

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA NUTRIÇÃO NO PERFIL METALOPROTEÔMICO DA GELEIA
REAL PRODUZIDA POR ABELHAS *Apis mellifera* L.**

ADRIANA FAVA NEGRÃO

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

BOTUCATU – SP

Maio – 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DA NUTRIÇÃO NO PERFIL METALOPROTEÔMICO DA GELEIA
REAL PRODUZIDA POR ABELHAS *Apis mellifera* L.**

ADRIANA FAVA NEGRÃO

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. PEDRO DE MAGALHÃES PADILHA

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

BOTUCATU – SP

Maio – 2017

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

N385e Negrão, Adriana Fava, 1988-
 Efeito da nutrição no perfil metaloproteômico da geleia real produzida por abelhas *Apis mellifera* L. / Adriana Fava Negrão. - Botucatu : [s.n.], 2017
 vii, 62 f. : fots. color., grafs. color., tabs.

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

 Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
 Coorientador: Pedro de Magalhães Padilha
 Inclui bibliografia

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

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte".

Dedico

Ao meu avô, Durval (in memoriam), pelo amor que recebi desde sempre. Por me fazer querer sempre ser uma pessoa melhor. Onde estiver espero que se orgulhe de mim, como me orgulho de ser sua neta. Saudades enormes Durvalina.

Aos meus pais, Maria Amália e António Carlos, por serem as pessoas mais maravilhosas da minha vida. Por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Por terem me incentivado a perseguir todos os meus sonhos fazendo sacrifícios para que eu os alcançasse. Pessoas por quem eu faço o meu melhor para que sempre tenham orgulho de mim. Amo-os incondicionalmente.

A minha irmã, Alíne, pelo companheirismo, carinho e amizade que só fizeram aumentar ao longo das nossas vidas. Mesmo os chlíques são momentos que irei apreciar sempre... (depois de passar é claro!!!)

A minha tia, Eliza por sempre estar ao meu lado, desde quando saí de casa para buscar meus objetivos, e ao meu primo/irmão mais novo Lucas por me ensinar um amor tão enorme e maternal. Você ilumina minha vida de muitas maneiras Lukeete.

Aos meus padrinhos, Cida e Jorge, e meus primos Danilo e Marcelo, por todo carinho recebido durante todos os momentos da minha vida. Obrigada por me apoiarem em mais esta jornada. Adoro vocês.

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.

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

Ao meu orientador e amigo, Professor Doutor Ricardo de Oliveira Orsi, por ter me mostrado o mundo da apicultura, e me despertado a paixão pelas abelhas. Por ter me dado a oportunidade de ser sua orientada, de ter confiado e apostado em mim. Por todos os ensinamentos, pela dedicação e paciência. Obrigado por me ajudar a crescer tanto pessoalmente, como profissionalmente.

Ao professor Pedro Padilha, por ter aceitado ser meu co-orientador e aberto as portas de seu laboratório para realização da minha pesquisa.

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

Ao pessoal do laboratório de química do IB, José, Camila, João, Bruna, Vânia Alís, pelas conversas e ajuda prestada para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do NECTAR, Thaís, Marcela, Melina, Cíntia, Edson, Samir e Rodrigo, e aos novos integrantes Alex, Wellington, Roney, e Daniel pelo companheirismo, atenção, ajuda e descontração.

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	01
Considerações iniciais	02
1. As Abelhas <i>Apis mellifera</i> L.	02
1.1. Histórico da apicultura no Brasil	02
1.2. Castas	04
1.3. Importância do pólen para as abelhas <i>Apis mellifera</i> L.	05
2. A geleia real	06
3. Propriedades funcionais da geleia real.....	08
4. Proteômica	09
5. Metalômica	10
6. As metaloproteínas e proteínas ligadas a metais	11
Referências Bibliográficas	13
CAPÍTULO II	20
Resumo	21
Abstract	22
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	24
2.1. Origem das amostras	24
2.2. Coleta de geleia real	25
2.3.Extração e precipitação das proteínas da geleia real.....	25
2.4.Separações eletroforéticas das frações proteicas.....	26
2.5. Análise de Zn e Fe por espectrometria de absorção atômica com chama	27
2.6. Digestão trípica dos spots proteicos para identificação por ESI MS/MS	27
2.7. Identificação das proteínas por ESI MS/MS	28

2.8. Análise de Resultados	29
3. Resultados	29
4. Discussão	32
5. Referências	32
CAPÍTULO III	40
Implicações	41
ANEXO I	42
ANEXO II	56

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Concentração de proteína total (g L^{-1}) obtida nos extratos proteicos de geleia real coletada ao longo do ano; média total de spots proteicos por gel; % de match entre géis e número de spots encontrados contendo zinco, ferro ou ambos. Os dados representam a média seguida dos respectivos desvios-padrão.	29
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Número total de spots analisados com presença de zinco, ferro ou ambos (zinco/ferro).	30
Figura 2. Gráfico de participação em processos biológicos das MRJPs analisadas pelo Blast2Go	32

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. As abelhas *Apis mellifera* L.

1.1. Histórico da apicultura no Brasil

Acredita-se que as abelhas surgiram há cerca de 30 milhões de anos, e que este fato esteja intimamente ligado à evolução das plantas angiospermas (Pirani e Cortopassi-Laurino, 1993; Tautz, 2010). Durante o desenvolvimento da vida na terra haviam insetos, semelhantes às vespas atuais, que visitavam as flores para coletar néctar, sua principal fonte de energia, e caçavam pequenos animais para suprir sua necessidade de proteínas. Quando algumas destas vespas substituíram a proteína animal de sua dieta pela proteína vegetal, isto é, passaram a consumir pólen, também iniciaram uma história de vida própria. Dessas vespas originaram-se as abelhas (Pirani e Cortopassi-Laurino, 1993).

As abelhas *Apis mellifera* L. originaram-se no continente africano e, migraram para a Ásia e Europa diferenciando-se em pelo menos duas dúzias de subespécies fisiologicamente, comportamentalmente e morfológicamente distintas (Parker et al., 2010). Ao longo destas áreas, elas ocuparam os mais variados ambientes, como desertos, florestas tropicais, altas montanhas, savanas, dentre outros (Smith, 1961).

Devido ao processo da expansão territorial europeia e a colonização das novas terras descobertas, o Padre Antônio Carneiro trouxe para o estado do Rio de Janeiro (em 1839), proveniente da cidade de Porto em Portugal, as primeiras abelhas europeias da subespécie *Apis mellifera*. Imigrantes alemães, entre os anos de 1870 e 1880, trouxeram para o Rio Grande do Sul as abelhas *Apis mellifera ligustica*. Outras subespécies também foram trazidas por imigrantes europeus, disseminando-se, assim, as abelhas *Apis mellifera* L. por todo território brasileiro (Wiese, 2005).

Em meados de 1950, a produção nacional de mel era muito baixa (cerca de 4 a 6 mil toneladas/ano), a maioria dos equipamentos apícolas eram importados (centrifugas, decantadores, mesas desoperculadoras etc.) e o associativismo era praticamente inexistente (De Paula, 2008). Esta baixa produtividade apícola no Brasil causou um descontentamento, pois não era um fato condizente com o tamanho do país e com suas

características tropicais, propícias à exploração da apicultura e esta situação chamou a atenção de algumas autoridades brasileiras. (Kerr, 1967).

Devido ao interesse do governo brasileiro em mudar a situação da apicultura nacional, o Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr dirigiu-se a África, trazendo e introduzindo em 1956, na cidade de Rio Claro no estado de São Paulo, as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* (Gonçalves, 2006). Mas em 1957, 26 enxames, com suas respectivas rainhas africanas, escaparam e se estabeleceram como colônias selvagens. Iniciou-se então uma rápida expansão das abelhas *Apis mellifera scutellata* por todo o Brasil realizando um inter cruzamento com as varias subespécies europeias aqui existentes originando um descendente polihíbrido, denominado abelha africanizada, tendo predominância das características das abelhas africanas (De Jong, 1996; Gonçalves, 2006).

As abelhas africanizadas rapidamente se espalharam pelas Américas, colonizando inicialmente o Brasil, seguindo por quase toda a América do Sul, exceto as regiões abaixo do paralelo 35° na Argentina, onde o limite foi provavelmente imposto pelas baixas temperaturas de inverno encontradas nesta região (Sheppard et al., 1999). Ao Oeste, sua expansão foi limitada pela presença da Cordilheira dos Andes, que impediu a passagem dos enxames em razão das baixas temperaturas. Segundo Del Lama et al. (2004), devido as Cordilheiras, o Chile é o único país da América do Sul que não apresenta abelhas africanizadas em seu território até os dias de hoje.

A América Central foi rapidamente colonizada, mesmo com as tentativas de se criar barreiras que impedissem o avanço dos enxames na região do Panamá. Atualmente, ocupam grande parte ou totalidade dos Estados do Texas, Califórnia, Arizona, Novo México e Nevada, no Sul dos Estados Unidos (Alice Pinto et al., 2007).

O surgimento das abelhas africanizadas no Brasil e as suas consequências para a vida dos produtores apícolas, comerciantes e pesquisadores, causaram grande modificação no cenário apícola brasileiro, uma vez que este novo híbrido apresentou desempenho superior as abelhas europeias no continente, pois além da alta capacidade de produção, essa nova abelha apresentou importantes características como rápida adaptação, desenvolvimento populacional, rusticidade, resistência a doenças, prolificidade, eficiência na polinização e maior capacidade de identificação de fonte de

alimento, o que causou uma marco divisório na história da apicultura brasileira (Couto e Couto, 2006; Nogueira-Couto e Couto, 2006).

1.2. Castas

As abelhas *Apis mellifera* L. são insetos sociais que vivem em colônias organizadas onde os indivíduos se dividem em três castas, possuindo funções bem definidas que são executadas visando sempre à sobrevivência e manutenção do enxame. A abelha rainha (fêmea fértil) tem a função de manter a coesão do enxame através da liberação de feromônios, a cópula com o zangão durante o vôo nupcial e a postura diária de milhares de ovos, garantindo o nascimento de novos indivíduos. O zangão (macho fértil) é responsável pela fecundação da abelha rainha durante o vôo nupcial.

A manutenção dos trabalhos da colmeia é realizada pelas abelhas operárias (fêmeas inférteis), que dividem as tarefas de acordo com sua idade fisiológica. Do 1º ao 3º dia de vidas, realizam a limpeza de quaisquer sujidades existentes na colônia. Do 4º ao 12º dia, cuidam da nutrição das larvas, produzem geleia real alimentando a rainha e providenciam a criação de novas rainhas, caso seja necessário. Do 13º ao 18º dia são responsáveis pela produção de cera e construção dos favos. Do 19º ao 20º dia ficam de guarda no alvado defendendo seu território contra qualquer invasão. E, finalmente, do 21º dia em diante as abelhas operárias fazem os serviços externos no campo, coletando néctar, pólen, resinas e água, os quais são recursos de manutenção dos enxames e tornam-se produtos importantes para a produção apícola (Wiese, 2005). Destes, o pólen e o néctar constituem a maior parte da atividade de forrageamento das abelhas campeiras, exceto em períodos de estresse por calor em que a coleta de água pode ser muito mais intensiva (Johnson, 2010).

Atualmente, além do mel, outros produtos também podem ser obtidos por meio da exploração racional apícola, como a própolis, o pólen, a geleia real, a cera e a apitoxina. Além de fornecerem os produtos citados, as abelhas ainda contribuem ao meio ambiente com seus serviços de polinização. Ao forragear as plantas em busca de alimento (pólen e néctar), as abelhas operárias campeiras promovem a reprodução cruzada dos vegetais, aumentando o vigor das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e melhorando a produção de frutos e sementes (Couto e Couto, 2006). De acordo com Ricketts et al., (2008) em torno de 75% das

espécies vegetais existentes são dependentes de agentes polinizadores (água, vento, animais, etc.), no entanto, as abelhas são responsáveis por polinizar cerca de 73% de todas as espécies vegetais cultivadas no mundo.

1.3. Importância do pólen para as abelhas *Apis mellifera* L.

As abelhas *Apis mellifera*, tanto na fase larval quanto na adulta, possuem necessidades específicas de nutrientes para que possam desenvolver todo o seu potencial produtivo e reprodutivo. 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, migram à procura de maior oferta de alimento (Marchini et al., 2006).

As operárias adultas são dependentes dos estoques de alimentos na colônia (pólen e mel), e não sobrevivem a longos períodos sem alimentação, uma vez que não possuem quantidades consideráveis de reservas lipídicas, carboidratos e proteínas em seus corpos (Hrassnigg and Crailsheim, 2005). Quando existe a necessidade de fontes de energia (por exemplo, antes do forrageamento), as operárias consomem os açúcares presente no mel estocado ou por meio da trofalaxia (troca de substâncias entre operárias através de regurgitação) (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

Já o pólen representa a principal fonte de proteínas, gordura (lipídeos), vitaminas e minerais e possui funções fundamentais no desenvolvimento adequado das crias e nutrição de abelhas jovens, no funcionamento das glândulas e ovários e formação das gorduras corporais, além de servir como fonte de nitrogênio (Schäfer et al., 2006; Brodschneider e Crailsheim, 2010). O 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 (Estevinho et al., 2011; Silveira, 2012). Além disto, alguns minerais são considerados macronutrientes essenciais como o cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cloro e enxofre; e como micronutrientes essenciais o cobre, cobalto, ferro, iodo, manganês, selênio e zinco (Brodschneider e Crailsheim, 2010), sendo necessários às abelhas, e também obtidos do pólen. Embora o pólen coletado pelas abelhas apresente minerais em sua composição, 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 (Marchini et al., 2006; Modro et al., 2007).

O pólen que é coletado por abelhas forrageiras e transportado em suas patas traseiras, em estruturas chamadas de corbículas, e estocada nos alvéolos da colmeia, recebendo adição de néctar e secreções salivares, sendo então denominado “pão de abelhas” (De Grandi-Hoffman et al., 2013).

Segundo Funari et al. (1998) e Somerville (2005), a deficiência de proteínas e outros nutrientes 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 os níveis de proteínas brutas e sais minerais em até 8,4 e 38,5%, respectivamente.

Além disso, os teores proteicos presente 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 glandular. Da mesma forma, se as abelhas operárias jovens não consomem quantidade ideal de proteínas, suas glândulas hipofaríngeas (responsáveis pela produção de geleia real) não se desenvolvem completamente e o fornecimento deste alimento para as larvas e abelha rainha pode ficar prejudicado (Standifer, 2003).

2. A Geleia Real

A geleia real é composta a partir de uma mistura de secreções das glândulas hipofaríngeas e mandibulares (que compõem o sistema glandular cefálico), localizadas na cabeça das operárias de *A. mellifera* (Coelho et al., 2008). Estas secreções glandulares são produzidas pelas abelhas nutrizas entre o 5º e o 15º dia, possuindo características distintas, sendo que, a glândula mandibular secreta um componente branco leitoso e a hipofaríngea produz uma secreção de coloração clara e rica em proteínas (Zheng et al., 2010). De modo geral, a geleia real pode ser descrita como um creme branco-amarelado de aspecto leitoso, fortemente ácido, altamente nitrogenado e com odor e sabor característicos (Melliou e Chinou, 2005; Liu et al., 2008).

A importância da geleia real para as abelhas se dá uma vez que esta é utilizada na alimentação das larvas de operárias de até 3 dias após sua eclosão e de zangões

durante toda sua fase larval, e especialmente na alimentação da rainha durante todas as fases (larval e adulta). Desse modo a dieta larval possui uma importante função no polifenismo da abelha *A. mellifera*, sendo importante para a diferenciação das castas e pelas características exclusivas da rainha como o aumento da massa corporal, longevidade e desenvolvimento de estruturas relacionadas à reprodução (Ohashi et al., 1999; Evans e Wheeler, 2001).

A glândula hipofaringeana inicia seu pico de desenvolvimento a partir do 6º dia de vida da operária, sendo que a atividade e a taxa de síntese de proteínas na secreção desta glândula variam de acordo com a idade da operária, tendo maior atividade entre o 10º e o 12º dias de idade (Naiem et al., 1999). Após esse período, sua atividade e volume decrescem rapidamente, passando a secretar enzimas como a invertase quando as abelhas tornam-se campeiras (Deseyn e Billen, 2005).

Segundo Qu et al., 2008, a composição da geleia real varia com a idade e subespécie das abelhas nutrízes, bem como o tipo de alimento consumido e a condição sazonal, sendo então encontrados vários compostos como água (50-70%), proteínas (9-18%), carboidratos (7-18%), lipídios (3-8%, principalmente o 10-hidroxi-2-decenoico), sais minerais (0,8-3%, sendo encontrados em ordem decrescente : K, Ca, Na, Mg, Zn, Fe, Cu e Mn) e vitaminas (principalmente tiamina, niacina, e riboflavina) (Ramadan e Al-Ghamdi, 2012).

Entre as proteínas destacam-se as hidrossolúveis (Water Soluble Proteins - **WSP**). As WSP melhor caracterizadas são denominadas de principais proteínas da geleia real (Major Royal Jelly Proteins - **MRJPs**). Estas proteínas representam 82% do total das proteínas hidrossolúveis e cerca de 90% do total de proteínas da geleia real (Schmitzova et al., 1998), com massa molecular relativa de 49 a 87kDa (Scarselli et al., 2005). Até o presente momento, foram identificadas nove proteínas das MRJPs em *A. mellifera* (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5, MRJP6, MRJP7, MRJP8, MRJP9), além de um polipeptídio incompleto, MRJP ψ , codificado por um pseudogene (Drapeau et al., 2006).

A MRJP1 é estimada a glicoproteína dominante da geleia real, representando 48% do total de proteínas solúveis (Simuth et al., 2004), e juntamente com a MRJP2, MRJP3 (que existe em cinco isoformas) e MRJP5 são consideradas as reservas biológicas de nitrogênio e aminoácido para o rápido desenvolvimento das abelhas.

Acredita-se que as MRJP6, 7, 8 e 9, não possuem funções nutricionais bem definidas, uma vez que não são exclusivamente encontradas neste alimento secretado (Biliková et al., 2002; Majtan et al., 2006).

3. Propriedades funcionais da geleia real

A geleia real é um dos produtos mais atraentes dentre os considerados alimentos naturais, sendo utilizada tanto na indústria de cosméticos como suplemento alimentar. Este produto tem demonstrado possuir várias propriedades funcionais tais como: atividade antibacteriana, anti-inflamatória, atividades vasodilatadoras e hipotensores, ação desinfetante, atividade antioxidante e atividade anti tumoral, sendo particularmente atribuída ao conteúdo lipídico e proteico com a presença do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) e das MRJPs (Ramadan e Al Ghamdi, 2012).

Recentemente o mecanismo da atividade antitumoral da geleia real foi atribuído à presença do 10-HDA, e ao seu efeito inibitório no fator de crescimento do endotélio vascular, induzindo a angiogênese e consequentemente bloqueando a proliferação e migração das células cancerígenas. Por outro lado verificou-se também que as MRJPs estimulam a regressão de tumores em ratos (Pavel, et al., 2011).

Nagai e Inoue (2004) investigaram as propriedades funcionais e antioxidantes do extrato aquoso e alcalino preparado a partir da geleia real fresca. Os rendimentos foram cerca de 8,3% e 6,3% numa base de peso seco, respectivamente. Os níveis totais de compostos fenólicos foram de 21,2 e 22,8 µg/mg de geleia real. As atividades antioxidantes, em ambos extratos, aumentaram dependendo da concentração da amostra, assim como as atividades de sequestro de radicais superóxidos. Isso demonstra que as frações de proteínas e compostos fenólicos na geleia real possuem alta atividade antioxidante e capacidade de eliminação contra espécies ativas de oxigênio.

A maioria dos efeitos imunomoduladores da geleia real têm sido atribuídas aos seus componentes proteicos, especialmente para a principal proteína MRJP3 (Fang, et al., 2010) e apalbumina 1 (Majtan, et al., 2006). A MRJP3 tem sido descrita como o componente dominante anti-inflamatório e imunossupressor da geleia real que promove a resposta antialérgica (Okamoto et al., 2003).

Apesar de não existirem dados oficiais sobre o mercado de geleia real o maior produtor e exportador deste produto é a China, seguindo a mais de 30 anos um trabalho

de melhoramento genético visando o aumento anual da produtividade em abelhas *Apis mellifera*. Na China a produção média de geleia real por colônia/ano é de 8 kg (ou 300 mg por cúpula a cada três dias). É estimada uma produção de duas mil toneladas por ano, o que representa mais de 60% da produção mundial e quase toda produção é exportada para Japão, Estados Unidos e União Europeia. Países como Coreia, Taiwan e Japão também são importantes produtores e exportadores. Outros locais do mundo como a Europa Oriental e o México nas Américas se destacam como grandes produtores (Sabatini, 2009; Faquinello, 2010).

4. Proteômica

Com a codificação do genoma humano, o qual consiste no conjunto de todos os genes, os cientistas voltaram suas pesquisas ao sequenciamento de proteínas. Uma pesquisa está diretamente ligada à outra, pois são as proteínas que carregam as mensagens dos genes para controlar as funções do organismo (Wilkins et al., 2013). Um dos grandes desafios do século 21, segundo *Walter Gilbert*, será codificar as proteínas que os genes produzem e suas funções biológicas exercidas ao longo da vida, viabilizando novas drogas e terapias (Kazmi e Krull, 2001).

O termo proteoma foi inicialmente usado por *Wilkins* e *Williams* em 1993, para descrever o complemento proteico total do genoma (Belizario, 2000). Segundo Lanças et al., (2003) o genoma de um organismo é essencialmente estático e o DNA, do qual pode ser extraído em princípios de uma única célula, contém toda informação. Em contraste, o proteoma observável de uma única célula, definido como a coleção de todas as proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico é dinâmico e dependente do estado da célula. Portanto, o proteoma não é estacionário, mas muda com o desenvolvimento do organismo e com qualquer mudança no seu ambiente. Uma vez que o proteoma muda mais que o genoma, é possível então se obter mais informação do organismo estudando-se o proteoma.

O proteoma é mais complexo que o genoma, não apenas devido ao número de proteínas mas também devido às inúmeras possibilidades de interações entre elas e a estrutura tridimensional que a mesma possui, indo interferir decisivamente no papel que ela realiza. Desse modo, o principal objetivo da ciência do proteoma é fazer uma análise abrangente e em alta escala das proteínas, a proteômica. Com área de atuação ampla, a

proteômica abrange identificação e quantificação de proteínas nas células, tecidos, fluidos biológicos, análises de mudança de expressão normal das proteínas verso a expressão em células doentes, caracterização de modificações pós-traducionais, estudo de interação entre proteínas, entre outras funções (Beranova-Giorgianni, 2003).

Diante disso análise de proteomas possui várias aplicações e a demanda de trabalhos nessa área tem crescido nos últimos anos (Góes e Oliveira, 2014).

5. Metalômica

A metalômica é um campo de pesquisa que deve estar relacionada com a genômica e a proteômica, pois a síntese e funções metabólicas dos genes e proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas, que são metaloproteínas que atuam como catalisadores biológicos na regulação das reações biológicas e funções fisiológicas em células e órgãos (Neves et al., 2012).

A metalômica tem como objetivos a verificação da distribuição das espécies metálicas e metalóides, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas, tais como as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais (Mounicou et al., 2009). Na metalômica, são definidos como “metalomas” os íons metálicos ou espécies metalóides presentes em um sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos), na forma livre ou complexado (Garcia et al., 2009).

Uma das mais importantes tecnologias analíticas para estabelecer a metalômica como ciência dos biometais é a especiação química para a identificação específica de metalomas bioativos, uma vez que a identificação dos metalomas e a elucidação de funções bioquímicas ou fisiológicas nos sistemas biológicos são alvos da metalômica (Garcia et al., 2009). O estudo do metaloma pode fornecer informações tais como: (a) elemento (espécie metálica ou metalóide) distribuído entre os compartimentos celulares de determinado tipo de célula; (b) seu meio de coordenação (qual biomolécula está incorporada ou a qual bioligante está complexada); (c) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes e (d) a estrutura da biomolécula (Garcia et al., 2009; Brandão et al., 2010).

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).

6. As metaloproteínas e proteínas ligadas a metais

Os íons metálicos constituem uma pequena porção (4%) do tecido corporal dos seres vivos, contudo, possuem um papel muito importante como componente estrutural e em muitos processos vitais. Os principais papéis desses íons metálicos podem ser descritos como estrutural e funcional. No aspecto funcional, destaca-se o papel catalisador nos sistemas enzimáticos, por meio da ligação desses íons a substratos, e a mediação nas reações óxido-redução, através de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico. No aspecto estrutural, destaca-se o papel como integrantes dos compostos orgânicos do corpo, tais como ferro na hemoglobina, iodo na tiroxina, cobalto na vitamina B12 e o enxofre na tiamina e biotina, atuando na estabilização dessas moléculas através da proteção de cargas negativas (Romanowski et al., 2001; Voet et al., 2002).

Os íons metálicos ligados às proteínas e as metaloproteínas representam uma grande porção do número total de proteínas. Estima-se que aproximadamente 40% de todas as proteínas e enzimas requerem a presença de um íon metálico para realizar atividade biológica (Romanowski et al., 2001; Garcia et al., 2006). Esses íons são responsáveis por muitos processos metabólicos, como conversão de energia na fotossíntese e respiração, expressão e regulação gênica, além de processos catalíticos, como ligação a um substrato e ativação do mesmo, transporte e armazenamento (Romanowski et al., 2001)

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas de metal ligante (do inglês metal-binding). A primeira constitui um grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína. Já as proteínas ligadas a metais constituem um grupo de proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da ligação metal-proteína. Assim, essa ligação é facilmente quebrada (Romanowski et al., 2001; Voet et al., 2002). Fracamente ligados às proteínas estão os íons monovalentes como o sódio e o potássio.

De intensidade moderada temos o magnésio e o cálcio. Dentre os metais que apresentam forte ligação às proteínas, mais frequentemente estão os metais de transição, tais como o ferro, o cobre, o zinco, o manganês, o molibdênio e o cobalto. Estes, 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).

O zinco ligado às proteínas participa no estabelecimento permanente e na 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, 2004). Participa também na estabilização de membranas e interage com outros cátions bivalentes, sendo um composto que forma a maioria das metaloproteínas. Estas, por apresentar uma ligação estável com proteínas, necessita de um ou mais átomos de zinco para exercer funções catalíticas, co-catalíticas e estruturais. Devido à grande versatilidade de suas características físico-químicas, o zinco tornou-se um foco de investigação nos processos de controle da expressão gênica e outros mecanismos biológicos (Maret, 2010).

Já o ferro desempenha um papel vital em praticamente todos os organismos vivos. Entre os papéis significativos do ferro, estão o transporte, armazenamento e ativação de oxigênio molecular, redução de ribonucleotídeos, ativação e decomposição de peróxidos e de transporte de elétrons através de uma ampla variedade de transportadores, abrangendo um potencial redox de 1V essencialmente (Pierre et al., 2002).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram analisar o teor proteico; número de *spots* e identificar as proteínas da geleia real produzida por abelhas *Apis mellifera* L, assim como suas ligações aos elementos zinco (Zn) e ferro (Fe).

Esta pesquisa resultará no artigo intitulado **Estudo do perfil metaloproteômico do zinco e ferro na geleia real produzida por *Apis mellifera* L.**, o qual será submetido à revista *Insect Molecular Biology*, conforme as suas regras de publicação.

Referências Bibliográficas

ALICE PINTO, M.; SHEPPARD, W.S.; JOHNSTON, J.S.; RUBINK, W.L.; COULSON, R.N.; SCHIFF, N.M.; KANDEMIR, I.; PATTON, J.C. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) of African origin exist in non-africanized areas of the southern United States: evidence from mitochondrial DNA. **Annals of the Entomological Society of America**, v.100, p.289-295, 2007.

ARNESANO, F.; BANCI, L.; BERTINI, I.; CAPOZZI, F.; CIOFI-BAFFONI, S.; CIURLI, S.; LUCHINAT, C.; MANGANI, S.; ROSATO, A.; TURANO, P.; VIEZZOLI, M. S. An Italian contribution to structural genomics: understanding metalloproteins. **Coordination chemistry reviews**, v. 250, n. 11, p. 1419-1450, 2006.

BELIZÁRIO, J. E. Proteoma: o desafio tecnológico do século 21. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 27, n. 162, p. 78-81, 2000.

BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.

BILIKOVÁ, K.; HANES, J.; NORDHOFF, E.; SAENGER, W.; KLAUDINY, J.; ŠIMÚTH, J. Apisimin, a new serine–valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. **FEBS letters**, v. 528, n. 1, p. 125-129, 2002.

BRANDÃO, A. R.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **Journal of Proteomics**, v.73, p.1433-1440, 2010.

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

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

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

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.

DE GRANDI-HOFFMAN, G.; ECKHOLM, B.J.; HUANG, M.H. A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. **Apidologie**, v. 44, n.1, p.52-63, 2013.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v.77, p.67-70, 1996.

DE PAULA, J. Mel do Brasil: as exportações brasileiras de mel no período de 2000/2006 e o papel do Sebrae. Brasília: **SEBRAE**, 2008.

DEL LAMA, M.A.; SOUZA, R.O.; DURAN, X.A.A.; SOARES, A.E.E. Clinal variation and selection on MDH allozymes in honeybees in Chile. **Hereditas**, v.140, n.2, p.149-153, 2004.

DRAPEAU, M. D.; ALBERT, S.; KUCHARSKI, R.; PRUSKO, C.; MALESZKA, R. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. **Genome Research**, v. 16, n. 11, p. 1385-1394, 2006.

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.

EVANS, J.D.; WHEELER, D.E. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. **Bioessays**, v. 23, n. 1, p. 62-68, 2001.

FAQUINELLO, P. Heterogeneidade de variâncias e interação genótipo-ambiente na avaliação genética em abelhas *Apis mellifera* africanizadas para produção de geleia real. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, p.77, 2010.

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.

GARCIA, J. S.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; ARRUDA, M. A. 1 Z. Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through 2 proteomic changes. **Metallomics**, v.1, p.107-113, 2009.

GÓES, A. C. D. S.; OLIVEIRA, B. V. X. D. The Human Genome Project: a portrait of scientific knowledge construction by the Ciência Hoje magazine. **Ciência & Educação (Bauru)**, v. 20, n. 3, p. 561-577, 2014.

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

HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 36, n. 2, p. 255-277, 2005.

JOHNSON, B. R. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 64, n. 3, p. 305-316, 2010.

KAZMI, S.; KRULL, I. S. Proteomics and the current state of separations science, part one. **PharmaGenomics August**, p. 14-29, 2001.

KERR, W.E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**. v.39, n.2, p.3-5, 1967.

LANÇAS, F. M.; SILVA, J. C. R.; BICUDO, R. C.; NETO, B. M. A química analítica do proteoma. **Analytica**, v.6, p.60-66, 2003.

LIU, J. R.; YANG, Y. C.; SHI, L. S.; PENG, C. C. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 23, p. 11447-11452, 2008.

MAJTÁN, J.; KOVÁČOVÁ, E.; BÍLIKOVÁ, K.; ŠIMÚTH, J. The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1–major honeybee royal jelly protein–on TNF α release. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 269-278, 2006.

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) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.949-953, 2006.

MARET, W. Exploring the zinc proteome. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 1, p. 15-19, 2004.

MARET, W. Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. **Metallomics**, v. 2, n. 2, p. 117-125, 2010.

MELLIOU, E.; CHINOU, I. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 23, p. 8987-8992, 2005.

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, S.; SZPUNAR, J.; LOBINSKI, R. Metallomics: the concept and methodology. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n.4, p.1119-1138, 2009.

NAGAI, T.; INOUE, R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. **Food chemistry**, v. 84, n. 2, p. 181-186, 2004.

NAIEM, E.S.; HRASSNIGG, N.; CRAILSHEIM, K. Nurse bees support the physiological development of young bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 169, n. 4-5, p. 271-279, 1999.

NEVES, R. C. F.; LIMA, P. M.; BALDASSINI, W. A.; SANTOS, F. A.; MORAES, P. M.; CASTRO, G. R.; PADILHA P. M. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. **Química Nova**, v.35, p.493-498, 2012.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3ª ed., Jaboticabal:FUNEP, p.194, 2006.

OHASHI, K.; NATORI, S.; KUBO, T. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). **European Journal of Biochemistry**. v. 265, n. 1, p. 127-133, 1999.

OKAMOTO, I.; TANIGUCHI, Y.; KUNIKATA, T.; KOHNO, K.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. **Life sciences**, v. 73, n. 16, p. 2029-2045, 2003.

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.

PAVEL, C. I.; MĂRGHITAȘ, L. A.; BOBIȘ, O.; DEZMIREAN, D. S.; ȘAPCALIU, A.; RADOI, I.; MĂDAȘ, M. N. Biological activities of royal jelly-review. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, n. 2, p. 108-118, 2011.

PIERRE, J. L.; FONTECAVE, M.; CRICHTON, R. R. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. **Biometals**, v. 15, n. 4, p. 341-346, 2002.

PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. 1.ed. São Paulo:Edusp/Fapesp, p.49, 1993.

QU, N., JIANG, J., SUN, L., LAI, C., SUN, L., WU, X. Proteomic characterization of royal jelly proteins in Chinese (*Apis cerana cerana*) and European (*Apis mellifera*) honeybees. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 6, p. 676-680, 2008.

RAMADAN, M. F.; AL-GHAMDI, A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 39-52, 2012.

RICKETTS, T.H.; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEN, C.; BOGDANSKI, A.; GEMMILL-HERREN, B.; GREENLEAF, S.S.; KLEIN, A.M.; MAYFIELD, M.M.; MORANDIN, L.A.; OCHIENG', A.; VIANA, B.F.

Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns?. **Ecology Letters**, v.11, n.5, p.499-515, 2008.

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.

SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; CABONI, M. F.; BOGDANOV, S.; MURADIAN, L. B. A. Quality and standardisation of royal jelly. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2009.

SCARSELLI, R.; DONADIO, E.; GIUFFRIDA, M. G.; FORTUNATO, D.; CONTI, A.; BALESTRERI, E.; FELICOLI R.; PINZAUTI M.; SABATINI A.G. Towards royal jelly proteome. **Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 769-776, 2005.

SCHÄFER, M.O.; DIETEMANN, V.; PIRK, C.W.W.; NEUMANN, P.; CREWE, R.M.; HEPBURN, H.R.; TAUTZ, J.; CRAILSHEIM, K. Individual versus social pathway to honeybee worker reproduction (*Apis mellifera*): pollen or jelly as protein source for oogenesis. **Journal of Comparative Physiology**, v.192, p.761–768, 2006.

SCHMITZOVA J.; KLAUDINY J.; ALBERT S.; SCHRODER W.; SCHRECKENGOST W.; HANES J.; JUDOVA J.; SIMUTH J. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 54, n. 9, p. 1020-1030, 1998.

SHEPHERD, A.J.; GORSE, D.; THORNTON, J.M. Prediction of the location and type of β -turn types in proteins using neural networks. **Protein Science**, v.8, n.5, p.1045-1055, 1999.

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.

SILVEIRA, T.A. Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental.

Dissertação Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”., Universidade de São Paulo, Piracicaba, p.66, 2012.

ŠIMÚTH, J.; BÍLIKOVÁ, K.; KOVÁČOVÁ, E.; KUZMOVÁ, Z.; SCHRODER, W. Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α release is a regular component of honey. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2154-2158, 2004.

SMITH, F. G. The races of honeybees in Africa. **Bee World**, v. 42, p. 255-260, 1961.

SOMERVILLE, D.C. **Fat bees, Skinny bees – a manual on honey bee nutrition for beekeepers**. Australian Government: Rural Industries Research and Development Corporation, p.150, 2005.

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: 12/09/2016

TAUTZ, J. **O fenômeno das abelhas**. 1.ed. Porto Alegre: Atmed, p.288, 2010.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentals of biochemistry. Upgrade edition, John Wiley & Sons, Inc., p.931, 2002.

WIESE, H. **Apicultura Novos Tempos**, 2ª Ed. – Guaíba: Agrolivros, p.17, 2005.

WILKINS, M.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. **Proteome research: new frontiers in functional genomics**. Springer Science & Business Media, 2013.

YU, F.; MAO, F.; JIANKE, L. Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 5, p. 2207-2215, 2010.

ZHENG, H. Q.; HU, F. L.; DIETEMANN, V. Changes in composition of Royal jelly harvested at different times: consequences for quality Standards. **Apidologie**, 2010.

CAPÍTULO II

ESTUDO METALOPROTEÔMICO DO ZINCO E FERRO NA GELEIA REAL PRODUZIDA POR *Apis mellifera* L.

Resumo: A geléia real é um alimento exclusivo da abelha rainha que é sintetizado e secretado por abelhas nutrizas. Pouco se sabe sobre a funcionalidade e os componentes proteicos totais da geleia real, e sua associação a diferentes moléculas (ligação metal-proteína, por exemplo). O objetivo do trabalho foi analisar o teor proteico e número de *spots* da geleia real coletada ao longo do ano, assim como identificar as proteínas dos *spots* contendo zinco (Zn) e/ou ferro (Fe). A geleia real foi coletada quinzenalmente durante o período de janeiro a dezembro de 2015, de quatro colmeias mini-recria. A determinação dos minerais foi realizada por meio de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e a identificação das proteínas por ESI MS/MS. Os dados obtidos foram avaliados por ANOVA, seguido do teste de Tukey para verificar diferenças entre as médias ($P < 0,05$). Observamos que houve variação tanto no teor proteico como no número de *spots* da geleia real coletada ao longo do ano. O Zn foi encontrado em maior quantidade de *spots* analisados em comparação ao Fe ao longo do ano e, nos meses de fevereiro a junho e setembro, estes minerais foram observados simultaneamente em alguns *spots*. Dentre as proteínas identificadas, destacam-se as Major royal jelly protein - MRJPs, sendo a mais abundante neste trabalho a MRJP2 seguida respectivamente da MRJP3 e MRJP1 (importantes por desempenharem funções nutricionais); além destas proteínas principais também foram identificadas as MRJP5, MRJP6, MRJP7 e MRJP9. Nossos resultados mostram a importância de estudar as possíveis interações das proteínas da geleia real com metais como zinco e ferro, para melhor entender as possíveis atuações destes complexos nos sistemas biológicos da *Apis mellifera* L.

Palavra-Chave: apicultura, minerais, MRJP, proteoma, *spots* proteicos.

METALOPROTEOMIC STUDY OF ZINC AND IRON IN ROYAL JELLY
PRODUCED BY *Apis mellifera* L.

Abstract: Royal jelly is an exclusive food of the queen bee which is synthesized and secreted by nursing bees. Little is known about the functionality and total protein components of royal jelly, and its association to different molecules (metal-protein binding, for example). This work purpose was to analyze the protein content and number of spots of the royal jelly collected over the year, as well as identifying the spots proteins containing zinc (Zn) and/or iron (Fe). Royal jelly was collected every two weeks during the period from January to December 2015, from four mini-rearing hives. The minerals determination was performed by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and the identification of the proteins by ESI MS/MS. The obtained data were evaluated by ANOVA followed by Tukey's test to check for differences between means ($P < 0.05$). We observed that there was a variation in both protein content and number of spots of royal jelly collected over the year. Zn was found in a greater variety of the analyzed spots compared to Fe throughout the year and in the months of February to June and September these minerals were observed simultaneously in some spots. Amongst the identified proteins, we highlight the so-called Main Royal Jelly Protein (MRJPs), being most abundant in this work the MRJP2, followed respectively by MRJP3 and MRJP1 (important by playing nutritional functions), besides these main proteins MRJP5, MRJP6, MRJP7 and MRJP9 were also found. Our results show the importance of studying the possible interactions of royal jelly proteins with metals such as zinc and iron, in order to better understand the possible actions of these complexes in biological systems of *Apis mellifera* L.

Keyword: Beekeeping, minerals, MRJP, proteome, protein spots.

1. INTRODUÇÃO

A geleia real é uma secreção de aspecto leitoso, fortemente ácido, altamente nitrogenado, com odor e sabor característicos, sintetizada e secretada pelas glândulas mandibulares e hipofaríngeas, localizadas na cabeça das abelhas operárias nutrízes de *Apis mellifera* L. entre o 5º e o 15º dia de vida (Schmitzova et al., 1998; Melliou e Chinou, 2005; Liu et al., 2008). É um produto apícola amplamente reconhecido pela sua composição complexa contendo vários elementos minerais, proteínas, aminoácidos, esteroides, fenóis, carboidratos, vitaminas, lipídios, além de outras substâncias desconhecidas (Garcia-Amoedo e Almeida-Muradian, 2007).

Segundo Schmitzova et al., (1998) a geleia real é fonte natural de aminoácidos essenciais, lipídios, vitaminas e outros nutrientes para as abelhas, além de possuir destacada importância no seu processo de reprodução e desenvolvimento. Dentre as proteínas destaca-se a família das principais proteínas encontradas na geleia real, denominada Major Royal Jelly Proteins (MRJPs) ou apalbuminas, que representam 82% do total das proteínas hidrossolúveis e cerca de 90% do total de proteínas da geleia real, constituída de 5 membros principais – MRJP1, 2, 3, 4 e 5 (Scarselli et al., 2005). Até o momento outras 4 proteínas foram adicionadas a esse grupo (MRJP6, 7, 8 e 9), perfazendo um total de 9 proteínas identificadas (Santos et al., 2005).

Devido à presença destas substâncias que auxiliam no aumento corporal e desenvolvimento dos ovários, a abelha rainha é alimentada com geleia real durante todo seu período larval e vida adulta, ao passo que as larvas de abelhas operárias recebem este alimento somente nos primeiros três dias da fase larval, alimentando-se posteriormente de pólen e néctar (Drapeau et al., 2006; Kamakura, 2011).

Embora a alimentação das abelhas seja focada em alimentos energéticos e proteicos, outros nutrientes como vitaminas e minerais são essenciais para o desenvolvimento das colônias (Brodschneider e Crailsheim, 2010). Dentre os micronutrientes presentes nesta dieta destacam-se dois minerais: zinco e ferro.

O zinco atua como um íon catalítico, estrutural e regulador em vários contextos, e a sua deficiência induz o estresse oxidativo (Mocchegiani et al., 2000). Além disso, estudos sugerem que a vitelogenina (glicolipoproteína precursora do vitelo) é a principal

transportadora de zinco em abelhas operárias, e demonstram que a falta de zinco induz a degeneração do núcleo de hemócitos em culturas celulares (Amdam et al., 2004).

Já o ferro tem grande importância no desenvolvimento dos insetos, auxiliando no funcionamento normal da célula, atuando como cofator enzimático, participando no metabolismo energético, xenobiótico e de aminoácidos, regulação da expressão gênica, entre outros. Diversas enzimas que contêm este mineral têm funções importantes na síntese de DNA, RNA e no processo de melanização, que está relacionado ao sistema imunológico de insetos (Locke e Nichol, 1992). Além disso, muitas enzimas que estão envolvidas na produção de energia e respiração contêm ferro em sua estrutura. Estas são utilizadas em quantidades consideráveis no músculo durante o voo (Moritz, e Southwick, 2012), sugerindo que este elemento tenha um importante papel no desenvolvimento do enxame (Hsu et al., 2007).

Sendo assim, estudos que analisem a composição da geleia real são de extrema importância, pois podem servir como ferramenta para auxiliar no conhecimento da nutrição dos enxames em determinadas regiões de acordo com o clima apresentado. Assim, a presente pesquisa teve por objetivo analisar o teor proteico; número de *spots* e identificação das proteínas da geleia real produzida por abelhas *Apis mellifera* L, assim como sua ligação com zinco (Zn) e ferro (Fe).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras

O experimento foi desenvolvido na área de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizada na Fazenda Experimental Lageado, UNESP, campus de Botucatu, com as seguintes coordenadas geográficas: 22° 82' de latitude Sul e 48° 39' de longitude Oeste com clima Cfa (subtropical úmido) de acordo com a classificação de Köppen (Köppen e Geiger, 1928).

2.2 Coleta de Geleia Real

As coletas foram realizadas quinzenalmente no período de janeiro a dezembro de 2015, sendo utilizadas 04 colmeias mini-recrias e 06 de apoio, semelhantes quanto ao número de quadros de cria e alimento.

A produção de geleia real foi realizada segundo Doolittle (1899), pelo método de transferência de larvas. Para isto, as rainhas das colmeias mini-recrias foram retiradas, aprisionadas em gaiolas e mantidas nas colmeias de apoio, com o objetivo de aumentar a necessidade de criação de nova rainha e assim existir maior aceitação das cúpulas e produção de geleia real. Após 48 horas, estas rainhas foram devolvidas às suas colmeias de origem.

Para a produção de geleia real, cada mini recria recebeu dois quadros porta-cúpulas, contendo um sarrafo, com aproximadamente 25 cúpulas acrílicas cada. Para padronizar a idade das larvas a serem transferidas para as cúpulas artificiais, outras duas colmeias tiveram suas rainhas aprisionadas em um quadro de ninho, contendo as laterais fechadas com tela excludora. Este processo garantiu a postura da rainha no quadro desejado e a padronização da idade das larvas. Estas larvas foram então transferidas para as cúpulas artificiais contendo uma gota de geleia real diluída em água (na proporção de 1:1), sendo uma larva para cada cúpula, com auxílio de pincel apropriado para a transferência. Após a montagem do quadro porta-cúpulas, este foi introduzido na mini recria sem a rainha. A produção de geleia real foi colhida após 48 horas da transferência e armazenada em vials e em freezer até o momento das análises.

2.3 Extração e Precipitação das Proteínas da Geleia Real

Para extrair as proteínas da geleia real foram pesados 250 mg desta em tubos tipo eppendorf e adicionado em cada, 500 µL de água ultrapura (a fim de extrair as proteínas hidrossolúveis do grupo principal), agitado no vórtex e submetido à centrifugação a 7000 rpm, 4°C por 30 min. O sobrenadante foi recolhido e submetido a mais 6 centrifugações a 14 000 rpm, 4°C com duração de 5 min cada, para descartar toda impureza da amostra.

Para precipitação das proteínas, foi adicionado aos microtubos contendo 100 µL de sobrenadante, 400 µL de acetona 80%, repousado por 2h e centrifugado novamente

por 14000 rpm, 4°C por 5 min. Após esse processo, foi descartado o sobrenadante e obtido os pellets proteicos, sendo esses submetidos a três lavagens com 200 µL de acetona 80%.

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).

2.4 Separações eletroforéticas das frações proteicas

Os pellets proteicos obtidos foram solubilizados, em solução contendo ureia 7 mol L⁻¹; tiourea 2 mol L⁻¹; CHAPS (sulfato de 3-[(3-cloroaminopropil) dimetilamônio]-propan-1) 2% (m/v); anfólitos 0,5% (v/v) com pH variando de 3 a 10; 0,002% de azul de bromofenol (m/v) e 2,8 mg de DTT (1,4-ditiotreitol). Um volume de 250 µL dessa solução de reidratação foi aplicado em cada tira de tampão immobiline pH 3-10, 13 cm e mantido em repouso por 12h. Foram hidratadas quatro fitas por mês, totalizando 48 fitas. Após esse período, foi realizado a focalização isoeletrica (IEF) - Ettan IPGphor (primeira dimensão). Etapa esse onde as proteínas são separadas de acordo com o pI (ponto isoeletrico) e, em seguida as tiras foram reequilibradas em duas soluções: redutora, utilizando 10 mL de solução contendo ureia 6 mol L⁻¹, SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8), 0,002% de azul de bromofenol (m/v) e 2% (m/v) DTT, a fim de manter as proteínas nas suas formas reduzidas; alquilante: utilizou-se uma solução de composição semelhante, substituindo o DTT por iodoacetamida a 2,5% (m/v) para alquilação dos grupos tiol das proteínas e, assim, prevenir a possível re-oxidação. As duas etapas foram mantidas sob agitação com duração de 15 minutos cada. Em seguida, as fitas foram aplicadas a géis de poliacrilamida 12,5% (m/v), adicionados padrões de massa molecular 14 a 97 ao lado de cada gel, ambos selados com uma solução de agarose (0,5% m/v) e realizado a corrida 2D-PAGE em duas etapas: 30 min a 100V e 2.35h a 250V (adaptado de GE Healthcare, 2007).

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel durante 1 h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). As proteínas foram coradas com Coomassie coloidal em contato com o gel durante 72 horas. Em seguida, os géis foram lavados com água ultrapura, digitalizados e analisados utilizando o software [ImageMaster platinum, versão 7.0](#) para se obter número de spots e matching.

Os parâmetros para a detecção dos spots utilizados foram: smooth - 2; saliency - 25 e min área – 5 (GE Healthcare, 2007).

2.5 Análise de Zn e Fe por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS)

Para determinação do Zn e Fe, os *spots* proteicos recortados dos géis foram transferidos para tubos de digestão de 5 mL, sendo adicionado a cada frasco alíquotas de 500 µL de ácido sulfúrico concentrado ultrapuro e 100 µL de peróxido de hidrogênio 30% (m/m). O conjunto de frascos foi colocado em bloco digestor até a completa mineralização das amostras (extrato transparente). Em seguida, os extratos ácidos obtidos foram avolumados para 5 mL com água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) (adaptado de Moraes et al., 2012).

Para a construção das curvas analíticas, soluções padrão de ferro e zinco em meio de H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas a partir da diluição dos padrões Titrisol contendo 1000 mol L^{-1} dos analíticos. As faixas ótimas de concentração das curvas analíticas foram as sugeridas no manual do equipamento. Para cada curva analítica foi preparado um branco. As condições operacionais utilizadas para as determinações de Fe e Zn por FAAS foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (Cookbook, Shimadzu AA – 6800, 2000).

2.6 Digestão trípica dos spots proteicos para identificação por ESI MS/MS

Os *spots* foram recortados dos géis em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 , transferidas para tubos de 2,0 mL contendo 200 µL de ácido acético 5% e armazenados a -4°C até o passo seguinte. Posteriormente, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução descorante contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 25 mM por 30 min. Posteriormente, os mesmos foram desidratados duas vezes em ACN 100% por 10 min. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente.

Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos à redução com DTT 20 mM em AmBic 50 mM incubados por 40 min a 56°C . O excesso de líquido foi removido e substituído por IAA 55 mM em AmBic 50 mM. Após 30 min no escuro, em

temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AMBIC 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados em 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, EUA) em AmBic 25 mM por 15 min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AmBic 25 mM para total cobertura dos *spots* e incubou-se a 37°C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 min com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 min com solução de eluição B (metanol 60 % v/v e ácido fórmico 1 % v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação em banho (Ultracleaner 1600A, Unique, Brasil) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em temperatura ambiente, por 6-8 h e armazenada a -20°C até a realização do sequenciamento (Shevchenko et al., 2006).

2.7 Identificação das proteínas por ESI MS/MS

As alíquotas das soluções contendo os peptídeos foram analisadas para obtenção dos espectros de massas utilizando Plataforma LCMS em espectrômetro de massa com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA). Os dados obtidos para sequência de proteínas foram processados pelo banco de dados teórico *Uniprot* (www.uniprot.org).

A análise de bioinformática foi realizada através do programa Blast2GO, onde as seqüências dos peptídeos trípticos de cada proteína digerida foram usadas para analisar a função expressada pelas proteínas junto ao banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Conesa et al., 2005).

2.8 Análise dos resultados

Os resultados foram avaliados por ANOVA, seguida do teste de Tukey para verificar diferenças entre as médias ($P < 0,05$) (Zar, 2010).

3. RESULTADOS

Observou-se que tanto os valores de proteína quanto o número de *spots* variaram significativamente entre os meses ao longo do ano (Tabela 1).

Fevereiro e outubro apresentaram a maior concentração de proteína ($23,79 \pm 0,4$ e $23,68 \pm 0,9$ g L⁻¹) nos pellets de geleia real em comparação com junho e dezembro que apresentaram os menores valores, respectivamente ($14,07 \pm 0,9$ e $15,10 \pm 1,6$ g L⁻¹). A maior média de número de *spots* proteicos foi encontrada em abril ($131,0 \pm 17,0$) não diferindo significativamente dos meses de maio ($125,0 \pm 8,3$), junho ($127,0 \pm 1,8$) e setembro ($127,0 \pm 7,1$). O matching (que é a correlação obtida entre os géis analisados, feita pela equivalência entre os *spots* de 4 géis por tratamento) para todos os meses se apresentou acima dos 70%, significando uma alta repetibilidade entre os *spots* dos géis de um único mês.

Tabela 1: Concentração de proteína total (g L⁻¹) obtida nos extratos proteicos de geleia real coletada ao longo do ano; média total de *spots* proteicos por gel e % de match entre géis. Os dados representam a média seguida dos respectivos desvios-padrão.

MESES	Proteína (g L ⁻¹)	Média do nº de <i>spots</i>	% Match géis
Janeiro	$18,96 \pm 2,4$ ab	$97,7 \pm 7,1$ a	$88,2 \pm 4,9$
Fevereiro	$23,79 \pm 0,4$ b	$62,5 \pm 4,6$ c	$96,5 \pm 0,5$
Março	$17,74 \pm 2,1$ ab	$90,0 \pm 7,8$ ad	$92,7 \pm 4,2$
Abril	$16,27 \pm 2,9$ ab	$131,0 \pm 17,0$ b	$92,5 \pm 3,6$
Maió	$17,13 \pm 2,2$ ab	$125,0 \pm 8,3$ b	$90,5 \pm 3,1$
Junho	$14,07 \pm 0,9$ a	$127,0 \pm 1,8$ b	$95,5 \pm 1,7$
Julho	$19,52 \pm 0,6$ ab	$79,2 \pm 5,1$ ac	$97,5 \pm 3,1$

Agosto	16,37±2,3 ab	80,5±4,9 ac	91,0±5,6
Setembro	17,41±2,8 ab	127,0±7,1 b	90,7±6,1
Outubro	23,68±0,9 b	76,0±4,2 ac	95,0±5,6
Novembro	17,55±1,3 ab	71,2±6,3 cd	90,2±2,3
Dezembro	15,10±1,6 a	72,7±3,3 cd	96,5±4,3

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa entre as médias ($P \leq 0,05$).

O número de *spots* obtidos nas amostras de geleia real que continham os minerais zinco e ferro variou entre os meses estudados. O zinco foi encontrado em todos os meses, sendo que maio apresentou maior quantidade de *spots* com este mineral (80) e janeiro o menor (6). O ferro por sua vez esteve presente em menor número de *spots* ao longo do ano, sendo que nos meses de julho, agosto, outubro e novembro este mineral não foi encontrado ligado às proteínas presentes nos *spots* analisados. Observamos também que foram encontrados simultaneamente *spots* com zinco e ferro nos meses de fevereiro (19), março (9), abril (2), maio (2), junho (1) e setembro (2) (Figura 1).

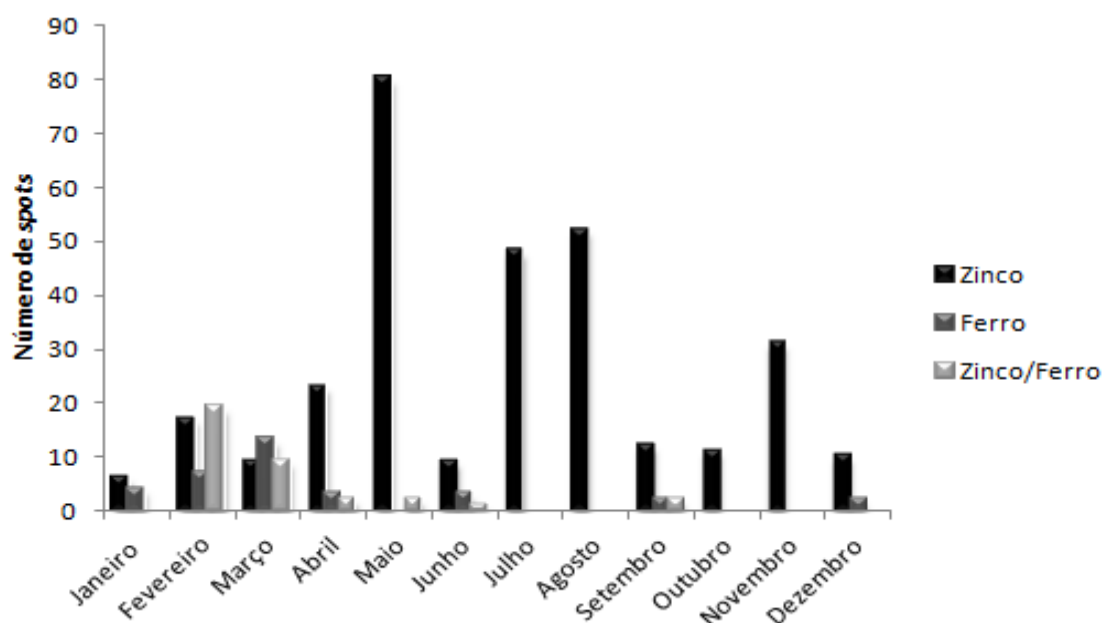


Figura 1 – Número total de spots analisados com presença de Zinco, Ferro ou ambos (Zinco/Ferro)

Dos *spots* selecionados, foram identificados por ESI MS/MS um total de 94, sendo que as proteínas encontradas são as que formam o grupo de proteínas principais da geleia real denominado Major royal jelly protein (MRJP). Foram identificadas as MRJP1;

MRJP2; MRJP3; MRJP5; MRJP6; MRJP7 e MRJP9. A tabela com a descrição das proteínas identificadas pode ser encontrada no anexo I deste trabalho.

Na maioria dos *spots* proteicos foram encontradas mais de uma proteína quando buscada no banco de dados, podendo este fato ocorrer durante o processo de caracterização das proteínas pela espectrometria de massas. A veracidade da proteína caracterizada por ESI MS/MS foi feita considerando o *score* obtido maior do que 50.

Observamos que as proteínas do grupo principal, mais abundantes nos *spots* obtidos dos géis de amostras de geleia real foram a MRJP1, MRJP2 e MRJP3, sendo que as mesmas apareceram como proteína única em determinados *spots*.

A MRJP1 foi identificada como proteína única nos *spots* número 10 (encontrado nos meses de fevereiro, maio e julho ligado ao zinco); 54 (ligado ao zinco nos meses de janeiro, fevereiro, março, julho, agosto, setembro e novembro) e 55 (fevereiro e março ligado ao zinco e ferro simultaneamente e somente ao zinco nos meses de maio, junho, julho, agosto, novembro e dezembro).

Já a MRJP2 foi observada nos *spots* 3 (no mês de agosto ligado ao zinco); 7 (ligado ao ferro no mês de abril e ao zinco em maio) e 33 (ligado ao zinco nos meses de janeiro, fevereiro e agosto).

A MRJP3 por sua vez, foi encontrada nos *spots* 59 (observado nos meses de maio, junho e agosto ligado ao zinco); 60 (ligado ao zinco nos meses de maio, junho, julho, agosto e novembro); 61 (ligado ao zinco nos meses de fevereiro, maio, junho, julho, agosto, setembro e novembro) e 71 (ligada simultaneamente ao zinco e ferro no mês de fevereiro, ligada ao zinco nos meses de abril, maio, agosto, outubro e novembro e ligada somente ao ferro no mês de dezembro).

Já nos demais *spots* essas proteínas foram encontradas em conjunto com demais proteínas do grupo principal (MRJP5, 6, 7, e 9).

As imagens dos géis de poliacrilamida 12,5% contendo os *spots* apresentando zinco e/ou ferro podem ser encontradas no anexo II deste trabalho.

Todas as proteínas que foram identificadas contendo zinco e/ou ferro ligado à sua estrutura foram analisadas pelo programa de bioinformática Blast2Go para definir sua atuação em diferentes processos biológicos (Figura 2).

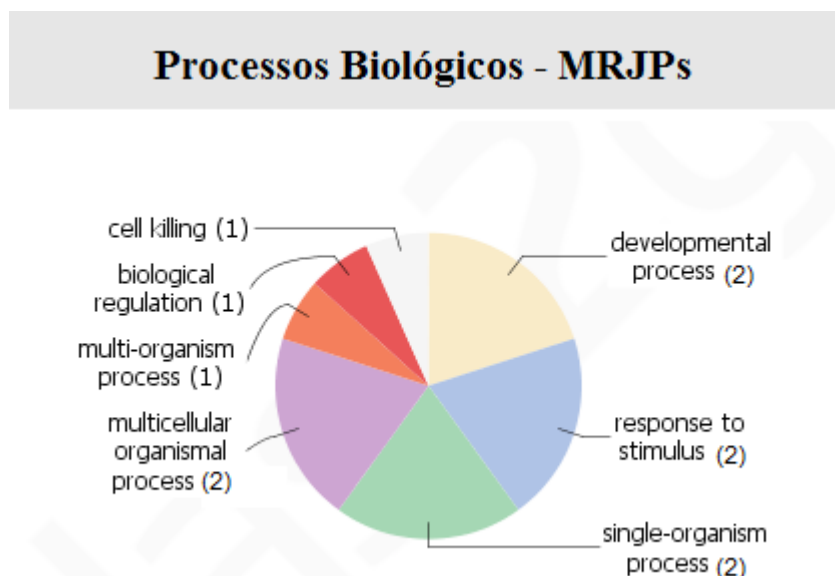


Figura 2 – Gráfico de participação em processos biológicos das MRJPs analisadas pelo Blast2Go

Todas as proteínas encontradas que foram analisadas são consideradas componente extracelular da geleia real. A análise de processos biológicos efetuada pelo programa mostrou as proteínas MRJP1 e MRJP9 atuando em processos de desenvolvimento; resposta a estímulos; processo de um único organismo e processo de organismo multicelular. A MRJP1 foi identificada atuando também em morte celular, regulação biológica e processo de multi-organismos.

4. DISCUSSÃO

O teor de proteína da geleia real variou entre $14,07 \pm 0,9$ e $23,79 \pm 0,4$ g L⁻¹ ao longo do ano. As diferenças obtidas podem ser explicadas uma vez que a composição da geleia real varia principalmente de acordo com o estado nutricional, fisiológico e metabólico da abelha nutriz, a espécie da abelha e as condições sazonais da região em que a geleia real é produzida (Scarselli et al., 2005). Os valores de proteína encontrados neste trabalho estão condizentes com os relatados por outros estudos (Sabatini et al., 2009; Lopes, 2014).

Observamos também que o número médio de *spots* esteve entre $62,5 \pm 4,6$ a $131,0 \pm 17,0$ nos meses estudados. Estas variações podem ser explicadas pela presença de isoformas de proteínas do grupo principal (Major Royal Jelly Proteins – MRJPs) que sofrem processos de transformações *in vivo*, tais como fosforilação, acetilação e glicosilação e processos de modificações pós-traducionais em diferentes extensões, e/ou

são produtos de alelos polimórficos com algumas substituições de aminoácidos que afetam o ponto isoelétrico (pI) dos polipeptídeos, o que pode acrescentar ainda mais complexidade ao padrão proteico da geleia real. O polimorfismo destas proteínas assim como diferenças nas modificações pós-tradução podem ser causadas pela variabilidade genética dos indivíduos da colmeia, bem como entre diferentes colônias e linhagens de abelhas (Schmitzova et al., 1998; Yu et al., 2010).

Dentre as proteínas caracterizadas neste estudo, observamos uma predominância da MRJP1, MRJP2 e MRJP3 em relação às demais. A abundância destas proteínas (consideradas as mais importantes do grupo principal, juntamente com a MRJP4 e 5) assim como a presença de diferentes isoformas das mesmas, foram também relatadas em diferentes estudos que utilizaram técnicas de separação eletroforética em 2ª dimensão (2-DE) (Li et al., 2008; Furusawa et al., 2008).

A MRJP1 (anteriormente denominada royalactina – 57 kDa) é considerada a proteína de maior importância nutricional do grupo principal e sozinha chega a compreender cerca de 48% de todas as proteínas hidrossolúveis encontradas na geleia real (Šimúth, 2001). Segundo Kamakura (2011), a MRJP1 desempenha funções importantes reduzindo o tempo de desenvolvimento da rainha (fase larval e pupa), e principalmente acarretando o aumento do seu tamanho corporal e desenvolvimento ovariano. Essas funções são determinadas uma vez que a MRJP1 é capaz de ativar a proteína p70 S6 quinase, uma vez que a mesma é responsável pelo aumento dos níveis de hormônio juvenil da abelha, responsável pelo desenvolvimento dos ovários da rainha.

Apesar de ser considerada a proteína mais abundante presente na geleia real, neste estudo a MRJP1 foi encontrada em cerca de 61% do total de *spots* analisados, sendo a terceira proteína do grupo principal mais presente, sendo que a MRJP2 foi a primeira mais presente (77%), seguida da MRJP3 (63%). A sobreposição das MRJP2 e 3 sobre a MRJP1 encontrada neste trabalho é similar aos resultados obtidos por Yu et al. (2010) analisando o proteoma da geleia real de abelhas *A. mellifera ligustica*.

Por sua vez as MRJP2 e 3 parecem funcionar como um armazenamento de nitrogênio em sua forma biologicamente processável e a MRJP3 também pode exibir potentes efeitos imunorreguladores, o que pode explicar sua associação a metais como zinco uma vez que a deficiência deste mineral pode causar apoptose em várias linhas

celulares, incluindo as imunitárias (Albert et al., 1999; Mocchegiani et al., 2000; Albertova et al. 2005).

Caracterizadas em menores quantidades de *spots* estão as MRJP5, 6, 7 e 9. Acredita-se que a MRJP5 seja capaz de armazenar enxofre (nutriente limitante para as abelhas) uma vez que possui uma repetição tripeptídica rica em metionina (Drapeau et al., 2006).

As MRJP 6, 7 e 9 por sua vez, provavelmente não expressam funções nutricionais, diferentemente das proteínas principais deste grupo (Albert e Klaudiny, 2004). Isto pode estar associado ao fato de que a presença destas proteínas não está restrita somente ao alimento secretado, uma vez que foram encontradas na análise proteômica do veneno de *Apis mellifera*, da hemolinfa de larvas e também de forma constante no cérebro de abelhas adultas em estruturas denominadas corpora pendunculata (Peiren et al., 2008; Randolt et al., 2008; Hojo et al., 2010). Estudos corroboram os encontrados nesta pesquisa, demonstrando a baixa frequência destas proteínas na geleia real (Santos et al., 2005; Schönleben et al., 2007; Fujita et al., 2012).

As MRJP possuem uma sequência de aminoácidos homóloga entre si, apresentando concentrações médias de cisteína e histidina em sua estrutura, sendo esses aminoácidos essenciais para formar um sítio de ligação a metais como o zinco (Andreini et al., 2006). Essa pode ser uma das explicações pela qual este mineral esteve presente nas proteínas analisadas ao longo do ano em maior quantidade em relação ao ferro.

Santos et al., 2005, analisando o proteoma da geleia real de abelhas africanizadas observaram a presença de uma proteína homóloga a ferritina (pI: 4.21 e MM: 24,767 Da), que armazena ferro em forma solúvel e não tóxica, prontamente disponível para uso. Nesta pesquisa esta proteína não foi identificada, mas podemos inferir que o transporte de ferro pode ser realizado por proteínas do grupo das MRJP em menores concentrações.

A proporção divergente entre zinco e ferro encontrado nos *spots* da geleia real neste estudo pode ser explicada pois as concentrações de zinco parecem se manter mais constantes neste produto em comparação com as concentrações de ferro, uma vez que a abelha nutriz pode regular fisiologicamente as concentrações deste mineral de acordo com as necessidades das larvas (Stocker et al., 2005). Os íons ferrosos por sua vez podem ser encontrados em maior quantidade armazenados em vesículas dos trofócitos

presentes no abdômen, sendo esta deposição iniciada logo no segundo dia após a abelha emergir na fase adulta (Hsu e Chan, 2011).

Por fim, observamos que o número de *spots* encontrados na geleia real variou significativamente ao longo do ano, assim como a ligação das proteínas caracterizadas com os minerais zinco e ferro. Estes primeiros resultados mostram a necessidade de se estudar a interação destas proteínas com os metais, para melhor definir seu papel biológico no desenvolvimento de colônias de abelhas *Apis mellifera*.

5. REFERÊNCIAS

- Albert, Š., Klaudiny, J., & Šimúth, J. (1999). Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(5), 427-434.
- Albert, Š., Klaudiny, J. (2004). The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. *Journal of Insect Physiology*, 50(1), 51-59.
- Albertová, V., Su, S., Brockmann, A., Gadau, J., Albert, Š. (2005). Organization and potential function of the *mrjp3* locus in four honeybee species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 8075-8081.
- Amdam, G. V., Simões, Z. L., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S. W. (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental gerontology*, 39(5), 767-773.
- Andreini, C, Banci, L, Bertini, I; Rosato, A. (2006). Zinc through the three domains of life. *Journal of proteome research*, 5(11), 3173-3178.
- Brodschneider, R., Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674-3676.

- Doolittle, G. M. (1899). Mr. G. M. Doolittle's queen rearing methods. *American Bee Journal*, 39(28), 435-436.
- Drapeau, M. D., Albert, S., Kucharski, R., Prusko, C., Maleszka, R. (2006). Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research*, 16(11), 1385-1394.
- Fujita, T., Kozuka-Hata, H., Ao-Kondo, H., Kunieda, T., Oyama, M., Kubo, T. (2012). Proteomic analysis of the royal jelly and characterization of the functions of its derivation glands in the honeybee. *Journal of proteome research*, 12(1), 404-411.
- Furusawa, T., Rakwal, R., Nam, H. W., Shibato, J., Agrawal, G. K., Kim, Y. S., Ogawa, Y., Yoshida, Y., Kouzuma, Y., Masuo, Y., Yonekura, M. (2008). Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one-and two-dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/glycoproteins. *Journal of proteome research*, 7(8), 3194-3229.
- Garcia-Amoedo, L. H., & Almeida-Muradian, L. B. D. (2007). Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Química Nova*, 30(2), 257-259.
- GE Healthcare. (2007). *2-D electrophoresis: Principles and methods*. GE Healthcare Limited.
- Hojo, M., Kagami, T., Sasaki, T., Nakamura, J., Sasaki, M. (2010). Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie*, 41(2), 194-202.
- Hsu, C. Y., Ko, F. Y., Li, C. W., Fann, K., Lue, J. T. (2007). Magnetoreception system in honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 2(4), 395.
- Hsu, C. Y., Chan, Y. P. (2011). Identification and localization of proteins associated with biomineralization in the iron deposition vesicles of honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 6(4), e19088.
- Kamakura, M. (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348), 478-483.

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

Li, J. K., Feng, M., Zhang, L., Zhang, Z. H., Pan, Y. H. (2008). Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *Journal of proteome research*, 7(8), 3339-3353.

Liu, J. R., Yang, Y. C., Shi, L. S., Peng, C. C. (2008). Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(23), 11447-11452.

Locke, M., Nichol, H. (1992). Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. *Annual review of entomology*, 37(1), 195-215.

Lopes, C. L. A. D. V. (2014). Otimização das condições de produção da geleia real e avaliação de parâmetros da qualidade do produto final (Doctoral dissertation).

Melliou, E., Chinou, I. (2005). Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(23), 8987-8992.

Mocchegiani, E., Muzzioli, M., Giacconi, R. (2000). Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends in pharmacological sciences*, 21(6), 205-208.

Moraes, P. M., Santos, F. A., Padilha, C. C., Vieira, J. C., Zara, L. F., Padilha, P. D. M. (2012). A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from Amazonas, Brazil. *Biological trace element research*, 150(1-3), 195-199.

Moritz R.; Southwick, E. E. (2012) Bees as superorganisms: an evolutionary reality. Springer Science & Business Media, 395.

Peiren, N., de Graaf, D. C., Vanrobaeys, F., Danneels, E. L., Devreese, B., Van Beeumen, J., Jacobs, F. J. (2008). Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*, 52(1), 72-83.

Randolt, K., Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M. J., Albert, S., Tautz, J., Beier, H. (2008). Immune-related proteins induced in the

hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 69(4), 155-167.

Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Caboni, M. F., Bogdanov, S., & Almeida-Muradian, L. (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1), 1-6.

Santos, K. S., dos Santos, L. D., Mendes, M. A., de Souza, B. M., Malaspina, O., Palma, M. S. (2005). Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(1), 85-91.

Scarselli, R., Donadio, E., Giuffrida, M. G., Fortunato, D., Conti, A., Balestreri, E., Felicioli, R., Pinzauti, M., Sabatini, A. G., Felicioli, A. (2005). Towards royal jelly proteome. *Proteomics*, 5(3), 769-776.

Schmitzova, J., Klaudiny, J., Albert, Š., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Judova J., Šimúth, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(9), 1020-1030.

Schönleben, S., Sickmann, A., Mueller, M. J., Reinders, J. (2007). Proteome analysis of *Apis mellifera* royal jelly. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(4), 1087.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856-2860.

Šimúth, J. (2001). Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32(1), 69-80.

Stocker, A., Schramel, P., Kettrup, A., Bengsch, E. (2005). Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(2), 183-189.

Sykes, E., Grzych, C., Epstein, E., Kiechle, F. L. (1987). Dextran interference in biuret-based assays for serum proteins. *Clinical chemistry*, 33(6), 1073-1074.

Yu, F., Mao, F., Jianke, L. (2010). Royal jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. *Journal of proteome research*, 9(5), 2207-2215.

Zar J.H. (2010). Bioestatistical analysis. Pretince Hall, New Jersey.

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES

O pólen e a geleia real representam para as abelhas operárias e a rainha a única fonte natural disponível de proteínas, respectivamente, sendo produtos indispensáveis por conter diversos nutrientes responsáveis por atender as exigências principais das abelhas de modo a favorecer o desenvolvimento de todo seu potencial produtivo e reprodutivo.

Estudos que relacionem a composição nutricional destes produtos, principalmente da geleia real por ser um alimento completo, com o desenvolvimento dos enxames, tanto por meio da proteômica como da metalômica, tornam-se essenciais para que possamos entender como funciona o mecanismo de atuação destes nutrientes no organismo destes indivíduos.

Espera-se que este trabalho atente para a importância do conhecimento da composição de proteínas e também dos metais a estas ligados, de forma que análises por meio da bioinformática sejam capazes de melhorar nosso entendimento sobre a ação que a variação dos nutrientes acarreta no desenvolvimento destes insetos. Com isso, espera-se que novas pesquisas na área de nutrição apícola sejam realizadas, através da formulação de dietas adequadas, que otimizem a seleção de nutrientes adequados pelas abelhas.

ANEXO I

Anexo I: Proteínas identificadas nos *spots* proteicos da geleia real por meio de 2D-PAGE e ESI MS/MS.

Spot	Proteína	Acesso	Score	pI/MM teórico (Da)	pI/MM spot	Cobertura (%)	Nº peptídeos
1	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	7829.441	6.83/51073.52	6.82/23732	33.63	16
	Major Royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	134.670	6.47/61661.79		12.32	8
2	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	51472.803	6.83/51073.52	6.79/25875	28.76	10
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	2091.188	5.10/48886.09		46.99	17
3	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	3731.781	6.83/51073.52	6.35/25467	28.1	13
4	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	10544.57	6.83/51073.52	7.65/31611	47.57	23
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1843.372	6.47/61661.79		7.72	4
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	847.584	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	459.815	5.95/70235.97		3.01	2
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	169.99	8.70/48687.94		1.65	1
5	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1969.04	6.83/51073.52	7.29/32449	42.12	25
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	541.839	6.47/61661.79		2.02	1
6	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	2843.168	6.83/51073.52	7.02/31099	51.33	30
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	761.168	6.47/61661.79		15.07	10
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	151.207	5.10/48886.09		15.51	5
7	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	174.412	6.83/51073.52	5.97/36622	10.18	3
8	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	581.842	6.47/61661.79	5.70/51236	22.79	14
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	267.674	6.83/51073.52		2.43	1

	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	102.252	5.10/48886.09		13.66	3
9	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	943.013	6.47/61661.79	5.86/51561	13.24	11
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	386.602	6.83/51073.52		2.43	1
10	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	3533.021	5.10/48886.09	6.03/51398	53.24	24
11	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	3682.503	5.10/48886.09	6.20/51236	54.17	24
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1074.00	6.83/51073.52		47.12	17
12	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	3314.465	6.83/51073.52	6.37/50113	36.95	15
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	3177.87	6.47/61661.79		34.01	22
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	105.85	5.10/48886.09		6.94	2
13	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	8543.235	6.83/51073.52	6.76/49170	58.85	35
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	2953.206	5.95/70235.97		28.93	18
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	1167.902	5.10/48886.09		7.41	2
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	955.118	6.47/61661.79		27.57	11
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	108.985	4.90/5040.92		2.26	1
14	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	15778.03	6.83/51073.52	7.09/49015	59.29	34
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	10385.98	5.95/70235.97		33.11	23
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	1903.084	5.10/48886.09		35.19	11
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	1890.673	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	820.888	6.47/61661.79		14.34	9
	Major royal jelly protein 6	Q6W3E3_APIME	188.272	5.89/49786.32		4.12	2
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	154.653	8.70/48687.94		1.65	1
15	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	9467.178	6.83/51073.52	7.30/49326	61.28	28
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	3121.659	5.95/70235.97		26.59	15

	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1512.71	6.47/61661.79		8.09	6
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	1360.99	5.10/48886.09		6.25	3
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	224.946	4.90/5040.92		2.26	1
16	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	6716.455	5.95/70235.97		27.26	21
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	1988.474	5.10/48886.09		7.87	3
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	700.172	6.83/51073.52	7.63/51398	31.42	15
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	257.656	6.47/61661.79		7.9	6
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	168.597	4.90/5040.92		2.26	1
17	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	5551.544	5.95/70235.97		27.26	21
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	673.448	5.10/48886.09		24.54	8
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	300.106	6.83/51073.52	8.00/52716	21.02	10
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	196.876	6.47/61661.79		20.77	12
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	119.642	4.90/5040.92		2.26	1
18	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	3225.373	5.95/70235.97		33.95	20
	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	1700.026	5.10/48886.09	8.53/52883	2.55	1
19	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	659.264	6.47/61661.79		32.33	19
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	166.120	6.83/51073.52	5.74/55279	7.08	3
	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	61.585	5.10/48886.09		6.94	2
20	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	7159.72	6.47/61661.79		42.82	25
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1370.545	6.83/51073.52	5.89/55279	25.66	8
	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	118.174	5.10/48886.09		12.5	5
21	Major royal Jelly protein 2	MRJP2_APIME	17645.09	6.83/51073.52		67.26	39
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	1277.434	4.90/5040.92	9.90/60402	2.71	2

	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	86.868	5.10/48886.09		6.94	6
22	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	10455.78	6.83/51073.52	7.82/56877	63.27	28
	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	507.122	5.10/48886.09		17.82	8
23	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	33034.21	6.83/51073.52	7.56/55631	88.05	60
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	2387.186	6.47/61661.79		22.79	10
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	798.951	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	453.26	5.95/70235.97		19.57	8
24	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	29579.01	6.83/51073.52	7.34/55631	86.28	67
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1668.059	6.47/61661.79		6.25	4
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	1015.269	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	395.894	5.95/70235.97		20.23	7
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	103.007	8.70/48687.94		13.24	6
25	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	26672.99	6.83/51073.52	7.14/55455	85.62	56
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	1833.639	4.90/5040.92		5.87	3
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1330.642	6.47/61661.79		5.51	3
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1259.557	5.95/70235.97		17.73	9
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	215.393	8.70/48687.94		1.65	1
26	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	41222.57	6.83/51073.52	6.93/56161	87.39	61
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1972.856	6.47/61661.79		13.79	4
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	1728.977	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	517.340	5.95/70235.97		3.85	3
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	333.894	8.70/48687.94		1.65	1
27	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	29561.55	6.83/51073.52	6.70/56877	88.5	49

	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	2586.86	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1821.129	5.95/70235.97		3.01	3
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1438.305	6.47/61661.79		2.02	1
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	191.823	8.70/48687.94		1.65	1
	Major royal jelly protein 6	Q6W3E3_APIME	65.579	5.89/49786.32		1.83	2
28	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	5980.703	6.83/51073.52	6.55/57057	68.81	32
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	132.281	8.70/48687.94		1.65	1
29	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	28755.17	6.83/51073.52	6.39/57967	72.57	42
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1469.485	6.47/61661.79		19.12	7
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	1417.578	4.90/5040.92		12.19	4
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	840.214	5.95/70235.97		3.01	2
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	354.997	5.10/48886.09		43.98	12
30	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	6253.494	6.83/51073.52	6.23/58706	51.55	27
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	96.632	6.47/61661.79		2.02	1
31	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	2435.432	6.47/61661.79	6.14/57238	42.1	25
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1843.729	6.83/51073.52		50	20
32	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	6433.85	6.47/61661.79	6.03/57784	43.2	23
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	2000.193	6.83/51073.52		53.98	23
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	179.598	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	150.649	5.95/70235.97		3.01	2
33	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1535.477	6.83/51073.52	5.87/58151	57.3	23
34	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	4832.459	6.47/61661.79	5.71/59454	40.99	23
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	2012.981	6.83/51073.52		46.24	20

	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	295.465	4.90/5040.92		14	5
35	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	4678.278	5.10/48886.09		47.22	24
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	475.398	6.83/51073.52	9.92/65791	20.8	7
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	117.372	6.47/61661.79		7.9	4
36	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	3099.972	5.10/48886.09	9.43/65971	56.71	23
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	573.041	5.95/70235.97		1.84	1
37	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	3647.345	5.10/48886.09	9.32/65971	54.86	22
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	362.232	5.95/70235.97		1.84	1
38	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	1661.99	5.10/48886.09	9.16/65971	48.84	23
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	250.071	5.95/70235.97		1.84	1
39	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	6174.673	5.10/48886.09	8.45/64350	57.41	23
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1327.749	5.95/70235.97		1.84	1
40	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	9241.382	5.10/48886.09	8.16/64350	66.67	31
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1815.891	6.47/61661.79		31.25	17
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1303.703	5.95/70235.97		1.84	1
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	502.375	6.83/51073.52		19.69	6
41	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	9218.89	5.10/48886.09	7.90/64350	66.2	28
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	2164.379	6.47/61661.79		40.99	21
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	330.193	6.83/51073.52		10.18	4
42	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	7247.976	5.10/48886.09	7.63/64350	70.37	32
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1631.472	6.47/61661.79		32.72	18
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	936.205	5.95/70235.97		1.84	1
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	531.76	6.83/51073.52		22.35	6

43	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	12290.11	5.10/48886.09		63.43	30
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	2002.618	6.47/61661.79		35.66	19
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1700.076	5.95/70235.97	7.44/64350	4.85	4
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1598.49	6.83/51073.52		32.3	14
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	282.545	4.90/5040.92		2.26	1
44	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	5367.184	6.47/61661.79		43.57	24
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	2881.739	6.83/51073.52	7.22/65170	58.41	23
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	279.743	4.90/5040.92		2.26	1
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	279.743	5.95/70235.97		3.01	2
45	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	10831.81	6.47/61661.79		39.89	23
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	4575.831	5.10/48886.09		58.8	24
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	2492.273	6.83/51073.52	6.56/70919	42.28	17
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1196.173	5.95/70235.97		16.22	8
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	702.414	4.90/5040.92		2.26	1
46	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	6236.645	6.47/61661.79		42.83	25
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	2652.464	5.10/48886.09		44.44	18
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1750.96	6.83/51073.52	6.36/66681	38.27	17
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	768.722	5.95/70235.97		8.36	5
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	190.944	4.90/5040.92		2.26	1
47	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	9152.608	5.10/48886.09		70.6	33
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	6052.675	6.47/61661.79	6.17/63944	47.61	34
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1203.96	6.83/51073.52		44.47	15
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1012.965	5.95/70235.97		4.85	3

48	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	3904.3	6.47/61661.79		41.73	21
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	1129.497	5.10/48886.09		39.81	15
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	834.835	5.95/70235.97	6.22/71284	17.06	10
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	804.753	6.83/51073.52		26.99	11
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	284.551	4.90/5040.92		2.26	1
49	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	7151.822	5.10/48886.09		52.31	24
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	4281.637	6.47/61661.79	6.02/64146	37.87	20
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	786.601	5.95/70235.97		3.18	2
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	675.516	6.83/51073.52		11.95	5
50	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	17975.4	5.10/48886.09		69.21	33
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	9324.506	6.47/61661.79	5.87/63944	44.67	27
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	2168.178	5.95/70235.97		4.85	3
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1335.39	6.83/51073.52		20.35	8
51	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	13840.18	5.10/48886.09		69.21	33
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	5445.676	6.47/61661.79	5.73/6339	38.6	21
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1658.315	5.95/70235.97		1.84	1
52	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	18884.34	5.10/48886.09		77.78	34
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	5013.581	6.47/61661.79	5.60/62542	40.99	23
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	908.438	5.95/70235.97		1.84	1
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	560.278	6.83/51073.52		19.91	6
53	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	41156.56	5.10/48886.09		74.77	41
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1347.736	5.95/70235.97	5.36/62940	1.84	1
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	187.454	6.47/61661.79		20.4	9

54	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	18583.49	5.10/48886.09	5.19/65791	76.85	31
55	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	18678.07	5.10/48886.09	5.05/65791	84.26	37
56	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	23344.01	5.10/48886.09	4.90/65791	70.14	36
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	612.663	4.90/5040.92		30.47	10
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	181.982	6.83/51073.52		6.64	4
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	154.896	5.95/70235.97		3.51	2
57	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	25977.73	5.10/48886.09	4.73/64146	77.78	41
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	2116.29	4.90/5040.92		54.18	19
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	887.904	5.95/70235.97		12.21	6
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	341.575	6.83/51073.52		13.05	6
58	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	3171.894	6.47/61661.79	9.91/86640	32.9	19
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	774.425	5.10/48886.09		34.72	12
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	517.837	6.83/51073.52		2.43	1
59	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	913.396	6.47/61661.79	9.64/86640	26.84	11
60	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	1344.81	6.47/61661.79	8.94/84444	22.24	14
61	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	2708.672	6.47/61661.79	8.81/83582	31.8	17
62	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	9076.996	6.47/61661.79	8.53/82304	41.73	23
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1011.458	6.83/51073.52		5.53	2
63	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	15575.53	6.47/61661.79	8.15/81883	53.13	35
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1876.795	6.83/51073.52		18.81	4

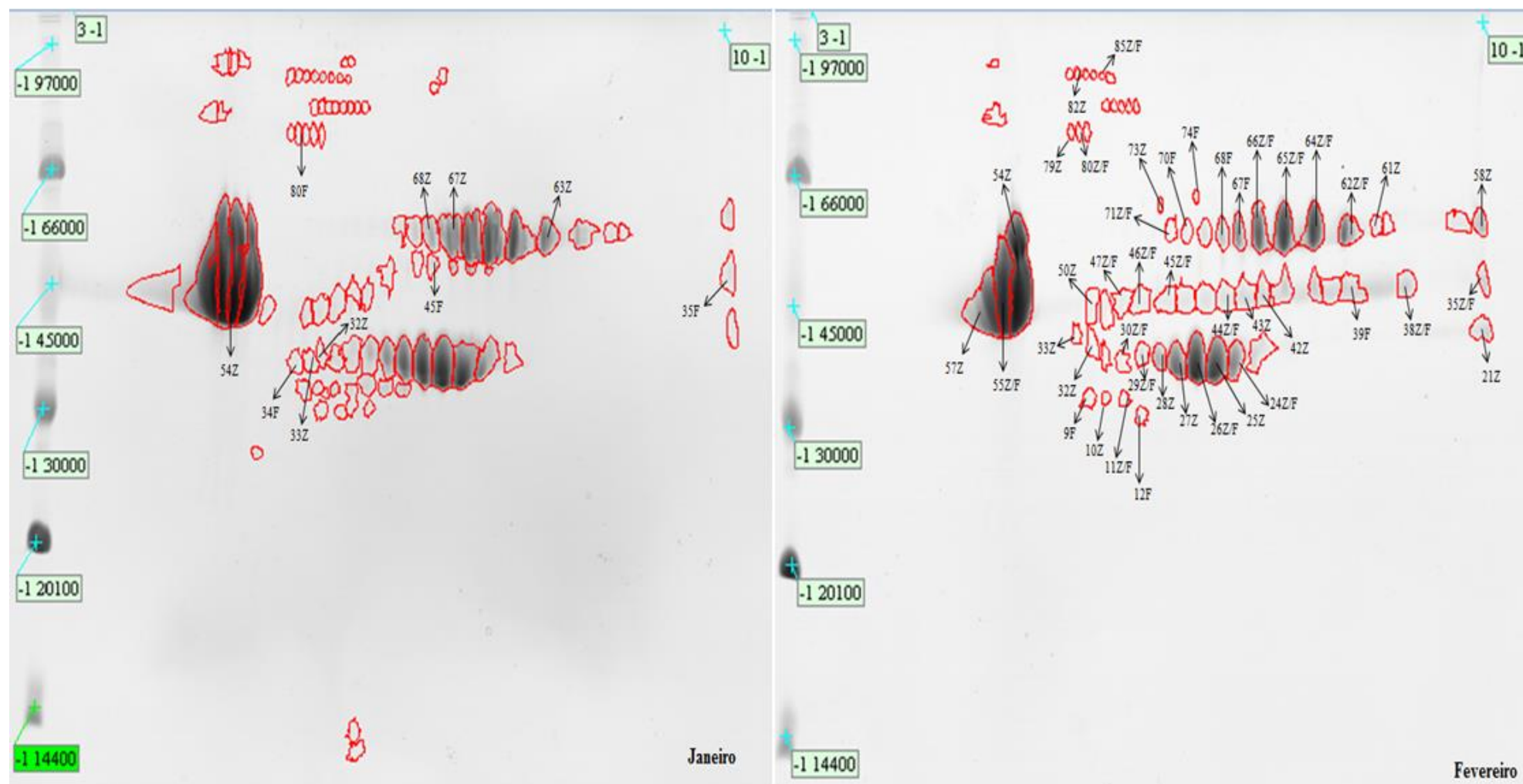
64	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	17032.84	6.47/61661.79	7.87/82304	46.69	29
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1890.801	6.83/51073.52		2.43	2
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	117.379	5.10/48886.09		10.42	4
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	92.167	5.95/70235.97		1.84	1
65	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	9180.853	6.47/61661.79	7.63/82304	41.73	26
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	912.761	6.83/51073.52		19.47	6
66	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	7796.233	6.47/61661.79	7.37/81463	58.09	31
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	617.487	6.83/51073.52		25	8
67	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	7553.655	6.47/61661.79	7.17/81463	78.21	23
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	239.302	6.83/51073.52		13.27	4
68	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	8055.282	6.47/61661.79	7.00/82304	41.73	23
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	981.800	6.83/51073.52		38.27	16
69	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	10665.77	6.83/51073.52	6.86/82728	58.19	27
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	9981.265	6.47/61661.79		45.77	26
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	456.857	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	408.339	5.95/70235.97		11.04	5
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	137.175	8.70/48687.94		1.65	1
70	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	10735.93	6.47/61661.79	6.67/82304	39.89	24
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	4789.829	6.83/51073.52		51.99	20
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	806.242	5.95/70235.97		7.19	4
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	766.555	4.90/5040.92		2.26	1
71	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	452.345	6.47/61661.79	6.52/8444	18.2	11

72	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	2083.532	6.47/61661.79	6.41/8444	30.88	17
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	295.676	6.83/51073.52		2.43	1
73	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1589.511	5.95/70235.97	6.44/90737	20.74	11
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	796.154	5.10/48886.09		2.55	1
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	367.052	6.83/51073.52		6.86	3
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	324.47	4.90/5040.92		2.26	1
74	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1384.783	5.95/70235.97	6.60/89810	23.08	12
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	505.728	5.10/48886.09		2.55	1
75	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1570.061	5.95/70235.97	6.78/90273	27.26	13
	Major royal jelly protein 1	MRJP1_APIME	511.415	5.10/48886.09		2.55	1
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	414.421	6.83/51073.52		7.74	4
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	370.039	4.90/5040.92		2.26	1
76	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	950.239	6.47/61661.79	6.95/93097	28.68	15
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	485.544	5.95/70235.97		22.24	11
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	402.105	6.83/51073.52		15.04	6
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	246.478	4.90/5040.92		2.26	1
77	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	5154.345	6.47/61661.79	7.18/95517	32.35	21
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	385.002	5.95/70235.97		16.39	8
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	236.546	6.83/51073.52		10.84	4
78	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	12946.47	6.47/61661.79	7.39/100035	45.04	31
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1762.201	6.83/51073.52		24.34	8
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	143.535	5.95/70235.97		22.91	10
79	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	883.021	5.10/48886.09	5.78/116094	30.79	11

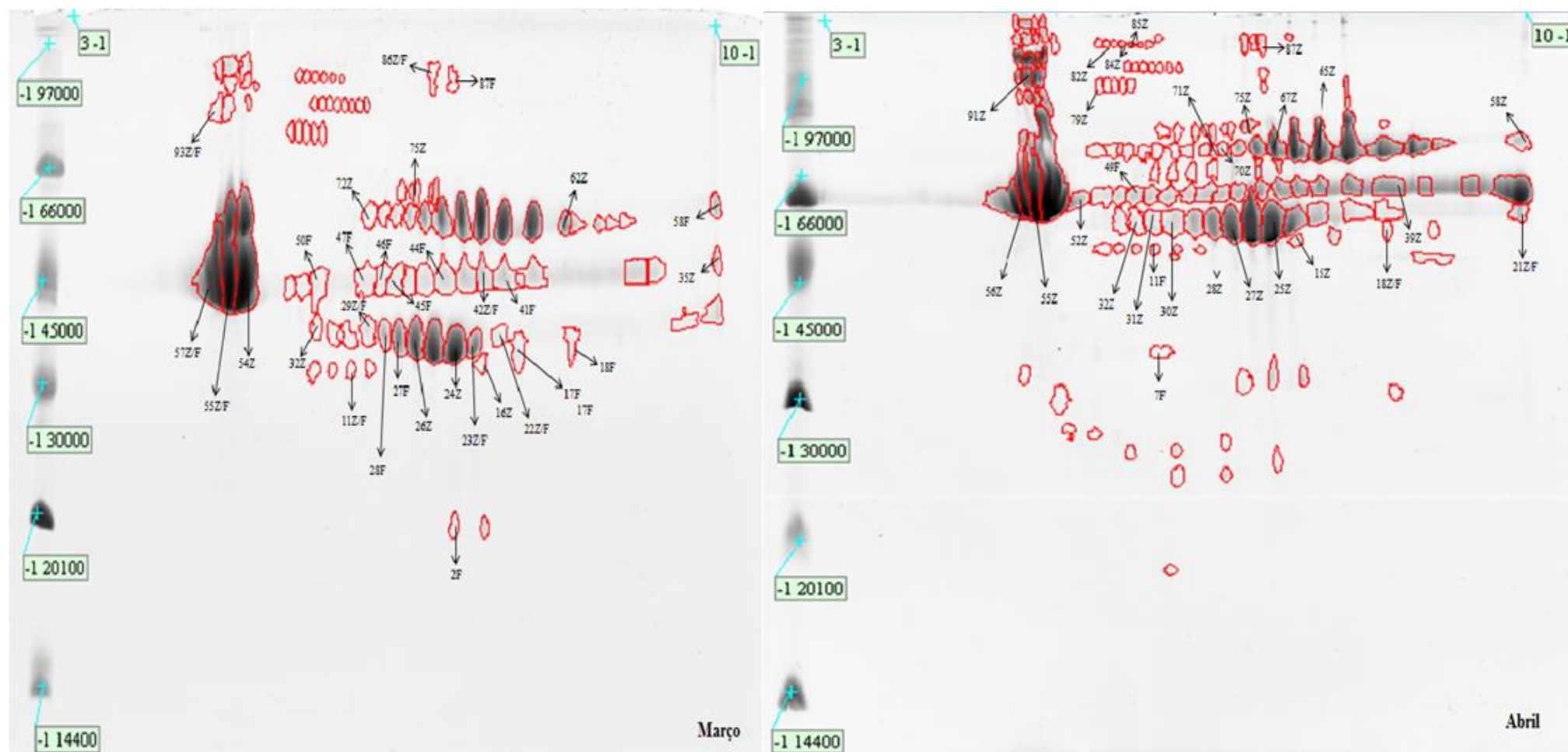
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	642.365	6.83/51073.52		29.87	13
80	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	539.153	5.10/48886.09	5.83/116094	26.62	9
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	239.329	6.83/51073.52		18.14	7
81	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	488.635	5.10/48886.09	5.66/141831	20.37	7
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	67.65	6.83/51073.52		7.08	3
82	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	1632.152	5.10/48886.09	5.75/141831	34.95	13
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	385.462	6.83/51073.52		27.88	13
83	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	655.89	6.83/51073.52	5.80/140382	22.57	8
	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	484.159	5.10/48886.09		29.17	9
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	135.467	6.47/61661.79		2.02	1
84	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	1182.941	5.10/48886.09	5.91/140382	40.51	15
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	493.693	6.83/51073.52		36.28	16
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	385.095	5.95/70235.97		4.85	3
85	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	184.411	6.83/51073.52	5.99/140382	16.59	6
	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	129.184	5.10/48886.09		3.01	2
86	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	4603.595	6.83/51073.52	6.94/140382	52.65	26
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	550.426	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	395.575	5.95/70235.97		3.01	2
87	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	5065.382	6.83/51073.52	7.10/141831	55.75	25
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	621.600	4.90/5040.92		2.71	2
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	489.974	6.47/61661.79		17.28	10
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	312.34	5.95/70235.97		3.01	2
	Major royal jelly protein 9	Q4ZJX1_APIME	63.619	8.70/48687.94		1.65	1

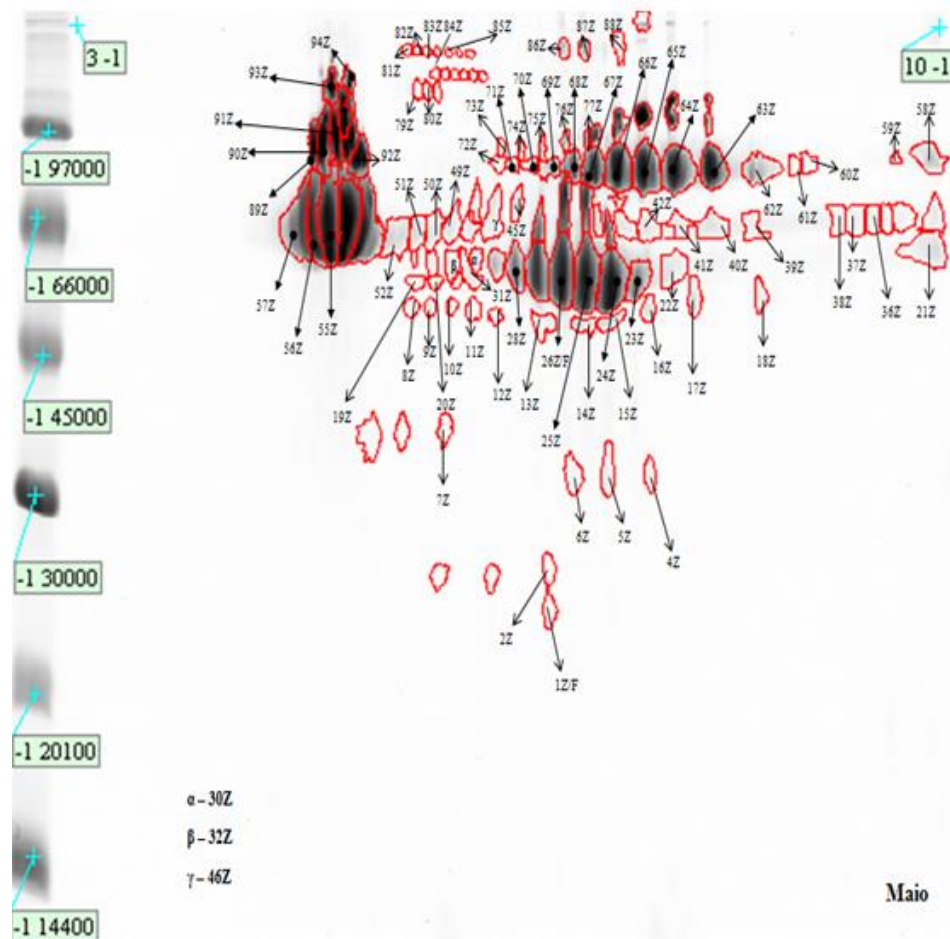
88	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	1279.698	6.83/51073.52	7.39/145319	29.42	14
	Major royal jelly protein 3	MRJP3_APIME	891.636	6.47/61661.79		22.98	13
89	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	9505.928	5.10/48886.09	4.91/93067	53.24	26
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	296.562	4.90/5040.92		14.22	6
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	197.688	5.95/70235.97		3.51	2
	Major royal jelly protein 2	MRJP2_APIME	196.908	6.83/51073.52		2.21	3
90	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	21860.19	5.10/48886.09	4.99/92146	73.61	37
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1755.692	5.95/70235.97		1.84	1
91	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	18562.67	5.10/48886.09	5.09/92620	63.66	30
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	1795.955	5.95/70235.97		1.84	1
92	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	17708.57	5.10/48886.09	5.31/90737	75.23	38
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	656.124	5.95/70235.97		1.84	1
93	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	26721.34	5.10/48886.09	5.06/117896	80.56	39
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	3719.036	5.95/70235.97		1.84	1
	Major royal jelly protein 7	Q6IMJ9_APIME	323.972	4.90/5040.92		22.57	7
94	Major royal Jelly protein 1	MRJP1_APIME	13343.87	5.10/48886.09	5.20/122210	76.39	33
	Major royal jelly protein 5	MRJP5_APIME	557.5982	5.95/70235.97		1.84	1

ANEXO II

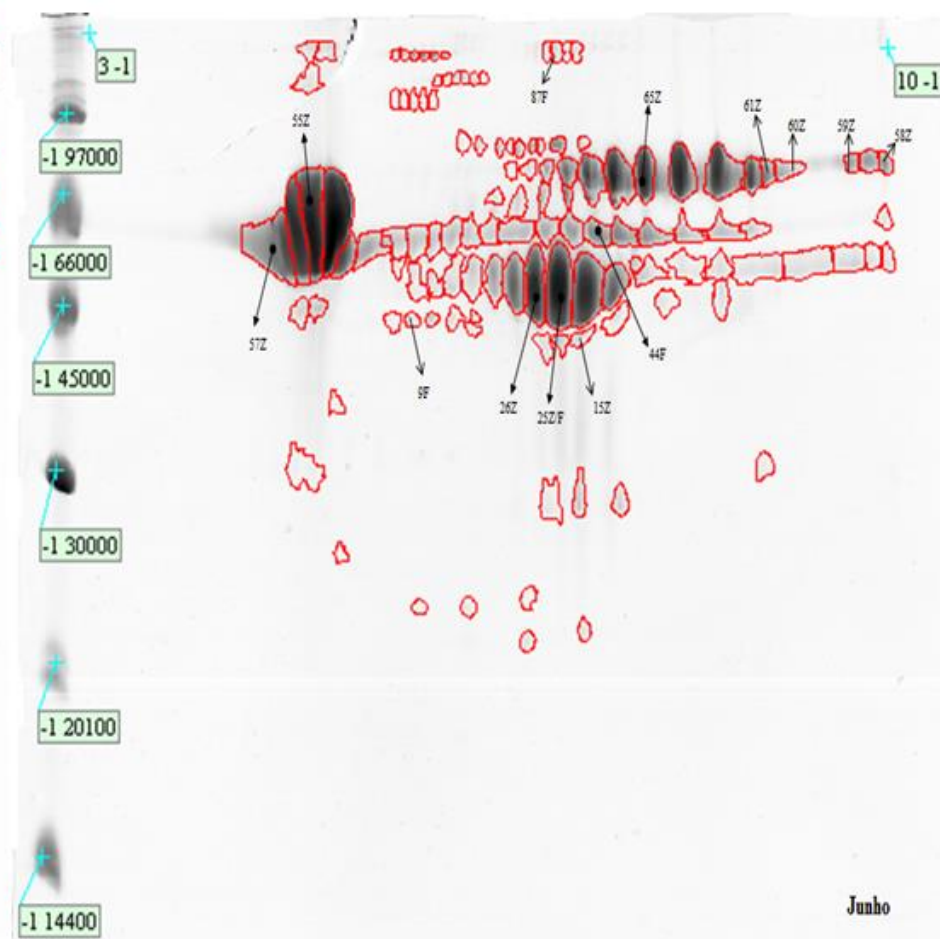


AnexoII: Fotos dos géis de poliacrilamida 12,5%, contendo os spots proteicos da geleia real. O numero do spot corresponde à respectiva proteína no anexo I. Os spots que apresentam zinco estão identificados ao lado do número com a letra Z; os que apresentam ferro com a letra F e os que apresentam ambos os metais estão identificados com Z/F.





Maio



Junho

