Ao longo dos anos diversos trabalhos com expressão gênica em *Apis mellifera* foram desenvolvidos, nas mais variadas áreas, mostrando ser uma técnica de grande valia (Hagai et al. 2007; Mustard et al. 2010; Fang et al., 2012).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a técnica de PCR (Reação em Cadeia Polimerase) em Tempo Real tem sido largamente empregada no estudo de alteração na expressão de genes em abelhas *Apis mellifera*. A PCR em tempo real é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação (Ginzinger, 2002).

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar o efeito do aumento do espaço interno da colmeia (por meio da adição de melgueiras) na produção e características físico-químicas do mel (acidez total, pH, umidade, cinzas), desenvolvimento populacional da colmeia na expressão de genes relacionados ao estresse em abelhas *Apis mellifera*.

## **2. MATERIAL E METODOS**

### *2.1 Local do Experimento*

O trabalho foi conduzido na Área de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizada na Fazenda Edgárdia, UNESP, campus de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22° 82' de latitude Sul e 48° 39'

de longitude Oeste com clima Cfa de acordo com a classificação de Köppen (Köppen e Geiger, 1928) e altitude média de 488,39 m.

## 2.2 Abelhas utilizadas e tratamentos

Foram utilizadas vinte colmeias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, alojadas em colmeias padrão Langstroth, distribuídas ao acaso, sendo cinco colmeias para cada tratamento: Tratamento 1 (T1): controle, sendo acrescentado uma “melgueira” ao início do experimento e “melgueiras” gradativamente ao longo do período da florada; Tratamento 2 (T2): duas “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; Tratamento 3 (T3): três “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; Tratamento 4 (T4): quatro “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho.

Todas as colmeias utilizadas no T1 tiveram necessidade de adição de melgueiras sobressalentes, estas foram acrescentadas logo abaixo das melgueiras cheias de mel. Em uma colmeia foi adicionado uma melgueira e em quatro colmeias foram adicionadas duas sobressalentes, ao longo da florada. Nos demais tratamentos as melgueiras não foram movidas nem alteradas até o final do experimento.

No período que antecedeu o experimento foi feito manejo de equalização dos quadros de cria e alimento das vinte colmeias, fazendo com que todas tivessem sete quadros de cria e três quadros de alimento. As rainhas utilizadas nas colmeias eram provenientes da Área de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de crias e acasalamento natural.

O experimento foi realizado durante o período de 7 de Dezembro de 2010 à 15 de Março de 2011. Os dados climáticos, referentes ao período experimental, foram cedidos pelo Departamento de Ciências Ambientais da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Campus de Botucatu.

Os dados climáticos, referentes ao período do estudo foram: temperatura mínima de  $18,9 \pm 1,64$  °C, temperatura máxima de  $28,7 \pm 3,06$ , temperatura média de  $24,7 \pm 2,60$ , precipitação pluviométrica de  $12,30 \pm 29,73$  mm, umidade relativa do ar de  $53,3 \pm 16,15\%$ , insolação de  $6,2 \pm 3,75$  e velocidade do vento de  $75,1 \pm 31,29$  km h<sup>-1</sup>.

## 2.3 Desenvolvimento populacional dos enxames

Foi avaliado o desenvolvimento populacional das colmeias mensalmente ao longo do período experimental, medindo a área de cria aberta e fechada no quadro central do ninho, segundo metodologia adaptada de Al-Tikrity et al. (1971).

#### *2.4 Avaliação da produção de mel e análises físico-químicas do mel*

A produção de mel foi colhida ao final da florada, separada por colmeia e tratamento, pesada em balança e beneficiada em equipamento de aço inoxidável.

Amostras de mel (500 gramas) foram separadas de acordo com cada tratamento para a realização das seguintes análises físico-químicas: acidez total (meq kg<sup>-1</sup>), pH, teor de umidade (%) e cinzas (%) (Instituto Adolfo Lutz, 1985; Sodré e Marchini, 2006).

#### *2.5 Avaliação da Expressão gênica*

As colheitas das abelhas para a expressão dos genes relacionados ao estresse foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 29, 56 e 98. Para isto, foram colhidas cinco abelhas operárias do quadro central e cinco abelhas operárias campeiras no momento da chegada de cada colmeia experimental. Após a colheita as abelhas foram imediatamente armazenadas em freezer – 80° C para extração de RNA.

Para a extração de RNA, a cabeça de cada abelha operária foi separada do corpo com o auxílio de um bisturi descartável (Scharlaken et al., 2008). Cada amostra foi composta de um “pool” de cinco cabeças e a extração do RNA foi feita pelo meio do método TRIzol, utilizando-se para cada amostra 500 µl de TRIzol (GIBCO BRL) para romper as células e liberar seu conteúdo. O produto da extração foi visualizado em gel de agarose 1%, e quantificados com o aparelho NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000). Em seguida, todas as amostras foram armazenadas a -80°C até a sua utilização.

Após o tratamento do RNA com DNase, uma solução de oligo dT (N=18) 0,75 mM; oligos aleatórios (N=8) 0,15 mM; dNTP 0,75 mM e 11 µl RNA tratado com DNase na etapa anterior, foi preparada e incubada a 65°C por 5 minutos e depois colocada no gelo por 1 minuto. A esta preparação, adicionou-se tampão 1x; DTT 0,005 M; RNase out 40 U e 100 U da enzima super script III. Essa preparação foi incubada a 50°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos para inativar a enzima. O nível de estresse das abelhas foi monitorado pela alteração na expressão de genes relacionados a esta situação, entre eles, defensina (proteína de defesa) ([Scharlaken et al., 2008](#)), ERP 60 e catalase (envolvida no stress oxidativo). Como controle interno para as reações de PCR quantitativo, foi utilizado o gene da actina ([Scharlaken et al., 2008](#)).

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems) utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: um ciclo a 50°C por 2 minutos; um ciclo a 94°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e

60°C por 1 minuto. A curva de dissociação foi obtida da seguinte maneira: 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos. A determinação da expressão dos genes foi realizada por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real (Real-time PCR), em triplicatas. Em cada reação foi feita um controle negativo, constituído da mistura de reagentes e água.

As sequências e informações dos oligonucleotídeos utilizados foram as seguintes:

| Gene             | Número de acesso no Gene Bank  | Sequencia dos Primers 5'-3'                            | Amplificado (pb) | Ta (°C) <sup>a</sup> | E(%) <sup>b</sup> |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------|----------------------|-------------------|
| <b>Actina</b>    | AB023025                       | TGCCAACACTGTCCTTTCTG<br>AGAATTGACCCACCAATCCA           | 155              | 61                   | 91,17             |
| <b>Catalase</b>  | <a href="#">XM_003699011.1</a> | CCTGGTATTGGAGCAAGTCC<br>GGCCATCACGTTGGTAGTTT           | 154              | 61                   | 89,19             |
| <b>Defensina</b> | <a href="#">U15955.1</a>       | GTCGGCCTTCTCTTCATGG<br>TGACCTCCAGCTTTACCCAAA           | 200              | 61                   | 87,06             |
| <b>ERP 60</b>    | XM_623279                      | ACTCTTGCTAAAGTTGATTGTACA<br>G<br>TAGATGCTGGACCAACTTGTG | 178              | 61                   | 96,77             |

<sup>a</sup>Ta Temperatura ótima de anelamento específica de cada primer

<sup>b</sup>E Mensuração da eficiência da reação de Real Time PCR (calculada através da curva padrão)

Para se calcular a eficiência dos oligonucleotídeos, foram feitas quatro diluições das amostras de cDNA: 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625. A eficiência (E) foi calculada através da fórmula  $E=10(-1/\text{inclinação})$ . A quantificação relativa (R) dos genes foi determinada de acordo com Pfaffl (2001), na qual CP (crossing point) é definido como o ponto em que a fluorescência detectada está apreciavelmente acima da fluorescência de fundo. A quantificação relativa dos genes foi calculada de acordo a seguinte fórmula:

$$R = \frac{E_{\text{alvo}} \Delta CP_{\text{alvo}}}{\Delta CP_{\text{endógeno}} (controle - amostra) E_{\text{endógeno}}}$$

## 2.6 Análise estatística

Os resultados foram comparados por ANOVA, seguida do teste de Tukey para verificar diferenças entre as médias. Foi considerado como estatisticamente diferentes quando  $P < 0,05$  (Zar, 1996).

## 3. RESULTADOS

Os resultados referentes à produção de mel, em função dos diferentes tratamentos, estão apresentados na tabela 1.

Pode-se observar que o tratamento T1 apresentou produção de mel significativamente maior quando comparado com os demais tratamentos (duas, três ou quatro melgueiras).

**TABELA 1:** Médias e desvio padrão da produção de mel (Kg) em função dos diferentes tratamentos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas.

| Produção de mel (kg) |             |             |            |
|----------------------|-------------|-------------|------------|
| T1                   | T2          | T3          | T4         |
| 24,33±2,14A          | 17,50±1,76B | 14,76±2,32B | 9,81±1,87B |

Letras maiúsculas diferentes, na linha, indicam diferença estatística entre médias ( $P < 0,05$ ).

T1: controle, sendo acrescentada uma “melgueira” ao início do experimento e “melgueiras” gradativamente ao longo do período da florada; T2: duas “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; T3: três “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; T4: quatro “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho.

Os resultados referentes à quantificação relativa (R) dos genes catalase, defensina e ERP 60, com a utilização do gene actina como endógeno, em função dos diferentes tratamentos, estão apresentados na tabela 2.

Todos os valores da quantificação relativa dos genes catalase, defensina e ERP 60 em todos os tratamentos apresentaram valor inferior a um. Pode-se inferir que o valor inferior a um da quantificação relativa dos genes estudados esta ligada com o tipo de manejo utilizado para a implantação do experimento, pois os dados foram calculados usando como controle o dia zero em relação às outras cinco colheitas ao longo dos 98 dias do experimento.

Pode-se observar que na quantificação relativa do gene catalase, o T4 apresentou expressão significativamente maior quando comparado com o T1 e T2, nas abelhas campeiras. As abelhas colhidas no interior do enxame não apresentaram diferença entre os tratamentos ao longo do período experimental. Não foi observada diferença entre as abelhas campeiras e internas dos quatro tratamentos.

A quantificação relativa nas abelhas campeiras para o gene defensina apresentou diferença significativa maior para o T4. As abelhas colhidas no interior do enxame não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ao longo do período experimental. Não foi observada diferença entre as abelhas campeiras e internas dos tratamentos T1, T2 e T3. As abelhas campeiras do T4 apresentaram expressão significativamente maior em relação às internas.

A quantificação relativa para o gene ERP 60 tanto nas abelhas campeiras como nas abelhas internas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ao longo do período experimental. Não foi observada diferença entre as abelhas campeiras e internas dos quatro tratamentos.

**TABELA 2:** Médias e desvios padrão da quantificação relativa dos genes catalase, defensina e ERP60 em abelhas campeiras e internas, em função dos diferentes tratamentos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas.

|    | Catalase     |             | Defensina    |              | ERP 60      |             |
|----|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
|    | Campeiras    | Internas    | Campeiras    | Internas     | Campeiras   | Internas    |
| T1 | 0,17±00 aA   | 0,20±0,2 aA | 0,009±00 aA  | 0,007±00 aA  | 0,78±1,4 aA | 0,24±0,2 Aa |
| T2 | 0,16±02 aA   | 0,42±0,5 aA | 0,005±00 aA  | 0,09±01 aA   | 0,43±0,4 aA | 0,35±0,4 aA |
| T3 | 0,19±0,3 abA | 0,37±0,3 aA | 0,004±0,0 aA | 0,09±00 aA   | 0,24±0,3 aA | 0,12±0,0 Aa |
| T4 | 0,57±0,5bA   | 0,26±0,2aA  | 0,028±00 bA  | 0,004±0,0 aB | 0,97±1,6 aA | 0,06±0,0 aA |

Letras minúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença estatística entre médias ( $P < 0,05$ ).

Letras maiúsculas diferentes, na linha, indicam diferença estatística entre médias ( $P < 0,05$ ).

T1: controle, sendo acrescentada uma “melgueira” ao início do experimento e “melgueiras” gradativamente ao longo do período da florada; T2: duas “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; T3: três “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; T4: quatro “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho.

Os resultados referentes ao desenvolvimento populacional em função dos diferentes tratamentos estão apresentados na tabela 3.

Pode-se observar que, para todos os tratamentos, não foram verificadas diferenças na área de cria aberta dos enxames, durante o período experimental. Para a área de cria fechada, o T2 apresentou diferença em relação os demais tratamentos.

**TABELA 3:** Médias e desvio padrão da área de cria aberta (CA) e cria fechada (CF), em cm<sup>2</sup>, em função dos diferentes tratamentos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas.

| Meses        | T1                 |                     | T2                 |                      | T3                   |                      | T4                  |                      |
|--------------|--------------------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|              | CA                 | CF                  | CA                 | CF                   | CA                   | CF                   | CA                  | CF                   |
| 0            | 214,0±34,0         | 792,0±432,0         | 94,0±2,0           | 1740,0±4,0           | 624,0±256,0          | 338,0±82,0           | 138,0±22,0          | 1014,0±710,0         |
| 1            | 154,0±126,0        | 792,0±192,0         | 38,0±2,0           | 1274,0±14,0          | 122,0±58,0           | 696,0±112,0          | 164,0±76,0          | 544,0±16,0           |
| 2            | 208,0±111,0        | 422,0±114,0         | 120,0±36,0         | 792,0±360,0          | 280,0±0,0            | 276,0±108,0          | 192,0±108,0         | 654,0±310,0          |
| 3            | 220,0±4,0          | 378,0±358,0         | 120,0±4,0          | 898,0±206,0          | 68,0±16,0            | 212,0±168,0          | 212,0±168,0         | 568,0±4,0            |
| <b>Média</b> | <b>199,0±26,3A</b> | <b>596,0±196,6A</b> | <b>93,0±27,32A</b> | <b>1176,0±371,6B</b> | <b>273,5±216,83A</b> | <b>553,5±258,16A</b> | <b>176,5±28,01A</b> | <b>695,0±188,66A</b> |

Letras maiúsculas diferentes, na linha, indicam diferença estatística entre médias ( $P < 0,05$ ).

T1: controle, sendo acrescentada uma “melgueira” ao início do experimento e “melgueiras” gradativamente ao longo do período da florada; T2: duas “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; T3: três “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; T4: quatro “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho.

Os resultados referentes às análises físico-químicas do mel em função dos diferentes tratamentos estão apresentados na tabela 4.

Não foram observadas diferenças significativas entre as análises físico-químicas realizadas para todos os tratamentos. Pode-se observar que todas as análises físico-químicas, exceto a umidade (%), estão de acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2000).

**TABELA 4:** Médias e desvio padrão da análise físico-química (acidez total - meq kg<sup>-1</sup>; pH, teor de umidade -%; cinzas - %; matéria seca - %) do mel em função dos diferentes tratamentos em abelhas *Apis mellifera* africanizadas.

| ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS |            |             |            |            |
|--------------------------|------------|-------------|------------|------------|
|                          | T1         | T2          | T3         | T4         |
| Acidez Total             | 17,6±3,84  | 19,2±4,14   | 16,8±1,09  | 20,4±0,89  |
| pH                       | 3,69±0,06  | 3,67±0,08   | 3,71±0,18  | 3,64±0,19  |
| Umidade (%)              | 22,70±1,15 | 22,31±0,49  | 22,48±0,60 | 23,13±1,14 |
| Cinzas (%)               | 0,01±0,004 | 0,016±0,005 | 0,01±0     | 0,01±0,004 |

T1: controle, sendo acrescentada uma “melgueira” ao início do experimento e “melgueiras” gradativamente ao longo do período da florada; T2: duas “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; T3: três “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho; T4: quatro “melgueiras” acrescentadas simultaneamente sobre o ninho.

#### 4. DISCUSSÃO

Foi observado que o aumento de espaço interno nas colmeias, pelo acréscimo de duas ou mais melgueiras no início da florada, influenciou negativamente na produção de mel dos enxames.

Esta interferência não foi observada no desenvolvimento populacional, com exceção do T2 para a área de cria fechada. Pode-se inferir que este fato observado tenha sido ao acaso, pois este tratamento não apresentou maior produção de mel ao longo da florada.

Não existem estudos com a combinação da técnica de Real Time PCR (utilizando a quantificação da expressão de genes relacionados ao estresse provocado no sistema imune neural de abelhas *Apis mellifera*) com diferentes métodos de manejo na produção dos produtos apícolas.

Deste modo o estudo da expressão de genes relacionados ao sistema imune-neural pode ser utilizado como uma ferramenta para mensurar o estresse provocado em métodos de manejo de produção de mel. Em campo as abelhas estão diretamente expostas a diversos patógenos e possíveis infecções bacterianas devido ao desgaste provocado pelo sistema de produção imposto aos enxames.

Neste experimento foi observado que o tratamento T4 apresentou maior expressão do gene catalase, o qual pode ser utilizado como indicador de alteração no sistema imune de abelhas (Boncristiane et al., 2012). Este fato pode ser explicado pelo aumento do espaço interno nas colmeias deste tratamento, o qual triplicou pelo acréscimo das melgueiras no início da florada. Este aumento de expressão do gene catalase foi observado apenas em abelhas campeiras, que poderiam estar mais expostas a patógenos ambientais em decorrência de alteração de seu sistema imune. De forma oposta não foi observado alteração nas abelhas internas do ninho.

O resultado encontrado e descrito demonstra que o manejo de produção de mel, com relação ao acréscimo de melgueiras pelo apicultor, pode afetar significativamente a produção das colmeias, conforme evidenciado para o tratamento T4. Torna-se evidente a necessidade de estudos que visem aumento de produtividade aliado ao bem-estar animal, o que tem sido alvo de recentes pesquisas (Vaz et al. 2001, Borges et al. 2003, Nardone et al. 2010, Haldar et al, 2011).

A quantificação da expressão do gene defensina foi utilizada neste estudo por ser um gene que tem sua expressão alterada, uma vez que as abelhas *Apis mellifera* sofreram estresse devido alguma alteração em seu sistema imune. Yang et al. (2005) utilizaram reações de Real Time PCR para quantificar a expressão do gene defensina após as abelhas *Apis mellifera* terem sido expostas a patógenos.

No estudo as abelhas campeiras do tratamento T4 apresentaram uma expressão significativamente maior deste gene em relação aos outros tratamentos e

com diferença para as abelhas campeiras em relação às abelhas internas. O fato de apenas as abelhas campeiras do T4 terem apresentado maior expressão deste gene pode estar relacionado diretamente com a menor produção de mel em relação aos outros enxames. Isto pode ser devido às abelhas campeiras estarem expostas a uma maior gama de agentes patógenos durante a atividade de forrageamento.

O gene ERP 60 em abelhas codificam proteínas e mostra similaridade com Proteínas da família Disulfil Isomerase (PDI). Pouco se sabe sobre o gene ERP 60 em insetos. Em *Drosophila* o gene ERP 60 é similar em humanos (Koivunen, et al. 1996). Em outras espécies implica na resposta ao estresse e codifica a proteína envolvida no enovelamento da proteína oxidativa. No presente trabalho a expressão do gene ERP 60 não apresentou diferença significativa entre os quatro tratamentos, tanto na quantificação com abelhas campeiras como com as abelhas colhidas do interior do enxame.

Com relação às características físico-químicas das amostras de mel provenientes dos diferentes tratamentos, não foram observadas diferenças significativas entre as variáveis analisadas. Sugere-se que este resultado seja, provavelmente, devido às colmeias estarem sujeitas às mesmas condições ambientais e de manejo.

A acidez encontrada nos méis apresentou-se dentro dos valores admitidos pela legislação, cujo valor máximo é de 50 miliequivalentes por quilograma (Brasil, 2000). Silva et al. (2004) encontraram acidez no intervalo de 10,10 a 31,03 meq kg<sup>-1</sup> de amostras de mel produzidos no estado do Piauí, confirmando as afirmações de Gonnet (1982) que relata um intervalo de 10 a 60 meq kg<sup>-1</sup> de mel. O tipo de florada poderia ser um fator que explicaria essa variabilidade, uma vez que a acidez no mel tem origem nos diversos ácidos orgânicos contidos no néctar colhido pelas abelhas (Root, 1985) que, pela ação da enzima glicose-oxidase, originam o ácido glucônico (White Júnior, 1989); outro fator que também poderia influenciar na acidez seria a quantidade de minerais presentes no néctar (Barth, 1989).

Embora não haja valores de referência de pH estabelecidos para aferição da qualidade do mel, Venturini et al. (2007) relataram que o pH ideal para o mel deve ser inferior a 4,0. Assim, o pH encontrado nas amostras dos diferentes tratamentos está dentro do ideal.

Os teores de umidade encontrados nos méis dos tratamentos estão acima do permitido pela legislação, de 20% (Brasil, 2000). Tal fato poderia estar relacionado com a colheita do mel de cada tratamento, ao final da florada, assim como pelo beneficiamento realizado neste trabalho, no qual todos os favos foram processados ao término do experimento, independente de conterem mel maduro (operculado) ou verde

(aberto). Tal procedimento foi necessário para se obter a produção média de cada tratamento.

O teor de cinzas encontrado nos méis provenientes dos quatro tratamentos está dentro das especificações brasileiras, que permitem o máximo de 0,6% de cinzas nos méis (Brasil, 2000). Silva et al.(2004) encontraram porcentagem entre 0,04 e 1,02% de cinzas nos méis analisados do Estado do Piauí. O teor mineral do mel está diretamente relacionado com a espécie vegetal, tipo de solo e condições climáticas (Montenegro; Fredes, 2008). Aquarone et al. (2007), encontraram em méis argentinos resultados semelhantes de teor de cinzas para amostras oriundas de diferentes solos, sugerindo que a origem floral seja a maior responsável pelo conteúdo mineral das amostras. Silva et al. (2004), encontraram diferença significativa entre o conteúdo de cinzas de méis de floradas diferentes no Piauí. Sendo assim era esperado que todas as amostras não apresentassem diferença.

Pode-se concluir que o T1 apresentou produção de mel significativamente maior em comparação aos demais tratamentos e que o aumento de espaço interno nas colmeias promoveu aumento da expressão dos genes catalase e defensina, sem interferir com o desenvolvimento populacional do enxame e com a qualidade físico-química.

## **AGRADECIMENTOS**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida

## **6. REFERÊNCIAS**

Acquarone C., Buera P., Elizalde B. (2007) Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. Food Chemistry, 101, 695-703.

Al-Tikrity W.S., Hillman R.C., Benton A.W., Clarke J. R. (1971) A new instrument for brood measurement in a honey bee colony. Am. Bee J.,111, 20-6.

Barth O. M. (1989) O pólen no mel brasileiro. Gráfica Luxor, Rio de Janeiro.

Boncristiani H., Underwood R. N., Schwarz R., Evans J. D., Pettis J., vanEngelsdorp D. (2012) Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, 58, 5, 613–620.

Borges S. A., Maiorka A., Silva A. V. F. (2003) Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. *Ciência Rural*, Santa Maria, 33, 5, 975-981.

Brasil (2000) Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Instrução Normativa nº11, de 20 de Outubro de 2000, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasília, 1997. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 out.. Seção I, 16 A.

Fang Y. et al. (2012) Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera* L.). *Journal of Proteomics*, 75, 756-773.

Ginzinger D.G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 503-512.

Gonnet M. (1982) Le miel: composition, propriétés, conservation. Montfavet: OPIDA.

Hagai T., Cohen M., Bloch G. (2007) Genes encoding putative Takeout/juvenile hormone binding proteins in the honeybee (*Apis mellifera*) and modulation by age and juvenile hormone of the takeout-like gene GB19811. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 689-701.

Haldar S., Ghosh T. K., Toshiwati, Bedford M. R. (2011) Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast protein concentrate on production performance of broiler chickens exposed to heat stress and challenged with *Salmonella enteritidis*. *Animal Feed Science and Technology*, 168, 61– 71.

Honey bee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. (2006) *Nature*, 443, 931-949.

Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (1985) Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo.

Koivunen P, Helaakoski T, Annunen P, Veijola J, Raïsañnen S, Pihlajaniemi T, et al. (1996) ERp60 does not substitute for protein disulphide isomerase as the b-subunit of prolyl 4-hydroxylase. *Biochem J*; 316:599–605.

Koppen W., Geiger R. (1928) *Klimate der Erde*. Gotha:Verlag Justus Perthes.

Montenegro G., Fredes C. (2008) Relación entre el origen floral y el perfil de elementos minerales en mieles chilenas. *Gayana Botanica*, 65, 1, 123-126.

Mustard A. J. et al. (2010) Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 56, 422-430

Nardone A., Ronchi B., Lacetera N., Ranieri M.S., Bernabucci (2010) Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock system. *Livestock Science, Itália*, 130, 57–69.

Pfaffl M. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucl. Acids Res.*,45, 29. .

Root A.I. (1985) *ABC y xyz de la apicultura: encyclopedia de la cria científica y práctica de las abejas*. Editorial Hemisfério Sur, Buenos Aires.

Scharlaken B., De Graaf D. C., Goossens K., Peelman L. J., Jacobs F. J. (2008) Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge. *Dev Comp Immunol.*, 32, 8,883-889.

Silva G. L., Queiroz A. J. M., Figueiredo R. M. F. (2004) Caracterização físico-química de méis produzida no Estado do Piauí para diferentes floradas. *Revista Brasileira de Engenharia química Ambiental*,Campina Grande, 8, 2/3, 260-265.

Sodré G.S., Marchini L.C., Moreti A.C.C.C., Otsuk I.P., Carvalho C.A.L. (2007) Physical-chemical characterization of honey samples of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from Ceará State. *Ciência Rural*, Santa Maria, 37, 4, 1623-1624.

Vaz F. N., Restle J., Feijó G. L. D., Brondani I. L., Rosa J. R. P., Santos A. P. (2001) Qualidade e Composição Química da Carne de Bovinos de Corte Inteiros ou Castrados de Diferentes Grupos Genéticos Charolês x Nelore. Revista brasileira de Zootecnia, 30, 2, 518-525.

Venturini K.S., Sarccinelli M.F., Silva L.C. (2007) Características do mel. Boletim Técnico – PIE-UFES: 01107.

White Júnior J.W. La miel. In: Dadant, H. (1989) La colmena y la abeja melífera. Hemisfério Sul, Montevideo.

Yang X.L., Cox-Foster D.L. (2005) Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. Proc. Natl. Acad. Sci., 102, 7470–7475.

Zar J.H. (1996) Bioestatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey.

Zhang Y., Liu X., Zhang W., Han R. (2010) Differential gene expression of the honey bees *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. **Journal of Insect Physiology**, 56, 9, 1207–1218.

## CAPITULO III

**IMPLICAÇÕES**

A atividade apícola tem crescido e se desenvolvido ao longo dos anos no Brasil. Neste sentido é necessário que técnicas para produção de mel acompanhem o crescimento, visando maior produção, qualidade dos produtos e bem-estar animal.

Atualmente a maioria dos apicultores - por questão de desconhecimento técnico ou diminuição de gastos com transporte e mão de obra, acrescentam várias melgueiras no início da florada, independente do tamanho da colônia, o que pode ocasionar uma diminuição na produção de mel devido ao estresse provocado nas abelhas.

Pelo fato de não existirem estudos sobre técnicas de produção de mel, procurou-se neste trabalho conciliar a produtividade com o menor estresse que possa interferir nas atividades dos enxames, utilizando técnicas moleculares como ferramenta para esta mensuração.

A adição de uma melgueira ao início da florada e melgueiras sobressalentes, de acordo com a necessidade do enxame durante o período de florada, pode ser uma técnica de grande valia para o aumento da produtividade da apicultura nacional.

A avaliação da expressão dos genes catalase e defensina em abelhas campeiras demonstrou ser um bom método de avaliação do estresse causado na produção de mel, podendo ser usado futuramente como indicativo de estresse na produção de outros produtos apícolas.

Espera-se que este trabalho possa contribuir para a cadeia apícola e para a produção aliada ao bem estar das abelhas. Entretanto, sugerem-se novos estudos para verificar outros genes que possam estar relacionados ao estresse provocado na produção de mel.