

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO EM GLÂNDULAS
HIPOFARINGEAS E TEOR PROTEICO DA GELEIA REAL EM ABELHAS
*APIS MELLIFERA L.***

MARCELA PEDRAZA CARRILLO

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

BOTUCATU – SP

Junho – 2016

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

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO EM GLÂNDULAS
HIPOFARINGEAS E TEOR PROTEICO DA GELEIA REAL EM ABELHAS
*APIS MELLIFERA L.***

MARCELA PEDRAZA CARRILLO

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

COORIENTADOR: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

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

BOTUCATU – SP

Julho – 2016

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

C317e Carrillo, Marcela Pedraza, 1989-
Efeito da suplementação de zinco em glândulas hipofaríngeas e teor proteico da geleia real em abelhas *Apis mellifera* L. / Marcela Pedraza Carrillo. - Botucatu: [s.n.], 2016
iv, 42 f. : fots. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2016

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha

Inclui bibliografia

1. Abelha - Criação. 2. Abelha - Nutrição. 3. Proteínas. 4. Minerais na nutrição animal. I. Orsi, Ricardo de Oliveira. II. Padilha, Pedro de Magalhães. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Aos meus pais Vivian e Marcelo,
Pelo exemplo, incentivo, amor e carinho
Minha eterna gratidão.

Agradeço

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

Ao Cnpq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa e reserva técnica concedida. Processo : 2014/14699-9.

Aos meus pais, Vivian e Marcelo por toda dedicação, amor e carinho, por sempre estarem ao meu lado me apoiando. Minha eterna gratidão, admiração e respeito.

Ao meu irmão, Caio, pelo companheirismo e amizade, e por simplesmente existir na minha vida e ser muito importante.

Ao meu orientador e amigo, Professor Doutor Ricardo de Oliveira Orsi, por todos os ensinamentos, pela dedicação e paciência.

Aos meus colegas do grupo Nectar, Thais, Melina, Edson, Adriana, Rodrigo, Cinthia, Mauricio, Welington, Samir, Alex, Adriano e Mauricio pelo companheirismo, atenção, ajuda e pelas comilanças.

Aos meus amigos de pós-graduação, Daniela e Igor, por terem feito minhas aulas da pós muito mais animadas, por todos os nossos encontros, sempre muito agradáveis, pela amizade e carinho.

A minha fiel amiga de graduação Viviane, pelo seu apoio e companheirismo, mesmo com a distância, é muito bom saber que sempre posso contar com você.

As minhas amiga de república, Lais(tira), Mariana(Xarope), Raísa (Mini), Natália (Petekia), Thais(Méto) e Fernanda, por compartilharem momentos inesquecíveis durante todos esses anos e espero que durante muitos mais.

Aos meus amigos Rogério, Bruna, Nani, Taia e Guilherme, pela nossa amizade de anos, pura e sincera, que apesar de estarmos seguindo nossas vidas, quando nos encontramos parece que o tempo nunca passou. Amo vocês!

Ao meu namorado, Diego, pelo companheirismo, carinho, amor e muita paciência! A você!

Ao professor Pedro de Magalhães Padilha e todos do laboratório de química, Alis, José, João, Bruna, Camila e Vania, por toda ajuda e paciência.

Ao professor Luis Antonio Justulin Junior, e todos do laboratório de morfologia, mas principalmente ao Sergio e a Vivian, por toda ajuda e paciência.

Aos professores Dalanezi e Simone, por aceitarem a participar da minha banca, e por serem um exemplo de seres humanos e profissionais.

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

Sumário

CAPÍTULO I	1
Considerações iniciais	2
1. As abelhas <i>Apis mellifera</i> L.	2
1.1. Histórico	2
1.2. Exigências nutricionais das abelhas <i>Apis mellifera</i>	3
1.3. Glândulas hipofaringeanas	5
2. Proteômica e metaloproteômica	6
3. Referências Bibliográficas	9
CAPÍTULO II	13
Resumo	14
Abstract	15
1. Introdução	16
2. Material e métodos	17
2.1. Local do Experimento	17
2.2. Tratamentos	17
2.3. Desenvolvimento de Glândulas Hipofaringeanas	18
2.4. Indução da produção de geleia real	20
2.5. Obtenção da massa proteica da geleia real	20
2.6. Separações eletroforéticas	21
2.7. Análises Estatísticas	22
3. Resultados	23
4. Discussão	28
5. Conclusão	30
6. Referências	31
CAPÍTULO III	33
Implicações	34
ANEXOS	35

CAPÍTULO I

Considerações iniciais

1. As abelhas *Apis mellifera* L.

1.1. Histórico

Abelhas são insetos pertencentes à ordem dos himenópteros e família dos apídeos, sendo conhecidas cerca de vinte mil espécies diferentes. Entre elas as do gênero *Apis* e espécie *mellifera* são as mais utilizadas para serviços de polinização, produção de mel, geleia real, cera, própolis e pólen (Ramos e Carvalho, 2007).

As abelhas *A. mellifera* originaram-se no continente africano e, em seguida, em dois eventos diferentes e anteriores à chegada do *Homo sapiens*, migraram para a Ásia e Europa diferenciando-se em subespécies fisiológica, comportamental e morfologicamente distintas (Parker et al., 2010).

A interação entre seres humanos e abelhas *A. mellifera* é muito antiga; existem registros de abelhas encontrados em pinturas de cavernas e manuscritos de livros científicos, gravuras feitas em cavernas datadas de 7.000 a.C., que mostram o ser humano colhendo mel de ninhos silvestres de forma extrativista, sem qualquer tipo de cuidado, causando danos à estrutura e longevidade dos enxames (Crane, 1999).

Assim, com o processo da expansão territorial europeia e a colonização das novas terras, as abelhas que antigamente ocupavam apenas o Velho Mundo foram introduzidas em locais onde não se tinham registros de sua existência. Os primeiros ninhos de *Apis mellifera* encontrados nas Américas datam do século XVII, no ano de 1621 (Crane, 1999).

O Padre Antônio Carneiro conseguiu autorização do rei D. Pedro II, em março de 1839, para importar para o estado do Rio de Janeiro, proveniente da cidade de Porto em Portugal, as primeiras abelhas europeias da subespécie *A. mellifera mellifera* (Wiese, 2005).

No Rio Grande do Sul, imigrantes alemães, entre os anos de 1870 e 1880, trouxeram as abelhas *Apis mellifera ligustica*. Outras subespécies também foram trazidas por imigrantes europeus, disseminando-se, assim, as abelhas *A. mellifera* por todo território brasileiro (Wiese, 2005).

Em 1956, foi introduzida, na cidade de Rio Claro, a abelha *A. mellifera scutellata*, ou abelha africana, com o objetivo de melhorar a produção nacional de mel (Gonçalves, 2006).

No ano seguinte, 26 enxames, com suas respectivas rainhas africanas, escaparam e se estabeleceram como colônias selvagens. Iniciou-se então uma rápida expansão das abelhas africanas por todo o Brasil realizando um inter cruzamento com as várias subespécies europeias aqui existentes, originando um descendente híbrido, denominado abelha africanizada, tendo predominância das características das abelhas africanas (De Jong, 1996; Gonçalves, 2006).

Este novo híbrido apresentou desempenho superior às abelhas europeias presentes no continente americano. Além da alta capacidade de produção, essa nova abelha demonstrou importantes características como rápida adaptação, desenvolvimento populacional, rusticidade, resistência a doenças, eficiência na polinização e maior capacidade de identificação de fonte de alimento (Couto e Couto, 2006).

As abelhas africanizadas se espalharam pelas Américas, cuja migração para áreas tão distantes pode ser explicada pela capacidade deste híbrido de voar longas distâncias e pela alta frequência de enxameamento, que pode ocorrer de 6 a 12 vezes ao ano, enquanto que as demais abelhas podem enxamear (deixar a colmeia para instituir outra colônia) de 2 a 3 vezes (Mitchell, 2006).

1.2. Exigências nutricionais das abelhas *Apis mellifera*

Toda colmeia, em condições normais, possui uma rainha, que é a responsável pelo equilíbrio populacional da colmeia; enquanto as operárias são responsáveis pela execução de todos os trabalhos dentro e fora da colmeia; já os zangões, participam do voo nupcial (Wiese, 2005).

As abelhas necessitam de reservas de alimento suficientes para atender a sua própria alimentação e das crias em desenvolvimento. Em épocas de escassez de néctar e pólen, é comum os apicultores perderem seus enxames que, enfraquecidos em razão da falta de alimento na região, que migram à procura de maior oferta de alimento (Marchini et al., 2006).

As características produtivas e reprodutivas de colônias de abelhas são influenciadas pelo clima e disponibilidade de alimento na região. Assim, durante o

período de inverno, época de maior escassez de alimento, os apicultores devem fornecer alimentação artificial que assegura a continuidade do desenvolvimento da colônia, e assim prepará-los para coletar néctar, polinizar plantações e aumentar a produção da rainha, que, conseqüentemente, aumenta o número de operárias (Carrillo et al, 2014).

Os nutrientes requeridos pelas abelhas *Apis mellifera*, guardadas as suas particularidades, são os mesmos requeridos por outras espécies animais: proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais e água. A diferença entre as abelhas e outros animais é que para as abelhas em condições naturais, todos esses nutrientes necessários à sua alimentação provêm apenas do néctar, pólen e água. O néctar satisfaz as necessidades de carboidratos, fundamental para a geração de energia; o pólen supre o requerimento de proteínas, minerais, lipídeos e vitaminas; e a água cumpre papel de transporte e dissolução de substâncias, e serve de meio para várias reações químicas (Couto, 1996).

O pólen possui funções fundamentais no desenvolvimento adequado de crias e nutrição de abelhas jovens, funcionamento de glândulas e ovários e formação de gorduras corporais (Campana e Moeller, 1977; Marchini et al., 2006). Seu constituinte mais importante é a proteína, cujo conteúdo pode variar de 4 a 34%, sendo a única fonte natural disponível deste nutriente para as abelhas (Winston, 2003; Estevinho et al., 2011).

As proteínas possuem importantes funções em todos os seres vivos. Os teores de proteína no pólen são extremamente importantes para a nutrição da colmeia, pois durante os primeiros cinco ou seis dias de vida adulta, as abelhas operárias consomem grandes quantidades de pólen para obter um nível adequado de proteínas e aminoácidos necessários para completar o seu crescimento e desenvolvimento. Da mesma forma, se as abelhas operárias jovens não consomem quantidade ideal de proteínas, suas glândulas hipofaríngeas não se desenvolvem completamente e a produção de geleia real pode ficar prejudicada (Standifer, 2003).

A deficiência de proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e água, podem prejudicar o desenvolvimento, manutenção e reprodução das colônias, reduzir a vida das abelhas, provocar estresse e facilitar o aparecimento de doenças, afetar a capacidade das abelhas de cuidarem das crias novas, como também a composição bromatológica das pupas, diminuindo o nível de proteína bruta e minerais em até 8,4 e 38,5%, respectivamente (Funari et al., 1998).

Alguns mineirais são considerados macroelementos essenciais como o cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre; e como microelementos essenciais o cobre, cobalto, ferro, iodo, manganês, selênio e zinco (Weckwerth, 2007), são necessários às abelhas, e também obtidos do pólen.

Embora o pólen coletado pelas abelhas apresente minerais em sua composição (Couto e Couto, 2002; Marchini et al., 2006; Modro et al., 2007), em determinadas épocas do ano, em função da disponibilidade de recursos florais ao entorno do apiário, este teor pode encontrar-se reduzido, afetando o desenvolvimento da colmeia.

O mineral zinco (Zn) é importante para o funcionamento celular normal, 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).

Além disso, apresenta importância fundamental como componente estrutural e funcional dos seres vivos; no aspecto estrutural estão presentes nas metaloproteínas, e no aspecto funcional, o papel catalisador que esse íon exerce nos sistemas enzimáticos (Haragushi, 2004).

O zinco ligado às proteínas participa no estabelecimento permanente e modulação transitória das interações entre proteínas, exercendo funções catalíticas e inibitórias enzimáticas, arranjos e desarranjos de complexos de subunidades macromoleculares e formação de proteína/receptor complexo (Maret, 2003).

O zinco é o mineral que está presente em maior quantidade nas células e com papel fundamental na função de mais de 300 classes de enzimas. De todos os minerais que se ligam a proteínas, o zinco é o mais abundante (Shi e Chance, 2011). Por isso o zinco tornou-se um foco de investigação nos processos de controle da expressão gênica e outros mecanismos biológicos (Valle et al, 1993).

1.3. Glândulas hipofaríngeas

As glândulas mandibulares e hipofaríngeas produzem substâncias complementares que se misturam formando a geleia real, sendo esse alimento uma complexa composição de açúcares, água, proteínas, colesterol, aminoácidos e vitaminas, com 90% de suas proteínas pertencentes ao mesmo grupo químico; porém, há cinco

outros grupos que se destacam pela elevada quantidade de aminoácidos essenciais (Deseyn e Billen, 2005).

As glândulas hipofaringeanas em seu máximo desenvolvimento formam cachos com acinos pluricelulares, que ligam-se a um ducto principal (Huang et al., 1989), e estão presentes na cabeça da operária e suas células 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; Kamakura, 2011).

As glândulas hipofaringeanas também produzem a enzima glicose-oxidase, a qual tem ação intracelular, atuando na própria síntese de geleia real. Quando na fase de campeira, as glândulas hipofaringeanas das operárias produzem as enzimas invertase, α -glicosidase e amilase, que possuem ação extracelular, atuando na digestão e processamento do mel (Costa, 2002; Cruz-Landim e Abdalla, 2009).

Deseyn e Billen (2005) verificaram que abelhas na fase de nutriz com seis dias de idade apresentam a glândula mais desenvolvida, quando comparada a abelhas com 0, 3, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 dias de vida. Os autores demonstraram que o tamanho da glândula é relacionado com a atividade da mesma, sendo que indivíduos recém-emergidos apresentaram-na pouco desenvolvida e com 15 dias de idade observou-se redução no tamanho dos ácinos. Esses autores também elucidaram que a quantidade de geleia real secretada está diretamente relacionada ao tamanho dos ácinos, mostrando que glândulas bem desenvolvidas produzem mais geleia real.

Para essas abelhas, a quantidade e qualidade do pólen consumido são imprescindíveis ao desenvolvimento de suas glândulas hipofaringeanas. O tamanho e desenvolvimento desta glândula são representados pelo diâmetro de seus ácinos e estão relacionados ao total de proteínas consumido (Pernal e Currie, 2000).

2. Proteômica e metaloproteômica

O proteoma é o conjunto de proteínas expresso por um determinado organismo, que permite compreender os efeitos estruturais e funcionais causados por fatores ambientais, incluindo a nutrição (Wilkins et al, 1996); enquanto o genoma proporciona

somente informação estática, o proteoma fornece uma visão geral do funcionamento da célula (Manso et al., 2005).

Já a metalômica está relacionada com genômica e proteômica, pois a síntese e funções metabólicas dos genes e proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos. As metaloproteínas podem ser definidas como aquelas proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas são dependentes de um íon metálico para exercer sua atividade biológica (Romanowski et al., 2001; Garcia et al., 2006). Neste sentido, a metalômica pode ficar na mesma posição em importância científica como genômica e proteômica (Haragushi, 2004).

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

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

Embora os íons metálicos constituam pequena porção do tecido corporal dos seres vivos (4%), estes são essenciais como componentes estruturais e em diversos processos vitais, com funções estruturais e funcionais. Na parte estrutural, destaca-se seu papel como integrantes de compostos orgânicos corporais. Na parte funcional, como catalisador de sistemas enzimáticos, por exemplo (Hilton, 1989).

O estudo de metaloma pode fornecer informações tais como: (i) elemento (espécie metálica ou metalóide) distribuído entre os compartimentos celulares de determinado tipo de célula; (ii) seu meio de coordenação (à qual a biomolécula está incorporada ou a qual o bioligante está complexado); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes; e (iv) a estrutura da biomolécula (Gómez-Ariz et al., 2004; Szpunar, 2005; Mounicou et al., 2009).

Devido ao importante papel que essas biomoléculas exercem sobre as atividades biológicas dos seres vivos, novas áreas científicas, denominadas metalômica e metaloproteômica, foram propostas e permitiram a integração de estudos

tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos (Haragushi, 2004; Garcia et al., 2006). Técnicas importantes frequentemente empregadas na metaloproteômica incluem ferramentas clássicas da proteômica, como espectrometria de massas e 2D-PAGE, cromatografia de afinidade, bioinformática para análise de sequências e modelagem 11 por homologia, espectroscopia de absorção de raios-X e outras ferramentas baseadas em radiação síncrotron. A combinação dessas técnicas fornece uma abordagem poderosa para o entendimento da função das metaloproteínas (Shi e Chance, 2011).

Assim o desenvolvimento da colmeia está ligado à nutrição, e pode ser observada nas glândulas hipofaringenas, que quanto mais desenvolvida maior sua quantidade proteica, em que o mineral zinco tem influência, pois se liga as metaloproteínas, e esse desenvolvimento da glândula é de grande importância para a produção de geleia real, alimento utilizado por larvas jovens e rainhas, que são as responsáveis pelo desenvolvimento populacional da colmeia.

Diante deste contexto, o estudo da influência do mineral zinco na nutrição da abelha e seu reflexo na glândula hipofaringeana e nas proteínas da geleia real são de extrema importância.

Assim, os objetivos do trabalho foram avaliar o efeito de suplementação de Zinco (Zn) na alimentação das abelhas e seus reflexos na glândula hipofaringeana e nas proteínas da geleia real.

De acordo com as normas do programa de pós graduação em Zootecnia, o capítulo II está apresentado de acordo com as normas de publicação na revista *Apidologie*.

3. Referências Bibliográficas

- ARNESANO, Fabio et al. An Italian contribution to structural genomics: understanding metalloproteins. **Coordination chemistry reviews**, v. 250, n. 11, p. 1419-1450, 2006.
- CAMPANA, B.J.; MOELLER, F.F. Honeybee preference for and nutritive value of pollen from five plants sources. **Journal of Economy Entomology**, v.70, p.39-41, 1977.
- CARRILLO, Marcela Pedraza et al. Energetic feedings influence beeswax production by *Apis mellifera* L. honeybees. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 37, n. 1, p. 73-76, 2015.
- COSTA, R.A.C. **Glândulas Hipofaringeas**, in: Cruz-Landim C. A. F. C. (Eds.), **Glândulas Exócrinas das Abelhas**, Funpec, pp.91-110, 2002.
- COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, p.193, 2006. BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. **Bee World**, v.60, p.24-39, 1979.
- COUTO, R.H.N. and COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 154p.
- COUTO, R.H.N. and COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 191p.
- CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1.ed. New York: Routledge, p.682, 1999.
- DA CRUZ LANDIM, Carmina. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. SciELO-Ed. UNESP, 2009.
- DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v.77, p.67-70, 1996.
- DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v.36, p.49-57, 2005.
- ESTEVINHO, L.M.; RODRIGUES, S.; PEREIRA, A.P.; FEÁS, X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**. p.1365-2621, 2011.

- 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.
- FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. **BMC Genomics**, v.10, p.645-657, 2009.
- FUNARI, S.R.C.; ROCHA, H.C.; SFORCIN, J.M.; CURI, P.R.; PEROSA, J.M.Y. Coleta de pólen e produção de mel e própolis em colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Boletim da Indústria Animal**, v.55, p.189-193, 1998.
- GARCIA, J.S.; MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. **Talanta**, v.69, p.1-15, 2006.
- GÓMEZ-ARIZ, J.L et al. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n.1-2, p. 15-22, 2004.
- GONÇALVES, L.S. Desenvolvimento e expansão da apicultura no Brasil com abelhas africanizadas, **Revista SEBRAE**, n.3, p.14-16, 2006.
- HARAGUCHI, Hiroki. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 1, p. 5-14, 2004.
- HILTON, John W. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. **Aquaculture**, v. 79, n. 1-4, p. 223-244, 1989.
- HUANG, Z.Y.; OTIS, G.M.; TEAL, P.E.A. Nature of brood signal activation of protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera) **Apidologie**, Versailles, v.20, p 455-464, June 1989.
- KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v. 473, p.478-483, 2011.
- MANSO, M. A. et al. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. **International dairy journal**, v. 15, n. 6, p. 845-855, 2005.

- MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p. 949-953, 2006.
- MARET, W. In Handbook of Metalloproteins, ed. A. Messerschmidt, Wiley, **Chichester, UK**, 2003.
- MITCHELL, A. Africanized killer bees: a case study. **Critical Care Nurse**, v.26, n.3, p. 23-32, 2006.
- MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA NETO, J.A.A. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. Pesquisa. **Agropecuária Brasileira** (Online), v.42, p.1057-1065, 2007.
- MOUNICOU, Sandra; SZPUNAR, Joanna; LOBINSKI, Ryszard. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 4, p. 1119-1138, 2009.
- PARKER, R.; MELATHOPOULOS, A.P.; WHITE, R.; PERNAL, S.F.; GUARNA, M.M.; FOSTER, L.J. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. **PloS One**, v.5, n.6, p.1-12, 2010.
- PERNAL, S.F.; CURRIE, R.W. Pollen quality of fresh na 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, v.31, p.387-409, 2000.
- RAMOS, Juliana Mistrone; CARVALHO, NC de. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de apis mellifera. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 6, n. 10, 2007.
- ROMANOWSKI, S.M.; MANGRICH, A.S.; NEVES, A. Síntese e caracterização de novos compostos de coordenação de cobre (II) com ligantes não simétricos N,O-doadores: contribuições para o sítio ativo da galactose oxidase. **Química Nova**, v.24, p.592-598, 2001.
- SHI, W; CHANCE, M.R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, n.1, p. 144-148, 2011.
- STANDIFER, L.N. Honey bee nutrition and supplemental feeding. Agriculture Handbook, 2003. Disponível em: <http://www.beesource.com/resources/usda/honeybee-nutrition-and-supplemental-feeding/> Acesso em: 09/07/2016.

SZPUNAR, Joanna. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. **Analyst**, v. 130, n. 4, p. 442-465, 2005.

VALLEE, Bert L.; FALCHUK, Kenneth H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological reviews**, v. 73, n. 1, p. 79-118, 1993.

WIESE, Helmuth. **Apicultura: novos tempos**. Agrolivros, 2005.

WILDE, J.; BEETSMA, J. The physiology of caste development in social insects. **Advances in Insect Physiology**, v.16, p.167-246, 1982.

WILKINS M.R., SANCHEZ J.C., GOOLEY A.A., APPEL R.D., HUMPHERYSMITH I., HOCHSTRASSER D.F., WILLIAMS K.L. Progress with proteome projects: 19 why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biot. Genetic**, v.13, p.19-50, 1996.

WINSTON, M. L. **A Biologia da Abelha**. Porto Alegre: Magister, 2003. 276 p.

CAPÍTULO II

Efeito da suplementação de zinco em glândulas hipofaringeanas e teor proteico da geleia real em abelhas *Apis mellifera* L.

Resumo

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito de suplementação de zinco, na alimentação de inverno das abelhas, e seus reflexos na glândula hipofaringeana (GH) e conteúdo proteico da geleia real. Para isto, foram utilizadas 12 colmeias (03 colmeias por tratamento) distribuídas de forma aleatória nos seguintes tratamentos: Controle (sem suplementação de Zn), T1 com suplementação de 0,5 mg mL⁻¹ de Zn; T2 com suplementação de 1,0 mg mL⁻¹ de Zn e, T3 com suplementação de 1,5 mg mL⁻¹ de Zn. A fonte de zinco utilizada foi Sulfato de Zinco heptahidratado (20% de zinco), diluído em xarope de açúcar, e fornecido a cada 07 dias para os enxames (500 mL). Para a morfometria da glândula, foram coletadas 20 abelhas de cada tratamento com seis dias de idade (previamente marcadas na região do pronoto), nos meses de junho e julho. As lâminas foram processadas em cortes de resina e analisadas utilizando o software de análise de imagem Leica Qwin Plus®. Mensalmente, foi estimulada a produção de geleia real e a concentração de proteínas totais determinada de acordo com o método do Biureto, sendo posteriormente realizadas as separações eletroforéticas em corrida de primeira e segunda dimensão. Os géis obtidos foram escaneados e as imagens analisadas, utilizando-se o programa Image Master Platinum 7.0. Após calculou-se o número de spots protéicos para cada tratamento. Os resultados obtidos foram comparados por ANOVA, seguida do teste de Tukey (P<0,05). Verificou-se que a suplementação com o mineral Zn promoveu, em um primeiro momento, maior desenvolvimento da GH em todos os tratamentos; entretanto, este efeito desapareceu nos meses seguintes, sugerindo modulação na fisiologia ou toxicidade deste mineral para as abelhas. Com relação ao extrato protéico da geleia real, observou-se maior valor no mês julho para o T3. Por outro lado, o número de spots protéicos foi significativamente maior em todos os meses e tratamentos, em relação ao controle. Conclui-se que o zinco pode contribuir para o desenvolvimento da glândula hipofaringeana e enriquecimento protéico da geleia real.

Palavras-chave: apicultura, nutrição, proteínas, suplementação mineral

Abstract

The objectives of this study were to evaluate the effect of zinc supplementation in the winter feeding of bees, and the reflection on hypopharyngeal gland (GH) and protein content in royal jelly. For this, 12 hives were selected (03 hives for treatment) randomly distributed in the following treatments: control (no supplemental Zn), T1 supplemented with 0.5 mg mL⁻¹ Zn; T2 supplemented with 1.0 mg mL⁻¹ of Zn and T3 supplemented with 1.5 mg mL⁻¹ of Zn. The zinc used was zinc sulfate heptahydrate (20% zinc), diluted in sugar syrup, every 07 days for hives (500ml). For morphometry of the gland were collected 20 bees for treatment with six days of age (previously marked on the pronotum region) in the months of June and July. The laminae were processed in resin cuts and analyzed using image analysis software Leica Qwin Plus®. The royal jelly was stimulated for production monthly in the treatments and full protein concentration determined according to the Biuret method, and subsequently electrophoretic separations performed in the first run and the second dimension. The obtained gels were scanned and the images analyzed using the Image Master Platinum 7.0 software. After it was calculated that the number of protein spots for each treatment. The results were compared by ANOVA followed by Tukey test ($P < 0.05$). It was found that supplementation with mineral Zn promoted in the first moment, more development of GH in all treatments; however, this effect disappeared with the passing of months, suggesting modulation in physiology or toxicity of this mineral for the bees. With regard to the protein extract of royal jelly, the higher value was observed in the month July for the T3. Moreover, the number of protein spots was significantly higher in every month and treatments compared to control. It is concluded that zinc can contribute to the development of hypopharyngeal gland and protein enrichment of royal jelly.

Keywords: beekeeping, nutrition, protein, mineral supplements

1. Introdução

Os teores de proteína no pólen são extremamente importantes para a nutrição da colmeia, pois durante os primeiros 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 desenvolvimento da glândula hipofaringeana. Da mesma forma, se as abelhas operárias jovens não consomem quantidade ideal de proteínas, suas glândulas hipofaringeanas não se desenvolvem completamente e a produção de geleia real pode ficar prejudicada (Standifer, 2003).

As glândulas mandibulares e hipofaringeanas produzem substâncias complementares que se misturam formando a geleia real, sendo esse alimento, uma complexa composição de açúcares, água, proteínas, colesterol, aminoácidos e vitaminas (Deseyn e Billen, 2005). As glândulas hipofaringeanas estão presentes na cabeça da operária e suas células 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; Kamakura, 2011).

Os minerais como o zinco apresentam importância fundamental como componentes estruturais e funcionais dos seres vivos; no aspecto estrutural estão presentes nas metaloproteínas, e no aspecto funcional, o papel catalisador que esses íons exercem nos sistemas enzimáticos (Haragushi, 2004). O conhecimento de fatores que podem afetar o desenvolvimento de glândulas hipofaringeanas e a qualidade da geleia real produzida é de extrema importância para apicultura, auxiliando em estratégias de suplementação alimentar e melhor entendimento de como práticas de manejo podem afetar o enxame de abelhas.

Assim o estudo de nutrientes como o mineral zinco para a formulação de uma dieta adequada para enxames em épocas de escassez de alimento, é de extrema importância para o meio apícola, pois uma nutrição adequada influencia no fortalecimento dos enxames e consequentemente a produção dos produtos da colmeia.

Desta forma, os objetivos da presente pesquisa foram avaliar o efeito de suplementação de Zinco (Zn), em épocas de escassez de alimento para as abelhas, e seus reflexos na glândula hipofaringeana e no teor proteico da geleia real.

2. Material e métodos

2.1. Local do Experimento

O projeto foi desenvolvido no Setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizado na Fazenda Experimental Lageado, UNESP, Campus de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22° 49' de latitude sul e 48° 24' de longitude Oeste, com clima tipo Cfa e altitude média de 623 metros.

2.2. Tratamentos

Anteriormente ao início dos experimentos, foram realizados testes em laboratório, com abelhas campeiras coletadas em colmeias de apoio, para verificar o consumo e aceitação de xarope de açúcar (água e açúcar na proporção 1:1) contendo zinco inorgânico (Sulfato de Zinco heptahidratado contendo 20% de zinco da marca Dinâmica) em diferentes concentrações (50,0; 40,0; 30,0; 15,0; 12,5; 10,0; 7,5; 5,0; 2,5; 1,5; 1,0 e 0,5 mg mL⁻¹). Verificou-se que concentrações de Zn acima de 1,5 mg mL⁻¹ deixaram o xarope de açúcar viscoso e de difícil consumo pelas abelhas; desta forma, optou-se por utilizar as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mg mL⁻¹ de Zn.

As colmeias utilizadas foram padronizadas quanto ao número de quadros de cria e alimento. O xarope de açúcar com e sem zinco começaram a ser oferecido um mês antes do início das coletas tanto das abelhas quanto a indução da produção de geleia real.

Assim, as colmeias foram divididas nos seguintes tratamentos (03 colmeias / tratamento):

- Tratamento Controle: sem suplementação com Zn;
- Tratamento 1: Suplementação com Zn na concentração de 0,5mg mL⁻¹;
- Tratamento 2: Suplementação com Zn na concentração de 1,0 mg mL⁻¹;
- Tratamento 3: Suplementação com Zn na concentração de 1,5 mg mL⁻¹.

A fonte de zinco inorgânico foi administrada a cada sete dias, por meio de alimentador tipo Boardman, durante os meses de junho, julho e agosto, correspondente ao período de inverno ou entressafra na região do estudo.

2.3. Desenvolvimento de Glândulas Hipofaringeanas

- Colheita das abelhas

A colheita das abelhas foi baseada na metodologia descrita por Oliveira (2013). Nos meses de junho e julho, foram colhidas 20 abelhas operárias com seis dias de idade, provenientes de um quadro aleatório de uma colmeia de cada tratamento a cada mês. Para isso, foram retirados um quadro com cria operculada de cada tratamento; em seguida, estes foram envolvidos individualmente em tecido filó, para que os adultos permanecessem presos após a emergência das células de cria. Os quadros foram colocados em estufa com temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ e umidade $\pm 60\%$ até a emergência dos adultos. As operárias nascidas foram marcadas na região do pronoto com caneta atóxica, ainda presas ao quadro, por cima do tecido filó. Após serem marcadas, as abelhas foram reintroduzidas em seus enxames de origem.

Essas abelhas foram colhidas com auxílio de pinça entomológica e imediatamente armazenadas em potes plásticos com furos para facilitar a entrada de ar. Logo após, foram eutanasiadas (anestesiadas com CO_2 e posteriormente decapitadas com bisturi) e suas cabeças fixadas em formaldeído a 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 24 horas.

Após, as cabeças das abelhas foram lavadas em água corrente por mais 24 horas, sendo então adicionado álcool etílico a 70%, permanecendo nessas condições até o processamento para análises histológicas.

- Morfologia e Morfometria

Os procedimentos foram baseados e adaptados de Smodiš-Škerl e Gregorc (2010).

O material foi processado em série crescente de etanol, sendo embebido em resina metacrilato (Historesin - Leica). Após a embebição em resina, as cabeças das

abelhas foram incluídas em moldes plásticos com a resina de montagem formando os blocos para produção de lâminas. Em cada bloco foram colocadas duas cabeças, que secaram por um período de 24 horas. Em seguida os blocos são soltos dos moldes para serem colados (com cola araldite) em madeira.

Na seqüência os blocos foram levados ao micrótomo rotativo automático e cortes de 3µm são produzidos com navalha de vidro. Os cortes foram colhidos e imediatamente colocados em lâminas para serem corados.

De cada bloco foram produzidos 130 cortes em série, os quais foram imediatamente dispostos em lâminas de vidro, sendo colocados 10 cortes por lâmina, totalizando 13 lâminas por bloco. Para cada mês analisado foram feitos 5 blocos (2 cabeças em cada bloco) que produz um total de 650 cortes para análise.

As lâminas contendo os cortes foram coradas em hematoxilina-eosina, secas em estufa e colocada uma lamínula colada com Entellan®.

- Análise da Área Acinar

Por meio de uma câmera digital acoplada ao microscópio os cortes foram fotomicrografados e analisados utilizando-se o software de análise de imagem Leica Qwin Plus® (Figura 1).

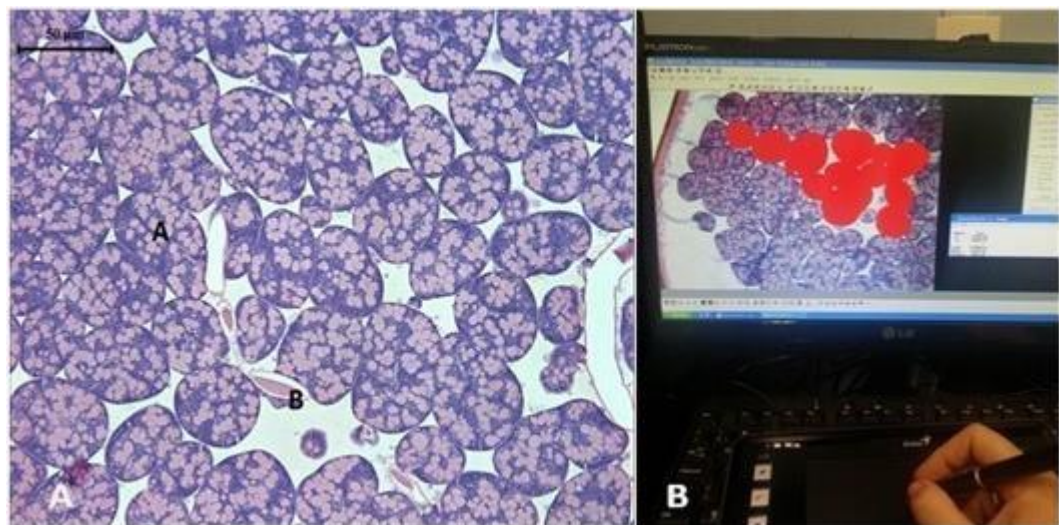


Figura 1: A. Fotomicrografia da glândula hipofaringeana de abelha operária com 6 dias de idade (fase de nutriz). A: ácino pluricelular; B: ducto excretor. Barra de escala: 50µ m; B. Uso do software de análise de imagens para determinação das áreas dos ácinos (em vermelho) com auxílio de mesa digitalizadora.

- *Cálculo do número médio de ácidos e da área média dos maiores ácidos secretores durante o período experimental.*

Para a quantificação do número médio e área média dos ácidos nas glândulas hipofaringea, foram analisadas 20 imagens histológicas de cada abelha (n=10), num total de 200 imagens. Com auxílio do software de análise de imagem Leica Qwin Plus® foi realizada contagem do número de ácidos por animal para cada grupo experimental. Além disso, utilizando-se o mesmo software, os ácidos foram contornados e a área média (μm^2) dos 10 maiores ácidos para cada grupo experimental foi determinada, isso porque após realizados testes observou-se que os 10 maiores eram representativos do todo. Todas as medidas foram salvas em planilhas do programa Excel®, para serem analisadas.

2.4. Indução da produção de geleia real

A produção de geleia real foi realizada segundo Doolittle (1899), pelo método de transferência de larvas. A produção de geleia real foi colhida após 48 horas da transferência e armazenada em frasco âmbar e em freezer (abaixo de 0°C) até o momento das análises.

2.5. Obtenção da massa proteica da geleia real

Para obtenção do extrato proteico, 250 mg de amostra foram pesadas em 2 tubos eppendorf (totalizando 500 mg) sendo adicionado 500 μL de água deionizada. Essa mistura contida nos tubos foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 7000 rpm por 30 minutos. Após, ambos os sobrenadantes foram retirados e colocados em micro tubo, sendo este centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm. Da mesma forma, após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e transferido a outro tubo, sendo este processo repetido por seis vezes, até obtenção de um extrato limpo.

Foi adicionado às amostras solução gelada de acetona 80% (v/v) na proporção de 1:4 (amostra:acetona) e estas armazenadas por duas horas em geladeira para precipitação das proteínas. Em seguida, o precipitado proteico obtido foi centrifugado a 14000 rpm

em centrífuga refrigerada por 5 minutos para retirada do sobrenadante e obtenção da massa proteica.

A concentração de proteínas totais nos extratos de geleia real foram determinadas de acordo com o método do Biureto, empregando albumina de soro bovino como padrão (Sykes et al., 1987). Para leitura das amostras, os precipitados proteicos foram ressolubilizados em 150 μL de NaOH 0,5 mol L^{-1} . Em tubos de vidro foram adicionados 50 μL da amostra ressolubilizada e 2,5 mL do reagente do Biureto. Estes tubos foram mantidos em banho maria a 32°C durante 15 minutos. Após o tempo de reação, as leituras de absorbância foram medidas a 540 nm, usando espectrofotômetro UV/Vísivel.

2.6. Separações eletroforéticas

Para as separações eletroforéticas, a massa proteica (*pellet*) foi ressolubilizada em tampão Tris-HCl 1 mol L^{-1} (pH 6,8), contendo ureia a 7 mol L^{-1} , tiourea 2 mol L^{-1} , 3-[(3-cloroamidopropil)dimitelamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) a 2% (m/v), anfólitos de pH 3 a 10 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002% (Candiano et al., 2004).

Após, 250 μL da massa proteica mais tampão, foram aplicados em fitas de 13cm que contém gel pré-fabricado com anfólitos imobilizados de pH 3-10 e colocados em um aparato com óleo mineral em temperatura ambiente, para serem hidratados com o extrato proteico e após 12 horas foram levadas ao sistema de isofocalização elétrica (IOF – corrida em primeira dimensão), para a separação das proteínas em função do pH.

Antes do início da corrida eletroforética em segunda dimensão, as fitas foram submetidas a soluções de equilíbrio em duas etapas utilizando-se mesa agitadora: na primeira etapa de redução, foram utilizados 10 mL de solução contendo 6 mol L^{-1} , SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L^{-1} , azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v). Na segunda etapa, de alquilação dos grupos tióis, foi utilizada uma solução de composição similar, porém, substituindo-se o DTT por iodocetamida 2,5% (m/v). Na segunda dimensão do processo eletroforético (2D-PAGE), as fitas foram colocadas sob os géis de poliacrilamida a 12,5%, preparados previamente em placas de vidro de 180x160x1,5mm, a partir das seguintes soluções: acrilamida, N,N,-metilenobisacrilamida, Tris-hidroximetil amino metano, dodecil sulfato de sódio (SDS), N,N,,N,N,-tretametilenodiamina (TEMED), ácido clorídrico e persulfato de amônio. Ao

lado das fitas aplicou-se um pedaço de papel de filtro, contendo 10 µL de padrão de massa molar apresentando as proteínas β -fosforilase (97kDa), albumina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa) e α -lactoalbumina (14,4kDa). As fitas e os filtros foram vedados com solução quente de agarose (0,5% m/v) em tampão adequado, de modo a garantir contato com o gel de poliacrilamida. Em seguida, a corrida em segunda dimensão foi realizada com a seguinte programação: Tensão $\rightarrow$ 100V por 30 minutos e em seguida, Tensão $\rightarrow$ 250V por 2h35min.

Após término da corrida, os géis foram submetidos à solução fixadora contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por uma hora e finalmente corados durante 72 horas - sobre mesa agitadora - com corante Coomassie coloidal, que consiste em solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), azul de coomassie G-250 0,08% (m/v) e metanol 25%(v/v). Após 72 horas os géis foram lavados sucessivamente com água deionizada para remoção do corante.

Os géis obtidos foram escaneados e as imagens analisadas, utilizando-se o programa Image Master Platinum 7.0. A detecção dos spots e a determinação do seu volume foram realizadas de modo automático adotando-se os parâmetros: smooth = 2; área mínima = 5 e saliência = 30. Dentro de cada grupo, o gel com maior número de spots foi escolhido como gel de referência e em seguida efetuado o “match gels”, uma comparação entre os spots das réplicas de cada grupo.

2.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos 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

Observou-se que o tratamento 1 (T1) proporcionou aumento significativo no número de ácidos da glândula hipofaríngea para o mês de junho, com relação ao controle e demais tratamentos. Os tratamentos T2 e T3 não diferiram entre si, mas foram significativamente diferentes do controle. Para o mês de julho não foram observadas diferenças entre os tratamentos e controle (Tabela 1).

TABELA 1: Número de ácidos das glândulas hipofaríngeas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas colhidas nos meses de junho e julho de 2015. Os valores expressam as médias seguidas de seus desvios padrão.

Número de ácidos		
	Junho	Julho
Controle	20,7±8,9A	28,1±8,4A
T1	29,1±5,5B	28,8±5,8A
T2	24,2±5,9C	28,5±7,8A
T3	24,1±4,4C	27,9±8,9A

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). Controle (sem adição de Zn), Tratamento T1 (0,5 mg mL⁻¹ Zn), Tratamento T2 (1,0 mg mL⁻¹ Zn) e Tratamento T3 (1,5 mg mL⁻¹ Zn).

Com relação à área média dos ácinos das glândulas hipofaringeanas, observou-se que o T1, promoveu aumento significativo neste parâmetro no mês de junho, em comparação com o controle e T2 e T3; por outro lado, T2 e T3 foram semelhantes entre si, diferindo estatisticamente do controle (Tabela 2).

Para o mês de julho, o T1 reduziu significativamente a área média dos ácinos das glândulas hipofaringeanas em relação controle e T2, não diferindo de T3. Já os tratamentos T2 e T3 foram semelhantes ao controle (Figura 2).

TABELA 2: Área média dos 10 maiores ácinos (μm^2) das glândulas hipofaringeanas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas colhidas nos meses de junho e julho de 2015. Os valores expressam as médias seguidas de seus desvios padrão.

Média da área dos ácinos ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$)		
	Junho	Julho
Controle	26,915 $\pm$ 3,5A	28,856 $\pm$ 3,3A
T1	31,244 $\pm$ 5,2B	26,876 $\pm$ 4,5B
T2	28,892 $\pm$ 3,5C	29,267 $\pm$ 4,6A
T3	29,201 $\pm$ 3,9C	28,227 $\pm$ 6,7AB

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$). Controle (sem adição de Zn), Tratamento T1 (0,5 mg mL⁻¹ Zn), Tratamento T2 (1,0 mg mL⁻¹ Zn) e Tratamento T3 (1,5 mg mL⁻¹ Zn).

Por meio das fotomicrografias obtidas foi possível observar diferenças entre o número de ácinos e a área ocupada por eles (Figuras 2 e 3).

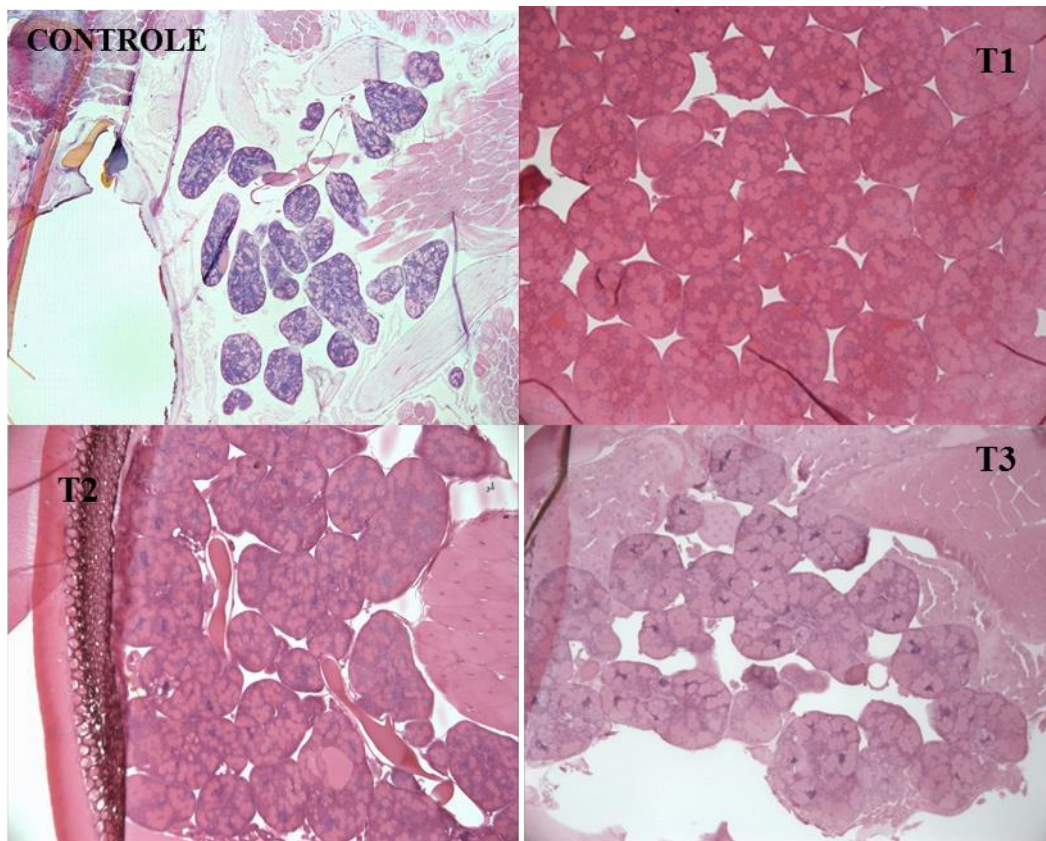


Figura 2: Fotomicrografias da glândula hipofaringeana de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com seis dias de idade (fase de nutriz) coradas pela hematoxilina e eosina, referentes ao mês de junho de 2015. Controle (sem adição de Zn), Tratamento T1 (0,5 mg mL⁻¹ Zn), Tratamento T2 (1,0 mg mL⁻¹ Zn) e Tratamento T3 (1,5 mg mL⁻¹ Zn). Aumento: 200X.

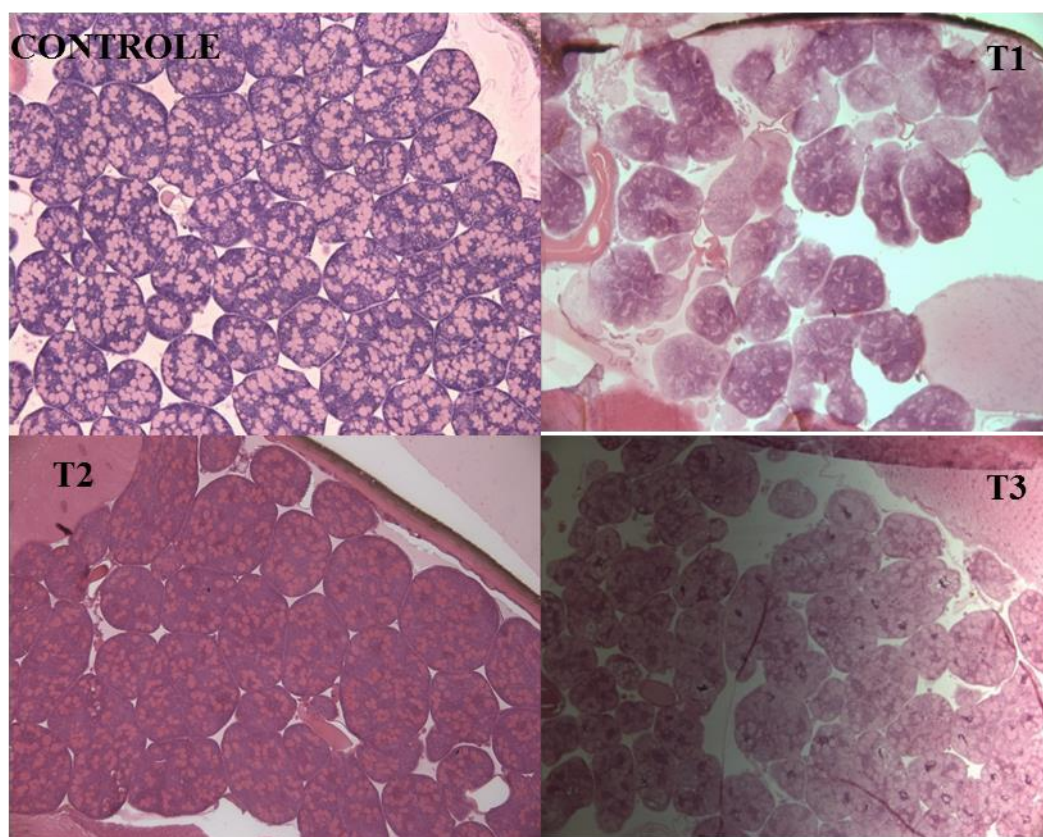


Figura 3: Fotomicrografias da glândula hipofaringeana de abelhas *Apis mellifera* africanizadas com seis dias de idade (fase de nutriz) coradas pela hematoxilina e eosina, referentes ao mês de julho de 2015. Controle (sem adição de Zn), Tratamento T1 ($0,5 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Zn}$), Tratamento T2 ($1,0 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Zn}$) e Tratamento T3 ($1,5 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Zn}$). Aumento: 200X.

Não foram observadas diferenças significativas entre o extrato proteico da geleia real nos meses de junho e agosto, para todos os tratamentos; já para o mês de julho, os tratamentos T1 e T2 não diferiram entre si, mas apresentaram diminuição significativa na concentração do extrato protéico, em relação ao tratamento controle e T3 (Tabela 3).

Com relação aos tratamentos, observou-se que apenas o tratamento T3 apresentou aumento significativo no extrato proteico da geleia real no mês de julho, em comparação aos demais meses analisados.

Tabela 3: Concentração de proteína total obtida nos pellets obtida nos extratos dos pellets de geleia real coletadas nos meses de junho, julho e agosto de 2015. Os valores expressam as médias seguidas de seus desvios padrões. Controle (sem adição de Zn), Tratamento T1 (0,5 mg mL⁻¹Zn), Tratamento T2 (1,0 mg mL⁻¹ Zn) e Tratamento T3 (1,5 mg mL⁻¹ Zn).

Concentração de proteína total (g/L)			
	Junho	Julho	Agosto
Controle	14,067 ± 0,9 aA	19,524 ± 0,6 aA	16,367 ± 2,4 aA
T1	16,538 ± 3,1 aA	14,600 ± 0,1 bA	13,861 ± 0,1 aA
T2	16,618 ± 0,7 aA	15,760 ± 0,9 bA	16,63 ± 1,0 aA
T3	16,344 ± 1,1 aA	23,529 ± 0,9 cB	17,957 ± 0,4 aA

Letras minúsculas indicam valores diferentes dos tratamentos em relação ao controle para o mesmo mês (P<0,05).

Letras maiúsculas indicam valores diferentes dos mesmos tratamentos para os meses diferentes (P<0,05).

Os resultados da análise da contagem dos spots proteicos estão apresentados na Tabela 4.

Observou-se aumento significativo no número de spots proteicos no tratamento T2 em relação ao controle, T1 e T3 para todos os meses analisados (Tabela 4). Observou-se ainda redução significativa no número de spots protéicos ao longo dos meses para todos os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4: Análise da contagem de spots proteicos nos géis de poliacrilamida da geleia real coletada nos meses de junho, julho e agosto de 2015. Os valores expressam as médias seguidas de seus desvios padrões. Controle (sem adição de Zn), Tratamento T1 (0,5 mg mL⁻¹ Zn), Tratamento T2 (1,0 mg mL⁻¹ Zn) e Tratamento T3 (1,5mg mL⁻¹Zn).

Número de spots proteicos na geleia real			
	Junho	Julho	Agosto
Controle	122,5 ± 2,1 aA	79,2 ± 5,6 aB	73,0 ± 0,0 aB
T1	143,5 ± 5,2 bA	130,7 ± 4,4 bB	98,0 ± 5,0 bC
T2	174,5 ± 3,7 cA	148,5 ± 9,5 cB	140,2 ± 8,0 cB
T3	149,3 ± 9,1 dbA	129,5 ± 6,4 bdA	95,0 ± 11,3 bdB

Letras minúsculas indica valores diferentes dos tratamentos em relação ao controle para o mesmo mês (P<0,05).

Letras maiúsculas indica valores diferentes dos mesmos tratamentos para os diferentes meses (P<0,05).

4. Discussão

Neste trabalho, observamos que as adições de zinco inorgânico em concentrações acima de 1,5 mg mL⁻¹ deixaram o alimento artificial (xarope de açúcar) com alta viscosidade, dificultando o consumo pelas abelhas, em condições de laboratório. Sendo assim, optamos por fornecer às colmeias experimentais concentrações abaixo deste valor, para verificar o efeito da suplementação deste mineral no desenvolvimento da glândula hipofaringeas de abelhas com seis dias de idade e no número de spots proteicos da geleia real. Também realizamos a suplementação das abelhas com zinco na estação

do inverno ou período de entressafra, quando ocorre tendência de redução do diâmetro da glândula, por conta da escassez de alimento nessa época (Crailsheim, 1990).

Na natureza, as necessidades do mineral zinco pelas abelhas são supridas pela colheita de recursos florais, como o néctar e pólen, com concentrações que podem variar dependendo da região e variabilidade vegetal presente nas proximidades do apiário (0,012 a 173,77 mg kg⁻¹ no mel e de 5,1 a 340,0 mg kg⁻¹ no pólen apícola) (Zhang et al., 2015).

Zhang et al. (2015) sugeriram que 60 mg kg⁻¹ de zinco no pólen colhido pelas abelhas seria suficiente para atender as exigências nutricionais deste mineral para enxames com presença de cria. Entretanto, os autores acima realizaram o experimento em laboratório, por um período de tempo curto e número limitado de abelhas. Neste trabalho, utilizamos uma concentração de zinco superior ao sugerido pelos autores acima, mas realizamos o experimento a campo, administrando o zinco diretamente na nutrição do enxame e com maior número de abelhas consumindo o alimento.

Verificamos que o fornecimento de zinco inorgânico, em um primeiro momento, promoveu aumento na área e número de ácinos da glândula hipofaringeana, sugerindo a importância deste mineral na nutrição das abelhas (Zhang et al., 2015). Entretanto, após o primeiro mês do experimento, observamos redução nos parâmetros avaliados da glândula hipofaringeana, com abandono dos enxames das colmeias experimentais no terceiro mês.

Isto poderia estar relacionado com o fato do zinco estar diretamente ligado à vitelogenina, maior proteína circulante na hemolinfa das abelhas adultas (Amdam et al., 2005). Níveis aumentados de vitelogenina podem reduzir a produção de Hormônio Juvenil (HJ), envolvido em mudanças fisiológicas de glândulas exócrinas, como a hipofaringeana. Sendo assim, podemos inferir que o aumento de zinco estaria levando ao aumento de vitelogenina circulante e conseqüente redução de HJ, o que poderia explicar a redução, em um segundo momento, da área dos ácinos da glândula observada com a menor concentração de zinco. Além disso, esta possível redução nos níveis de HJ poderia ter afetado a área de cria promovendo redução desta e conseqüente abandono do enxame.

Outra hipótese para o abandono dos enxames experimentais seria um possível efeito tóxico do zinco (Eisler, 1993; Chang et al., 2012), que apresentaria efeito

neurotóxico e redução da longevidade das abelhas, com redução do peso do cérebro e perda de massa protéica (Milivojevic et al., 2015).

Por outro lado, observamos redução no número de spots protéicos ao longo dos meses analisados, provavelmente pelo efeito da estação do inverno, onde ocorre redução da atividade da glândula hipofaringeana (Crailsheem, 1990); entretanto, o número de spots proteicos foi significativamente maior em todos os tratamentos, quando comparados com o controle, pelo fato do zinco ser o mineral que mais se liga a proteínas (Shi e Chance, 2011).

5. Conclusão

Conclui-se que o zinco pode contribuir para o desenvolvimento da glândula hipofaringeana e enriquecimento protéico da geleia real.

6. Referências

- AMDAM, Gro V. et al. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 12, p. 939-947, 2005.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-259 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v.25, p.1327-1333, 2004.
- CHANG, Y.N.; ZHANG, M.; XIA, L.; ZHANG, J.; XING, G. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. **Materials**, v.5, p.2850-2871, 2012.
- CRAILSHEIM, K. et al. The protein balance of the honey bee worker. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 417-429, 1990.
- DESEYN, J.; BILLEN, J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). **Apidologie**, v.36, p.49-57, 2005.
- DOOLITTLE, G.M. Mr. Doolittle's queen rearing methods. **American Bee Journal**, v.39, p.435-436, 1899.
- EISLER, R. **Zinc hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review**. Contaminant Hazard Reviews, Report 26, US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Laurel, MD, USA. 1993.
- FENG, M.; FANG, Y.; LI, J. Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development. **BMC Genomics**, v.10, p.645-657, 2009.
- HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.19, n.1, p. 5-14, 2004.
- KAMAKURA, M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. **Nature**, v.473, p.478-483, 2011.
- MILIVOJEVIC, T.; GLAVAN, G.; BOZIC, J.; SEPCIC, K.; MESARIC, T.; DROBNE, D. Neurotoxic potential of ingested ZnO nanomaterials on bees. **Chemosphere**, v.120, p.547-554, 2015.

- DE OLIVEIRA, Maria Emilene Correia. **Polietismo e detecção de vírus deformador das asas em abelha *Apis mellifera scutellata* (Africanizada) e *Apis mellifera ligustica* (Europeia)**. 2013. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- SHI, Wuxian; CHANCE, Mark R. Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization. **Current opinion in chemical biology**, v. 15, n. 1, p. 144-148, 2011.
- SMODIŠ ŠKER, M.I.S., GREGORC, A. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. **Apidologie**, v.41, n. 1, p.73–86, 2010.
- STANDIFER, L.N. Honey bee nutrition and supplemental feeding. Agriculture Handbook, 2003. Disponível em: <http://www.beesource.com/resources/usda/honey-bee-nutrition-and-supplemental-feeding/> Acesso em: 09/07/2016.
- SUN, J.Y.; JING, M.Y.; WENG, X.Y.; FU, L.J.; XU, Z.R. Effects of dietary zinc levels on the activities of enzymes, weight of organs and the concentrations of zinc and copper in growing rats. **Biological Trace Element Research**, v.107, p.153-165, 2005.
- SYKES, E.; GRZYCH, C.; EPSTEIN, E.; KIECHLE, F.L. Dextran interference in biuret-based assays for serum proteins. **Clinical chemistry**, v.33; 1073-1074; 1987.
- ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. New Jersey: Pretince Hall, 1996. 718p.
- ZHANG, G.E.; ZHANG, W.; QUI, X.; BAOHUA, X. Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.156, p.201-210, 2015.

CAPÍTULO III

Implicações

No presente estudo verificamos que o mineral Zn é de extrema importância na nutrição das abelhas *Apis mellifera*, promovendo melhora na glândula hipofaríngea e no número de spots proteicos da geleia real.

Entretanto, próximo do término do período experimental, ocorreu o abandono de todas as colmeias dos tratamentos, sugerindo que o zinco interferiu de forma negativa na fisiologia da glândula ou apresentou efeito tóxico. Este fato poderia ser atribuído as concentrações de zinco utilizadas neste trabalho, que foram superiores aos da literatura, devido aos experimentos terem sido realizados a campo e não em condições de laboratório.

Sendo assim a falta de trabalhos na área de nutrição apícola mostrou-se um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento do trabalho, não tendo como referências a quantidade de zn ideal para um trabalho a campo.

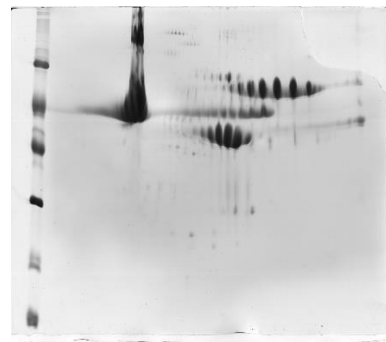
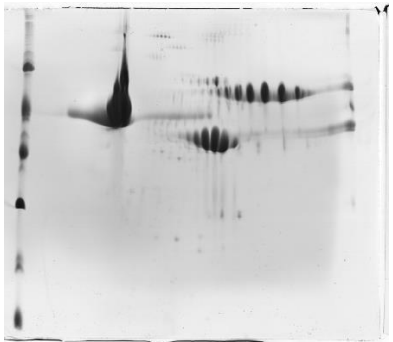
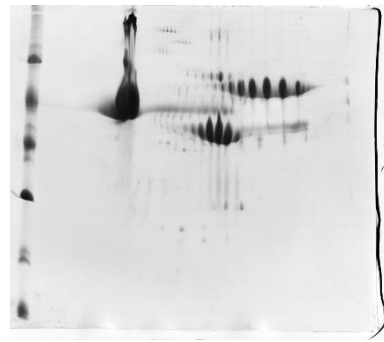
Estes resultados mostram que ainda existe uma grande lacuna na área de nutrição de abelhas e novas pesquisas precisam ser realizadas com o objetivo de se determinar níveis seguros de inclusão de minerais na dieta das abelhas.

ANEXOS

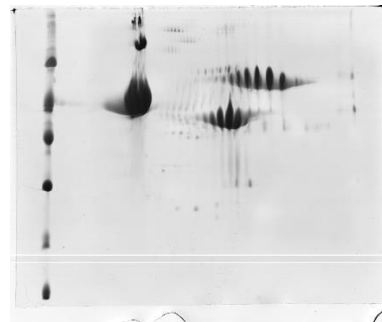
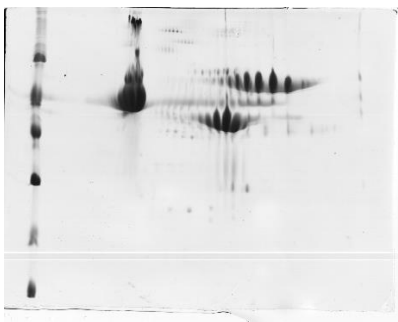
1. Géis dos tratamentos T1, T2 e T3 para os meses de junho, julho e agosto.

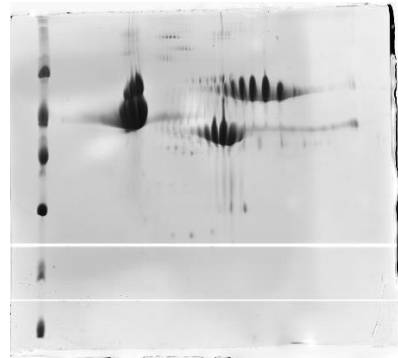
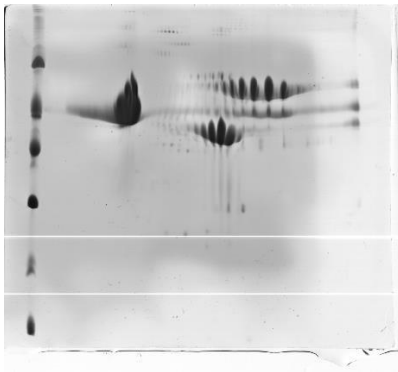
Tratamento 1: Suplementação de zinco com concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Zn}$.

a) Junho

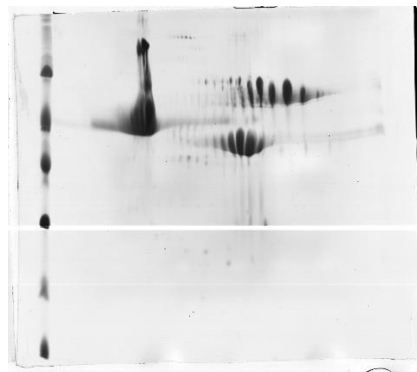
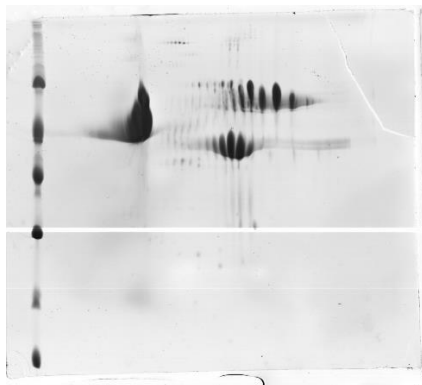
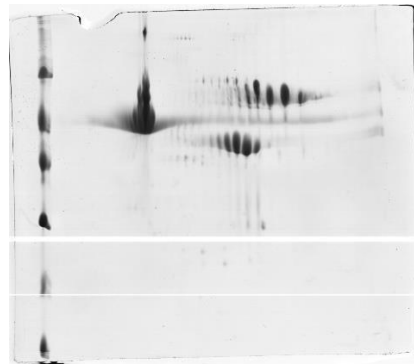
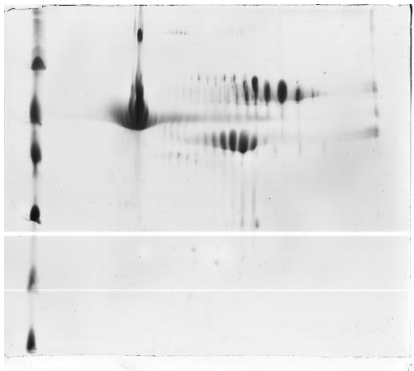


b) Julho:



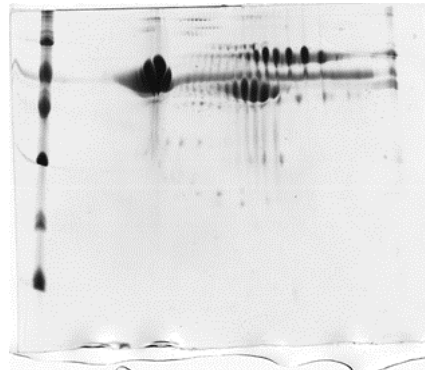
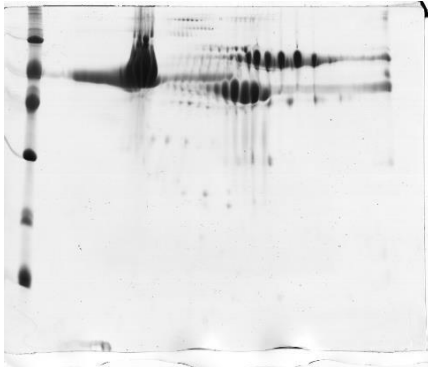
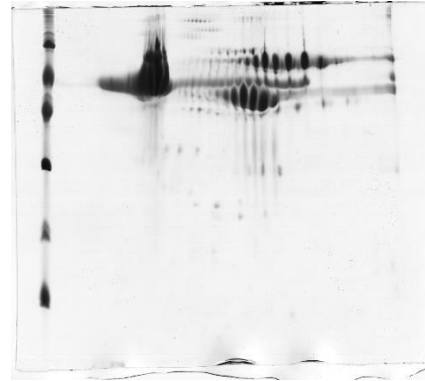
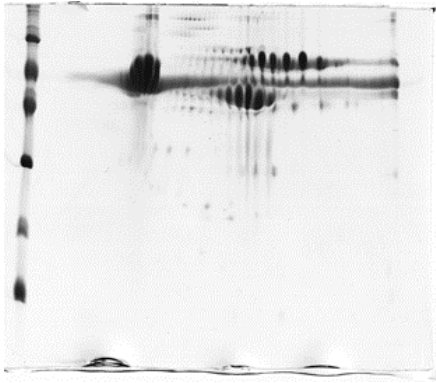


c) Agosto:

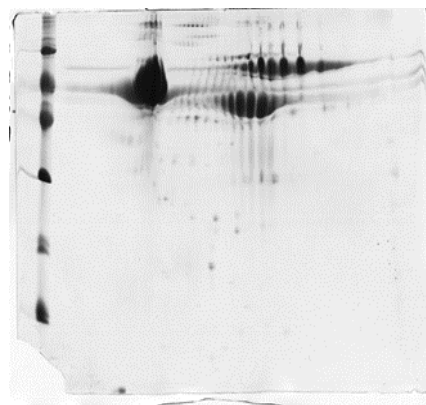
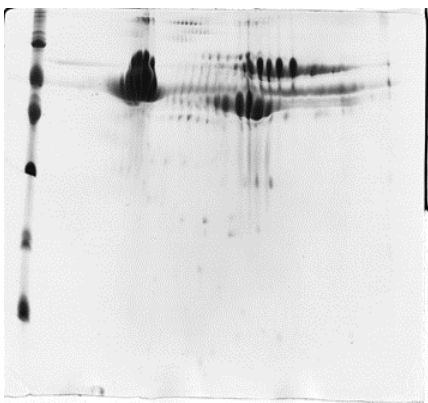


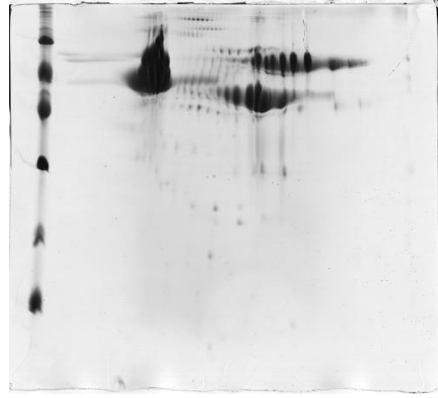
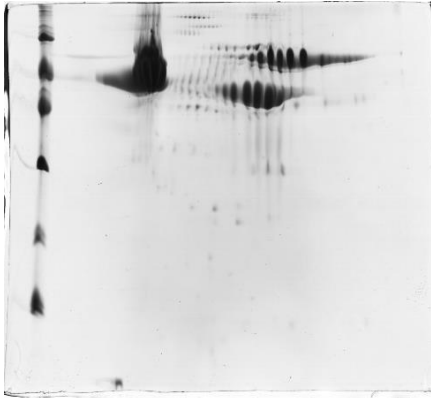
Tratamento 2: Suplementação de zinco com concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Zn}$.

a) Junho:

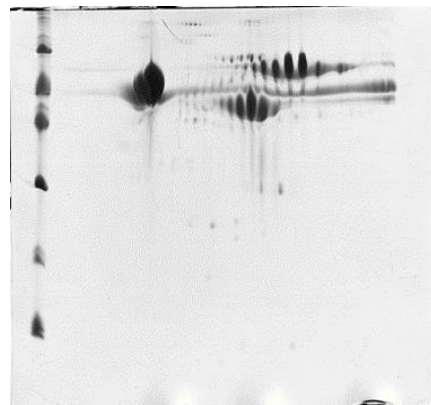
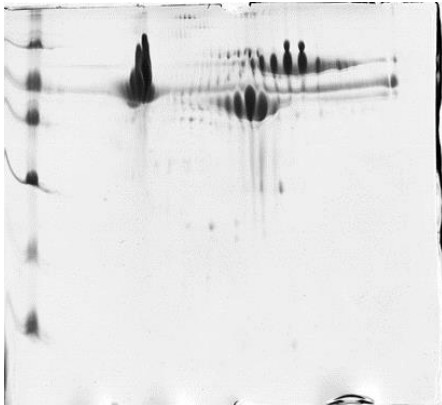


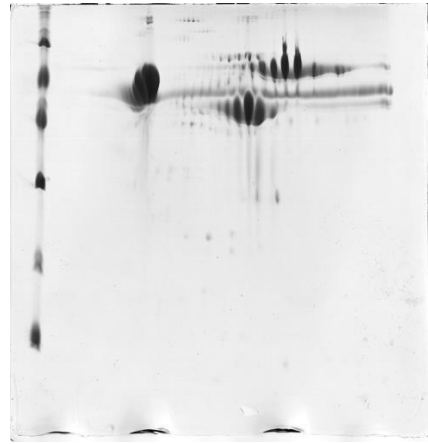
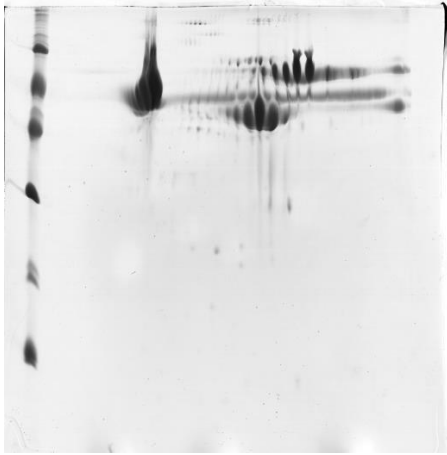
b) Julho:





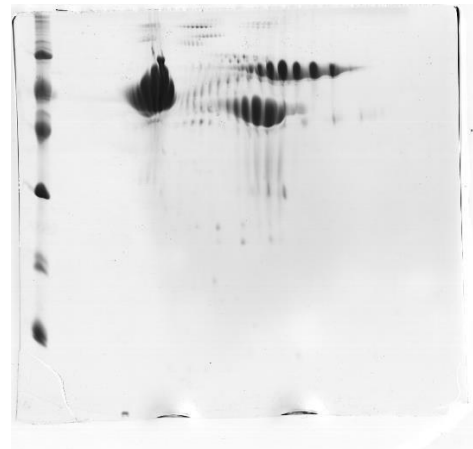
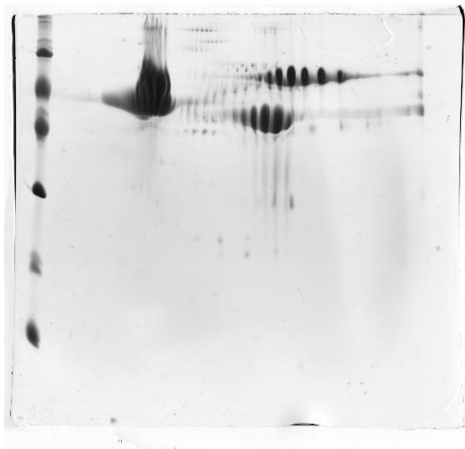
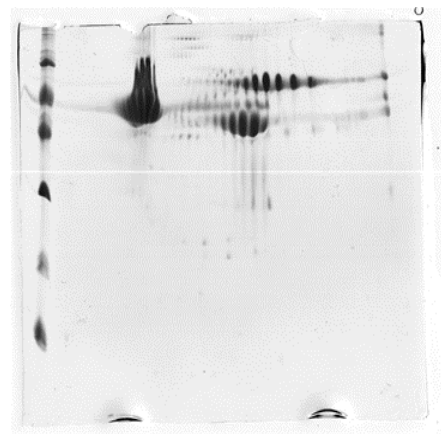
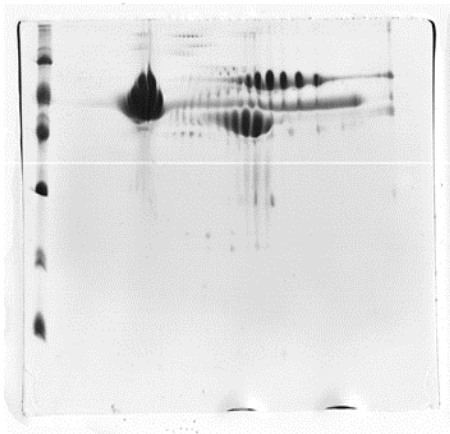
c) Agosto:

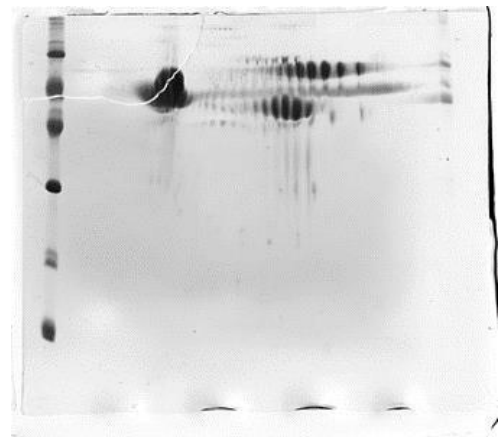
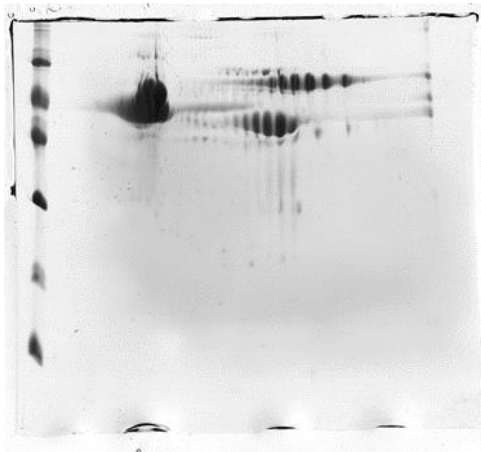
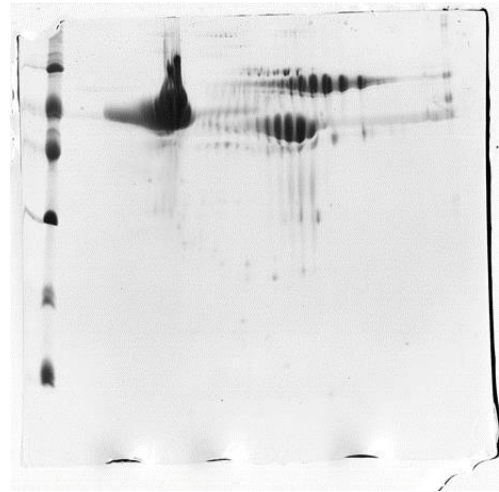
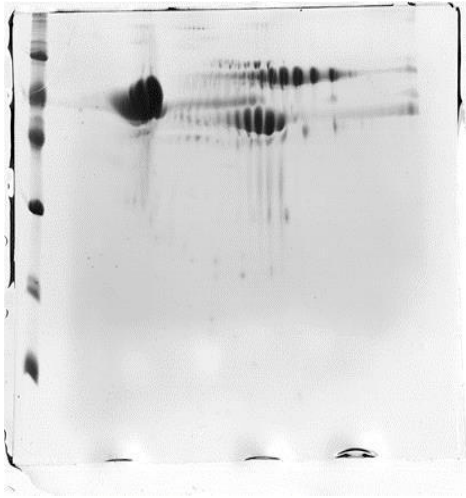




Tratamento 3: Suplementação de zinco com concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Zn}$.

a) Junho



b) Julho:**c) Agosto:**