

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

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

DANIEL CAVALCANTE BRAMBILA DE BARROS

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

BOTUCATU – SP

2021

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

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

DANIEL CAVALCANTE BRAMBILA DE BARROS
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Dr. Samir Moura Kadri

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

BOTUCATU – SP

2021

B277e

Barros, Daniel Cavalcante Brambila de

Efeito da suplementação de zinco orgânico e inorgânico no desenvolvimento da glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera* L. / Daniel Cavalcante Brambila de Barros. -- Botucatu, 2021
39 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Samir Moura Kadri

1. Apicultura. 2. Nutrição. 3. Suplementação mineral. 4. Morfologia.
I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

“Se as abelhas desaparecerem da face da Terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais, não haverá raça humana”
(Albert Einstein).

DEDICO

Primeiramente aos meus pais, Marcos Cezar Brambila de Barros e Elda Cavalcante Brambila de Barros, pela criação e pelos princípios, que me deram suporte para alcançar meus objetivos pessoais e profissionais e para concluir o presente estudo, sempre apoiando meu crescimento profissional e pessoal, dando todo apoio necessário.

Aos meus irmãos, Danilo Cavalcante Brambila de Barros e Felipe Cavalcante Brambila de Barros, pelo imenso estímulo e carinho que sempre me ofereceram, e apesar da distância e ausência em alguns momentos em que gostaria de estar os acompanhando, todo nosso esforço futuramente será recompensado para nossa família prosperar sempre mais.

Muito obrigado por tudo, amo vocês.

AGRADEÇO

Primeiramente a Deus, por me ajudar em todos os momentos, me dando saúde e inspiração para que eu pudesse realizar o presente estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi e ao meu coorientador Dr. Samir Moura Kadri, pela oportunidade da orientação, amizade e por me proporcionarem o conhecimento sobre esses animais incríveis que são as abelhas, que admiro e respeito cada dia mais, por ter me permitido conhecer pessoas maravilhosas, aprendi muito, tanto profissionalmente como pessoalmente.

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

Ao Prof. Dr. Marcos Livio Panhoza Tse e ao Doutor Sergio Alexandre Alcântara dos Santos, pela participação e enorme contribuição na banca do exame de qualificação.

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

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

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

BIOGRAFIA DO AUTOR

DANIEL CAVALCANTE BRAMBILA DE BARROS

Data de nascimento: 03 de Junho de 1993

Naturalidade: São Paulo – SP

E-mail: daniel.barros@unesp.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2018 – 2021: Doutorado em Zootecnia (área: Nutrição e Produção Animal); Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil.

2016 – 2018: Mestrado em Zootecnia (área: Nutrição e Produção Animal); Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil.

2011 – 2015: Graduação em Zootecnia; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ – UNESP, Botucatu, Brasil.

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5006929892440604>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	10
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	11
1. As abelhas <i>Apis mellifera</i>.....	11
1.1. Histórico de abelhas <i>Apis mellifera</i>	12
1.2. Exigências nutricionais de abelhas <i>Apis mellifera</i>	13
1.3. Zinco (Zn)	14
1.4. Glândula mandibular de abelhas <i>Apis mellifera</i>.....	16
2. Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO II.....	23
Abstract.....	24
1. Introduction.....	25
2. Materials and methods	27
2.1. Treatments	27
2.2. Collection and storage of bees.....	28
2.3. Histological analysis	29
2.4. Morphometry of mandibular glands	29
3. Results	30
4. Discussion.....	31
5. References	34
CAPÍTULO III	38
Implicações.....	39

LISTA DE TABELAS

Tab. I. Area of the mandibular gland (μm^2). Values represent the means followed by their standard deviations. Zn0 (without zinc addition); ZnI25 (supplemented with 25 ppm zinc inorganic); ZnI50 (supplemented with 50 ppm zinc inorganic); ZnI75 (supplemented with 75 ppm zinc inorganic); ZnO25 (supplemented with 25 ppm zinc organic); ZnO50 (supplemented with 50 ppm zinc organic); ZnO75 (supplemented with 75 ppm zinc organic).....	30
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Representative photomicrographs of the area of the mandibular gland of *Apis mellifera* bees. Zn0: control; ZnI25: 25 ppm of inorganic zinc; ZnI50: 50 ppm of inorganic zinc; ZnI75: 75 ppm of inorganic zinc; ZnO25: 25 ppm of organic zinc; ZnO50: 50 ppm of organic zinc; ZnO75: 75 ppm of organic zinc. The black line represents the area of the gland. Scale bars 200 μ m.**31**

Capítulo I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. As abelhas *Apis mellifera*

As abelhas *Apis mellifera* (Classe: Insecta; Ordem: Hymenoptera; Família: Apidae), são insetos eussociais e estão presentes em todos os continentes do globo terrestre, com exceção da Antártida; são insetos de grande importância, seja por fatores econômicos (produção), ou por seus serviços ambientais (polinização). As abelhas *Apis mellifera* vivem em colônias muito bem organizadas onde os indivíduos se dividem em castas, possuindo funções bem definidas que são executadas visando sempre à sobrevivência e manutenção do enxame. Numa colônia, em condições normais, existe uma rainha, cerca de 5.000 a 100.000 operárias e de 0 a 400 zangões (GUPTA, 2014).

São insetos que fornecem benefícios para os seres humanos, como o mel e outros produtos apícolas, polinização de culturas alimentares e serviços ecológicos. A apicultura é praticada em todo o mundo e pode fornecer uma valiosa fonte de renda para as pessoas em regiões em desenvolvimento com relativamente pouco investimento (FAO, 2016). Segundo Bacaxixi et al. (2011) as abelhas possuem grande importância na polinização cruzada, aumentando a variabilidade genética das espécies e aumentando a produção de frutos e sementes, que são responsáveis por fecundar 73% dos vegetais da nossa flora.

A riqueza e variedade de abelhas são notáveis, chegando a 20.000 espécies em todo o mundo. Destas, aproximadamente 2.500 espécies são encontradas no Brasil, onde estão distribuídas em cinco famílias, sendo que dentro de cada uma muitos gêneros e espécies são representados com características próprias e papéis na natureza de crucial importância (SILVA et al., 2014).

Um desses papéis é a manutenção da variabilidade genética dos vegetais por meio da reprodução sexuada. Este processo chamado de serviço ecossistêmico de polinização vem sendo muito valorizado atualmente, principalmente os prestados pelas abelhas no que diz respeito a plantas silvestres e cultivadas (CASTRO et al., 2006).

Exemplo deste serviço é evidenciado pelo agronegócio, que atualmente é responsável por 21,3% de todo rendimento gerado pela economia brasileira, em que a contribuição econômica dos polinizadores nas principais culturas comercializadas, tanto para exportação, como para o mercado interno é substancialmente elevada (CEPEA, 2014). De acordo com Giannini (2015), de 141 culturas avaliadas no país, 85 delas

dependem de polinizadores. Além disso, o valor atribuído a esse serviço ecossistêmico, prestado de forma gratuita é de U\$\$ 12 bilhões ao ano.

As paisagens se tornam cada vez mais caracterizadas pela agricultura intensiva de monoculturas, portanto a polinização das abelhas é influenciada de maneira negativa, bem como suas necessidades nutricionais (NAUG, 2009). As abelhas de todos os tipos desempenham um papel importante na produção agrícola, na silvicultura. Atualmente, no entanto, os serviços de polinização estão mostrando tendências declinantes em todo o mundo, principalmente pelo uso indiscriminado de inseticidas, queimadas, desmatamento, e grandes áreas de monoculturas, o que tem efeitos diretos no rendimento produtivo e na nutrição das abelhas (FAO, 2016).

1.1. Histórico de abelhas *Apis mellifera*

As abelhas evoluíram de um grupo de vespas semelhantes às atuais (família Sphecidae), existiam insetos que coletavam o néctar das flores (fonte de energia), e caçavam pequenos animais como pequenas moscas e aranhas (fonte proteica); com o passar do tempo e seleção natural, algumas dessas vespas abandonaram totalmente o hábito predatório e substituíram a proteína animal pela proteína vegetal, passando a se alimentar de pólen (DANFORTH, 2007; GUPTA, 2014).

Existem registros de pinturas rupestres em cavernas no continente Africano e Europeu no período paleolítico, aproximadamente 6.000 anos A.C.; essas pinturas representavam a extração do mel realizada pelo homem em enxames selvagens instalados em frestas rochosas, sendo que essa extração era bastante primitiva, o que prejudicava a longevidade dos enxames (CRANE, 1999). A criação e o manejo de abelhas pelo ser humano, no entanto, culminou em diferentes subespécies por meio de diferentes acasalamentos naturais (hibridação), especialmente em regiões como o continente Americano, onde a *Apis mellifera* não era endêmica (PARKER et al., 2010).

No Brasil, as abelhas chegaram no século XIX, foi no ano de 1839 que Padre Antônio Carneiro conseguiu autorização do rei Dom Pedro II e trouxe para o Rio de Janeiro as primeiras abelhas europeias da subespécie *Apis mellifera mellifera* (abelhas pretas), com o objetivo de produzir mel para a alimentação da família real e a fabricação de velas de cera, dando início as atividades apícolas no país (GONÇALVES, 2001). Em 1879, imigrantes alemães trouxeram para o Rio Grande do Sul as colmeias de abelhas *Apis mellifera ligustica*. Outras subespécies também foram trazidas por imigrantes

europeus, disseminando-se, assim, as abelhas *Apis mellifera* L. por todo território brasileiro (WIESE, 2005).

Porém, foi com a introdução da abelha *Apis mellifera scutellata* (abelha africana), em 1956, pelo engenheiro agrônomo e professor Warwick Estevam Kerr, com objetivo de melhorar a produção nacional de mel, a apicultura nacional obteve significativo avanço tecnológico e produtivo, devido ao fato de serem mais produtivas, defensivas e resistentes às doenças; assim, atualmente no Brasil existe o a poli-híbrida denominada “abelha africanizada”, oriunda do cruzamento entre abelhas de sub-espécies européias e africana (GONÇALVES, 2001).

A apicultura brasileira tem demonstrado um crescente desenvolvimento, tendo a seu favor a vasta extensão do território brasileira, possuir floradas diversas e clima propício que possibilitam elevada produção ao longo do ano (COUTO; COUTO, 2002).

1.2. Exigências nutricionais de abelhas *Apis mellifera*

Durante períodos de escassez de alimento (entressafra), as abelhas enxameiam a procura de alimento (néctar e pólen, fonte de energia e proteína, respectivamente). Ao longo da vida, possuem exigências específicas de nutrientes para que possam desenvolver todo o seu potencial produtivo. As abelhas coletam e estocam alimento na forma de mel e “bee bread” (pólen estocado nos favos), com o intuito de reservar alimento suficiente para atender suas exigências nutricionais e das crias. Em épocas de escassez de néctar e pólen, muitos apicultores perdem parte de seus enxames, em razão da diminuição da população, devido à falta de alimento (MARCHINI et al., 2006). A produção e a reprodução das abelhas *Apis mellifera* L. são influenciadas principalmente pela disponibilidade de alimento e pelo clima da região.

As abelhas *Apis mellifera* L. são insetos sociais que possuem necessidades específicas de nutrientes para que possam desenvolver todo o seu potencial produtivo e reprodutivo, visando sempre à sobrevivência e manutenção do enxame (LAMONTAGNE-DROLET et al., 2019; AHMED et al., 2020). Portanto, durante os períodos de escassez, os apicultores devem fornecer suplementação artificial, para assegurar a manutenção da colônia, para que esteja saudável, e com seus estoques de alimento completos no início da florada, para que dessa forma, estejam aptas à produção (WOLFF, 2007; HENDRIKSMA, 2016; WRIGHT, 2018).

Os teores de proteínas, aminoácidos e minerais no pólen são extremamente importantes para nutrição das colônias, pois durante os primeiros cinco ou seis dias de vida adulta, as abelhas operárias consomem grandes quantidades de pólen para obter um nível adequado de proteínas e aminoácidos necessários para completar o seu crescimento e desenvolvimento (OMAR et al., 2017; LAMONTAGNE-DROLET et al., 2019).

Da mesma forma, se as abelhas operárias jovens de *Apis mellifera* L. não consumirem quantidades ideais de proteínas, a produção de geleia real pode ficar prejudicada (STANDIFER, 1980). A geleia real é um produto composto a partir de uma mistura da secreção das glândulas hipofaríngeas e mandibulares (que compõem o sistema glandular cefálico), localizadas na cabeça das abelhas operárias de *Apis mellifera* L. (COELHO et al., 2008). Embora a alimentação de abelhas seja focada em alimentos energéticos e proteicos, outros nutrientes como vitaminas e minerais são essenciais para o desenvolvimento das colônias (HAYDAK, 1970).

Os nutrientes requeridos pelas abelhas *Apis mellifera* L. são os mesmos requeridos por outras espécies animais: carboidratos, proteínas, vitaminas, lipídeos, minerais e água. As abelhas são dependentes de recursos naturais para a sua sobrevivência, visto que todos os nutrientes requeridos à sua dieta provêm apenas do néctar, pólen e água. O néctar é a fonte de carboidratos e o pólen é a fonte de proteínas, minerais, lipídeos e vitaminas; e a água participa do transporte e dissolução de substâncias, servindo de meio para várias reações químicas (COUTO; COUTO, 2002).

Trabalhos de nosso grupo de pesquisa na área de nutrição mostram que o teor de proteína recomendado para abelhas *Apis mellifera* é de 22,2% e que minerais como zinco e ferro podem modular a qualidade da geleia real e o desenvolvimento das glândula mandibulares (BARROS et al., 2021; CAMILLI et al., 2021; LONGUINI et al., 2021).

1.3. Zinco (Zn)

O metal de transição zinco é um elemento químico com símbolo Zn, número atômico 30, massa atômica 65,4 e localizado no grupo 12 da tabela periódica e foi

reconhecido pela primeira vez como essencial para sistemas biológicos em 1869. O zinco é um nutriente essencial para o metabolismo animal, pois participa de importantes funções no organismo (KLASING, 1998). Este mineral pode ser considerado o mais importante mineral metabolicamente ativo e sua deficiência prejudica a maioria das rotas metabólicas, uma vez que tem participação em diversos processos enzimáticos (KLASING, 1998).

O zinco é essencial para o funcionamento celular, atuando como cofator enzimático, participando do metabolismo, regulação da expressão gênica, manutenção estrutural de biomembranas, imunidade e proteção contra radicais livres, síntese de proteínas, entre outras (FAA et al., 2008).

Os minerais essenciais podem ser classificados em macroelementos (cálcio, fósforo, potássio, sódio, cloro, magnésio, enxofre) quando o organismo necessita de valores superiores a 100 miligramas diários e microelementos (ferro, cobre, zinco, cobalto, manganês, iodo, flúor, selênio, crômio, silício) quando o organismo necessita de valores inferiores a 100 miligramas diários, sendo eles fundamentais para as funções fisiológicas do corpo (HENDLER, 1994).

O zinco é um elemento pertencente aos metais de transição, possui cor cinza prateada, sendo encontrado na natureza na forma de sulfeto associado ao chumbo, cobre, ferro e prata (BRASIL, 2001). No organismo, o zinco é um dos principais protetores do sistema imunológico, participa de diversas atividades enzimáticas e colabora para a produção dos ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA) com a formação dos chamados dedos de zinco, que permite a aderência entre as proteínas e os ácidos para a boa regulação e expressão genética (HENDLER, 1994).

O zinco apresenta importância fundamental como componentes estruturais e funcionais dos seres vivos, estando presentes nas metaloproteínas e exercendo papel catalisador nos sistemas enzimáticos, entretanto, a fonte na qual o mineral é oferecido pode interferir em sua biodisponibilidade; minerais ligados a moléculas orgânicas, denominados quelatados, apresentam vantagens sobre a forma inorgânica, com melhor absorção e redução de competição por sítios de ligação com os outros minerais (HARAGUCHI, 2004).

A adequada nutrição resulta em um desenvolvimento de colônias de abelhas saudáveis (BRODSCHNEIDER e CRAILSHEIM, 2010). Trabalhos de nosso grupo de pesquisa mostram que as suplementações com fonte inorgânica de zinco e ferro (sulfato

de zinco e ferro) podem modular o desenvolvimento da glândula mandibular e a qualidade da geleia real (BARROS et al., 2021; LONGUINI et al., 2021). Entretanto, o estudo de glândulas mandibulares com suplementação e comparativo entre fonte orgânica e inorgânica de zinco para abelhas são escassos.

1.4. Glândula mandibular de abelhas *Apis mellifera*

As glândulas mandibulares são estruturas pares, saculares e constituídas por um reservatório rodeado por células secretoras, formando um pseudoepitélio e suas secreções são canalizadas até a base da mandíbula por um ducto, o qual apresente forma bífida, estão localizadas na cabeça das abelhas, em íntima relação com as mandíbulas (CRUZ-LANDIM, 2004; LANDIM, 2009).

As células secretoras das glândulas mandibulares produzem enzimas que metabolizam os nutrientes liberados pela digestão do pólen, além de secretar parte dos componentes da geleia real, substância de base proteica, responsável pela diferenciação de castas e também utilizada na alimentação de larvas jovens e rainhas (FENG et al., 2009; LI et al., 2010). Essas glândulas são estimuladas pela presença de feromônios liberados pelas crias e para seu desenvolvimento completo dependem de um aporte protéico derivado do consumo do pólen (DESEYN; BILLEN, 2005). As glândulas mandibulares são menores em operárias e zangões, quando comparadas as glândulas da rainha (SALLES; CRUZ-LANDIM, 2004; LANDIM, 2009).

O tamanho da glândula das abelhas operárias está relacionado com sua atividade e nutrição, sendo que indivíduos recém-emergidos possuem glândulas pouco desenvolvidas. Em abelhas na fase nutriz, correspondente às abelhas com seis dias de idade, apresentam a glândula mais desenvolvida (estima-se que esta idade seja o pico de seu desenvolvimento e produção de geleia real), diferentemente das abelhas com 0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33 dias de vida (DESEYN; BILLEN, 2005).

As larvas escolhidas pelas abelhas operárias para a criação de novas rainhas são alimentadas com secreções produzidas inteiramente pela glândula mandibular nos três primeiros dias de vida, seguido de dois dias de alimentação de secreções produzidas pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas (proporção 1:1). Diferentemente, as larvas de abelhas operárias são alimentadas com secreções provenientes das glândulas mandibulares e hipofaríngeas (proporção 4:1 e 3:1, respectivamente) (JUNG-

HOFFMANN, 1966) e passam a receber uma mistura de ambas as secreções com pólen e mel a partir do terceiro dia (HAYDAK, 1970).

A secreção da glândula é lançada através de um ducto diretamente para a base das mandíbulas das abelhas. As glândulas mandibulares das abelhas nutrizas são responsáveis pela produção de uma secreção rica em ácido 10-hidroxidecenoico (10HDA) que é utilizado na alimentação de larvas no início do desenvolvimento. A capacidade de produção de secreção nessa glândula pode ser avaliada pelo tamanho do reservatório e das células secretoras que a compõe (LANDIM, 2009). As glândulas mandibulares e hipofaringeanas secretam geleia real, de coloração esbranquiçada, tornando-se mais clara e menos abundante após a fase de nutriz (MICHENER, 1974).

A alimentação larval exerce papel fundamental na diferenciação de castas, uma vez que promove a mudança no perfil hormonal e a manutenção da integridade do ovário nas rainhas. Essa grande diferença no desenvolvimento é atribuída a sua dieta exclusiva e rica em geleia real, produzida pelas abelhas operárias nutrizas com idade entre 4 e 12 dias, a partir das secreções proteicas das glândulas mandibulares e hipofaringeanas localizadas na região da cabeça (CRUZ-LANDIM; ABDALLA, 2009; PINTO et al., 2012). Dentre as diversas fases de vida das abelhas operárias, as nutrizas apresentam maior capacidade de digerir o pólen, devido à alta produção de enzimas proteolíticas que ocorrem durante essa fase, isto faz com que sejam responsáveis pela produção da geleia real (CRAILSHEIM, 1992).

Deseyn e Billen (2005) verificaram que a quantidade de geleia real secretada está diretamente relacionada ao tamanho das glândulas, mostrando que glândulas bem desenvolvidas produzem mais geleia real.

Vale ressaltar que avaliações das glândulas mandibulares e hipofaringeanas em abelhas *Apis mellifera* mantidas em colônias são mais precisas quando comparadas as realizadas em laboratório, devido às interações que ocorrem no enxame e promovem completo desenvolvimento dessas glândulas em abelhas nutrizas (LASS; CRAILSHEIM, 1996). O estudo da suplementação do micromineral Zinco na nutrição das abelhas *Apis mellifera* e seu reflexo no desenvolvimento da glândula mandibular são de extrema importância, pois o desenvolvimento do enxame está diretamente ligado ao fator nutricional, o nível de consumo e a fonte (orgânica e inorgânica) do mineral Zn pode influenciar no desenvolvimento das glândulas mandibulares, afetando a nutrição e o desenvolvimento do enxame.

Diante deste contexto, o estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de diferentes concentrações de zinco orgânico e inorgânico sobre o desenvolvimento das glândulas mandibulares de abelhas *Apis mellifera* L., por meio de análises morfológicas.

O presente estudo resultou no capítulo II, artigo intitulado “**Effect of organic and inorganic zinc supplementation on the development of mandibular glands in *Apis mellifera***”, o qual foi aceito na revista “**Bulletin of Insectology**”, conforme suas regras de publicação.

2. Referências Bibliográficas

AHMED, Zeinab H. et al. Nutritional value and physiological effects of some proteinaceous diets on honey bee workers (*Apis mellifera* L.). **Bee World**, v. 97, n. 1, p. 26-31, 2020.

BACAXIXI, P. et al. A importância da apicultura no brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. v. 10, n. 20, 2011.

BARROS, D. C. B.; SHINOHARA, A. J.; CAMILLI, M. P.; SANTOS, S. A.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. D. O. Mineral iron affects the development of mandibular gland in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, p. 439-444, 2021.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Balanco Mineral. Balanco Mineral Brasileiro**, 2001. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2021.

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

CAMILLI, M. P.; BARROS, D. C. B.; JUSTULIN, L. A.; TSE, M. L.; ORSI, R. O. Protein feed stimulates the development of mandibular glands of honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, v. 60(1), p. 165-171, 2021.

CASTRO, M. S. et al. Stingless bee. In: Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. Ribeirão Preto: **Holos**, p. 75-83, 2006.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. **Relatório PIB Agro-Brasil**, 2014. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2021.

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

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: Funep, 2002.

CRAILSHEIM, K. The flow of jelly within a honeybee colony. **Journal of Comparative Physiology B**, Heidelberg, v.162, p. 681-689, 1992.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1.ed. New York: Routledge, p. 682, 1999.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, p.416, 2009.

DANFORTH, B. Primer - Bees. **Current Biology**. Cambridge, v. 17, n.5, p.156-161, 2007.

DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, Paris, v.36, p.49-57, 2005.

FAA, G.; NURCHI, V.M.; RAVARINO, A.; FANNI, D.; NEMOLATO, S.; GEROSA, C.; EYKEN, P.V.; GEBOES, K. Zinc in gastrointestinal and liver disease. **Coordination Chemistry Reviews**, v.252, p.1257-1269, 2008.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2016. Disponível em <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2021.

FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. **BMC Genomics**, London, v.10, p.645-657, 2009.

GIANNINI, T. C. et al. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. *Journal of economic entomology*, **College Park MD**, p. 1-9, 2015.

GONÇALVES, L. S. Africanized honey bee: introduction, adaptation and benefits: In: International Apicultural Congress, 2011, Durban. **Proceedings**, p. 1-3, 2001.

GUPTA, R. K. Taxonomy and distribution of different honeybee species. **Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security**. Netherlands, p. 63-103, 2014.

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 1, p. 5-14, 2004.

HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Annual review of entomology**, v. 15, n. 1, p. 143-156, 1970.

HENDLER, S. S. **A Enciclopédia de vitaminas e minerais**. 7. ed. Rio de Janeiro: Campus, p. 576, 1994.

HENDRIKSMA, H. P. Honey bee foragers balance colony nutritional deficiencies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 70, n. 4, p. 509-517, 2016.

JUNG-HOFFMANN, I. Die determination von konigin and arbeiterin der honigbiene. **Z. Bienenforsch**, v.8, p.296-322, 1966.

KLASING, K. C. Comparative avian nutrition. **CAB International**, Wallingford. p. 350, 1998.

LAMONTAGNE-DROLET, M. et al. The impacts of two protein supplements on commercial honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 5, p. 800-813, 2019.

LANDIM, C. C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Ed. UNESP, p. 408, 2009.

LASS, A.; CRAILSHEIM, K. Influence of age and caging upon protein metabolism, hypopharyngeal glands and trophallactic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Insects Sociaux**. Basel, v.43, p.347-358, 1996.

LI, J. et al. Differential protein expression in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: underlying caste differentiation. **PLoSOne**, San Francisco, v.5, n.10, p.e13455, 2010.

LONGUINI, A. A., MARTINELLI, G. M., CAMILLI, M. P., BARROS, D. C. B., VIEIRA, J. C. S., PADILHA, P. M., ORSI, R. O. Supplementation with an Inorganic Zinc Source in the Metalloproteomic Profile of Royal Jelly in *Apis mellifera* L. **Biological Trace Element Research**, 1-11, 2021.

MARCHINI, L. C.; REIS, V. D. A.; MORETI, A. C. C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: 15 Apidae) in Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees: a comparative study**. Cambridge: Harvard University Press, p. 404, 1974.

NAUG, D. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. **Biological Conservation**, v. 142, p. 2369–2372, 2009.

OMAR, E. et al. Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 48, n. 4, p. 425-436, 2017.

PARKER, R. et al. Ecological Adaptation of diverse Honey Bee (*Apis mellifera*) populations. **Plos One**, v. 5, n. 6, p. 1-12, 2010.

PINTO, F. A. et al. Nutritional and temporal effects on hypopharyngeal glands of Africanized honeybees (Hymenoptera – Apidae). **Sociobiology**, Feira de Santana, v.59, n.2, p.447-456, 2012.

SALLES, H. C.; CRUZ-LANDIM, C. Efeito do hormônio juvenil sobre o desenvolvimento da glândula mandibular em pupas de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.64, p.691-695, 2004.

SILVA, I. C. et al. Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras no Brasil. São Paulo: Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, Co-Editor: **Ministério do Meio Ambiente**, p. 50, 2014.

STANDIFER, L. N. Honey bee nutrition and supplemental feeding. **Beekeeping in the United States Agriculture Handbook**, v. 335, p. 39-45, 1980.

WIESE, H. Apicultura Novos Tempos. Guaíba: **Livraria e Editora Agropecuária**. p. 378, 2005.

WOLFF, L. F. **Alimentação de enxames em apicultura sustentável**. Pelotas. Circular Técnica, 63. (online) Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/circulares/Circular_63.pdf>.

Acesso em: 23 de fevereiro de 2021.

WRIGHT, Geraldine A.; NICOLSON, Susan W.; SHAFIR, Sharoni. Nutritional physiology and ecology of honey bees. **Annual review of entomology**, v. 63, p. 327-344, 2018.

Capítulo II

Effect of organic and inorganic zinc supplementation on the development of mandibular glands in *Apis mellifera*

Daniel C. B. de Barros^{1*}; Marcelo P. Camilli¹; Gabriel M. Martineli¹; Aimê A.

Longuini¹; Samir M. Kadri¹; Luis A. Justulin²; Ricardo O. Orsi¹

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

²Institute of Biosciences, Department of Structural and Functional Biology, UNESP - São Paulo State University, São Paulo, Botucatu, Brazil

*Corresponding author: M.Sc. Daniel Cavalcante Brambila de Barros, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus Botucatu Distrito de Rubião Junior s/n Caixa Postal 560, CEP: 18618-970. Tel.: +55 (14) 3880-2946, e-mail: daniel.barros@unesp.br

Abstract

We Investigated the effects of organic and inorganic zinc (Zn) supplementation on the morphology of mandibular glands in *Apis mellifera*. We randomly assigned 28 beehives to seven treatment groups (four beehives in each group) as follows: control (without Zn) and Zn organic or inorganic supplementation (25, 50, and 75 ppm organic or inorganic Zn, respectively). The inorganic source was Zn sulfate monohydrate (37% of zinc) and the organic source was Zn-methionine (16% of zinc), which were diluted in sugar syrup 1:1 (50% water and 50% sugar) and provided to the honeybees for 36 days. The morphology of the mandibular glands collected from 6-day-old nurse honeybees from each group was analyzed after sectioning and visualizing the sections under a microscope. The results were compared using analysis of variance followed by Tukey's

test. The area of the mandibular glands increased in the groups containing the organic Zn source and was higher in the 75 ppm treatment; however, the inorganic 75 ppm treatment showed the worst glands development. Therefore, organic Zn supplementation in the feeding of honeybees, in the concentrations used in this study, positively modulated development of the mandibular glands.

Keywords: beekeeping; mandibular glands; mineral supplementation; morphology; nutrition.

1. INTRODUCTION

Honeybees (*Apis mellifera*), similar to all living organisms, require nutrients in a quantity and quality that is adequate for their developmental require and routine activities. Their nutritional needs are exclusively obtained via the floral resources in the form of nectar (amino acids and phytochemicals) and pollen (which provides proteins, vitamins, lipids, and minerals) (Imdorf et al. 1998; Gupta 2014; Omar et al. 2017).

Larval feeding plays a fundamental role in caste differentiation by promoting changes in the hormone profile and maintaining the integrity of ovaries in the queens, this, developmental difference is attributed to their exclusive diet that is rich in royal jelly produced by nurse worker honeybees, aged 4 to 12 days, from the secretions of the mandibular glands located in the head region (Cruz-Landim and Abdalla 2009; Feng et al. 2009; Kamakura 2011). Deseyn and Billen (2005) found that the amount of royal jelly secreted was directly related to the size of the glands and demonstrated that well-developed glands produced more royal jelly. Thus, the mandibular glands secretes a protein-based liquid substance from pollen digestion, which is used to feed both larvae

and queen, and are therefore extremely important in the nutrition of the colony members (Li et al. 2010).

During the off-season period, there is a natural reduction in the availability of food near the apiary, requiring intervention by a beekeeper via the provision of supplementary feed (Butler 1946; Penick and Crofton, 2016; Eşanu et al. 2018).

Although the foods of *A. mellifera* mainly consists of protein and energy-rich foods, other nutrients such as vitamins and minerals are important for colony development (Brodschneider and Crailsheim 2010). Under natural conditions, the mineral requirements of *A. mellifera* are exclusively supplied by floral resources (e.g., pollen and nectar) at concentrations that may vary depending on the region and plant variety in the vicinity of the apiary (Zhang et al. 2015).

Herbert and Shimanuki (1978) suggested a diet with 1000 ppm of potassium, 500 ppm of calcium, 300 ppm of magnesium, and 50 ppm each of sodium, manganese, copper, iron, and zinc (Zn). Among the essential elements required to the complete development of honeybees, Zn is extremely important. The mineral Zn contributes to normal cellular functioning, acting as an enzymatic cofactor and participating in metabolism, the regulation of gene expression, the structural maintenance of biomembranes, immunity, and protection against free radicals and protein synthesis (Faa et al. 2008).

Zn is one of the main protectors of the immune system, participating in several enzymatic activities and collaborating to the production of deoxyribonucleic acids and ribonucleic acids with the formation of so-called Zn fingers that allowing the adhesion between proteins and acids for good regulation and gene expression (Zhang et al. 2015; Maret 2017).

Zn sulfate is an inorganic source and Zn-methionine is an organic source that are both used in animal research on nutrition (Legg and Sears 1960; Maage et al. 2001; Yu et al. 2005). The source in which the mineral is offered (i.e., organic or inorganic) might interfere with its bioavailability (Haraguchi 2014; Maret 2017). However, for *Apis mellifera* honeybees, no studies have evaluated the best source of Zn to date.

Little is known about the requirement of Zn and its influence on the physiology of honeybees (Brodtschneider and Crailsheim 2010). It is, therefore, important to study this mineral that could affect the development of mandibular glands in nurse honeybees.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Treatments

A total of 28 beehives of *A. mellifera*, standardized for the number of food frames. These were segregated into the following seven treatment groups, with four experimental replicates per group: Zn0 (control treatment): sugar syrup without Zn supplementation; ZnI25: sugar syrup supplemented with 25 ppm inorganic Zn, ZnI50: sugar syrup supplemented with inorganic 50 ppm Zn, ZnI75: sugar syrup supplemented with 75 ppm inorganic Zn, ZnO25: sugar syrup supplemented with 25 ppm organic Zn, ZnO50: sugar syrup supplemented with 50 ppm organic Zn, and ZnO75: sugar syrup supplemented with 75 ppm organic Zn.

The inorganic source was Zn sulfate monohydrate (containing 37% Zn) and the organic source was Zn-methionine (containing 16% Zn). These were diluted in sugar syrup 1:1 ratio (50% water and 50% crystal sugar), vortexed and administered using a Boardman feeder in all treatments (500 mL per week for 30 days). The feed was consumed within 24 h by the experimental colonies, thereby ensuring the stability of the Zn (Ingraham 1963; Labadi et al. 1993).

Herbert and Shimanuki (1978) suggested the inclusion of 50 ppm Zn in the diet of honeybees; therefore, we tested the effects of the inclusion of Zn at concentrations above and below the recommended value. In this study, we supplemented the feed of honeybees in the colonies with inorganic and organic Zn to verify its effects on the glandular physiology of nurse honeybees. Zn levels were determined using an atomic absorption spectrometry (FAAS) and were 23.57, 49.44, and 75.09 ppm in the ZnI25, ZnI50, and ZnI75 groups, respectively. In the ZnO25, ZnO50, and ZnO75 groups, these concentrations were 23.16, 48.80, and 74.44 ppm, respectively.

2.2. Collection and storage of bees

The supply of sugar syrup containing the different Zn sources and concentrations was provided weekly for 36 days and the honeybee collections for morphological analyses were performed at age 36 days (6 days of adult life) ensuring the receipt of Zn supplementation during the larval and adult phase until the nursing phase.

Two combs by each colony (eight per treatment) were removed from each treatment and were individually wrapped in tissue. The frames were placed 24 hours in an incubator at approximately 34 °C and 60% relative humidity until the emergence of adult workers. On hatching, fifty workers were marked with non-toxic dye and introduced in their mother colony. At 6 days of age, the nurse honeybees were harvested with entomological forceps and immediately stored in a plastic tube with holes to allow air circulation. Ten 6-day-old worker honeybees per treatment were collected (two to three honeybees per colony), totaling 70 honeybees in the present study. These honeybees were euthanized (decapitated with a scalpel after being anesthetized with CO₂) and their heads were fixed in 4% formaldehyde (dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3) for 24 h to increase exoskeleton permeability. Subsequently, the heads

were washed in running water for 24 h and then placed in 70% ethyl alcohol until processing for histological analysis (Zaluski et al., 2017).

2.3. Histological analysis

Histological analyses were performed, according to an adaptation of the method described by Smodiš-Škerland (2010). The samples were processed in a graded series of ethanol (70%, 80%, 90%, and 95%) and cuts were made on the anterior and posterior portions of the heads (eliminating an approximately 1-mm thick layer of chitin); thereafter, the heads were embedded in methacrylate resin (HistoResin[®], Leica, Heidelberg, Germany) and included in plastic molds with the assembly resin to form blocks for slide production. The blocks were glued in wood and were then sliced into 3- μ m sections using an automatic rotary microtome (Leica RM2155, Germany).

Serial slices were produced from each block and were immediately mounted on glass slides. A total of 12 slices were cut per block and an average of 13 slides were made from each block. The slides containing the sections were stained with hematoxylin-eosin, oven-dried, and coverslips were placed over the sections. Entellan[®] was used for mounting.

2.4. Morphometry of mandibular glands

The sections were photographed using a digital camera (Leica DC300FX) coupled to a microscope (Leica DMLB80) and the images were analyzed using image analysis software (Leica Q-win version 3 for Windows). The mean area of the reservoir in the mandibular glands was determined for honeybees in each of the experimental groups.

For determining the area of the mandibular glands reservoir, 10 honeybees (five blocks) were analyzed per treatment and 200 images of the mandibular glands were analyzed for each treatment (20 images per bee, 40 images per block).

The results were compared using analysis of variance, followed by Tukey's test to verify the differences among means, the data were normal and homoschedastic. The differences were considered statistically significant at $P < 0.05$ (Zar 1996).

3. RESULTS

The ZnO75 group showed higher area glands development compared with the other treatments. ZnI75 showed the smallest development of the mandibular glands of all treatments. Average mandibular glands area for every experimental condition is reported in Table I and Figure 1.

Table I. Area of the mandibular gland (μm^2). Values represent the means followed by their standard deviations. Zn0 (without zinc addition); ZnI25 (supplemented with 25 ppm zinc inorganic); ZnI50 (supplemented with 50 ppm zinc inorganic); ZnI75 (supplemented with 75 ppm zinc inorganic); ZnO25 (supplemented with 25 ppm zinc organic); ZnO50 (supplemented with 50 ppm zinc organic); ZnO75 (supplemented with 75 ppm zinc organic).

Average area ($\mu\text{m}^2 \times 10^4$) of mandibular gland in <i>Apis mellifera</i>						
Zn0	ZnI25	ZnI50	ZnI75	ZnO25	ZnO50	ZnO75
4,7 $\pm$ 1,4cd	5,6 $\pm$ 2,1c	3,9 $\pm$ 1,1de	3,7 $\pm$ 1,0e	7,3 $\pm$ 2,0b	7,6 $\pm$ 2,1b	8,8 $\pm$ 2,4a

Values followed by different lowercase letters indicate a significant difference in the mean area between treatments ($P > 0.05$).

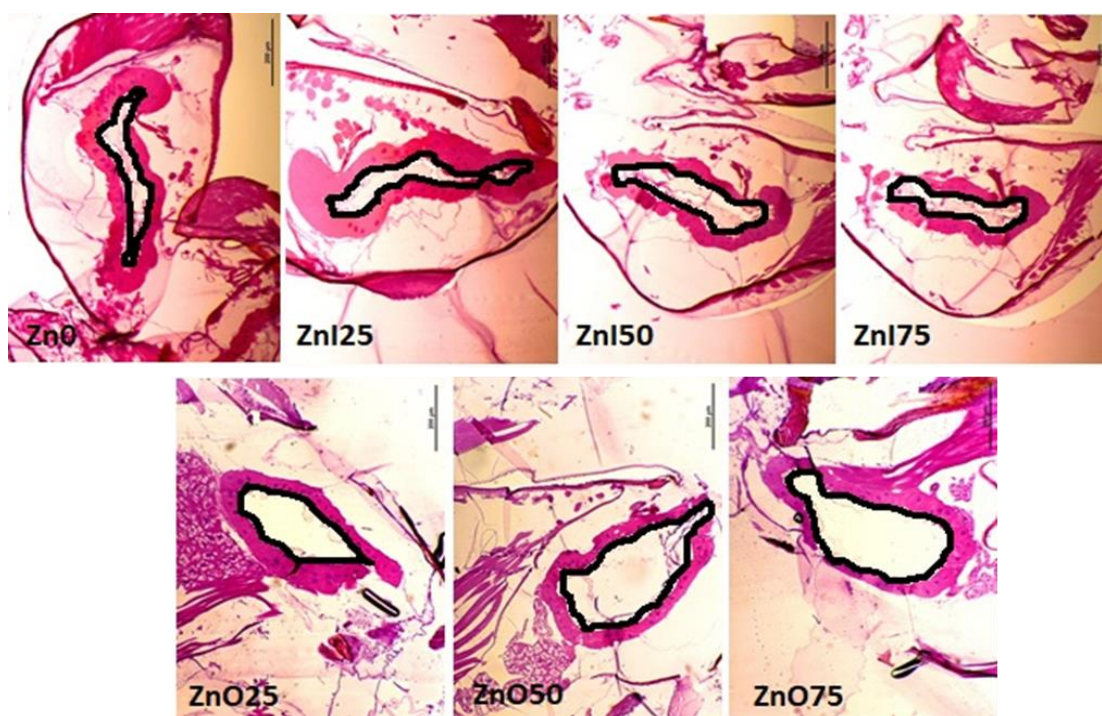


Figure 1. Representative photomicrographs of the area of the mandibular gland of *Apis mellifera* bees. Zn0: control; ZnI25: 25 ppm of inorganic zinc; ZnI50: 50 ppm of inorganic zinc; ZnI75: 75 ppm of inorganic zinc; ZnO25: 25 ppm of organic zinc; ZnO50: 50 ppm of organic zinc; ZnO75: 75 ppm of organic zinc. Scale bars 200 μ m.

4. DISCUSSION

The purpose of the present study was to evaluate the effect of organic and inorganic Zn supplementation in the honeybee diet on the development of the mandibular glands, under field conditions, with the honeybees having access to foraging activities.

The mandibular glands are important for colony development in honeybees and their size is an indication of their activity, reflecting the amount of protein secreted. Thus, the mandibular glands has been used as an indicator of development and activity under different conditions of management and nutrition (Smodiš-Škerl and Gregorc

2010). Several factors may affect the development of the mandibular glands, such as the caste and physiological age of bees, contact with pesticides, juvenile hormone concentration that is increased in queen bees, and swarm nutrition (Pankiw et al. 1998; Salles and Cruz-Landim, 2004; Zaluski et al. 2017).

Observed that organic Zn treatments (i.e., ZnO25, ZnO50, and ZnO75) positively altered the development of the mandibular glands in the different treatments studied. Zn is fundamentally important as a structural and functional component of living beings and is present in metalloproteins and plays a catalytic role in enzymatic systems (Haraguchi 2014; Maret 2017). Zn is the mineral that is present in the largest number of cells and plays a fundamental role in the function of more than 300 classes of enzymes. Of all the minerals that bind to proteins, Zn is the most abundant (Shi and Chance 2011).

Supplementation with organic Zn can modulate the nutritional and physiological status of worker bees. The amount of royal jelly secretion is directly related to the size of the mandibular glands, showing that well-developed glands produce more royal jelly, a hypothesis that would directly influence colony nutrition and development (Deseyn and Billen 2005; Peters et al. 2010).

The honeybees in the control and inorganic Zn groups did not positively modulate the glands, showing less development of the mandibular glands compared to the organic Zn groups. According to a study by Longuini et al. (2021) demonstrate that vital proteins and metabolic processes are impaired in nursing honeybees exposed to the mineral zinc in its inorganic form in all doses used affecting nutrition and maintenance of colonies, at the study aimed to evaluate the quality of royal jelly produced by honeybees *Apis mellifera* supplemented with different concentrations of inorganic zinc (zinc sulfate monohydrate - 0, 25, 50, and 75 ppm).

These results can be explained based on the hypothesis that the source (organic or inorganic) in which the mineral is offered may interfere with its bioavailability; minerals linked to organic molecules, called chelates, feature advantages over the inorganic form, with better absorption and less competition for binding sites with other minerals, suggesting that the supplementation of organic Zn positively modulated the nutrition of the swarms (Haraguchi 2014; Maret 2017). We concluded from the present study that the supplementation of organic Zn in the diet of *A. mellifera* positively modulated the development of the mandibular glands, contributing to better nutrition and maintenance of the colonies.

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Daniel C. B. de Barros: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data Curation, Writing – Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Project administration. **Marcelo P. Camilli:** Conceptualization, Investigation. **Gabriel M. Martineli:** Conceptualization, Methodology, Investigation. **Aimê A. Longuini:** Conceptualization, Investigation. **Samir M. Kadri:** Conceptualization, Methodology, Investigation. **Luis A. Justulin:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Software, Data Curation. **Ricardo O. Orsi:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing , Visualization, Supervision, Funding acquisition.

CONFLICT OF INTEREST

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

REFERENCES

- Brodschneider, R., Crailsheim, K. (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*. 41, 278-294
- Butler, C.G. (1946) The provision of supplementary food to hive bees. *Annals of Applied Biology*. 33(3), 307-309
- Cruz-Landim, C., Abdalla, F.C. (2009) Bees: morphology and function of systems. São Paulo: Ed. UNESP. 416
- Deseyn, J., Billen, J. (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*. 36, 9-57
- Eşanu, D., Pop, I.M., Simeanu, D. (2018) The Influence of Some Supplementary Feeds on Food Consumption and Body Weight of Caged Honeybees. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies/Lucrari Stiintifice: Zootehniesi Biotehnologii*. 51(1)
- Faa, G., Nurchi, V.M., Ravarino, A., Fanni, D., Nemolato, S., Gerosa, C., Eyken, P.V., Geboes, K. (2008) Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coord. Chem. Rev.* 252, 1257-1269
- Feng, M., Fang, Y., Li, J. (2009) Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. *BMC Genomics*. 10, 645–657
- Gupta, R.K. (2014) Taxonomy and distribution of different honeybee species. *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security*. Netherlands. 1, 63-103

Haraguchi, H. (2014) Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 19(1), 5-14

Herbert, E.W., Shimanuki, H. (1978) Mineral Requirements for Brood-Rearing by Honeybees Fed a Synthetic Diet. *Journal of Apicultural Research*. 17(3), 118-122

Indorf A., Rickli M., Kilchenmann V., Bogdanov S., Wille H. (1998) Nitrogen and mineral constituents of honey bee worker brood during pollen shortage. *Apidologie*. 29, 315–325

Ingraham, T.R., Kellogg, H.H. (1963) Thermodynamic properties of zinc sulfate, zinc basic sulfate, and the system Zn-SO. Queen's Printer.

Kamakura, M. (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*. 473, 478–483

Labadi, I., Parkanyi, L., Kenessey, G., Liptay, G. (1993) Thermal stability and crystal structure of bis (1, 2 ethanediol) zinc sulfate. *Journal of crystallographic and spectroscopic research*. 23(4), 333-338.

Legg, S.P., Sears, L. (1960) Zinc sulphate treatment of parakeratosis in cattle. *Nature*. 186(4730), 1061-1062

Li, J., Wu, J., Rundassa, D.B., Song, F., Zheng, A., Fang, Y. (2010) Differential protein expression in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: underlying caste differentiation. *PLoS One*. 5(10), e13455

Longuini, A. A., Martineli, G. M., Camilli, M. P., Barros, D. C. B., Vieira, J. C. S., Padilha, P., Orsi, R. O. (2021). Supplementation with an Inorganic Zinc Source in the Metalloproteomic Profile of Royal Jelly in *Apis mellifera* L. *Biological Trace Element Research*, 1-11.

Maage, A., Julshamn, K., Berge, G.E. (2001) Zinc gluconate and zinc sulphate as dietary zinc sources for Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition*. 7(3), 183-187

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

Omar, E., Abd-Ella, A., Khodairy, M., Moosbeckhofer, R., Crailsheim, K., Brodschneider, R. (2017) Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 48(4), 425-436

Pankiw, T., Winston, M.L., Robinson, G.E. (1998) Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *Journal of insect physiology*. 44(7-8), 685-692

Penick, C.A., Crofton, C.A., Holden Appler, R., Frank, S.D., Dunn, R.R., Tarpy, D.R. (2016) The contribution of human foods to honey bee diets in a mid-sized metropolis. *Journal of Urban Ecology*. 2(1)

Peters, L., Zhu-Salzman, K., Pankiw, T. (2010) Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 56, 132–137

Salles, H.C., Cruz-Landim, C. (2004) Effect of the juvenile hormone on the development of the mandibular gland in workers' pupae of *Apis mellifera* L. *Braz J Biol.* 64(3), 691–695

Shi, W., Chance, M. R. (2011) Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. *Current opinion in chemical biology*. 15(1), 144-148.

Smodiš-Škerl, M.I., Gregorc, A. (2010) Heat shock protein and cell death in situ localization in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie*. 41, 73-86

Yu, Z.P., Le, G.W., Shi, Y.H. (2005) Effect of zinc sulphate and zinc methionine on growth, plasma growth hormone concentration, growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I gene expression in mice. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 32(4), 273-278

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

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

Zhang, G.E., Zhang, W., Qui, X., Baohua, X. (2015) Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. *Entomol. Exp. Appl.* 156, 201-210

Capítulo III

Implicações

Há uma grande escassez de informações sobre os minerais na nutrição de abelhas *Apis mellifera*, pouco se sabe sobre os níveis adequados de suplementação, efeitos e fontes minerais que podem ser oferecidas às colônias. Minerais como o zinco são fundamentais como componentes estruturais e funcionais, constituem as metaloproteínas e atuam como cofator enzimático, participando do metabolismo, regulação da expressão gênica, manutenção estrutural de biomembranas, imunidade e proteção contra radicais livres, síntese de proteínas, entre outras.

Espera-se que esse trabalho possa contribuir com informações para a área de suplementação mineral de abelhas, permitindo contribuir com a mensuração da real exigência nutricional do Zn para a dieta durante o período de entressafra. Novas pesquisas devem ser realizadas com objetivo de determinar níveis nutricionalmente seguros de minerais na dieta das abelhas, e sugerem-se novas pesquisas com maiores proporções do mineral Zn na dieta.