

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

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

GABRIEL MORENO MARTINELI

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

BOTUCATU – SP

Abril - 2021

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

**SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO ORGÂNICO E INORGÂNICO NO  
DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA HIPOFARINGEANA DE ABELHAS *Apis*  
*mellifera* L**

GABRIEL MORENO MARTINELI  
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Prof. Dr. Samir Moura Kadri

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

BOTUCATU – SP

Abril - 2021

M385s      Martineli, Gabriel Moreno  
Suplementação de zinco orgânico e inorgânico no desenvolvimento da  
glândula hipofaringeana de abelhas *Apis mellifera* L. / Gabriel Moreno Martineli.  
-- Botucatu, 2021  
40 p. : il., tabs., fotos

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 com ênfase em zinco. 4.  
Ácidos. 5. Morfologia da glândula hipofaringeana de abelhas africanizadas. 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.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Gabriel Moreno Martineli – nascido em 12 de julho de 1988, na cidade de Castanhal/PA, filho de Luiz Otávio Martineli e Terezinha Moreno Segundo Martineli. Passou toda a infância e adolescência nas cidades de Descalvado e Rio Claro. Aprovado nos cursos de Economia da UEM e UFSCar, Engenharia Agrícola na Unicamp e Zootecnia na Unesp em 2008. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, em março de 2009, onde foi bolsista de iniciação científica, realizou estágios e cursos nas áreas de nutrição e produção animal, incluindo 6 meses na Universidade de Auburn, em Auburn/AL nos Estados Unidos, formando-se em dezembro de 2013. Em agosto de 2014 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia da Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, atuando nas áreas de nutrição, produção e automação animal, além de ser um dos responsáveis pelo desenvolvimento e publicação de uma patente de invento, defendendo seu mestrado em fevereiro de 2017. Em janeiro de 2018 iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia da Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, atuando nas áreas de nutrição e produção animal.

**DEDICO**

Primeiramente aos meus pais, Luiz Otávio Martineli e Terezinha Moreno Segundo Martineli, pela educação e pelos princípios, que me deram força para concluir o presente estudo, e mesmo com a distância, sempre apoiaram meu crescimento profissional e pessoal, dando todo apoio necessário.

Ao meu irmão, Tiago Moreno Martineli, pelo imenso estímulo e carinho que sempre me ofereceu, 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.

Agradeço à minha namorada, Aimê de Almeida Longuini, que jamais me negou apoio, carinho e incentivo. Obrigado, amor da minha vida, por aguentar tantas crises de estresse e ansiedade. Sem você do meu lado esse trabalho não seria possível.

Aos meus Avós Lurdes Moreno, Doraci Moraes Martineli e Otávio Martineli pelos melhores anos de minha vida.

Aos meus cães, Shiva, Cindy, Gudula e Zulema, pois independente do dia, lá estavam elas, felizes da vida por me verem.

Muito obrigado por tudo, amo vocês.

## AGRADEÇO

Ao meu orientador Professor Doutor Ricardo de Oliveira Orsi, pela oportunidade da orientação, amizade e por me proporcionar 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.

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

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, que tenho muito orgulho de fazer parte.

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

Ao funcionário do Setor de Apicultura, Maurício Silva, pela ajuda e paciência durante toda a execução do trabalho.

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.

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

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

## RESUMO GERAL

As abelhas *A. mellifera* possuem necessidades específicas de nutrientes para que possam desenvolver todo o seu potencial produtivo e reprodutivo, visando a sobrevivência e manutenção da colônia. Neste projeto avaliamos duas fontes de zinco (orgânico e inorgânico), em diferentes concentrações, na morfologia das glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrizas de seis dias de idade. Foram utilizadas 28 colônias de abelhas *A. mellifera*, distribuídas aleatoriamente nos seguintes tratamentos (04 colmeias por tratamento): controle: xarope de açúcar sem suplementação de zinco; I25: xarope de açúcar suplementado com 25 ppm de Zn inorgânico; I50: xarope de açúcar suplementado com 50 ppm de Zn inorgânico; I75: xarope de açúcar suplementado com 75 ppm de Zn inorgânico; O25: xarope de açúcar suplementado com 25 ppm de Zn orgânico; O50: xarope de açúcar suplementado com 50 ppm de Zn orgânico; O75: xarope de açúcar suplementado com 75 ppm de Zn orgânico. A fonte de zinco inorgânico foi o sulfato de zinco monohidratado (37,4% de zinco) e a fonte orgânica de zinco metionina (16% de zinco), diluída em xarope de açúcar. Os níveis reais de zinco foram determinados por espectrometria de absorção atômica (FAAS). As abelhas *A. mellifera* recém-emergidas foram marcadas ao final de 30 dias de suplementação com caneta atóxica, na região pronoto e suas coletas para análise morfológica das glândulas hipofaríngeas foram realizadas aos 6 dias de idade em sua fase de nutriz, com exatamente 36 dias de experimento. Observou-se durante o experimento que a área média ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$ ) das glândulas hipofaríngeas das abelhas *A. mellifera* apresentou modulação positiva na área da glândula hipofaríngea (AGH) para os tratamentos suplementados com 50 e 75 ppm de zinco orgânico, com  $11,60 \pm 1,1$  e  $12,40 \pm 1,6$ , respectivamente, quando comparado ao tratamento controle  $9,78 \pm 3,7$ . Quando os tratamentos suplementados com zinco foram comparados entre si isolando o tratamento controle, podemos observar que os tratamentos suplementados com zinco orgânico apresentam uma maior área média de ácidos ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$ ) do AGH em *A. mellifera* quando comparados com os tratamentos suplementados com zinco inorgânico, apresentando esses valores  $7,25 \pm 1,0$ ,  $8,57 \pm 1,1$ ,  $9,18 \pm 1,4$ , para I25, I50, I75 respectivamente e  $7,51 \pm 1,0$ ,  $11,60 \pm 1,1$ ,  $12,40 \pm 1,6$ , para O25, O50, O75 respectivamente. Observando o número médio de ácidos ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$ ) do AGH em *A. mellifera*, podemos concluir que não foram encontradas diferenças significativas.

Ácidos / abelhas / minerais / morfologia / nutrição

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Pinturas rupestres encontradas na Caverna de Remigia, em Ares de Maestre, província de Castellón, Espanha (4.500 anos).....	10
<b>Figura 2.</b> Castas da colônia de <i>Apis mellifera</i> . Rainha, Operária, e Zangão.....	11
<b>Figura 3.</b> (A) Representação da glândula hipofaringeana (GH) e sua localização na cabeça da abelha. (B) Corte histológico da glândula, com destaque pontilhado no ácino. Corados com Hematoxilina e Eosina.....	15
<b>Figura 4.</b> Corte histológico da glândula hipofaringeana destacando o canal excretor e ácinos secretores .....	16

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Fotomicrografias representativa das áreas dos ácinos das glândulas hipofaríngeanas de abelhas <i>Apis mellifera</i> . Controle (sem Zn), zinco inorgânico e zinco orgânico (25, 50 e 75 ppm). A cor preta representa a área dos ácinos das glândulas. Aumentada:10x.....	38
--	----

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO II**

**Tabela 1.** Níveis reais de zinco determinados por espectrometria de absorção atômica (FAAS) ..... 28

**Tabela 2.** Área e número médio dos ácinos nas glândulas hipofaríngeas ( $\mu\text{m}^2 \cdot 10^{-4}$ ). Fontes inorgânicas x orgânicas. Os valores representam as médias seguidas de seus desvios padrão. Controle (sem Zn), zinco inorgânico e zinco orgânico (25, 50 e 75 ppm).  
..... 37

## SUMÁRIO

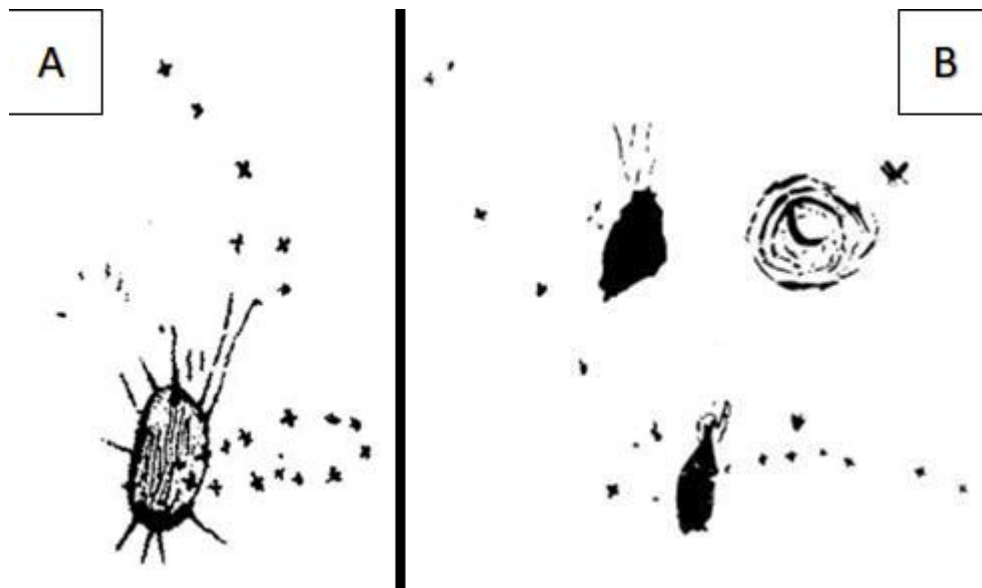
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>9</b>
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>10</b>
1.    As abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	10
2.    Exigências nutricionais de abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	12
2.1.    Mineral Zinco (Zn).....	14
3.    Glândula mandibular de abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	14
<b>4.    Referências Bibliográficas .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>24</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>25</b>
<b>1.    Introduction .....</b>	<b>26</b>
<b>2.    Materials and Methods .....</b>	<b>28</b>
Treatments.....	28
Collection and storage of bees.....	29
Histological analysis.....	29
Morphometry of hypopharyngeal glands.....	30
<b>3.    Results .....</b>	<b>30</b>
<b>4.    Discussion.....</b>	<b>31</b>
<b>5.    References .....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>39</b>
<b>Implicações .....</b>	<b>40</b>

# CAPÍTULO I

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.0. As abelhas *Apis mellifera* L.

A abelhas *A. mellifera* são de origem Africana, existem registros de que em pelo menos em dois momentos diferentes e anteriores à chegada do *Homo sapiens*, migraram para Ásia e Europa, se dividindo em pelo menos duas dúzias de subespécies fisiológica, comportamental e morfológicamente distintas. 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 de abelhas pelo homem, no entanto, culminou em diferentes subespécies por meio de hibridação intraespecífica, especialmente em regiões como o continente Americano, onde *A. mellifera* não era endêmica. (Parker et al., 2010).



**Figura 1.** Pinturas rupestres encontradas na Caverna de Remigia, em Ares de Maestre, província de Castellón, Espanha (4.500 anos). **Fontes:** (A) Bélles (1997); (B) - Boscovich (1989).

No Brasil, as abelhas chegaram no século XIX junto com a imigração europeia. Foi no ano de 1839 que o Padre Antônio Carneiro conseguiu autorização do rei Dom Pedro II e trouxe para o Rio de Janeiro as primeiras abelhas europeias da subespécie *A. 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 abelhas *A. mellifera ligustica*. Outras subespécies também foram trazidas por imigrantes europeus, disseminando-se, assim, as abelhas *A. mellifera* por todo território brasileiro (Wiese, 2005).

Com a baixa produtividade das abelhas europeias e alta susceptibilidade a doenças, em 1956, o pesquisador Warwick Estevam Kerr, com objetivo de melhorar a produção nacional de mel, buscou abelhas mais adaptadas ao clima tropical. Então, importou as abelhas africanas da subespécie *A. mellifera scutellata*, bastante produtivas, defensivas e resistentes a doenças (Gonçalves, 2006). Porém, no ano seguinte 26 enxames com suas rainhas africanas, escaparam da área experimental e acasalaram de forma natural no ambiente, com as várias subespécies européias existentes, dando origem a um poli-híbrido, denominado “abelha africanizada”, visto que predominaram as características das abelhas africanas (Kerr, 1967; Gonçalves, 2006).

Desde a entrada das abelhas *A. mellifera* a apicultura brasileira tem demonstrado um crescente desenvolvimento, tendo a seu favor a vasta extensão do território brasileiro, possuir floradas diversas e clima propício que possibilitam elevada produção ao longo do ano (Couto; Couto, 2002).

As abelhas *A. mellifera* são insetos sociais, (Classe: Insecta; Ordem: Hymenoptera; Família: Apidae) vivem em colônias organizadas em que 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, existem cerca de 5.000 a 100.000 operárias e de 0 a 400 zangões que exercem funções somente reprodutivas e somente 1 rainha, que irá acasalar uma vez na vida com vários zangões durante o “voo nupcial”, sendo responsável pela postura diária média de até 2 mil ovos (Gupta, 2014).



**Figura 2.** Castas da colônia de *Apis mellifera* L.: Rainha, Operária e Zangão. **Fonte:** <https://escolakids.uol.com.br/sociedade-das-abelhas.htm>

Dentro do enxame, as abelhas operárias são responsáveis pelo trabalho e bom funcionamento da colônia, com suas funções diretamente relacionadas com sua idade e desenvolvimento fisiológico. Entre o 1° e 3° dia de vida são responsáveis por realizar a limpeza dos favos, sendo denominadas “faxineiras”. Entre o 4° e 12° dia de vida são responsáveis por alimentar as larvas e produzirem geleia real (alimento exclusivo da rainha) tendo nesta fase suas glândulas hipofaríngeas e mandibulares mais desenvolvidas, sendo denominadas “nutrizes”. Entre o 13° e 18° dia, possuem suas glândulas cerígenas mais desenvolvidas, assim, produzem cera e constroem os favos, sendo assim conhecidas como “engenheiras”. Entre o 19° e 20° dia são denominadas de “guardiãs”, ficando responsáveis pela defesa de seu território e ferrendo caso se sintam ameaçadas. Após os 21 dias de idade são denominadas “campeiras”, e saem a campo para coleta de recursos naturais (néctar e pólen) para manutenção do enxame (Amdam, 2010).

As abelhas *A. mellifera* são insetos que fornecem uma ampla gama de benefícios para os seres humanos, como o mel, pólen, cera, própolis, 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) possuem grande importância na polinização cruzada, que constitui uma importante adaptação evolutiva das plantas, aumentando o vigor das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e aumentando a produção de frutos e sementes, que são responsáveis por fecundar 73% dos vegetais da flora nativa.

## 2.0. Exigências nutricionais das abelhas *Apis mellifera* L

As abelhas *A. mellifera* 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).

As necessidades nutricionais das abelhas *A. mellifera* são as mesmas de 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 (Hendriksma 2016; Wright 2018).

A produção e a reprodução das abelhas *A. mellifera* são influenciadas principalmente pela disponibilidade de alimento e pelo clima da região. Portanto, durante os períodos de escassez, os apicultores devem fornecer alimentação artificial, para assegurar a manutenção e reprodução da colônia, além de preparar a colônia para que esteja saudável, e com seus estoques de alimento completos no início da florada (Hendriksma 2016; Wright 2018).

O néctar satisfaz as necessidades de carboidratos, fundamental para a geração de energia, a água cumpre papel de transporte e dissolução de substâncias, e serve de meio para várias reações químicas, já o pólen é de extrema importância para nutrição das colônias, pois supre o requerimento de proteínas, minerais, lipídeos e vitaminas (Couto, 2006).

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). Camilli et al. (2020) sugerem uma suplementação de 22,2% proteína bruta em períodos de escassez de alimento.

Em contrapartida, se as abelhas operárias jovens de *A. mellifera* não consumirem quantidades de proteínas adequadas, a produção de geleia real pode ficar prejudicada (Standifer, 2003). A geleia real é um produto composto a partir de uma mistura das glândulas hipofaríngeas e mandibulares (que compõem o sistema glandular cefálico), localizadas na cabeça das abelhas operárias de *A. mellifera* (Lin et al., 2018; Maghsoudlou et al., 2019; Dobritzsch et al., 2019). É um alimento completo (proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais) para as larvas de todas as castas (operária, zangão e rainha) até o terceiro dia de vida, bem como para a rainha durante toda a sua vida (Marchini, 1995). A geleia real constitui o único alimento da abelha rainha. O valor nutritivo potencial dessa substância evidencia-se pelo fato de ela produzir um indivíduo (a rainha), anatômica e fisiologicamente diferente das abelhas operárias.

Além disso, a falta de alimento pode estimular o canibalismo de larvas jovens e operculamento precoce de larvas mais desenvolvidas, levando a um declínio populacional pela combinação da redução da produção de crias e da longevidade das abelhas adultas (Imdorf et al., 1998; Alaux et al., 2010; Brodschneider & Crailsheim, 2010; Dolezal & Toth, 2018).

Embora a alimentação das abelhas *A. mellifera* seja focada em alimentos energéticos e proteicos, outros nutrientes como vitaminas e minerais são essenciais para o desenvolvimento das colônias (Haydak, 1970; Eyer 2016). Apesar de serem necessários em menor quantidade em relação às proteínas e carboidratos, são fundamentais para desenvolvimento normal dos

organismos atuando como componentes estruturais e participando de processos metabólicos (Silva et al., 2013).

### *2.1. Mineral zinco (Zn)*

Micronutrientes como os minerais são essenciais para o desenvolvimento das colônias (HAYDAK, 1970). Alguns minerais são considerados macroelementos essenciais, como o cálcio, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre, e microelementos essenciais, como o cobre, cobalto, iodo, manganês, selênio, zinco e ferro (WECKWERTH, 2007).

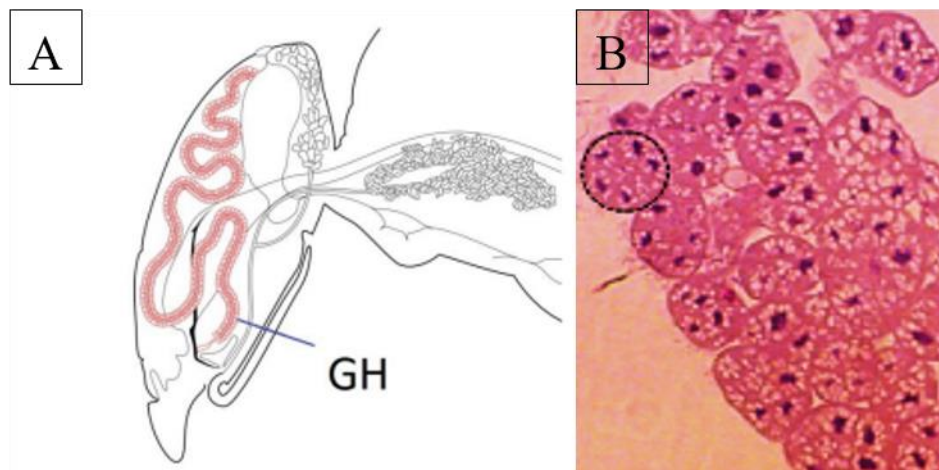
Zhang et al. (2015) sugerem 30 ppm de zinco para a sobrevivência e atividade antioxidante e de 60 a 70 ppm para a produção de geleia real. Herbert & Shimanuki (1978) sugeriram uma dieta com a concentração de 1000 ppm de potássio, 500 ppm de cálcio, 300 ppm de magnésio e até 50 ppm de sódio, zinco, manganês, cobre e ferro nas dietas artificiais para abelhas.

O zinco é um elemento pertencente aos metais de transição, possui número atômico 30 e cor cinza prateado, 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; Maret 2017; Abd El-Hack et al., 2020).

O zinco apresenta importância fundamental como componentes estruturais e funcionais dos seres vivos, estando presentes nas metalproteínas e exercendo papel catalisador nos sistemas enzimáticos (Haragushi, 2014; Abd El-Hack et al., 2020). 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 (Chand et al., 2020).

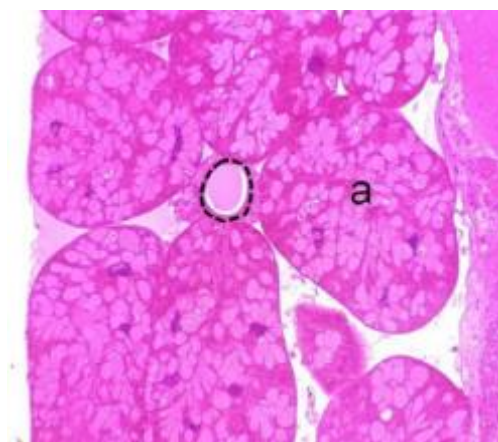
### *3.0. Glândulas Hipofaringeanas*

As glândulas hipofaríngeas estão localizadas exclusivamente nas cabeças das operárias, e fazem parte do sistema de glândulas anexas ao tubo digestivo, com desembocadura na região oral. Portanto, são consideradas como pertencentes ao sistema salivar ou como glândulas salivares, o qual também compreende as glândulas labiais e mandibulares dos adultos (Cruz-Landim; Abdalla, 2002).



**Figura 3.** (A) Representação da glândula hipofaríngea (GH) e sua localização na cabeça da abelha. (B) Corte histológico da glândula, com destaque pontilhado no ácinus. Corados com Hematoxilina e Eosina. **Fontes:** (A) Tofilski (2012); (B) Martineli (2020).

As glândulas consistem em um par de glândulas longas enroladas nos lados da cabeça, cada glândula consiste em cerca de 550 ácinus ovais ligados a um ducto coletor axial (Kheyri et al., 2013).



**Figura 4.** Corte histológico da glândula hipofaríngea destacando o canal excretor e ácinus secretórios (a). **Fonte:** Shinohara (2018).

A atividade das glândulas depende da idade das abelhas operárias, sua alimentação e presença de larvas (Suwannapong, 2010). As glândulas são mais ativas em abelhas operárias jovens, no entanto, elas também podem ser desenvolvidas em abelhas operárias mais velhas, se as mais jovens estiverem ausentes, por exemplo, em colônias irremediavelmente sem rainha (Ohashi, 2000).

As glândulas hipofaríngeas são responsáveis pela produção de substâncias complementares (secreção clara e rica em proteínas), 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 (Deseyn e Billen, 2005). As células secretoras da glândula hipofaríngea produzem enzimas que metabolizam os nutrientes liberados pela digestão do pólen; também, secreta 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).

A geleia real é alimento de extrema importância na dieta da colmeia, pois é o ponto inicial nas diferentes rotas de desenvolvimento das abelhas, já que a diferenciação das castas é condicionada diretamente pela composição da geleia real, uma vez que promove a mudança no perfil hormonal e a manutenção da integridade do ovário nas rainhas. Seu conteúdo de 35% de hexose (um açúcar) determina o desenvolvimento de uma rainha e o conteúdo de 10% determina o desenvolvimento de uma operária. As larvas de rainhas chegam a ser visitadas dez vezes mais pelas operárias nutrizas do que larvas de operárias, dessa forma, as larvas que resultam em rainhas ingerem maiores quantidades de geleia real e de melhor qualidade com maior frequência e por período maior de tempo (Feng et al., 2009).

O tamanho da glândula está relacionado com sua atividade, 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).

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 hipofaríngeas localizadas na região da cabeça (Cruz-landim; Abdalla, 2009). Dentre as diversas fases de vida das abelhas operárias,

as nutrízes 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, 1989).

Diante deste contexto, o estudo da suplementação do micromineral zinco na nutrição das abelhas *A. mellifera* e seu reflexo no desenvolvimento da glândula hipofaríngeana são de extrema importância, pois o desenvolvimento da colônia está diretamente ligado ao fator nutricional, o nível de consumo do mineral zinco pode influenciar no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeanas, afetando o desenvolvimento populacional da colônia.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de diferentes concentrações de zinco orgânico e inorgânico e seu impacto no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeanas de abelhas *A. mellifera*, por meio de análises morfológicas.

O presente estudo resultou no capítulo II, artigo intitulado “**Suplementação de zinco orgânico e inorgânico no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeanas da abelha *Apis mellifera***”, o qual foi submetido à revista “**Journal of Apicultural Research**”, conforme suas regras de publicação.

#### **4.0. Referências Bibliográficas**

ABD EL-HACK, M.E.; ALAGAWANY, M.; CHAUDHRY, M.T.; SAEED, M.; AHMAD, E.A.M.; EL-SAYED, S.A.A. Does the gradual increase in dietary zinc oxide supplementation can affect egg quality, serum indices, and productive performance of laying hens? **Tropical animal health and production**, v.52, n.2, p.525-531, 2020.

AHMED, Z.H.; TAWFIK, A.I.; ABDEL-RAHMAN, M.F.; MOUSTAFA, A.M. Nutritional Value and Physiological Effects of Some Proteinaceous Diets on Honey Bee Workers (*Apis mellifera*). **Bee World**, v.97, n.1, p.26-31, 2020.

ALAUX, C.; DUCLOZ, F.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology letters**, p.rsbl20090986, 2010.

AMDAM, G.V. The developmental genetics and physiology of honeybee societies. **Animal Behavior**, v.79, p.973–980, 2010.

BABENDREIER, D.; KALBERER, N.M.; ROMEIS, J.; FLURI, P.; MULLIGAN, E.; BIGLER, F.D. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. **Apidologie**, v.36, p.585-594, 2005.

BACAXIXI, P.; BUENO, C.; RICARDO, H.A.; EPIPHANIO, P.D.; SILVA, D.; BARROS, B.; LIMA, F.A. Importância da apicultura no brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.10, n.20, 2011.

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 junho 2019.

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

CAMILI, M.P.; DE BARROS, D.C.; JUSTULIN, L.A.; TSE, M.L.; ORSI, R.D.O. Protein feed stimulates the development of mandibular glands of honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Apicultural Research**, p.1-7, 2020.

CHAND, N.; KHAN, R.U.; SHAH, M.; NAZ, S.; TINELLI, A. Zinc source modulates zootechnical characteristics, intestinal features, humoral response, and paraoxonase (PON1) activity in broilers. **Tropical Animal Health and Production**, v.52, n.2, 511-515, 2020.

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

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

CRAILSHEIM, K.; STOLBERG, E. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, v.35, p.595–602, 1989.

CRAILSHEIM, K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, Paris, v.29, n.1-2, p.97-112, 1998.

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

CRUZ, L.C.; ABDALLA, F.C. **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC, p.181, 2002.

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.

DOBRTZSCH, D.; AUMER, D.; FUSZARD, M.; ERLER, S.; BUTTSTEDT, A. The rise and fall of major royal jelly proteins during a honeybee (*Apis mellifera*) workers' life. **Ecology and Evolution**, v.9, n.15, p.8771-8782, 2019.

DOLEZAL, A.G.; TOTH, A.L. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. **Current Opinion in Insect Science**, 2018.

EYER, M.; NEUMANN, P.; DIETEMANN, V. A look into the cell: honey storage in honey bees, *Apis mellifera*. **PloS one**, v.11, n.8, p.e0161059, 2016.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 20 de junho de 2020.

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

FREE, J.B. Hypopharyngeal gland development and division of labour in honey-bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Proc. Roy. **Entomol. Soc. London**, v.8, p.36-5, 1961

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

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

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

HARAGUCHI, H. Metallomics as integrated biometal science. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.19, n.1, p.5-14, 2014.

HATJINA, F.; PAPAETHIMIOU, C.; CHARISTOS, L.; DOGAROGLU, T.; BOUGA, M.; EMMANOUIL, C.; ARNOLD, G. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. **Apidologie**, v.44, p.467–480, 2013.

HAYDAK, M.H. Honeybee nutrition. **Annual Review of Entomology**, v.15, 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.; SHAFIR, S. Honey bee foragers balance colony nutritional deficiencies. **Behavioral ecology and sociobiology**, v.17, p.70-509, 2016.

HERBERT JR, E.W.; SHIMANUKI, H. Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, v.9, n.1, p.33-40, 1978.

HEYLEN, K.; GOBIN, B.; ARCKENS, L.; HUYBRECHTS, R.; BILLEN, J. The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. **Apidologie**, v.42, p.103–116, 2011.

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

KHEYRI, H.; CRIBB, B.W.; MERITT, D.J. Comparing the secretory pathway in honeybee venom and hypopharyngeal glands. **Arthropd Structure & Development**, v.42, p.107-114, 2013.

LAMONTAGNE-DROLET, M.; SAMSON-ROBERT, O.; GIOVENAZZO, P. FOURNIER, V. The Impacts of Two Protein Supplements on Commercial Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies. **Journal of Apicultural Research**, v.58, n.5, p. 800-813, 2019.

LIN, N.; CHEN, S.; ZHANG, H.; LI, J.; FU, L. Quantification of Major Royal Jelly Protein 1 in Fresh Royal Jelly by Ultraperformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.66, n.5, p.1270-1278, 2018.

MAGHSOUDLOU, A.; MAHOONAK, A. S.; MOHEBODINI, H.; TOLDRA, F. Royal jelly: Chemistry, storage and bioactivities. **Journal of Apicultural Science**, v.63, n.1, p.1-24, 2019.

MARCHINI, L. C. Geleia real: composição e produção. *Zootecnia*, Nova Odessa, v.33, n.1, p.15-17, 1995.

MARET, W. Zinc in cellular regulation: The nature and significance of “zinc signals”. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.11, p.2285, 2017.

OHASHI, K.; SASAKI, M.; SASAGAWA, H.; NAKAMURA, J.; NATORI, S.; KUBO, T. Functional flexibility of the honey bee hypopharyngeal gland in a dequeened colony. **Zoological science**, v.17, p.1089–1094, 2000.

OMAR, E.; ABD-ELLA, A.A.; KHODAIRY, M.M.; MOOSBECKHOFER, R.; CRAILSHEIM, K.; BRODSCHNEIDER, R. Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honeybees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v.48, n.4, p.425–436, 2017.

IMDORF, A., RICKLI, M., KILCHENMANN, S.B., WILLE, H. Nitrogen and mineral constituents of honey bee worker brood during pollen shortage. **Apidologie**, v.29, n.4, p.315-325, 1998.

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.

SCHNEIDER, P.; DRESCHER, W. The effect of *Varroa jacobsoni* on development and weight of hypopharyngeal glands and lifespan of *Apis mellifera*. **Apidologie**, v.18, p.101-110, 1987.

SILVA, F.A.; CAVECCI, B.; BALDASSINI, W.A.; LIMA, P.M.; MORAES, P.M.; ROLDAN, P.S.; PADILHA, C.C.F.; PADILHA, P.M. Selenium fractionation from plasm, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Food Measurement and Characterization**, v.7, p.158–165, 2013.

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: 25 setembro de 2020.

SUWANNAPONG, G.; CHAIWONGWATTANAKUL, S.; BENBOW M.E. Histochemical. Comparison of the Hypopharyngeal Gland in *Apis cerana* Fabricius, 1793 Workers and *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 Workers. **A journal of Entomology**, p.7, 2010.

WECKWERTH, W. **Metabolomics: methods and protocols**. New Jersey: Humana Press Inc., p.525-528, 2007.

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

WRIGHT, G.A.; NICOLSON, S.W.; SHAFIR, S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. **Annual Review of Entomology**, v.63, 2018.

ZHANG, G.; ZHANG, W.; CUI, X.; XU, B. Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. **Entomol Exp Appl**, v.156, n.3, p.201–210, 2015.

## CAPÍTULO II

**Organic and inorganic zinc supplementation in the development of hypopharyngeal glands of the *Apis mellifera* honeybee**

Gabriel M. Martineli<sup>1</sup>; Aimê A. Longuini<sup>1</sup>; Daniel C. B. de Barros<sup>1</sup>; Marcelo P. Camilli<sup>1</sup>;  
Samir M. Kadri<sup>1</sup>; Luis A. Justulin<sup>2</sup>; Ricardo O. Orsi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Center 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.

<sup>2</sup>Department of structural and functional Biology, morphology sector, UNESP - São Paulo State University, São Paulo, Botucatu, Brazil.

\*Corresponding author: Ricardo de Oliveira Orsi, 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: ricardo.orsi@unesp.br.

**Short title:** Effect of zinc on hypopharyngeal glands in *Apis mellifera*

**Abstract**

In this project we evaluated two sources of zinc (organic and inorganic), in different concentrations, in the morphology of the hypopharyngeal glands, of six-day old nurse bees. For this, 28 beehives were used randomly distributed into following seven treatments: Control: no zinc supplementation and zinc organic or inorganic sources treatments (25, 50 and 75 ppm). The source of inorganic zinc was the zinc sulphate monohydrate (37.4% zinc) and organic source zinc methionine (16% zinc), diluted in sugar syrup. The morphology of glands collected from six-day-old nurse bees from each group was analyzed after sectioning them and visualizing the sections under a microscope. The results were compared by ANOVA followed by Tukey test ( $P < 0.05$ ). It was observed that the treatments supplemented with organic zinc 50

and 75 ppm modulated positively the hypopharyngeal gland area (HPG) in comparison to all other treatments and control. The organic source zinc shows better results in the HPG development in comparison the inorganic source. Regarding the average acini number in the gland, no significant differences were found in all treatments. It was concluded that organic zinc supplementation positively modulates the average acini area in concentrations above 50 ppm.

### **Acini /bees/mineral/morphology/nutrition**

## **1. INTRODUCTION**

Honey bees *A. mellifera* have specific nutrient needs so that they can develop their full productive and reproductive potential, aiming at colony survival and maintenance (Haydak, 1970; Crailsheim, 1992; Ahmed et al., 2020). Honey bees *A. mellifera* collect and store food in the form of honey (nectar) and “bee bread” (pollen stored in combs), in order to reserve enough food to meet nutritional larvae requirements (Haydak, 1970; Crailsheim, 1992; Lamontagne-Drolet et. al., 2019). In times of scarcity of nectar and pollen, many beekeepers lose part of their colonies due to the decrease in population, due to the lack of food resources; thus, the understanding of nutrients that complement the nutritional deficiencies of bees becomes a fundamental tool to increase and maintain their population (Hendriksma 2016; Wright; Nicolson; Shafir, 2018).

Although the feeding of honey bees *A. mellifera* is focused on energy and protein foods, other nutrients such as vitamins and minerals are essential for the development of colonies (Haydak 1970; Eyer 2016; Omar et al. 2017). Zinc is one of the main protectors of the immune system, participates in 300 enzyme systems, involved in the anabolism and catabolism of many nutrients, such as proteins, carbohydrates and nucleic acids, and collaborates in the production

of deoxyribonucleic (DNA) and ribonucleic acids (RNA) with the formation of so-called zinc fingers, which allows adhesion between proteins and acids for good regulation and gene expression (Haragushi, 2004; Faa et al., 2008).

The source in which the mineral is offered can interfere with its bioavailability; minerals linked to organic molecules, called chelates, have advantages over the inorganic form, with better absorption and reduced competition for binding sites with other minerals (Chand et al., 2020). Therefore, the knowledge of factors that can affect the development of royal jelly producing glands is extremely important, assisting in dietary supplementation strategies and a better understanding of how management practices can affect honey bees.

The hypopharyngeal glands are located exclusively in the heads of the workers, and are part of the system of glands attached to the digestive tract, with opening in the oral region (Snodgrass, 1956; Deseyn and Billen, 2005). Therefore, they are considered as belonging to the salivary system or as salivary glands, which also comprises the labial and mandibular glands of adults (Snodgrass, 1956; Deseyn and Billen, 2005; Rahman et al., 2014). The development of glands in honey bees *A. mellifera*, reach their maximum size and weight when honey bees *A. mellifera* are between five and eight days old (nursing stage) (Snodgrass, 1956; Deseyn and Billen, 2005; Renzi et al., 2016).

The secretory cells of the hypopharyngeal gland produce enzymes that metabolize the nutrients released by the digestion of pollen; it also secretes part of the components of royal jelly, a protein-based substance, with a complex composition of sugars, water, proteins, cholesterol, amino acids and vitamins, responsible for the differentiation of varieties and also used in the feeding of young larvae and queens (Maghsoudlou et al., 2019; Dobritsch et al., 2019; Xun et al., 2020). Deseyn and Billen (2005) found that the amount of royal jelly secreted is directly related to the size of the glands, showing that well-developed glands produce more royal jelly.

The objective of this work was evaluate the effect of supplementation with organic and inorganic zinc presents in the diet of honey bees *A. mellifera* and its impact on the development of the hypopharyngeal glands in nursing bees.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Treatments

Twenty-eight colonies of honey bees *A. mellifera* were used, distributed in the following treatments (04 beehives per treatment): Control: sugar syrup without zinc supplementation; I25: sugar syrup supplemented with 25 ppm Zn inorganic; I50: sugar syrup supplemented with 50 ppm Zn inorganic; I75: sugar syrup supplemented with 75 ppm Zn inorganic; O25: sugar syrup supplemented with 25 ppm Zn organic; O50: sugar syrup supplemented with 50 ppm Zn organic; O75: sugar syrup supplemented with 75 ppm Zn organic.

The inorganic source zinc sulfate monohydrate (containing 37.4% zinc) and the organic source zinc-methionine (containing 16% zinc) was diluted in sugar syrup (1:1 ratio of water and crystal sugar), 500 mL of syrup was supplied through feeders of the Boardman type and consumed by the bees weekly over 36 days. Actual zinc levels were determined by atomic absorption spectrometry (FAAS), where the values found are described in table 1.

**Table I.** Actual zinc levels determined by atomic absorption spectrometry (FAAS).

<b>Determined zinc levels (ppm)</b>						
<b>Control</b>	<b>I25</b>	<b>I50</b>	<b>I75</b>	<b>O25</b>	<b>O50</b>	<b>O75</b>
3.6	23.5	49.4	75.1	23.1	48.8	74.4

The newly emerged *A. mellifera* bees were marked when the supplementation was completed for 30 days and their collections for morphological analysis were performed at 6

days of age in their nursing bee phase, at exactly 36 days of supplementation ensuring that it was consumed throughout his life from his larval stage to adulthood as a nursing bee.

## **2.2. Collection and storage of bees**

Two frames were removed from each treatment and were individually wrapped in filo tissue that gives mobility to the bees that are born inside it, but does not let them pass through it, guaranteeing the handling of newly emerged. The frames were placed in an incubator at a temperature of about 30 °C and a relative humidity of about 60% until the emergence of individuals. The worker bees that emerged were marked in the pronotum region with a nontoxic pen (Posca Paint Pens, Mitsubishi, Japan), totaling approximately 50 honey bees marked per colony. The marked bees were reintroduced into their parent colonies. At six days of age, nursing bees were sampled with entomological forceps and immediately stored in a plastic tube with holes to facilitate the entry of air. Thereafter, they were euthanized (decapitated with a scalpel after being anesthetized with CO<sub>2</sub>) and their heads were fixed in 4% formaldehyde (dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3) for 24 hours.

Subsequently, the heads of the bees were washed in running water for 24 hours and then placed in 70% ethyl alcohol until they were processed for histological analysis (Zaluski et al., 2017).

## **2.3. Histological analysis**

Histological analyses were performed, according to an adaptation of the method described by Bovi et al. (2020). The heads were placed in falcon tubes immersed in 70% alcohol. Then, the material was dehydrated in an increasing series of ethanol (80%, 90% and 95% for 1 hour in each alcohol).

Subsequently, the material was embedded in methacrylate resin (Historesin - Leica). After soaking in resin, the heads of the honey bees *A. mellifera* were included in plastic molds with the mounting resin forming the blocks for the production of blades. Two heads were included in each block, which dried for 24 hours. 3- $\mu\text{m}$  thick histological sections were produced using a rotating microtome. The sections were placed on glass slides and stained with hematoxylin and eosin for analysis.

#### **2.4. Morphometry of hypopharyngeal glands**

The sections were photographed using a digital camera (Leica DC300FX) coupled to a microscope (Leica DMLB80), and the images were analyzed with an image analysis software (Leica Q-win version 3 for Windows).

For determining the area and average of acini of the hypopharyngeal glands, 10 bees (5 blocks) were analyzed per treatment; 400 images of the hypopharyngeal gland were analyzed for each of the 7 treatments (40 images per bee, 80 images per block). For the determination of the acini area, all histological sections were measured, however, considering the inherent variation of the hypopharyngeal gland acini area, 100 largest acini of each treatment were compared.

The results were compared by ANOVA, followed by the Tukey test to verify the differences among the means. The differences were considered statistically different at  $P < 0.05$  (Zar 1996).

### **3. RESULTS**

It was observed during the experiment that the mean area ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$ ) of the hypopharyngeal glands of the *A. mellifera* bees presented positive modulation in the area of the

hypopharyngeal gland (HGA) for the treatments supplemented with 50 and 75 ppm of organic zinc, with  $11.60 \pm 1.1$  and  $12.40 \pm 1.6$ , respectively when compared to the control treatment  $9.78 \pm 3.7$  (Table II and Figure I).

When the treatments supplemented with zinc are compared with each other isolating the control treatment, we can observe that the treatments supplemented with organic zinc present a greater average acini area ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$ ) of the HGA in *A. mellifera* when compared with the treatments supplemented with inorganic zinc, presenting these values  $7.25 \pm 1.0$ ,  $8.57 \pm 1.1$ ,  $9.18 \pm 1.4$ , for ZnI25, ZnI50, ZnI75 respectively and  $7.51 \pm 1.0$ ,  $11.60 \pm 1.1$ ,  $12.40 \pm 1.6$ , for O25, O50, O75 respectively (Table II).

Observing the average acini number ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$ ) of the HGA in *A. mellifera*, we can conclude that no significant differences were found (Table II).

#### 4. DISCUSSION

The results of this research demonstrated that the mineral zinc in its organic form positively modulated the development of the hypopharyngeal glands of honey bees *A. mellifera*, visualized by the alterations in the acini area. The colonies that received supplementation with concentrations above 50 ppm of organic zinc presented mean area of acini significantly larger when compared to the other treatments.

These results could be explained based on the hypothesis that the source (organic or inorganic) in which the mineral is offered may interfere with its bioavailability (Haraguchi 2004; Maret 2017). Minerals linked to organic molecules, called chelates, have advantages over the inorganic form, because in addition to increasing the absorption and the capacity to use essential nutrients, they decrease their excretion (Zhang, 2015; Chand et al., 2020), with reduced competition for sites of bond with other minerals (Maret 2017; Kazemi et al., 2020).

Studies with other animal species have observed that organic source is better than inorganic source, with significant results in feed efficiency and weight gain, in addition to potentiation of the immune system through the production of inflammatory cytokines and increased expression of immunoglobulins (Kohshahi et al., 2019; Dekani et al., 2019; Akhavan-Salamat and Ghasemi 2019; De Grande et al., 2020; Chand et al., 2020; Kazemi et al., 2020).

However, there are few studies in the literature that assess the efficiency of different mineral sources in the physiological development of honey bees *A. mellifera*. This research suggested that the source in which the mineral zinc was offered in the bees' diet promoted changes in its absorption and functions; this fact was observed by the increase in the area of the hypopharyngeal gland with zinc in the organic form, when compared with the inorganic form. During the off-season, the availability of bee pasture is reduced, and with the inevitable food scarcity, bees can swarm if the stocked resources are not enough (Wright 2018; Ahmed et al., 2020). Therefore, it is extremely important to provide an artificial food that ensures the maintenance of the colony (Carrillo et al., 2015; Eşanu et al., 2018).

The knowledge about the need for these micronutrients and their physiological influences is extremely important for the area, as they can affect the development of the hypopharyngeal glands, assisting in dietary supplementation strategies and a better understanding of how management practices can affect honey bees *A. mellifera* (Brodschneider and Crailsheim, 2010). It is suggested that supplementation with organic zinc positively modulated the nutritional and physiological status of worker bees. The amount of royal jelly secreted may be directly related to the size of the hypopharyngeal glands, showing that more developed glands can produce more royal jelly, a hypothesis that would directly influence the nutrition and development of honey bee colonies *A. mellifera* (Brodschneider and Crailsheim, 2010; Kohshahi et al., 2019; Dekani et al., 2019; Maghsoudlou et al., 2019; Chand et al., 2020).

It is concluded that zinc supplementation in its organic form, in concentrations above

50 ppm in the diet of *A. mellifera*, positively modulates the area of the hypopharyngeal gland.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

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 part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – “Finance Code 001”

## **AUTHORS CONTRIBUTION**

All authors have contributed equally to the work.

## **CONFLICT OF INTEREST**

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

## **REFERENCES**

Ahmed, Z. H., Tawfik, A. I., Abdel-Rahman, M. F., Moustafa, A. M. (2020) Nutritional Value and Physiological Effects of Some Proteinaceous Diets on Honey Bee Workers (*Apis mellifera*). *Bee World*, 97(1), 26-31.

Akhavan-Salamat, H., Ghasemi, H. A. (2019) Effect of different sources and contents of zinc on growth performance, carcass characteristics, humoral immunity and antioxidant status of broiler chickens exposed to high environmental temperatures. *Livestock science*, 223, 76-83.

Bovi, T. D. S., Caeiro, A., dos Santos, S. A. A., Zaluski, R., Shinohara, A. J., Lima, G. P. P., Orsi, R. O. (2020). Seasonal variation of flavonoid content in bee bread: Potential impact on hypopharyngeal gland development in *Apis mellifera* honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 59(2), 170-177.

Brodtschneider, R., Crailsheim, K. (2010) Nutrition and health in honey bees.

Apidologie, 41, 278–294.

Carrillo, M.P., Kadri, S.M., Veiga, N., Orsi, R.O. (2015) Energetic feedings influence beeswax production by *Apis mellifera* honeybees. *Acta Scientiarum*, 37(1).

Chand, N., Khan, R. U., Shah, M., Naz, S., Tinelli, A. (2020) Zinc source modulates zootechnical characteristics, intestinal features, humoral response, and paraoxonase (PON1) activity in broilers. *Tropical Animal Health and Production*, 52(2), 511-515.

Crailsheim, K., Schneider, L. H. W., Brassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R. & Schöffmann, B. (1992) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*, 38(6), 409-419.

De Grande, A., Leleu, S., Delezie, E., Rapp, C., De Smet, S., Goossens, E., Ducatelle, R. (2020). Dietary zinc source impacts intestinal morphology and oxidative stress in young broilers. *Poultry Science*, 99(1), 441-453.

Dekani, L., Johari, S. A., Joo, H. S. (2019). Comparative toxicity of organic, inorganic and nanoparticulate zinc following dietary exposure to common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of The Total Environment*, 656, 1191-1198.

Deseyn, J., Billen, J. (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 36, 49-57.

Dobritzsch, D., Aumer, D., Fuszard, M., Eler, S., Buttstedt, A. (2019). The rise and fall of major royal jelly proteins during a honeybee (*Apis mellifera*) workers' life. *Ecology and Evolution*, 9(15), 8771-8782.

Eşanu, D., Pop, I. M., Simeanu, D. (2018) The Influence of Some Supplementary Feeds on Food Consumption and BodyWeight of Caged Honeybees. *Animal Science*, 51(1).

Eyer, M., Neumann, P., Dietemann, V. (2016) A look into the cell: honey storage in

honey bees, *Apis mellifera*. PloS one, 11(8).

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. *Coordination Chemistry Reviews*, 252, 1257-1269.

Haragushi, H. (2004) Metallomics as integrated biometal science. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19(1), 5-14.

Haydak, M. H. (1970) Honeybee nutrition. *Annual Review Entomology*, 15, 143-156.

Hendriksma, H. P., Shafir, S. (2016) Honey bee foragers balance colony nutritional deficiencies. *Behavioral ecology and sociobiology*, 17, 70-509.

Kazemi, E., Sourinejad, I., Ghaedi, A., Johari, S. A., Ghasemi, Z. (2020) Effect of different dietary zinc sources (mineral, nanoparticulate, and organic) on quantitative and qualitative semen attributes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 515, 734529.

Kohshahi, A. J., Sourinejad, I., Sarkheil, M., Johari, S. A. (2019). Dietary cosupplementation with curcumin and different selenium sources (nanoparticulate, organic, and inorganic selenium): influence on growth performance, body composition, immune responses, and glutathione peroxidase activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*, 45(2), 793-804.

Lamontagne-Drolet, M., Samson-Robert, O., Giovenazzo, P. Fournier, V. (2019) The Impacts of Two Protein Supplements on Commercial Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies. *Journal of Apicultural Research*, 58(5), 800-813.

Maghsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mohebodini, H., Toldra, F. (2019). Royal jelly: Chemistry, storage and bioactivities. *Journal of Apicultural Science*, 63(1), 1-24.

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. A., Khodairy, M. 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 honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 48, 425–436.

Rahman, S., Thangkhiew, I., Hajong, S. R. (2014) Hypopharyngeal gland activity in task-specific workers under brood and broodless conditions in *Apis cerana indica*. *Journal of Apicultural Science*, 58, 61–70.

Renzi, M. T., Rodríguez-Gasol, N., Medrzycki, P., Porrini, C., Martini, A., Burgio, G., Maini, S., Sgolastra, F. (2016) Combined effect of pollen quality and thiamethoxan on hypopharyngeal gland development and protein content in *Apis mellifera*. *Apidologie*, 47, 779-788.

Snodgrass, Robert E. (1956) *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press.

Wright, G. A., Nicolson, S. W., Shafir, S. (2018) *Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees*. *Annual Review of Entomology*, 63.

Xun, L., Huang, X., Li, Q., Yang, S., Wang, Y. (2020) Effects of different bee pollens on expression of major royal jelly protein genes and yield, quality and composition of royal jelly of *Apis mellifera*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 32(2), 856-869.

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*). *Scientific Reports*, 7(1), 15217.

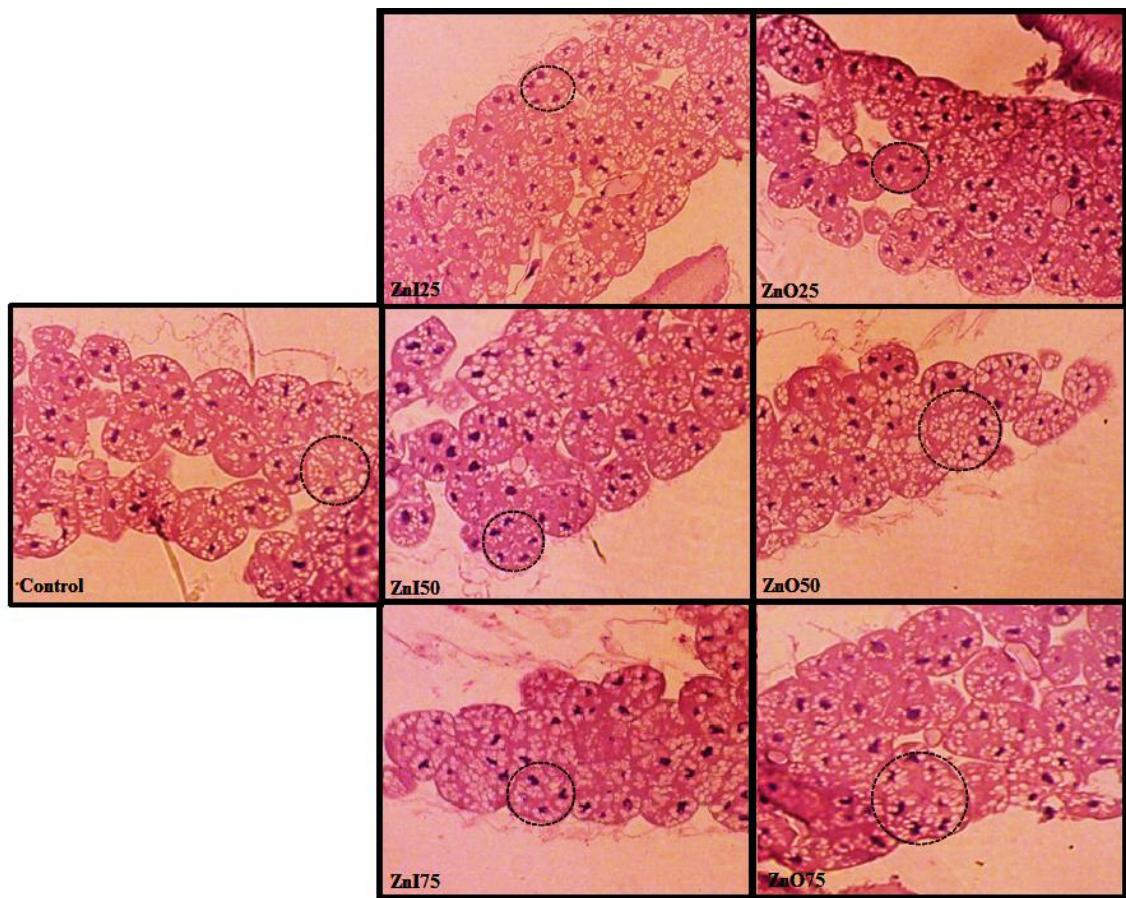
Zar, J. H. (1996) *Bio statistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall. 718.

Zhang, Y. (2015). Why do we study animal toxins? *Zoological research*, 36(4), 183.

**Table II.** Average acini area of the hypopharyngeal glands ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$ ). Inorganic x Organic Sources. Values represent the means followed by their standard deviations. Control (without Zn), inorganic zinc and organic zinc (25, 50 and 75 ppm).

<b>Average acini area (<math>\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}</math>) of the hypopharyngeal gland in <i>Apis mellifera</i></b>						
Control	I25	I50	I75	O25	O50	O75
9.78±3.7A	7.25±1.0A	8.57±1.1A	9.18±1.4A	7.51±1.0A	11.60±1.1B	12.40±1.6C
Inorganic x Organic	7.25±1.0A	8.57±1.1A	9.18±1.4A	7.51±1.0A	11.60±1.1B	12.40±1.6B
<b>Average acini number (<math>\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}</math>) of the hypopharyngeal gland in <i>Apis mellifera</i></b>						
Control	I25	I50	I75	O25	O50	O75
313.4±11	332.2±35	313.4±37	334.2±2	334.4±9.4	335.6±5.9	337.2±2.5

Different letters indicate statistical difference between treatments ( $P < 0.05$ ).



**Fig.1.** Representative photomicrographs of the area of acini the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* bees. Control (without Zn), inorganic zinc and organic zinc (25, 50 and 75 ppm). The black color represents the area of acini the gland. Increase: 10x.

## **CAPÍTULO III**

## Implicações

No estudo constatou-se que durante o período de entressafra o mineral zinco orgânico interferiu de forma positiva, melhorando o desenvolvimento das glândulas hipofaringeanas das abelhas *A. mellifera*.

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 zinco 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.

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 zinco para a dieta durante o período de entressafra.