

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**“Influência da nutrição sobre aspectos da fisiologia e  
nutrição de abelhas *Apis mellifera*.”**

Tânia Marisa Cremonez

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Usp,  
como parte das exigências para a obtenção  
do título de Doutor em Ciências, Área:  
Entomologia

RIBEIRÃO PRETO  
2001

DEDALUS - Acervo - FFCLRP



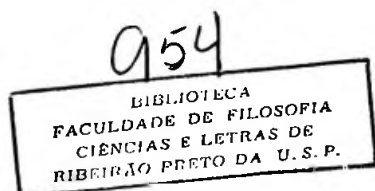
20800042519

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**“Influência da nutrição sobre aspectos da fisiologia e  
nutrição de abelhas *Apis mellifera*.”**

Aluna: Tânia Marisa Cremonez  
Orientador: David De Jong

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Usp,  
como parte das exigências para a obtenção  
do título de Doutor em Ciências, Área:  
Entomologia



RIBEIRÃO PRETO  
2001

À meus pais, **Antonio e Neusa**

À minhas irmãs **Daniela e Cibele**

Ao meu namorado **Renato**

Que sempre me apoiaram e incentivaram  
com amor, compreensão e carinho nos  
momentos mais difíceis deste projeto.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao Prof. Dr. **David De Jong**, pela orientação, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. **Márcia Gentile Bittondi**, pela solicitude, incentivo, sugestões e carinho com que sempre nos tratou.

À Profa. Dra. **Zilá L. Paulino Simões**, pelo incentivo, amizade e disponibilidade que sempre demonstrou.

Ao Prof. Dr. **Lionel Segui Gonçalves**, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. **Ademilson E. E. Soares**, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. **Klaus Hartfelder**, pelo incentivo, amizade e disponibilidade que sempre demonstrou.

Ao Prof. Dr. **Leomam Almeida Couto**, pelo incentivo e sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Fernando Sérgio Zucoloto**, pelas sugestões, incentivo e pela amizade.

À **Marcela A. F. Bezerra Laure**, pelos auxílios prestados durante a fase de coleta de dados deste trabalho, pelo incentivo, convivência e eterna amizade.

À **Renata Andrade Cavallari** por sua imprescindível ajuda e imensa paciência durante todos esses anos.

Ao Técnico **Adelino Penatti**, pelos auxílios prestados durante a fase de coleta de dados deste trabalho.

Aos Técnicos **Luiz Roberto Aguiar, João Dos Santos, Jairo De Souza, e Roberto Mazzucato**, pelos auxílios prestados, e ao **Paulo Ricardo Epifânio**, pelo seu zeloso trabalho no laboratório.

Aos amigos **Lucimara Zuanazi Pinto, Maria Helena Corrêa Marques** e ao **Weyder Cristiano**, pelo apoio, amizade, companheirismo e pela convivência neste período.

À **Estação Experimental de Zootecnia de Campinas**, em Ribeirão Preto, por fornecer os dados climáticos.

Aos colegas do Setor de Himenópteros do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e do Curso de Entomologia do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, pela convivência e amizade.

À **CAPES** (Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro proporcionado durante a realização deste trabalho.

**O meu muito obrigada!**

**“ Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons.  
Mas há os lutam toda a vida.  
Estes são imprescindíveis”.**

(Bertolt Brecht)

## SUMÁRIO

### RESUMO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1- Aspectos gerais da nutrição das abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	2
2- Resposta imune de insetos.....	6
3- Influência da rainha nas colônias.....	9
OBJETIVOS GERAIS.....	10
CAPÍTULO I: “Variação da concentração de proteína na hemolinfa de abelhas operárias ao longo do ano.”	12
Resumo.....	13
Introdução.....	15
Materiais e Métodos.....	17
Resultados.....	18
Discussão.....	22
CAPÍTULO II: “Determinação do valor nutricional de dietas protéicas: Comparação da técnica laboratorial com a medição da área de cria produzida em núcleos confinados.”	24
Resumo.....	25
Introdução.....	27
Materiais e Métodos.....	30
Resultados.....	33
Discussão.....	38
CAPÍTULO III: “Resposta imune de abelhas operárias <i>Apis mellifera</i> alimentadas com diferentes dietas.”	41
Resumo.....	42
Introdução.....	44
Materiais e Métodos.....	46
Resultados.....	49

Discussão.....	59
CAPÍTULO IV: “Abelhas <i>Apis mellifera</i> criadas em colônias órfãs tem maior longevidade e maior concentração de proteína na hemolinfa.”	62
Resumo.....	63
Introdução.....	64
Materiais e Métodos.....	66
Resultados.....	69
Discussão.....	73
CONCLUSÕES GERAIS.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ABSTRACT	
APÊNDICE	



**RESUMO GERAL**

---

A carência de pólen na natureza pode afetar a produtividade das colônias, bem como a fisiologia das próprias abelhas, já que estas necessitam de alimentos protéicos para o desenvolvimento dos tecidos do corpo e das glândulas, como por exemplo a glândula hipofaringeana. A falta de alimento protéico interfere na síntese protéica (já que fornece material e energia necessários a síntese), na longevidade das abelhas e na resposta imunológica das operárias.

Os critérios tradicionalmente utilizados para avaliar se determinados alimentos são adequados para substituir o pólen são: a quantidade de alimento consumido e a produção de cria pela colônia. A determinação da área de cria é uma medida adequada porque reflete a qualidade da dieta consumida: alimento escasso ou com teor nutritivo baixo resulta em diminuição da postura. Entretanto, interferências do ambiente, através de fontes naturais de pólen, podem acabar confundindo os dados. Pesquisadores têm contornado este problema alimentando pequenas colônias confinadas em gaiolas, mas este procedimento é demorado, se estendendo por 10 a 16 semanas e, além disso, é muito dispendioso. Um outro critério eficiente na determinação da eficiência das dietas protéicas é a determinação dos títulos de proteína na hemolinfa em operárias confinadas e alimentadas com as dietas a serem testadas.

O objetivo deste trabalho foi determinar como as dietas protéicas (natural ou artificial) e as condições na colméia (presença ou ausência da rainha) afetam a fisiologia das abelhas *Apis mellifera*. Os parâmetros analisados foram a produção de cria nas colônias, a capacidade imunológica, o teor protéico na hemolinfa e a longevidade das operárias.

A concentração de proteína total na hemolinfa, de operárias recém-emergidas e de 7 dias de vida adulta de colônias sem suplementação protéica, foi determinada durante todos os meses do ano, de setembro de 1999 a setembro de 2000, para relacionarmos com a temperatura e umidade relativa ambiental, parâmetros associados com a disponibilidade de alimento na natureza.

Nas operárias recém-emergidas, a concentração de proteína total foi menor nos meses de baixa temperatura ambiental, comparado com os meses de verão. Nas operárias de 7 dias de vida adulta, observamos que nos meses de alta temperatura e alta umidade relativa, meses em que existia grande quantidade de

pólen na natureza, a concentração de proteína total foi maior que nos meses com baixas temperaturas e baixa umidade relativa, meses de inverno, onde se observa pouco alimento disponível na natureza. Em todos os meses, no entanto, observamos uma maior concentração de proteína total na hemolinfa das operárias de 7 dias, quando estas foram comparadas com abelhas recém-emergidas (aumento médio de 159%).

Nas operárias recém emergidas, a concentração de proteína na hemolinfa reflete a quantidade e qualidade do alimento recebido na fase de larva, uma vez que estas abelhas não se alimentaram após a emergência. Nas operárias de 7 dias de vida adulta, a concentração de proteína na hemolinfa é influenciada pela temperatura e umidade relativa ambiental e, sabendo-se que a disponibilidade de pólen na natureza é afetada por estes fatores, concluímos que a concentração de proteína na hemolinfa também é influenciada pela disponibilidade de alimento na natureza. O aumento na concentração de proteína total nas operárias de 7 dias de vida adulta, em relação às operárias recém-emergidas, é explicada pelo aumento na síntese de proteína pelas operárias entre o 5<sup>o</sup> e o 15<sup>o</sup> dia de vida adulta, quando estas abelhas estão alimentando as crias.

Em épocas de carência de pólen, o fornecimento de dietas protéicas alternativas pode ajudar a melhorar o desempenho da colônia. Existem muitos materiais utilizados pelos apicultores nestes períodos. Algumas dietas protéicas mostraram ser tão eficientes quanto o pólen, no entanto, elas são menos atrativas que este.

O valor nutricional de algumas dietas: (1) 40% de pólen coletado de favos (*beebread*) misturado a 60% de candy (açúcar e mel); (2) 30% de farinha de soja, 10% de levedura de cana e 60% de açúcar; (3) 50% de açúcar em água (xarope), foi determinado pelos critérios de produção de cria e dosagem dos títulos de proteína na hemolinfa.

Nas colônias confinadas em gaiolas e alimentadas somente com as dietas testadas, vimos que, com as dietas ricas em proteína, as colônias produziram cria, entretanto, em níveis menores que nas colônias em condições naturais. A mesma tendência foi observada pelo método de determinação dos títulos de proteína na hemolinfa de operárias confinadas em pequenas gaiolas (grupos de 100

operárias) e alimentadas com as dietas teste. No grupo alimentado com a dieta de xarope, alimento pobre em proteína, houve uma interrupção da produção de cria, e os títulos de proteína na hemolinfa diminuíram em relação aos das abelhas recém-emergidas, quando o normal seria um aumento destes títulos nas operárias entre o quinto e o décimo quinto dia de vida adulta. A dieta de farinha de soja, levedura de cana e açúcar, mostrou-se eficiente tanto quanto a dieta de pólen estocado, alimento natural das abelhas. A dieta de xarope, dieta pobre em proteína, é incapaz de prover a produção de cria, ou o aumento nos títulos de proteína na hemolinfa das operárias. O método de testar dietas protéicas baseado na determinação dos títulos de proteína total em operárias confinadas em pequenos grupos e alimentadas com as dietas, mostrou ser tão eficiente e mais rápido que o método de determinação da produção de cria para análise das dietas artificiais.

A resposta imunológica foi investigada em operárias de *Apis mellifera* confinadas em pequenas caixas (grupos de 100 operárias), mantidas em estufa a 32°C e 80% de umidade relativa durante 4 ou 7 dias e alimentadas com diferentes dietas: (1) 40% de pólen coletado de favos (*beebread*) misturado a 60% de candy (açúcar e mel); (2) 30% de farinha de soja, 10% de levedura de cana e 60% de açúcar; (3) 50% de açúcar em água (xarope), para determinarmos se as dietas artificiais promovem uma resposta imunológica normal, igual a resposta observada quando elas se alimentam de pólen.

As abelhas alimentadas com as dietas ricas em proteína (pólen e farinha de soja) tiveram títulos significativamente maiores de fenoloxidase e lisozima em resposta à infecção, que as abelhas alimentadas apenas com xarope. Grupos alimentados com xarope, submetidos ou não à infecção no 4º dia, não diferiram quanto ao título de fenoloxidase. Quando mantidos neste regime alimentar por mais 3 dias e submetidos à infecção no 7º dia, mostraram títulos de fenoloxidase e lisozima significativamente inferiores que os controles. Outros grupos de abelhas foram alimentados com xarope até o 4º dia e depois até o 7º, alimentados com pólen, os títulos de fenoloxidase e lisozima não apresentaram diferença significativa após a infecção. Os títulos de proteína total, lisozima e fenoloxidase na hemolinfa das abelhas alimentadas exclusivamente com xarope mostraram-se

baixos em relação aos grupos que receberam dietas protéicas durante todo o experimento. Durante o período considerado, a mudança da dieta exclusiva de açúcar para a dieta contendo pólen não foi suficiente para estimular uma resposta imune suficiente.

Em conclusão: a qualidade da dieta é essencial para a ocorrência da resposta imune. Além disso, a resposta não depende da origem das proteínas da dieta: ocorre após alimentação com pólen, fonte natural de proteínas para as abelhas, assim como após consumo de dieta artificial (farinha de soja/levedura/açúcar), também rica em proteínas.

A ausência da rainha em uma colônia provoca muitas alterações no comportamento (como por exemplo, aumento na agressividade) e na fisiologia das operárias (desenvolvimento do ovário, aumento da síntese de vitelogenina, etc).

Analizamos como a ausência da rainha interfere na concentração de proteína total das operárias recém-emergidas e na longevidade destas. A longevidade das operárias, cujo desenvolvimento larval ocorreu na ausência da rainha, foi maior que nas operárias que se desenvolveram na presença da rainha.

O título de proteína na hemolinfa foi maior nas abelhas recém emergidas que se desenvolveram e foram alimentadas, quando larvas, na ausência de rainha do que nas abelhas criadas na presença de uma rainha.

Assim, nossa conclusão é que a maior longevidade das abelhas criadas na orfandade deve envolver uma alimentação reforçada das larvas em colônias sem rainha. Na ausência da rainha, a colônia fica sem reposição de novas abelhas e, portanto, um aumento na longevidade poderia constituir estratégia para a manutenção da população, até que a nova rainha inicie a ovoposição.

## INTRODUÇÃO GERAL

---

### 1- Aspectos gerais da nutrição das abelhas *Apis mellifera*.

As abelhas requerem proteínas, carboidratos, minerais, lipídios, vitaminas e água para seu crescimento e desenvolvimento normal. Estas necessidades alimentares são supridas pela coleta de néctar, pólen e água. O néctar coletado pelas abelhas satisfaz o requerimento de carboidratos; o pólen satisfaz o requerimento de proteínas, minerais, lipídeos e vitaminas (Herbert, 1992). As operárias selecionam o tipo de alimento a ser coletado (néctar ou pólen) e a quantidade, sendo que no decorrer do dia, elas podem alterar o tipo de coleta para atender às exigências da colméia (Free, 1980).

A única fonte de proteína para as abelhas operárias é o pólen (Biesmeyer et al., 1992) necessário ao crescimento, ao desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas e do tecido adiposo, além do que, a existência de proteína em níveis adequados na colônia, tende a elevar a quantidade de cria (Herbert & Shimanuki, 1979).

As abelhas operárias executam diferentes tarefas durante o estágio adulto (Rösh 1925, 1930; Lindauer, 1952; Seeley, 1985; Winston, 1987) de acordo com a idade, os requerimentos da colônia (Calderone & Page, 1988; Robinson & Page, 1988 e 1989; Frumhoff & Baker, 1988; Kolmes et al., 1989; Robinson et al., 1989; Rothenbuhler & Page 1989). Vinte horas após a emergência, 50%, ou mais, das operárias iniciam o consumo de pequenas quantidades de pólen (Dietz, 1969). Entretanto, o consumo máximo só ocorre quando as abelhas estão com idade entre 42 e 52 horas após emergência (Hagedorn & Moeller, 1967). O maior consumo de pólen ocorre durante a primeira semana de vida adulta. Cinco dias após emergirem, o conteúdo de nitrogênio das abelhas aumenta cerca de 93% na cabeça, 76% no abdômen e 37% no tórax (Haydak, 1943). As abelhas jovens, denominadas nutrizes, têm função de alimentar a cria. Estas abelhas têm as glândulas hipofaríngeas muito desenvolvidas (Maurizio, 1954; Knecht & Kaatz, 1990), produzindo a maior parte da geléia real, que é o alimento fornecido à cria, à rainha e aos zangões (Crailsheim, 1990 e 1991). Entre o 5º e o 15º dias ocorre grande síntese de proteínas no corpo gorduroso, principalmente de vitelogenina, (Engels, et al., 1990). Nas operárias mais velhas diminui o requerimento de pólen e, por apresentarem intenso metabolismo necessário à atividade de vôo, aumenta

o requerimento de carboidratos (Crailsheim, 1990; Crailsheim et al., 1992; Szolderits & Crailsheim, 1993).

A carência de pólen pode ocorrer em qualquer época do ano e tal fato acaba por afetar o desenvolvimento da colméia. A carência de pólen pode ocorrer, por exemplo, quando as abelhas estão visitando plantas que produzem muito néctar e pouco pólen (Stanger & Laidlaw, 1974; Johansson & Johansson, 1977). Em alguns períodos do ano, não há floradas suficientes para sustentar as colméias. Nestes períodos, o fornecimento de dietas alternativas ou substitutos de pólen pode melhorar o desempenho da colméia.

Apicultores e pesquisadores têm experimentado vários materiais que possam ser utilizados na produção de dietas protéicas para as abelhas. Haydak (1967) encontrou um alimento eficiente como substituto de pólen, constituído de uma mistura de farinha de soja, levedura de cerveja e leite em pó.

Embora alguns substitutos de pólen tenham se mostrado tão eficientes quanto o pólen, eles são geralmente menos atrativos. Muitos substitutos de pólen oferecidos para as abelhas são adequados à nutrição e podem até ter maior valor nutritivo, mas quando as abelhas têm livre escolha entre o pólen natural e o substituto de pólen, elas dão preferência ao pólen natural (Standifer et al., 1973).

Os principais critérios utilizados para avaliar se determinados alimentos são adequados para substituir o pólen são: a quantidade de alimento consumido e a produção de cria pela colméia. O consumo das dietas, entretanto, não é um método adequado porque quando ocorre falta de pólen, as abelhas podem coletar qualquer material, mesmo que estes sejam inadequados para a sua alimentação. No Brasil, em certas épocas, as abelhas coletam fubá de milho com muito entusiasmo; este é temporariamente estocado no favo e depois descartado (D. De Jong, com. pessoal). A determinação da área de cria é uma medida mais adequada, porque reflete a qualidade da dieta consumida: alimento escasso ou com teor nutritivo baixo resulta em diminuição da postura. Ao contrário, alimento adequado e abundante está correlacionado à intensificação da postura e, conseqüentemente, aumento da área de cria. Todavia, é difícil estimar a eficiência da dieta substituta quando as abelhas têm também acesso a fontes de pólen, mesmo em épocas de escassez. Herbert Jr. (1970, 1977) contornou este problema



mantendo pequenas colméias confinadas em gaiolas sem acesso à flores, mas este procedimento é demorado, variando entre 10 e 16 semanas, e muito dispendioso.

Muitos fatores parecem influenciar a síntese de proteínas em insetos. Em *Apis mellifera*, muito ainda precisa ser estudado com relação ao controle da síntese de proteínas, mas fatores hormonais (ação dos hormônios ecdisteróides e hormônio juvenil), nutricionais (o alimento fornece o material e a energia necessários à síntese) e ambientais (mais relacionados aos fatores nutricionais, pois as condições ambientais interferem na quantidade de alimento disponível na natureza) devem ser levados em consideração.

Uma das proteínas mais importantes para os insetos é a vitelogenina, que é produzida no corpo gorduroso das fêmeas e, em quantidade muito menor, nos zangões. Nas operárias de *Apis mellifera*, a síntese desta proteína tem início após a emergência e aumenta progressivamente durante as duas primeiras semanas de vida adulta, quando então, começa a diminuir. Rainhas recém emergidas já têm vitelogenina na hemolinfa e produzem esta proteína durante toda a vida adulta.

O papel da dieta alimentar na síntese de vitelogenina tem sido estudado em muitos insetos. Bownes *et al.* (1988) mostraram que em *Drosophila*, os genes da vitelogenina são continuamente transcritos nas células do corpo gorduroso a partir da eclosão, se as fêmeas estiverem bem alimentadas. Em alguns insetos, a síntese desta proteína é controlada pelos hormônios morfogenéticos (hormônio juvenil e ecdisteróides). Nutrientes podem influenciar a produção destes hormônios. Por exemplo, em *Calliphora* a síntese de hormônio juvenil depende da dieta (Duve *et al.*, 1972). Azambuja *et al.* (1993) mostraram que a síntese de ecdisteróides em *Rhodnius* também é dependente da dieta. Em *Musca domestica*, a alimentação protéica estimula o corpus cardiacum que produz um neuormônio necessário ao desenvolvimento dos ovários (Adams & Gerst, 1993). Portanto, a dieta alimentar não só fornece os materiais e energia necessários ao desenvolvimento dos ovários e reprodução, como também pode estimular a produção de hormônios relacionados à síntese de vitelogenina e sua incorporação aos ovócitos.

Bitondi *et al.* (1994), mostraram que operárias confinadas, tratadas com diferentes dietas, apresentaram diferentes títulos de Vg. Nas abelhas confinadas e

alimentadas com dietas pobres ou desprovidas de proteína, como o xarope (água e açúcar) não foi detectada a vitelogenina na hemolinfa. No entanto, em *Apis mellifera*, ao contrário do que ocorre em alguns outros insetos, o alimento protéico não estimulou a produção de hormônio juvenil (Bitondi e Simões, 1996), mas constitui fonte de material e energia para a síntese de proteínas. Além dos fatores relacionados acima, o controle exercido pela rainha sobre as operárias é um fator adicional influenciando a síntese de vitelogenina.

## 2- Resposta imune de insetos

Os alimentos protéicos são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal das abelhas, desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas, produção de cria, síntese e secreção de proteínas em níveis normais. As reações imunológicas das abelhas também podem ser afetada por dietas deficientes em proteína?

A eficiência em remover microorganismos e parasitas da circulação é um dos fatores que contribuiu para o enorme sucesso dos insetos. As reações imunológicas dos insetos empregam uma grande variedade de mecanismos que podem reconhecer e eliminar bactérias e parasitas metazoários (Boman and Hultmark, 1981; Gotz and Boman, 1985; Ratcliffe et al., 1985).

Os insetos têm mecanismos celulares de defesa (hemócitos, eficientes em remover partículas estranhas como bactérias, fungos, metazoários e ovos de himenópteros endoparasitas, através da fagocitose, formação de nódulos ou encapsulação); mecanismos humorais de defesa (enzimas e polipeptídeos antibacterianos, como por exemplo, a lisozima e a apidecina); bem como mecanismos de reconhecimento não específico (aglutininas e profenoloxidase) e o mecanismo de cooperação celular para agir contra o amplo espectro de agentes patogênicos (Ratcliffe and Rowley, 1979; Ratcliffe et al., 1985; Gotz and Boman, 1985; Pendlant et al., 1988).

- **Mecanismos celulares de defesa:** A hemolinfa dos insetos contém diferentes tipos de hemócitos que os protegem contra a invasão de microorganismos, como bactérias, fungos, etc, através da fagocitose, formação de nódulos e encapsulação. A fagocitose é o primeiro mecanismo de defesa dos insetos contra bactérias. Na fagocitose, bactérias inteiras são envolvidas pelos hemócitos, formando uma grande vesícula, e subseqüentemente são mortas e digeridas. A lisozima é uma das enzimas envolvidas no mecanismo de fagocitose (Gliński and Jarosz, 1995).

Quando o tamanho dos invasores é superior a 10 $\mu$ m, eles não podem ser fagocitados por um único hemócito; neste caso eles são encapsulados. A encapsulação envolve a formação de uma "cápsula" ao redor do objeto estranho pelos hemócitos (Poinar et al., 1968). A formação desta cápsula inicialmente

restringe o crescimento e movimento do invasor e pode resultar em sua morte (Dunn, 1986).

Quando um número maior de bactérias está presente na hemolinfa, o mecanismo de defesa mais eficiente é a formação de nódulos, a nodulação (Ratcliffe and Valters, 1983). A nodulação resulta de ambos os processos, fagocitose e encapsulação. Hemócitos agregados a bactérias podem ser rodeados por uma camada de hemócitos achatados. Os nódulos deixam a circulação e aderindo-se à superfície de órgãos internos.

O destino da bactéria no nódulo depende de sua virulência, geralmente as saprófitas morrem rapidamente com a melanização dos nódulos; as bactérias patogênicas podem, em alguns casos, conseguir liberar-se dos nódulos para a hemolinfa (Gliński and Jarosz, 1995).

- **Mecanismos de defesa humoral:** Os insetos podem responder à infecção sintetizando imuno-proteínas as quais atuam na hemolinfa, como por exemplo a lisozima, a cecropina, a fenoloxidase, etc. Em abelhas *Apis mellifera* foi isolado um imuno-polipeptídeo específico, chamado apidecina (Casteels et al., 1993), que combate as bactérias gram-negativas. Sua atividade letal é rápida e mostrou-se independente do mecanismo lítico convencional, ao contrário dos demais peptídeos (Casteels et al., 1994). As bactérias gram-positivas não são afetadas.

São conhecidas três formas de apidecinas: Ia, Ib e II, todas são funcionalmente idênticas, e são compostas por 18 aminoácidos de baixo peso molecular.

As abelhas adultas contêm as apidecinas tipo Ia, Ib e II (compostos biologicamente ativos), entretanto, a hemolinfa das crias contém uma molécula precursora inativa, a proapidecina (Gliński e Jarosz, 1995).

A lisozima é uma enzima bacteriolítica descoberta primeiro em mamíferos por Flemming. Esta enzima foi inicialmente isolada em *Galleria mellonella*, mas tem sido detectada em insetos de várias ordens (Boman and Hultmark, 1987).

A hemolinfa de insetos não imunizados contém baixos níveis de lisozima. Em insetos que possuem a cutícula mais rígida, o nível de lisozima é menor que

em insetos que possuem a cutícula menos rígida, como por exemplo, as borboletas.

A lisozima, nos insetos, é sintetizada no corpo gorduroso e então, secretada na hemolinfa. Quando um inseto é infectado, o nível de lisozima aumenta, e este aumento reduz o risco de novas infecções.

As abelhas operárias que saem para coletar pólen e néctar, ficam mais expostas à infecções por bactérias (ou por microrganismos). Em consequência, essas operárias podem carregar estes microrganismos para o interior da colônia, infectando-a. A presença de microrganismos dentro da colônia aumenta os níveis de lisozima nas abelhas, as quais ficam mais resistentes a infecções (Gliński and Jarosz, 1995).

A fenoloxidase é outra enzima envolvida no sistema de defesa dos insetos, formando o revestimento ao redor dos parasitas microbios e macrobios, durante a resposta celular de encapsulação e nodulação (Durrant et al., 1993). Entretanto, o sistema da profenoloxidase não é somente mediador da defesa dos artrópodos. Outras funções são desempenhadas pelos hemócitos quando o sistema da profenoloxidase é ativado, provavelmente incluindo várias lectinas. A distribuição de lectinas e da profenoloxidase, entre os compartimentos celular e humoral em insetos, é matéria de debate, mas em alguns insetos, como por exemplo *Leucophaea maderae*, *Galleria mellonella* e *Blaberus discoidalis*, elas são associadas aos hemócitos. Nas células da hemolinfa, interações bioquímicas podem ocorrer entre estes dois sistemas de reconhecimento não específico (lectinas e profenoloxidase), contudo, pouco se sabe ainda sobre os eventos da resposta imune dos insetos (Chen et al., 1995).

### 3- Influência da rainha nas colônias.

Em uma colônia normal, a ativação dos ovários das abelhas operárias é inibida pelo ácido 9-oxo-2-decenoic (9ODA) e também por feromônios voláteis. O 9- ODA é produzido pela glândula mandibular da rainha e então, secretado e distribuído sobre a superfície de seu corpo pelos movimentos de limpeza. A rainha está sempre rodeada por operárias que a examinam, freqüentemente, com suas antena. Assim procedendo, provavelmente, estão recebendo feromônios da rainha. Os feromônios voláteis inibidores também são produzidos pela cria e podem reprimir, temporariamente, o desenvolvimento ovariano das operárias, até que seja criada uma nova rainha (Free, 1980).

Quando uma colônia perde a sua rainha, muitas mudanças comportamentais e fisiológicas ocorrem. Há aumento da agressividade e, as operárias se movimentam mais (Winston, 1987). A maior evidência que uma colônia está sem rainha é a presença das realeiras, células onde serão criadas novas rainhas.

Um ou mais dias após a perda da rainha, as operárias modificam algumas das células dos favos que já abrigam crias de operárias, construindo assim as realeiras. As larvas destinadas a serem rainhas se desenvolvem nas realeiras e são alimentadas com grandes quantidades de geléia real (Free, 1980).

Em abelhas *Apis mellifera*, a alimentação tem papel fundamental na diferenciação das castas, uma vez que promove a mudança no perfil hormonal. As larvas de rainha são alimentadas com geléia real, enquanto que as larvas de operária são alimentadas com a geléia real apenas nos primeiros dias do estágio larval, e depois passam a ser alimentadas com secreção glandular suplementada com pólen e mel.

## **OBJETIVOS GERAIS**

---

Este trabalho tem como objetivo:

- Analisar como a concentração de proteína na hemolinfa de operárias recém-emergidas e operárias de 7 dias de vida adulta varia durante os meses do ano e correlacionar com a temperatura, a umidade relativa e a disponibilidade de alimento na natureza;

- Relacionar o método proposto por Cremonez et al. (1998) com o método de Herbert (1970), a fim de determinar se o novo método para testar dietas protéicas pode substituir o método clássico, sendo eficiente e mais rápido, bem como testar novas dietas artificiais que poderão ser utilizadas em épocas de carência de pólen ou como suplemento de pólen, e que tenham um custo acessível;

- Avaliar a influência destas dietas artificiais no estado imunológico das abelhas;

- Avaliar se a ausência da rainha na colônia durante a fase larval influencia a quantidade e qualidade das proteínas na hemolinfa e, a longevidade das abelhas adultas.



## **Capítulo I**

**“Variação da concentração de proteína na hemolinfa de abelhas operárias ao longo do ano.”**

## RESUMO

As abelhas necessitam de pólen como fonte de proteína para seu crescimento e desenvolvimento normal, bem como para o desenvolvimento da colônia. O maior consumo de pólen ocorre nas duas primeiras semanas de vida adulta, fase em que as operárias estão alimentando a cria. É neste período também que ocorre grande síntese de proteína pelas operárias. Neste trabalho analisamos como a concentração de proteína total na hemolinfa de operárias varia durante os meses do ano e como essa variação se relaciona com a temperatura e a umidade relativa ambiental, parâmetros associados com a disponibilidade de alimento na natureza. A concentração de proteína na hemolinfa de operárias recém-emergidas e de 7 dias foram determinadas por dosagem espectrofotométrica. Amostras de hemolinfa de 80 abelhas recém-emergidas, retiradas de 4 diferentes colméias, 20 de cada colméia, foram coletadas mensalmente, no período de setembro de 1999 à setembro de 2000. O mesmo procedimento foi adotado para a coleta de hemolinfa de operárias de 7 dias. Os resultados mostram que nos meses com menor temperatura ambiental, a concentração média de proteína na hemolinfa foi menor ( $6,46\mu\text{g}$  de proteína/ $\mu\text{l}$  de hemolinfa), enquanto que nos meses com maiores temperaturas, a concentração de proteína foi maior ( $9,15\mu\text{g}$  de proteína/ $\mu\text{l}$  de hemolinfa). Nestas abelhas, a concentração de proteína na hemolinfa parece refletir a quantidade e qualidade do alimento recebido durante a fase larval, uma vez que estas abelhas não se alimentaram no período compreendido entre a emergência e a extração de hemolinfa. Neste caso, a maior oferta de alimento durante o verão pode ter contribuído para a nutrição mais eficiente das larvas. Nas operárias de 7 dias, observamos que as maiores concentrações de proteína também ocorreram nos meses referentes ao verão (média de  $33,54\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), com altas temperaturas e maior umidade relativa, que caracteriza maior oferta de pólen na natureza que nos meses mais frios e secos (média foi de  $14,3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Em todos os meses, os títulos de proteína nas operárias de sete dias mostrou-se maior que das operárias recém-emergidas, evidenciando o acúmulo de proteína durante a primeira semana de vida adulta. Assim, concluímos que a temperatura e a umidade relativa, que

afetam a disponibilidade de alimento na natureza, influenciam o título de proteína total na hemolinfa de operárias recém-emergidas e de operárias de 7 dias.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*, pólen, proteínas da hemolinfa, operárias nutrizes.

## INTRODUÇÃO

As abelhas requerem proteínas para o crescimento normal, para o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas e do tecido adiposo, além do que, a existência de proteína em níveis adequados na colônia, tende a elevar a quantidade de cria (Herbert & Shimanuki, 1979).

A fonte de proteína para as operárias é o pólen (Biesmeyer et al., 1992) e o maior consumo de pólen ocorre durante a primeira semana do estágio adulto. As glândulas hipofaríngeas das operárias apresentam atividade a partir do 3º dia de vida adulta, e deste período em diante, as operárias jovens utilizam a secreção destas glândulas para alimentar a rainha e as larvas. Outro tecido, o corpo gorduroso, também apresentará aumento de sua capacidade de síntese de proteínas. Aproximadamente entre o 5º e o 15º dia do estágio adulto, o corpo gorduroso sintetizará quantidade maciça de vitelogenina (Engels et al., 1990). Esta proteína acumula-se na hemolinfa e poderá ser seqüestrada pelos ovários de algumas operárias se a colméia tornar-se órfã. Neste caso, a vitelogenina, modificada em vitelina, será um dos componentes do vitelo que se acumula nos ovócitos e constitui o nutriente do embrião.

Abelhas operárias *Apis mellifera* de 0- 7 dias, confinadas e alimentadas com dietas pobres ou desprovidas de proteína, não acumulam vitelogenina na hemolinfa (Bitondi et al., 1994 e Cremonese et al., 1998). Em consequência, o título de proteína total nestas abelhas é baixo. As abelhas operárias mais velhas diminuem naturalmente o consumo de pólen e, por apresentarem intenso metabolismo necessário à atividade de vôo, aumenta o consumo de carboidratos (Crailsheim, 1990; Crailsheim et al., 1992; Szolderits & Crailsheim, 1993).

Carência de pólen pode ocorrer em qualquer época do ano e afeta o desenvolvimento da colônia. Vários fatores, tais como a temperatura do ar, a umidade relativa, o pH e a fertilidade do solo afetam a quantidade de pólen, bem como o seu valor nutritivo deste. Conseqüentemente, o pólen de uma fonte floral pode ser quimicamente distinto de um pólen similar coletado em uma área diferente. O teor de proteína do pólen coletado de diferentes plantas varia de 8 a 40%. Esta grande diferença na composição química causa grande variabilidade

no valor nutritivo e no efeito fisiológico do pólen para as abelhas (Todd & Bretherick, 1942; Vivino & Palmer, 1944).

A variação da concentração de proteína total na hemolinfa de operárias recém-emergidas até 30 dias de vida adulta foi estudada por Cremonez (1996) em meses de verão e inverno. Valores significativamente maiores foram obtidos durante o verão. Esta diferença foi observada em todas as idades estudadas (0 a 30 dias). O objetivo do presente trabalho foi determinar como a concentração de proteína total na hemolinfa de operárias recém-emergidas e de 7 dias durante os meses do ano e correlacionar com a temperatura, a umidade relativa, fatores que interferem na disponibilidade de alimento na natureza.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no apiário experimental do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Foram utilizadas 4 colônias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, contendo 10 quadros, aproximadamente 1500 abelhas adultas, cria em todos os estágios de desenvolvimento, pólen, mel e uma rainha.

Uma vez por mês, durante todos os meses de setembro de 1999 à setembro de 2000, quadros de todas as colônias, contendo pupas de operária próximas da emergência, foram levados ao laboratório e colocados em estufa à 32°C e 80% de umidade relativa por um período de aproximadamente 16 horas. Das abelhas que emergiram neste período, foi retirada uma amostra de 20 abelhas recém-emergidas de cada colônia para a extração e determinação dos títulos de proteína da hemolinfa. Uma amostra de aproximadamente 200 abelhas recém-emergidas foram marcadas no tórax, com uma tinta não tóxica, e devolvida a colônia de origem até o sétimo dia, quando era coletada 20 abelhas para a extração e determinação dos títulos de proteína da hemolinfa.

**Extração de hemolinfa:** A hemolinfa das abelhas recém-emergidas e das de 7 dias foi coletada por meio de uma pequena incisão a nível do terceiro tergito dorsal, com auxílio de um microcapilar previamente lavado em uma solução 0,1% de feniltiouréia em água. Foram feitos 10 “pools” com hemolinfa de 2 operárias para cada idade, para cada colônia, todos os meses. A hemolinfa foi estocada em microtubos “eppendorf” e congelada a -20°C para posterior análise.

**Determinação da concentração de proteína total:** A concentração de proteína na hemolinfa foi determinada espectrofotometricamente à 595nm (Bradford, 1976), usando soro-albumina bovina para obtenção da curva padrão. O reagente para proteína consiste de 0,001 % de Coomassie Brilliant Blue G.250, 4,7% (wt: vol) etanol e 8,5% (wt: vol) de ácido ortofosfórico dissolvido em água. Um mililitro do reagente de proteína foi colocado em um tubo de ensaio de 10ml, adicionava-se 1µl de hemolinfa. Após agitação em vortex, esta mistura foi levada ao espectrofotômetro. As dosagens foram realizadas entre 5 e 60 minutos após a adição de hemolinfa ao reagente.

## RESULTADOS

A concentração de proteína total nas abelhas recém-emergidas, analisadas todos os meses, apresentou variação entre os meses analisados (Tab. 1). Os títulos mais baixos foram encontradas nos meses de junho e julho (média foi de  $6,46\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), as concentrações mais altas (média foi de  $9,15\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) foram detectados nos meses janeiro, fevereiro e março de 2000, sendo a diferença significativa (Kruskal-Wallis One Way Analysis, Dunn's Method,  $p < 0,05$ ).

A concentração de proteína total na hemolinfa nas abelhas recém-emergidas mostrou correlação positiva (Pearson's Product Moment,  $p < 0,05$ ) com a temperatura: Maiores concentrações de proteína foram detectadas nos meses caracterizados por temperatura média maior (Fig. 1). Não houve correlação entre a concentração de proteína total na hemolinfa de operárias recém-emergidas e a umidade relativa (Pearson's Product Moment,  $p > 0,05$ )

Nas operárias com 7 dias, a concentração de proteína na hemolinfa variou muito durante o ano (de  $13,91\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a  $37,17\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). As menores concentrações foram encontradas nos meses junho e julho ( $14,35\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), e as maiores concentrações de proteína foram encontradas nos meses de janeiro, fevereiro e março ( $33,54\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), sendo a diferença entre a concentração de proteína na hemolinfa entre estes meses estatisticamente diferente dos demais meses (Kruskal - Wallis One Way ou Dunn's method,  $p < 0,05$ ) (Fig. 1).

A concentração de proteínas na hemolinfa das abelhas operárias de 7 dias mostrou correlação positiva com a temperatura média (Pearson's Product Moment,  $p < 0,05$ ); nos meses com temperaturas mais baixas, a concentração de proteína na hemolinfa também foi mais baixa, e nos meses com temperatura média maior, a concentração de proteína na hemolinfa das operárias foi maior (Fig. 1). A concentração de proteína total mostrou correlação positiva com a umidade relativa (Pearson's Product Moment,  $p < 0,05$ ). Nos meses onde a umidade relativa foi maior a concentração de proteína total das operárias de 7 dias também foi maior (Fig. 2).

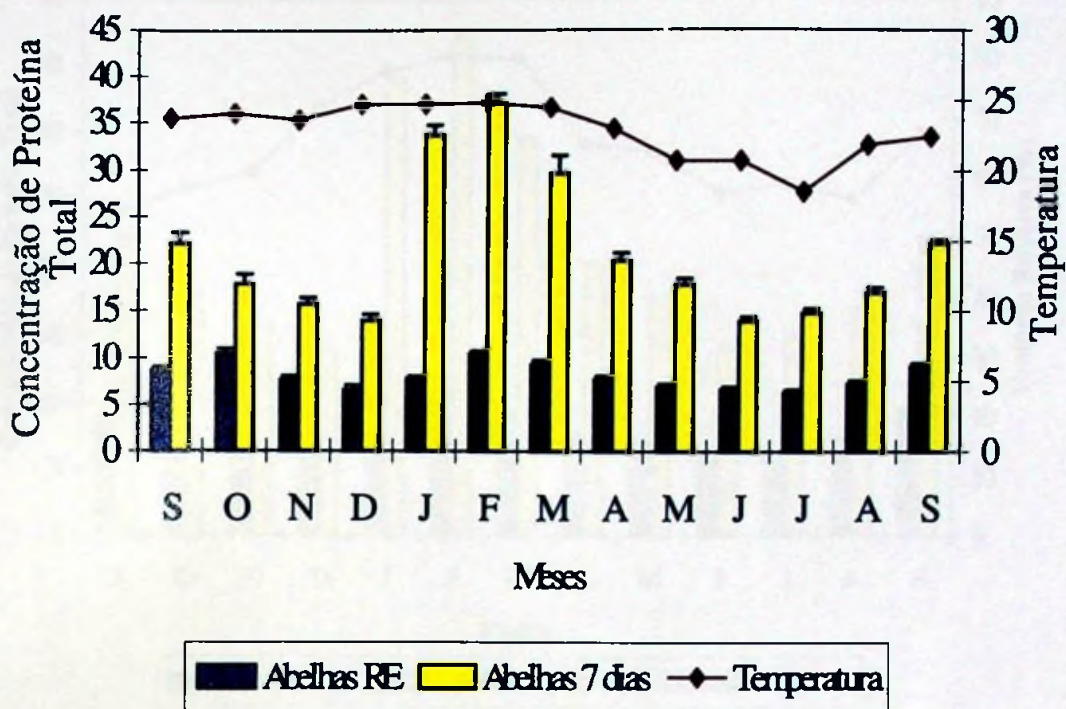
Em todos os meses estudados, observamos que a concentração de proteína na hemolinfa das operárias de sete dias de vida adulta foi significativamente

maior que nas operárias recém-emergidas (t-Test,  $p \leq 0,05$ ). Este aumento na concentração protéica ocorreu mesmo nos meses de inverno, onde a concentração de proteína na hemolinfa das operárias de sete dias foi menor que nos meses de verão.

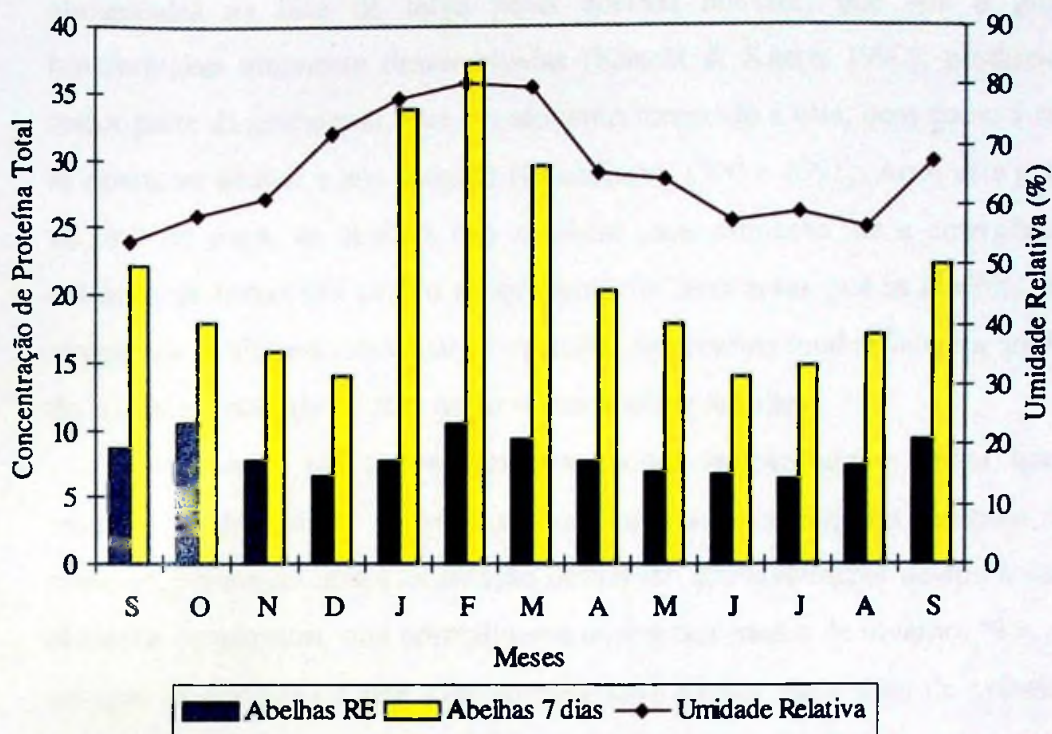
**Tabela 1:** Média das concentrações de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) na hemolinfa de operárias recém-emergidas (RE), e com 7 dias de vida adulta ao longo de uma ano, média da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e da umidade relativa (U.R.) (%) no período.

Meses	Abelha RE	Abelha 7 dias	Temperatura	U. R.
Setembro	8,56	22,19	23,7	53,8
Outubro	10,46	17,86	24,1	58,1
Novembro	7,66	15,87	23,6	61,2
Dezembro	6,5	13,98	24,7	72,1
Janeiro	7,69	33,81	24,7	78,1
Fevereiro	10,44	37,17	24,8	80,5
Março	9,31	29,64	24,5	79,9
Abril	7,7	20,39	23	65,6
Mai	6,89	17,91	20,7	64,3
Junho	6,62	13,91	20,7	57,3
Julho	6,31	14,79	18,5	58,9
Agosto	8,98	17,03	21,8	56,3
Setembro	9,2	22,3	22,4	67,5





**Figura 1:** Comparação da concentração de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) na hemolinfa de operárias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas recém-emergidas (RE) e com 7 dias de vida adulta, e a temperatura média ( $^{\circ}\text{C}$ ) no período de um ano. Dosagem protéica por ensaio espectrofotométrico usando soro albumina bovina como padrão.



**Figura 2:** Comparação da concentração de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) na hemolinfa de operárias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas recém-emergidas (RE) e com 7 dias de vida adulta, e a relação com a umidade relativa (%) (UR) média no período de um ano. Dosagem protéica por ensaio espectrofotométrico usando soro albumina bovina como padrão.

## DISCUSSÃO

A concentração de proteína total na hemolinfa das operárias recém-emergidas não apresentou grandes variações durante o ano. Estas abelhas foram alimentadas na fase de larva pelas abelhas nutrizas, que têm a glândula hipofaríngeas altamente desenvolvidas (Knecht & Kaatz, 1990), produzindo a maior parte da geleia real, que é o alimento fornecido à cria, bem como à rainha, às operárias adultas e aos zangões (Crailsheim, 1990 e 1991). Após este período, na fase de pupa, as abelhas não recebem mais alimento até a emergência. A extração de hemolinfa para o experimento foi feita antes que as abelhas recém-emergidas se alimentassem, assim os títulos de proteína total refletem a qualidade do alimento recebido na fase de larva das abelhas nutrizas.

Nos meses em que observamos menor temperatura e menor umidade relativa, os títulos de proteína nas abelhas recém-emergidas também foram menores, refletindo uma alimentação deficiente, provavelmente devido à falta de alimento na natureza, que normalmente ocorre nos meses de inverno. Nos meses em que as abelhas de sete dias apresentaram títulos mais altos de proteína na hemolinfa, observou-se que as abelhas recém-emergidas também apresentavam títulos maiores de proteína.

A concentração de proteína na hemolinfa das operárias de sete dias variou muito durante o ano. A baixa concentração de proteína encontrada nos meses de setembro de 1999 a dezembro de 1999, reflete a falta de pólen na natureza, pois os meses anteriores a estes são meses de inverno com baixas temperaturas e pouco alimento. Como o período de seca se prolongou até novembro, as abelhas não possuíam alimento suficiente. Com o início das chuvas em novembro, a oferta de alimento aumentou; com isso as abelhas passaram a coletar mais alimento, no entanto isso só se refletiu nos meses de janeiro a março de 2000.

Em *Apis mellifera*, a síntese de proteínas nos tecidos caracterizados por intensa atividade secretora, tais como o corpo gorduroso e as glândulas hipofaríngeas, é influenciada por vários fatores, entre eles o nutricional, pois o alimento fornece o material e a energia necessários à síntese. Bitondi et al. (1994) mostraram que operárias confinadas e tratadas com diferentes dietas, apresentavam diferentes títulos de vitelogenina. A alimentação exclusivamente

com xarope (água e açúcar) impediu o aumento de vitelogenina na hemolinfa durante a 1ª semana após a emergência (Bitondi et al., 1994). Em consequência, o título de proteína na hemolinfa em operárias de 6 dias mostrou-se bastante baixo e, freqüentemente menor que aquele detectado em operárias recém-emergidas (Cremonez et al., 1998). A escassez de pólen na natureza certamente prejudicará o aumento de proteínas na hemolinfa das abelhas operárias. O aumento da oferta de alimento na natureza ao contrário, favorecerá o acúmulo de proteínas na hemolinfa. Essas considerações foram corroboradas pelos resultados do presente trabalho que mostraram concentração de proteína total maior na hemolinfa de abelhas de 7 dias nos meses de janeiro, fevereiro e março, caracterizados por altas temperaturas e umidade relativa e, portanto, maior oferta de alimento.

Nos meses seguintes, de abril até setembro de 2000, observa-se uma queda nos títulos de proteína na hemolinfa das operárias de sete dias, mais acentuada nos meses de junho e julho, refletindo a diminuição de alimento na natureza.

Brandeburgo e Gonçalves (1989) observaram que temperaturas mais baixas provocam diminuição da área de cria. O presente trabalho mostra que nos meses de temperatura mais baixa e escassez de alimento, as operárias de 7 dias têm títulos de proteína total mais baixos. Se estas operárias são responsáveis pela alimentação das larvas, o “status” nutricional da colônia afeta a síntese e secreção de proteína, logo a diminuição da produção de cria. Nos meses com temperatura mais alta, os títulos de proteína total nas operárias foram maiores.

Podemos concluir que os títulos de proteína total na hemolinfa de operárias de 7 dias foi influenciado pelos fatores ambientais, como a temperatura e a umidade relativa, já que estes vão determinar a quantidade de alimento disponível na natureza. Entretanto, a maior influência é mesmo a disponibilidade de pólen na natureza e, conseqüentemente, de pólen estocado na colônia que é utilizado por estas operárias. Nas operárias recém-emergidas, o título de proteína total na hemolinfa é influenciado pelo alimento recebido na fase larval, que por sua vez reflete a alimentação recebida pelas operárias adultas e a oferta de alimento na natureza.

## Capítulo II

**“Determinação do valor nutricional de dietas  
protéicas: Comparação da técnica  
laboratorial com a medição da área de cria  
produzida em núcleos confinados.”**

## RESUMO

Em épocas de carência de pólen, o fornecimento de dietas protéicas alternativas pode ajudar a melhorar o desempenho da colônia. Existem muitos materiais utilizados pelos apicultores nestes períodos. Algumas dietas protéicas mostraram ser tão eficientes quanto o pólen, no entanto, elas são menos atrativas que este.

Os critérios tradicionalmente utilizados para avaliar se determinados alimentos são adequados para substituir o pólen são: a quantidade de alimento consumido e a produção de cria pela colônia. A determinação da área de cria é uma medida adequada, porque reflete a qualidade da dieta consumida: alimento escasso ou com teor nutritivo baixo resulta em diminuição da postura. Entretanto, interferências do ambiente, através de fontes de pólen, podem acabar confundindo os dados. Herbert (1970, 1977) contornou este problema mantendo pequenas colônias confinadas em gaiolas, mas este procedimento é demorado, se estende por 10 a 16 semanas, e é muito dispendioso. Um outro critério eficiente na determinação da eficiência das dietas protéicas é a determinação dos títulos de proteína total em operárias confinadas e alimentadas com as dietas a serem testadas.

O valor nutricional de algumas dietas: (1) 40% de pólen coletado de favos (*beebread*) misturado a 60% de candy (açúcar e mel); (2) 30% de farinha de soja, 10% de levedura de cana e 60% de açúcar; (3) 50% de açúcar em água (xarope), foi determinado pelos critérios de produção de cria e dosagem dos títulos de proteína total.

A determinação da produção de cria, em colônias confinadas em gaiolas e alimentadas somente com as dietas testadas, mostrou que com as dietas ricas em proteína, as colônias produziram cria, entretanto, em níveis menores que nas colônias em condições naturais. Os mesmos resultados foram obtidos pelo método de determinação dos títulos de proteína total na hemolinfa de operárias confinadas em pequenas gaiolas (grupos de 100 operárias) e alimentadas com as dietas teste. No grupo alimentado com a dieta de xarope, alimento pobre em proteína, houve uma interrupção da produção de cria, e os títulos de proteína total na hemolinfa mostraram uma redução em relação ao das abelhas recém-

emergidas, quando o normal, é um aumento destes títulos nas operárias entre o quinto e o décimo quinto dia de vida adulta. A dieta de farinha de soja, levedura de cana e açúcar, é eficiente tanto quanto a dieta de pólen estocado, alimento natural das abelhas. A dieta de xarope, dieta pobre em proteína, é incapaz de prover a produção de cria, ou o aumento nos títulos de proteína total das operárias. O método de testar dietas protéicas baseado na determinação dos títulos de proteína total em operárias confinadas em pequenos grupos e alimentadas com as dietas, mostrou ser tão eficiente e mais rápido que o método de determinação da produção de cria para análise das dietas artificiais.

**Palavras-chave:** dietas artificiais, área de cria, proteína, *Apis mellifera*, pólen.

## INTRODUÇÃO

Nas colônias de *Apis mellifera*, a produção de cria e a produção de mel são limitados pelo consumo de proteínas, que no caso destas, é obtida à partir do pólen coletado pelas abelhas forrageiras (Herbert, 1992). Durante os três primeiros dias após a eclosão do ovo, as larvas de abelhas consomem a geléia real, secreção glandular rica em proteína produzida por operárias jovens, chamadas de abelhas nutrizas. Estas por sua vez, consomem pólen para desenvolver as glândulas hipofaríngeas, as quais secretam a maior parte dos componentes da geléia real. Larvas à partir do sexto dia são alimentadas com uma mistura de pólen diluído em mel e água (Morse, 1975).

O requerimento anual de pólen por uma colônia varia consideravelmente dependendo da localização e tamanho da colônia e, das fontes florais do local. Assim, como o requerimento da colônia varia, o teor de proteína no pólen também varia muito. O teor de proteína de pólen coletado de diferentes plantas pode variar entre 8 e 40%. Muitos fatores como a temperatura do ar, o pH e a fertilidade do solo também afetam o valor nutritivo do pólen. Esta grande variação na composição química do pólen tem como consequência diferentes efeitos na fisiologia das abelhas.

Além da grande variação do valor nutritivo do pólen, as colônias ainda podem sofrer influências da falta de pólen na natureza, em determinados períodos. Nestes períodos o fornecimento de dietas alternativas ou substitutos de pólen podem ajudar a melhorar o desempenho da colônia. Para preparar as colônias para floradas importantes, é necessário que grandes populações sejam atingidas, logo no início da florada. Embora a alimentação com xarope (açúcar) estimule a produção de cria, se faltar pólen, este crescimento é limitado. Substitutos de pólen têm sido desenvolvidos em países como EUA, mas seu uso é bastante limitado por causa do custo. No Brasil, estas dietas não são utilizadas porque seus ingredientes, geralmente subprodutos ou produtos desenvolvidos para outros fins, não existem no Brasil, ou têm composições distintas. É importante utilizar os produtos que existem em cada região, que tenham composição e preço adequados, e testá-los para verificar se as abelhas aceitam e conseguem aproveitá-los para a produção de cria.



Vários materiais têm sido experimentado por apicultores e pesquisadores para serem utilizados na produção de dietas protéicas artificiais para as abelhas, como por exemplo: levedo seco de cerveja, leite integral fresco, nata de leite, gema de ovo (Haydak, 1936); farelo de soja e levedura de cerveja (Haydak, 1949); farinha de batata (Harp, 1978) e farinha de peixe (Chalmers, 1980).

Um dos problemas enfrentados pelos pesquisadores é que, embora alguns substitutos de pólen sejam tão eficientes quanto o pólen, em geral, são menos atrativos. Muitos substitutos de pólen oferecidos às abelhas são adequados à nutrição e podem até ter maior valor nutritivo que o pólen, mas quando as abelhas têm livre escolha entre o pólen natural e o substituto de pólen, elas se alimentam com o pólen natural (Standifer et al., 1973).

Para se avaliar as dietas substitutivas para o pólen, os critérios hoje utilizados são: a quantidade de alimento consumido e a produção de cria pela colônia. A quantidade de alimento consumido pela colônia não é um método adequado, uma vez que, em épocas de escassez de pólen, as abelhas coletam materiais que não são adequados a sua nutrição, e depois descartam. No Brasil, em certas épocas, as abelhas coletam fubá de milho com muito entusiasmo; este é temporariamente estocado no favo e depois descartado (De Jong, com. pessoal).

A quantidade de cria produzida pela colônia é um método mais eficiente, pois reflete a qualidade do alimento. Entretanto, para este método não sofrer influência de fontes externas de alimento, é necessário que as colônias sejam confinadas em gaiolas (Herbert, 1970 e 1977). Outros problemas deste método são: é necessário várias colônias para se obter um bom resultado e o tempo para se avaliar as dietas varia entre 10 e 16 semanas, o que torna o método muito dispendioso.

Simpson e Raubenheimer (1993) mostraram que a hemolinfa é a fonte central de informação sobre os mecanismos que controlam a alimentação, uma vez que reflete o estado dos insetos. Bitondi et al. (1994) mostraram que operárias confinadas, alimentadas com pólen ou açúcar, apresentaram diferentes títulos de vitelogenina (proteína do ovo, e que nas operárias é sintetizada principalmente entre o 5º e o 15º dia de vida adulta) na hemolinfa. Nas abelhas confinadas e alimentadas com dietas pobres ou desprovidas de proteína, como o

xarope (água e açúcar) não foi detectada a vitelogenina na hemolinfa. Com base nestes dados, Cremonez et al. (1998), utilizou a determinação do título de proteína total e de vitelogenina na hemolinfa de operárias confinadas, em pequenas caixas e mantidas em estufa, como método para determinar a eficiência de dietas alternativas para as abelhas. Este método mostrou ser eficiente uma vez que reflete a qualidade do alimento consumido, além de ser um método mais rápido (apresentando os resultados em duas semanas) e menos dispendioso.

Este trabalho têm como objetivo correlacionar o método proposto por Cremonez et al. (1998) com o método de Herbert (1970), para determinar se o novo método, para testar dietas protéicas, pode substituir o método clássico, sendo eficiente e mais rápido, bem como testar novas dietas artificiais que poderão ser utilizadas em épocas de carência de pólen ou como suplemento de pólen, e que tenham um custo acessível.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Preparação dos núcleos para confinamento.**

Colônias pequenas de abelhas híbridas Italianas mantidas em núcleos de quatro favos, foram escolhidas. Abelhas recém-emergidas (500g, nascidas de quadros mantidos na estufa por aproximadamente 18 horas) retiradas de colônias relativamente fortes (ninhos de 10 quadros) foram introduzidas no primeiro dia em cada núcleo. Subseqüentemente estes núcleos eram mudados de posição no apiário (diariamente), durante nove dias para perder as abelhas forrageiras. No décimo dia, cada núcleo foi colocado dentro de uma gaiola de tela (2 x 2 x 2m). Neste momento, havia abelhas na colônia suficientes para cobrir os dois lados de dois favos de cria. Imediatamente foi retirado todos os favos contendo cria e alimento, e foi introduzido favos novos e vazios.

### **Preparo e Fornecimento das dietas.**

Foram utilizadas para este experimento três dietas: (T1) constituída de pólen coletado dos favos (beebread) e candy (açúcar e mel); (T2) constituída de 30% de farinha de soja, 10% de levedura de cana e açúcar, a esta mistura foi adicionada água, em quantidade suficiente, para dar à dieta uma consistência pastosa; (T3) composta de açúcar, 50% em água (xarope). As dietas pastosas foram fornecidas em placas de plástico de 15cm de diâmetro e 1cm de altura, colocadas abaixo do favo, através do alvado, e a dieta T3, foi fornecida no alimentadouro interno.

Cada uma das dietas foi fornecida a quatro colônias. O experimento teve duração de 10 semanas, onde a dieta foi avaliada através do mapeamento da área de cria, método descrito por Herbert (1970). Estas mesmas dietas também foram comparadas através do método proposto por Cremonez (1998), que consiste em dosar a quantidade de proteína total na hemolinfa de operárias.

### **Mapeamento da área de cria.**

Os mapeamentos foram realizados no final da 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semanas. Os quadros de cria de cada colônia foram medidos, um a um, quanto às suas áreas com crias. Áreas com células, desoperculadas e operculadas, foram medidas separadamente. Utilizamos a metodologia adaptada de Al-Tikrity et al (1971), que consiste na colocação dos favos dentro de um suporte com laterais

construídas com arame esticado, formando quadrados de 2cm de lado (4cm<sup>2</sup> de área).

### **Determinação da concentração de proteína total na hemolinfa de operárias alimentadas com as dietas artificiais.**

Quadros com abelhas prestes a emergir foram utilizados para povoar pequenas gaiolas confinadas no laboratório. Os quadros foram mantidos em estufa a 34°C e 80% de umidade relativa por um período de aproximadamente 16 horas. As abelhas recém-emergidas foram confinadas em pequenas gaiolas de madeira de 11 x 13 x 8cm, uma das laterais de vidro e o piso formado por tela. Foram montadas 4 gaiolas com 120 abelhas cada mantidas em estufa a 34°C e umidade relativa de 80% por 14 dias. A cada grupo foi fornecido uma das seguintes dietas: (T1) constituída de pólen coletado dos favos (beebread) e candy (açúcar e mel); (T2) constituída de 30% de farinha de soja, 10% de levedura de cana e açúcar, a esta mistura foi adicionada água, em quantidade suficiente para dar à dieta uma consistência pastosa; (T3) composta de açúcar, 50% em água (xarope).

Este mesmo procedimento foi utilizado com outras duas dietas: a dieta T4 constituída de 40% de pólen congelado (congelado durante 6 meses) e 60% de açúcar; e a dieta T5, constituída de 60% de açúcar, 30% de farelo de soja e 10% de levedura de cana.

### **Coleta e estocagem de hemolinfa.**

Após a emergência (dia 0) e após 6, 10, 14 dias de vida adulta, foi feita a coleta de hemolinfa de uma amostra de 30 abelhas de cada um dos grupos confinados, alimentados com as diferentes dietas. As abelhas foram imobilizadas em placas de dissecação e a hemolinfa foi coletada com auxílio de microcapilares introduzidos numa pequena incisão abdominal dorsal. Os microcapilares foram, antes da coleta, lavados em solução de feniltiouréia em água, para evitar a melanização da hemolinfa. A hemolinfa de cada abelha foi mantida à -20°C, nos próprios capilares.

### **Dosagem de proteína total.**

A concentração de proteína na hemolinfa foi determinada espectrofotometricamente à 595nm (Bradford, 1976), usando soro-albumina

bovina para determinação da curva padrão. O reagente para proteína consiste de 0,001 % de Coomassie Brilliant Blue G.250, 4,7% (wt: vol) etanol e 8,5% (wt: vol) de ácido ortofosfórico dissolvido em água. Um mililitro do reagente de proteína foi colocado em um tubo de ensaio de 10ml e adicionava-se 1 $\mu$ l de hemolinfa e misturava-se. Esta solução foi colocada em uma cubeta e a dosagem espectrofotométrica foi realizada após 5 minutos, porém antes de uma hora da mistura ser feita.

#### **Análise estatística.**

A quantidade de cria produzida pela colônia, nos 5 mapeamentos realizados durante o experimento, foram analisadas pelo Tukey's Studentized Range (HSD) (Sigma Stat, 1995). A comparação dos títulos de proteína total na hemolinfa de operárias confinadas e alimentadas com diferentes dietas foi realizada pelo Student-Neuman-Keuls Method (Sigma Stat, 1995).

## RESULTADOS

### Determinação da área de cria:

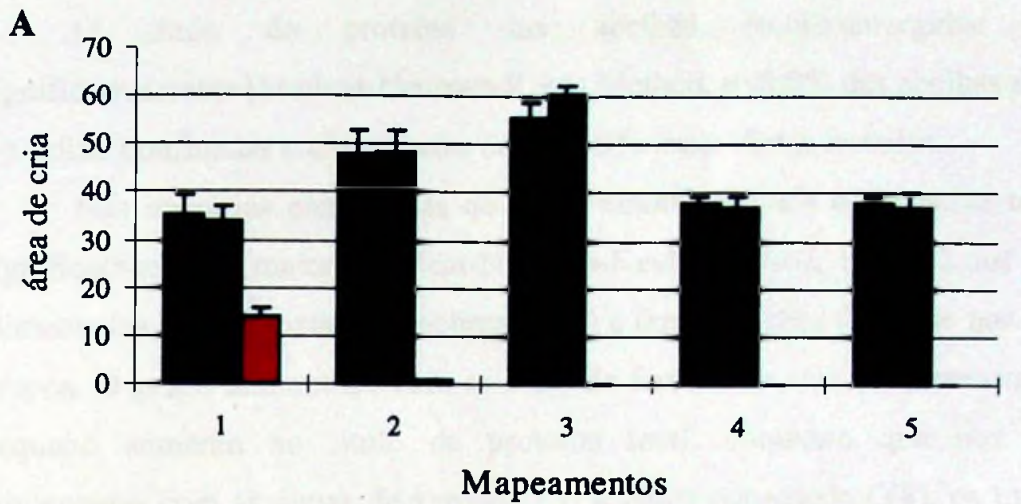
Nas colônias alimentadas com as dietas de pólen coletado dos favos (beebread) e com a dieta de farinha de soja, houve produção de cria durante todo o experimento. Ao serem confinadas, as colônias não possuíam nenhuma cria, após duas semanas estas colônias apresentaram uma pequena área de cria total, em média  $35,25\text{cm}^2$  nas colônias alimentadas com beebread, e de  $33,75\text{cm}^2$  nas colônias alimentadas com a dieta de farinha (Tukey's Studentized Range,  $p>0,05$ ).

No segundo e terceiro mapeamentos realizados, houve um aumento da área de cria total (26% e 14,6%, respectivamente), nas colônias alimentadas com a dieta de beebread. Nas colônias alimentadas com a dieta de farinha de soja, o aumento médio da área de cria total foi de 30,5% e 20,2% respectivamente (Fig. 1a).

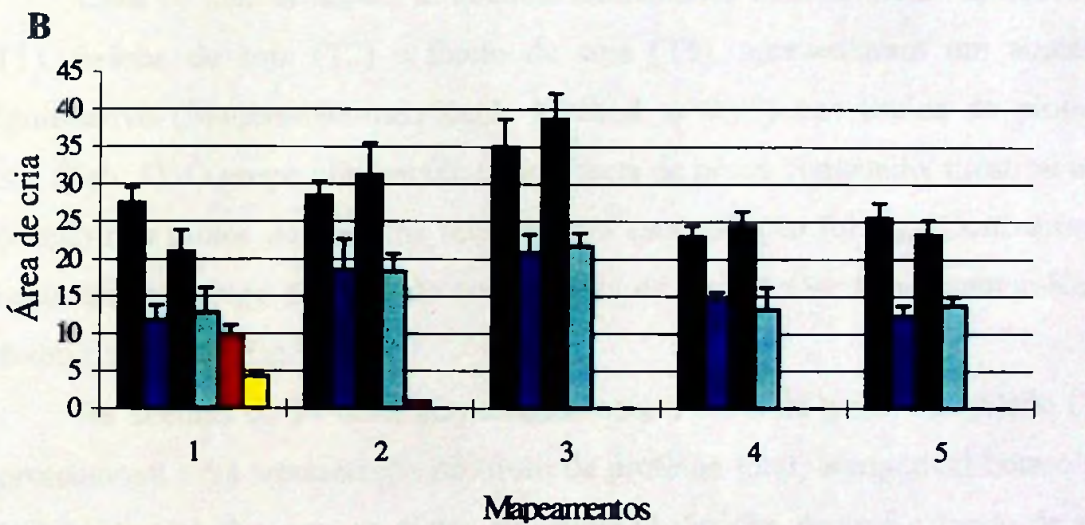
No quarto mapeamento realizado, observamos uma redução na área da cria das colônias confinadas e alimentadas com as dietas de beebread e farinha de soja, entretanto, esta redução não foi significativa (Tukey's Studentized Range,  $p>0,05$ ). A redução nas colônias confinadas e alimentadas com beebread foi em média de -32%, e nas colônias confinadas e alimentadas com farinha de soja foi de -39%. No último mapeamento, a área de cria destes grupos se manteve constante em relação ao mapeamento anterior (Fig 1A).

As tendências encontradas para a área de cria operculada e área de cria desoperculada foram iguais a área de cria total (Fig. 1B).

As colônias que receberam a dieta de xarope apresentaram no primeiro mapeamento, duas semanas após o início do experimento, uma pequena área de cria ( $14\text{ cm}^2$ ), entretanto após o segundo mapeamento nós observamos que não existia postura nestas colônias e assim aconteceu até o final do experimento.



■ Beebread e candy ■ Farinha de soja, levedura de cana e açúcar ■ Xarope



■ Beebread e candy (ACO) ■ Beebread e candy (ACD)  
 ■ Farinha de soja, levedura de cana e açúcar (ACO) ■ Farinha de soja, levedura de cana e açúcar (ACD)  
 ■ Xarope (ACO) ■ Xarope (ACD)

**Figura 1:** Área de cria de colônias confinadas em gaiolas por 10 semanas e alimentadas com diferentes dietas. A- Área de cria total; B- ACO: área de cria operculada e ACD: área de cria desoperculada.

**Determinação da concentração de proteína total na hemolinfa:**

O título de proteína das abelhas recém-emergidas diferiu significativamente (Student-Neuman-Keuls Method,  $p < 0,05$ ) das abelhas de 6, 10 e 14 dias, confinadas e alimentadas com as diferentes dietas testadas.

Nas operárias com 6 dias de idade adulta, o título de proteína total foi significativamente maior (Student-Neuman-Keuls Method,  $p < 0,05$ ) nos grupos alimentados com as dietas de beebread (T1) e farelo de soja (T5) que nos demais grupos. O grupo alimentado com a dieta de farinha de soja (T2) apresentou um pequeno aumento no título de proteína total, enquanto que nos grupos alimentados com as dietas de xarope (T3) e pólen congelado (T4), os títulos de proteína total apresentaram uma redução quando comparados às abelhas recém-emergidas (Tab.1).

Com 10 dias de idade, as abelhas alimentadas com as dietas de beebread (T1), farinha de soja (T2) e farelo de soja (T5), apresentaram um aumento significativo (Student-Neuman-Keuls Method,  $p < 0,05$ ) nos títulos de proteína total (Tab. 1). O grupo alimentado com a dieta de pólen congelado, mostrou uma redução nos títulos de proteína total, porém esta redução foi significativamente menor que no grupo alimentado com a dieta de xarope (Student-Neuman-Keuls Method,  $p > 0,05$ ) (Fig. 2).

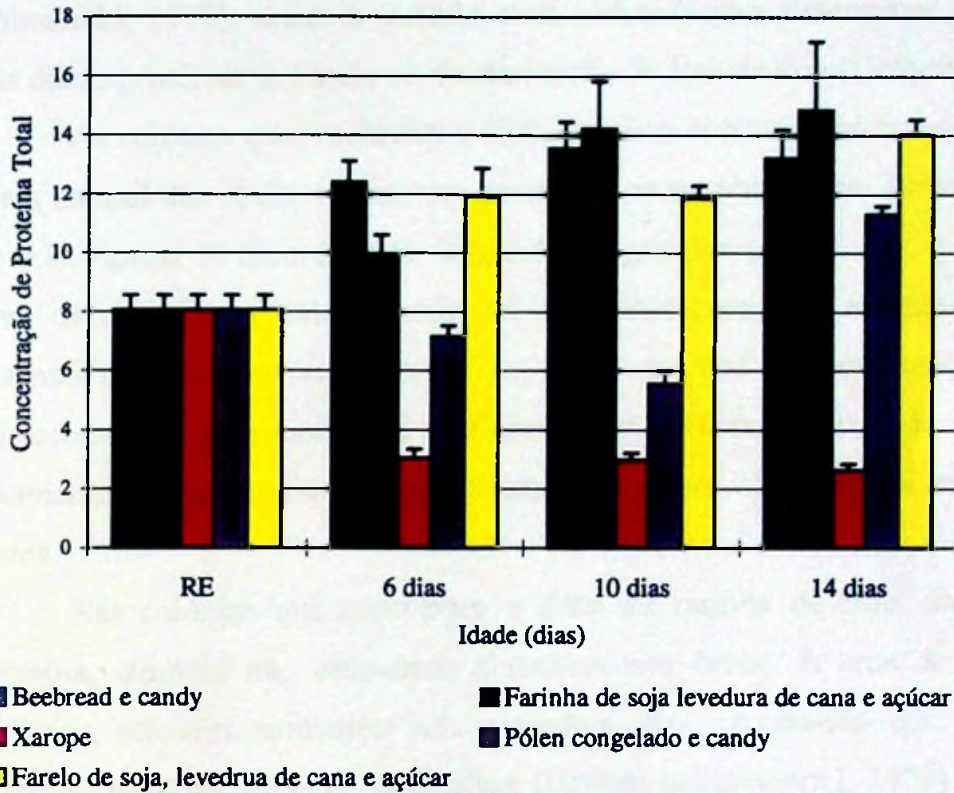
As abelhas de 14 dias, alimentadas com a dieta de pólen congelado (T4) apresentaram uma recuperação no título de proteína total, compatível com o das abelhas alimentadas com as dietas de beebread, farinha de soja e farelo de soja (Tab. 1). O grupo alimentado com a dieta de xarope (T3) apresentou uma redução significativa (Student-Neuman-Keuls Method,  $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos (Fig. 2).



**Tabela 1: Média e erro padrão da concentração de proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) na hemolinfa de abelhas *Apis mellifera* africanizadas confinadas em laboratório.**

Dietas/Idades	RE	6dias	10 dias	14 dias
T1	8,06 $\pm$ 0,49 <sup>Aa</sup>	12,40 $\pm$ 0,71 <sup>Ab</sup>	13,54 $\pm$ 0,92 <sup>Ab</sup>	13,22 $\pm$ 0,97 <sup>Ab</sup>
T2	8,06 $\pm$ 0,49 <sup>Aa</sup>	9,93 $\pm$ 0,69 <sup>Bb</sup>	14,22 $\pm$ 1,59 <sup>Ac</sup>	14,84 $\pm$ 2,33 <sup>Ac</sup>
T3	8,06 $\pm$ 0,49 <sup>Aa</sup>	3,04 $\pm$ 0,30 <sup>Bb</sup>	2,99 $\pm$ 0,22 <sup>Cb</sup>	2,63 $\pm$ 0,23 <sup>Bb</sup>
T4	8,06 $\pm$ 0,49 <sup>Aa</sup>	7,16 $\pm$ 0,37 <sup>Bb</sup>	5,55 $\pm$ 0,45 <sup>Bc</sup>	11,33 $\pm$ 0,27 <sup>Ad</sup>
T4	8,06 $\pm$ 0,49 <sup>Aa</sup>	11,92 $\pm$ 0,95 <sup>Ab</sup>	14,86 $\pm$ 0,44 <sup>Ac</sup>	14,02 $\pm$ 0,53 <sup>Ab</sup>

RE= recém-emergidas; T1= beebread/candy; T2= farinha de soja/levedura de cana/açúcar; T3= xarope (açúcar/água); T4= pólen congelado/açúcar; T5= farelo de soja/levedura de cana/açúcar. A análise estatística foi realizada pelo Student-Neuman-Keuls Method. As letras maiúsculas (A, B e C) comparam as médias das dietas (T1, T2, T3, T4, T5) dentro de cada dia (0, 6, 10 ou 14 dias). As letras minúsculas (a, b, c e d) comparam as médias de cada dieta ao longo dos dias (0 a 14). Nível de significância  $p < 0,05$ .



**Figura 2:** Concentração de proteína total na hemolinfa de operárias de *Apis mellifera* africanizadas confinadas em grupos de 120 abelhas em gaiolas, durante as duas primeiras semanas de vida adulta, com diferentes dietas. Dosagem por ensaio espectrofotométrico, usando soro-albumina bovina como padrão.

## DISCUSSÃO

As colônias de abelhas *Apis mellifera* precisam de dietas protéicas para produzirem cria. A falta de proteína tende a diminuir a área de cria (Herbert e Shimanuki, 1979), assim o método mais utilizado para determinar a eficiência das dietas protéicas se baseia na determinação da área de cria (Herbert, 1970).

As colônias que receberam a dieta de pólen coletado dos favos (beebread), dieta natural das abelhas e rica em proteínas, apresentaram um aumento na área de cria. Apesar da dieta ter sido fornecida em grandes quantidades, o aumento da área de cria destas colônias não foi suficiente para que atingisse os níveis normais das colônias na natureza. Um fator que nos chamou atenção, foi que oferecemos grande quantidade de alimento às abelhas, e nem todo alimento do recipiente foi consumido, o que mostra que pouco alimento foi estocado nos favos.

Nas colônias que receberam a dieta de farinha de soja, dieta rica em proteína, também não estocaram alimentos nos favos. A área de cria destas colônias, também aumentou nos primeiros dias, mostrando que o alimento protéico promove aumento da postura (Herbert e Shimanuki, 1979). A dieta de farinha de soja, levedura de cana e açúcar mostrou ser um bom substituto de pólen, uma vez que promoveu a produção de cria nos mesmos níveis das colônias que receberam a dieta de pólen (beebread).

Herbert et al. (1977), encontraram que quando as colônias são alimentadas com dietas com baixas concentrações de proteína (5 ou 10%), as rainhas continuavam pondo ovos e mantinham as crias por um pequeno período de tempo. Nossos resultados concordam com os de Herbert et al. (1977), nas colônias alimentadas com xarope, observamos uma pequena quantidade de cria nos primeiros quinze dias, a partir do segundo mapeamento, realizado 30 dias após o início do experimento, não observamos mais cria na colônia, nem mesmo ovos.

O método de testar dietas utilizando a determinação da área de cria de colônias confinadas (Herbert, 1970), é muito eficiente para analisar as dietas, entretanto, este método demanda muito tempo, uma vez que as dietas demoram entre 10 e 16 semanas para serem avaliadas. Outra dificuldade do método, é

manter as colônias confinadas por tanto tempo, uma vez que há uma grande diminuição na população da colônia, e a cria produzida não é suficiente para repor as abelhas mortas.

A síntese de proteína pelas abelhas é influenciada por muitos fatores, um deles é a alimentação, uma vez que desta provém o material e energia necessários à síntese protéica. Nossos dados mostraram que os títulos mais altos de proteína foram encontrados nos grupos que consumiram o pólen estocado nos favos (T1), o alimento natural das abelhas, bem como nos grupos alimentados com pólen congelado (T4); farinha de soja/levedura de cana/açúcar (T2); farelo de soja/levedura de cana/açúcar (T5). Nossos resultados estão de acordo com os resultados de Bitondi et al. (1994) e Cremonez et al. (1998), que observaram que, nas abelhas alimentadas com dietas com baixo teor protéico, é baixa a concentração de proteína na hemolinfa. As abelhas alimentadas com a dieta de xarope (T2) apresentaram concentrações protéicas baixas aos 2, 6, 10 e 14 dias de vida, mais baixas que nas abelhas desses grupos quando recém-emergidas. Haydak (1935) observou que em abelhas nutrízes, alimentadas apenas com carboidratos, decresce a quantidade de proteína.

Nas abelhas do grupo alimentado com a dieta de farinha de soja, levedura de cana e açúcar (T2) e com dieta de farelo de soja, levedura de cana, açúcar e água (T5), que apresentam um teor protéico similar ao do pólen, a concentração de proteína na hemolinfa atingiu os mesmos níveis das abelhas alimentadas com pólen. Os grupos alimentados com pólen estocado nos favos mais candy (T1) e pólen congelado mais candy (T4) apresentaram concentrações altas de proteína na hemolinfa, sendo esta maior no grupo alimentado com pólen estocado nos favos. Por outro lado, Herbert Jr. e Shimanuki (1978), não encontraram diferenças no valor nutritivo do pólen congelado comparado ao pólen estocado no favos.

A análise da quantidade de proteína na hemolinfa de operárias confinadas em laboratório, mostrou ser um método eficaz para determinar a eficiência de dietas protéicas, além de ser um método rápido.

Nossos resultados mostraram que as dietas artificias de farinha de soja/levedura de cana/açúcar e a de farelo de soja/levedura de cana/açúcar

promove a síntese de proteína em níveis normais. A dieta de xarope, não permitiu a síntese de proteína total em níveis normais. O teste laboratorial de quantificação da proteína total na hemolinfa de abelhas confinadas mostrou ser tão eficiente para avaliar as dietas protéicas, quanto o método tradicional que avalia as dietas pela determinação da área de cria em colônias confinadas, mas com vantagens em termos de tempo e custo.

## Capítulo III

**“Resposta imune de abelhas operárias *Apis mellifera* alimentadas com diferentes dietas.”**

## RESUMO

Ao longo de sua evolução, os insetos desenvolveram estratégias para defesa contra infecções que certamente contribuíram para a ocupação de nichos diversificados e variedade de espécies existentes. Quando a barreira estrutural de proteção dos insetos, representada pelo tegumento, é vencida por microorganismos ou partículas estranhas, diferentes respostas são acionadas. Esta reação que ocorre na hemolinfa, denominada “resposta imune” decorre dos sistemas de defesa celular e humoral. Os hemócitos circulantes mediam o reconhecimento e a remoção de bactérias, fungos e parasitas que penetram a hemolinfa. Fagocitose, formação de nódulos e encapsulação são os processos utilizados pelos hemócitos em resposta à infecção. A defesa humoral consiste na síntese de imuno-proteínas, como a lisozima e a fenoloxidase ou de polipeptídeos como as apidecinas, entre outros, que são secretados na hemolinfa (Dunn, 1986; Boman e Hultmark, 1987). A lisozima - uma enzima bacteriolítica - hidrolisa ligações mucopolissacarídicas da parede bacteriana. A fenoloxidase tem função na síntese e deposição de melanina que acompanham a resposta celular ao ferimento e invasão por parasitas. As apidecinas são polipeptídeos com ação bacteriostática (Glinski e Jarosz, 1995).

Este trabalho teve por objetivo estudar a resposta imune de abelhas operárias *Apis mellifera* alimentadas com dietas ricas ou desprovidas de proteína e subseqüentemente infectadas com *Escherichia coli*. A resposta à infecção foi caracterizada através da quantificação de lisozima e fenoloxidase.

Grupos de aproximadamente 120 abelhas recém-emergidas foram confinadas em pequenas caixas mantidas em estufa a 32°C e 80% de U.R., durante 4 ou 7 dias, durante os quais foram alimentadas com as seguintes dietas: (1) 40% de pólen coletado de favos (*beebread*) misturado a 60% de *candy* (açúcar e mel); (2) 30% de farinha de soja, 10% de levedura de cana e 60% de açúcar; (3) 50% de açúcar em água (xarope). Na maioria dos experimentos, as abelhas foram alimentadas exclusivamente com um único tipo de dieta. Alternativamente, grupos de abelhas receberam xarope até o 4º. dia e em seguida, *beebread/candy*, até o 7º. dia. No 4º. ou 7º. dias, um grupo de 50 abelhas operárias alimentadas com as diferentes dietas foram injetadas com 1µl de meio

de cultura contendo *E. coli*. Controles foram injetados com meio de cultura estéril. Após a infecção, os grupos experimentais foram acompanhados até que 50% das abelhas morressem. A hemolinfa foi coletada das abelhas restantes para dosagem de fenoloxidase e lisozima e para a determinação do título de proteína total.

Os resultados mostram que as abelhas alimentadas com as dietas ricas em proteína (*beebread/candy* ou farinha de soja/levedura de cana/açúcar), apresentaram títulos significativamente maiores de fenoloxidase e lisozima em resposta à infecção que as alimentadas com xarope. Grupos alimentados com xarope, submetidos ou não a infecção no 4º. dia, não diferiram quanto ao título de fenoloxidase. Quando mantidos neste regime alimentar por mais 3 dias e submetidos à infecção no 7º. dia, mostraram títulos de fenoloxidase e lisozima significativamente inferiores que os controles. Nos grupos alimentados com xarope até o quarto dia e depois até o sétimo com *beebread/candy*, os títulos de fenoloxidase e lisozima não apresentaram diferença significativa após a infecção. Os títulos de proteína total, lisozima e fenoloxidase na hemolinfa das abelhas alimentadas exclusivamente com xarope mostraram-se baixos em relação aos grupos que receberam dietas protéicas durante todo experimento. Durante o período considerado, a mudança da dieta exclusiva de açúcar para a dieta contendo pólen (*beebread/candy*) não foi suficiente para caracterizar a resposta imune.

Os resultados permitem concluir que a qualidade da dieta é essencial para a ocorrência da resposta imune. Além disso, a resposta não depende da origem das proteínas da dieta: ocorre após alimentação com pólen (*beebread/candy*), fonte natural de proteínas para as abelhas, assim como após consumo de dieta artificial (farinha de soja/levedura de cana/açúcar), também rica em proteínas.

**Palavras-chave:** fenoloxidase, lisozima, imunologia, proteína, *Apis mellifera*.



## INTRODUÇÃO

A eficiência em remover microorganismos e parasitas da circulação contribuiu para o enorme sucesso evolutivo dos insetos. As reações de defesa celular, nestes animais, utilizam os hemócitos, células da hemolinfa eficientes em remover partículas estranhas através de fagocitose, formação de nódulos ou encapsulação (Gliński e Jarosz, 1995). Além disso, existem os mecanismos humorais de defesa que incluem a síntese ou ativação de imuno-proteínas, como a lisozima e a fenoloxidase, além de imuno-peptídeos tais como as cecropinas e apidecinas.

A lisozima, enzima que hidrolisa a parede celular de bactérias, foi o primeiro fator antibacteriano identificado na hemolinfa dos insetos (Mohrig e Messner, 1968). Esta enzima, produzida no corpo gorduroso, existe em baixos níveis na hemolinfa (Anderson e Cook, 1979; Dunn e Drake, 1983; Kanost, 1983) mas aumenta consideravelmente após infecção por bactérias (Anderson e Cook, 1979; Chadwick, 1970; Kanost, 1983; Powning e Davidson, 1973).

A fenoloxidase é outra enzima envolvida no sistema de defesa dos insetos. Tem função na síntese de melanina que forma um revestimento ao redor de parasitas - micróbios ou macróbios - complementando a resposta celular de encapsulação e formação de nódulos (Durrant et al., 1993). Uma cascata de reações que tem início com a ativação do zimógeno inativo – a profenoloxidase – se segue à infecção. O produto final é a melanina, presente na cicatrização do ferimento ou encapsulando partículas estranhas.

A fenoloxidase, assim como a lisozima e os imuno-peptídeos não são os únicos mediadores da defesa dos artrópodos. Outros fatores são liberados dos hemócitos em resposta à infecção, como por exemplo, as lecetinas que mediam a ligação entre estas células e partículas estranhas, têm função na fagocitose e ativam o sistema de coagulação. A distribuição das lecetinas e do sistema da profenoloxidase entre os compartimentos celular e humoral dos insetos é matéria de debate, mas em *Leucophaea maderae*, *Galleria mellonella* e *Blaberus discoidalis*, eles são associados aos hemócitos. Nas células da hemolinfa podem ocorrer interações bioquímicas entre estes dois sistemas de reconhecimento. Por exemplo, a ativação da profenoloxidase por lecetinas foi demonstrada em

*Blaberus discoidalis* mostrando a ligação entre estas moléculas e o sistema da profenoloxidase dos artrópodos. Entretanto, ainda pouco se sabe sobre a interação entre tais eventos da defesa imune dos insetos (Chen et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi estudar a resposta de abelhas operárias *Apis mellifera* alimentadas com diferentes dietas à infecção bacteriana, utilizando como parâmetros a quantificação de lisozima e de fenoloxidase.

## MATERIAIS E MÉTODOS

***Apis mellifera: confinamento, dieta e infecção com bactérias*** - Foram utilizadas operárias africanizadas do apiário do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Quadros com operárias prestes a emergir foram retirados de colônias contendo uma rainha, aproximadamente 20.000 operárias, crias em todos os estágios de desenvolvimento, além de estoques de pólen e mel, e foram colocados em estufa a 32°C e 80% de umidade relativa. As operárias que emergiram num período de 16 horas foram colocadas em pequenas caixas quadradas de madeira (8 x 11 x 13cm), com 3 lados de vidro e um lado de madeira, e piso de tela. Em cada uma das caixas, num total de 30, foram confinadas 120 operárias recém-emergidas. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum*.

As abelhas confinadas foram alimentadas com diferentes dietas. Seis grupos receberam dieta composta por 40% de *beebread* (pólen processado pelas abelhas, coletado diretamente dos favos de colônias do apiário) e 60% de *candy* (mistura de açúcar e mel); outros 6 grupos receberam dieta composta de 30% de farinha de soja, 10% de levedura de cana (obtida durante o processo de produção do álcool) e 60% de açúcar; 8 grupos foram alimentados somente com uma solução de 50% de açúcar em água (dieta sem proteína). Todos estes grupos foram mantidos em estufa por quatro dias quando se procedeu à infecção de 50 abelhas de metade dos grupos alimentados com cada dieta. O mesmo número de abelhas de cada um dos grupos restantes foi utilizado como controle.

Outros grupos experimentais permaneceram confinados por 7 dias. Seis deles receberam a dieta de 50% de açúcar em água todos os dias, enquanto outros seis grupos receberam, nos quatro primeiros dias, esta mesma dieta e nos outros três dias, a mistura de 40% de *beebread* e 60% de *candy*. Do mesmo modo que para os grupos citados anteriormente, 50 abelhas de metade dos grupos alimentados com cada dieta foram infectadas com bactérias enquanto que o mesmo número de abelhas dos grupos restantes foi utilizado como controle.

**Bactérias:** Utilizou-se *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  mantidas em meio de cultura líquido contendo 10g de Triptona, 5g de Extrato de levedura, 0,58g de NaCl, 0,19g de KCl em 1000ml de água destilada, pH 7,4. O meio de cultura foi

autoclavado antes da adição de bactérias e acrescentou-se 15% de glicerol. Aliquotas foram colocadas em microtubos *ependorf*, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da injeção.

**Infecção:** As abelhas operárias foram anestesiadas com nitrogênio gasoso e injetadas com  $1\mu\text{l}$  do meio de cultura contendo bactérias, com densidade óptica (DO) igual a 400, determinada em espectrofotômetro Cecil 3000, em comprimento de onda de 550nm. A injeção foi feita superficialmente, entre o terceiro e o quarto tergitos dorsais, utilizando-se seringa Hamilton. As abelhas dos grupos controles foram injetadas com a mesma quantidade ( $1\mu\text{l}$ ) de meio de cultura estéril.

**Extração de hemolinfa:** Após a infecção, as operárias foram mantidas sob observação até que aproximadamente 50% das abelhas experimentais morressem (LD50). As abelhas restantes foram anestesiadas com nitrogênio gasoso para coleta da hemolinfa, extraída com o auxílio de microcapilares de vidro inseridos através de um pequeno corte na cutícula dorsal, ao nível do 3º tergitto. A hemolinfa, mantida em gelo, foi imediatamente utilizada para dosagem da atividade de lisozima, de fenoloxidase e para estimativa do título de proteína total.

**Ensaio para fenoloxidase:** A mistura de reação para dosagem de fenoloxidase foi preparada com  $286\mu\text{l}$  de solução saturada de L-dopa;  $250\mu\text{l}$  de solução de tripsina,  $461\mu\text{l}$  de tampão cacodilato de sódio  $0,01\text{M}$  pH7,0 e  $3\mu\text{l}$  de hemolinfa. Medidas de absorbância a 490nm foram realizadas em espectrofotômetro Cecil 3000, contra um “branco” preparado com  $286\mu\text{l}$  de solução saturada de L-dopa;  $250\mu\text{l}$  de solução de tripsina e  $464\mu\text{l}$  de tampão cacodilato de sódio.

**Ensaio para Lisozima:** Para dosagem da atividade de lisozima foi utilizado o método de Powning e Davidson (1973), modificado. A mistura de reação foi preparada com  $10\mu\text{l}$  de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* ( $0,5\text{mg ml}^{-1}$ ) em  $10\text{mM}$  de tampão fosfato de sódio, pH 6,0,  $990\mu\text{l}$  do mesmo tampão e  $3\mu\text{l}$  de hemolinfa. A diminuição da turbidez da mistura de reação,

causada pela atividade lisozímica foi medida a 450nm contra um “branco” contendo 10 $\mu$ l da suspensão de *Micrococcus* e 993 $\mu$ l de tampão fosfato de sódio.

**Dosagem de proteína Total:** A concentração de proteína total na hemolinfa foi determinada a 595nm (Bradford, 1976) usando albumina sérica bovina para construção da curva padrão. O reagente consiste de solução aquosa de 0,01% Coomassie Brilliant Blue G250, 4,7% de etanol e 8,5% de ácido ortofosfórico. Um mililitro deste reagente foi colocado em tubos de 10ml aos quais adicionou-se 1 $\mu$ l de hemolinfa. Após agitação, procedeu-se à leitura da absorbância, num período entre 5 minutos e 1 hora após adição da hemolinfa.

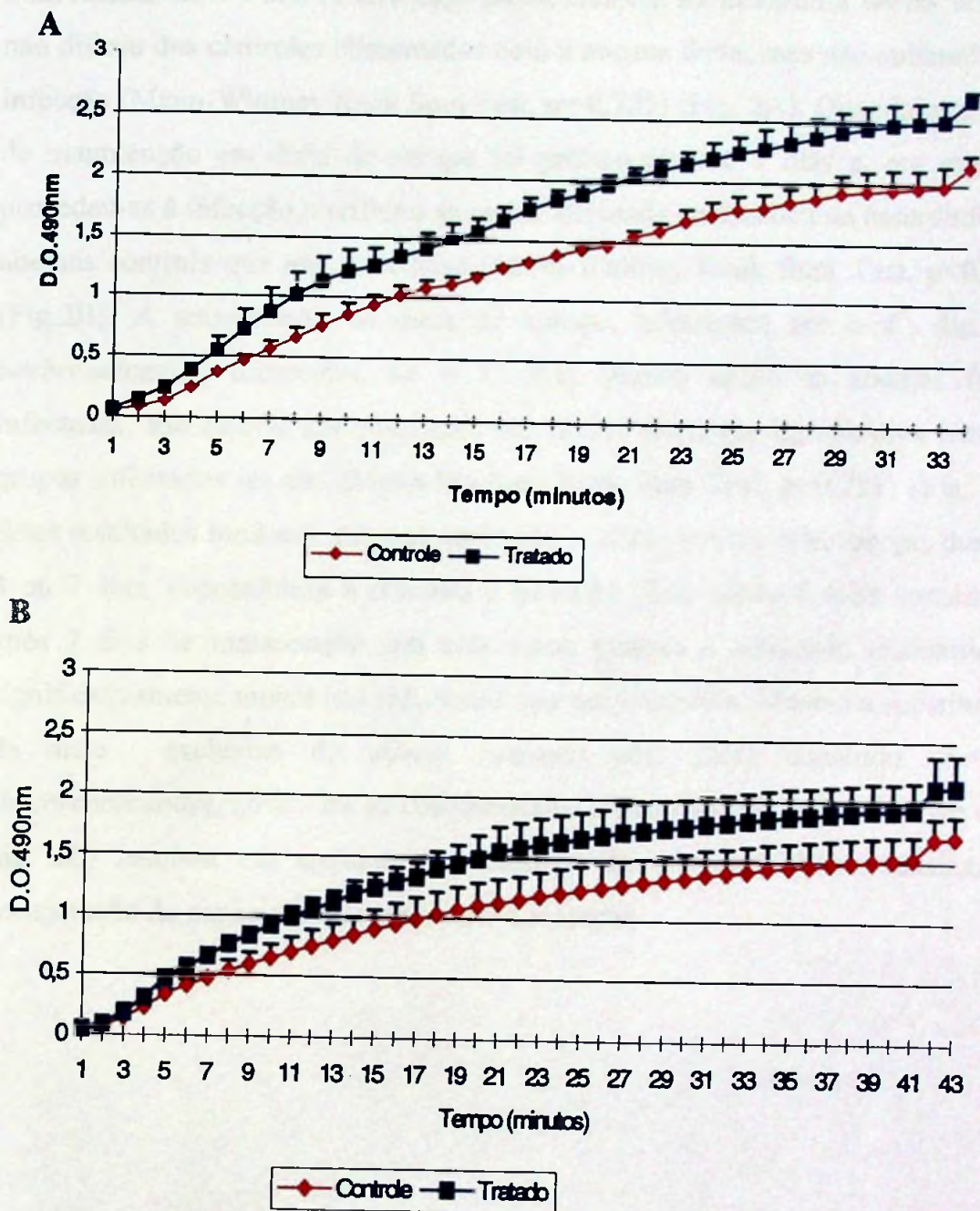
**Análise Estatística:** As medidas de atividade da fenoloxidase, lisozima e proteína total de cada grupo experimental (abelhas injetadas com a cultura de bactérias) foram comparadas com aquelas obtidas do grupo controle correspondente (abelhas injetadas somente com o meio de cultura) para cada um dos experimentos, para cada tipo de dieta. Utilizou-se o teste t indexado ou Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,05$  (Sigma Stat, 1995). Os títulos de proteína total nos diversos grupos experimentais e controles também foram comparados pelo teste Tukey.

## RESULTADOS

**Fenoloxidase:** Maior atividade fenoloxidásica foi detectada nos grupos de abelhas alimentadas com *beebread/candy* e submetidas à infecção bacteriana que nos controles, alimentados com a mesma dieta, mas não infectados. As três réplicas experimentais realizadas, cada uma utilizando *pool* de hemolinfa de aproximadamente 25 abelhas, resultaram em diferença estatisticamente significativa na atividade desta enzima entre as abelhas infectadas e controles (teste t,  $p=0,026$ ). A Figura 1(A) mostra o aumento desta atividade enzimática na hemolinfa extraída de abelhas infectadas e controles, ao longo de aproximadamente 40 minutos de reação.

De modo semelhante, os grupos que receberam dieta de farinha de soja/levedura de cana/açúcar e foram submetidos a infecção também mostraram maior atividade da enzima fenoloxidase que os controles, alimentados com a mesma dieta, mas não infectados (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p<0,001$ ) (Fig. 1B).

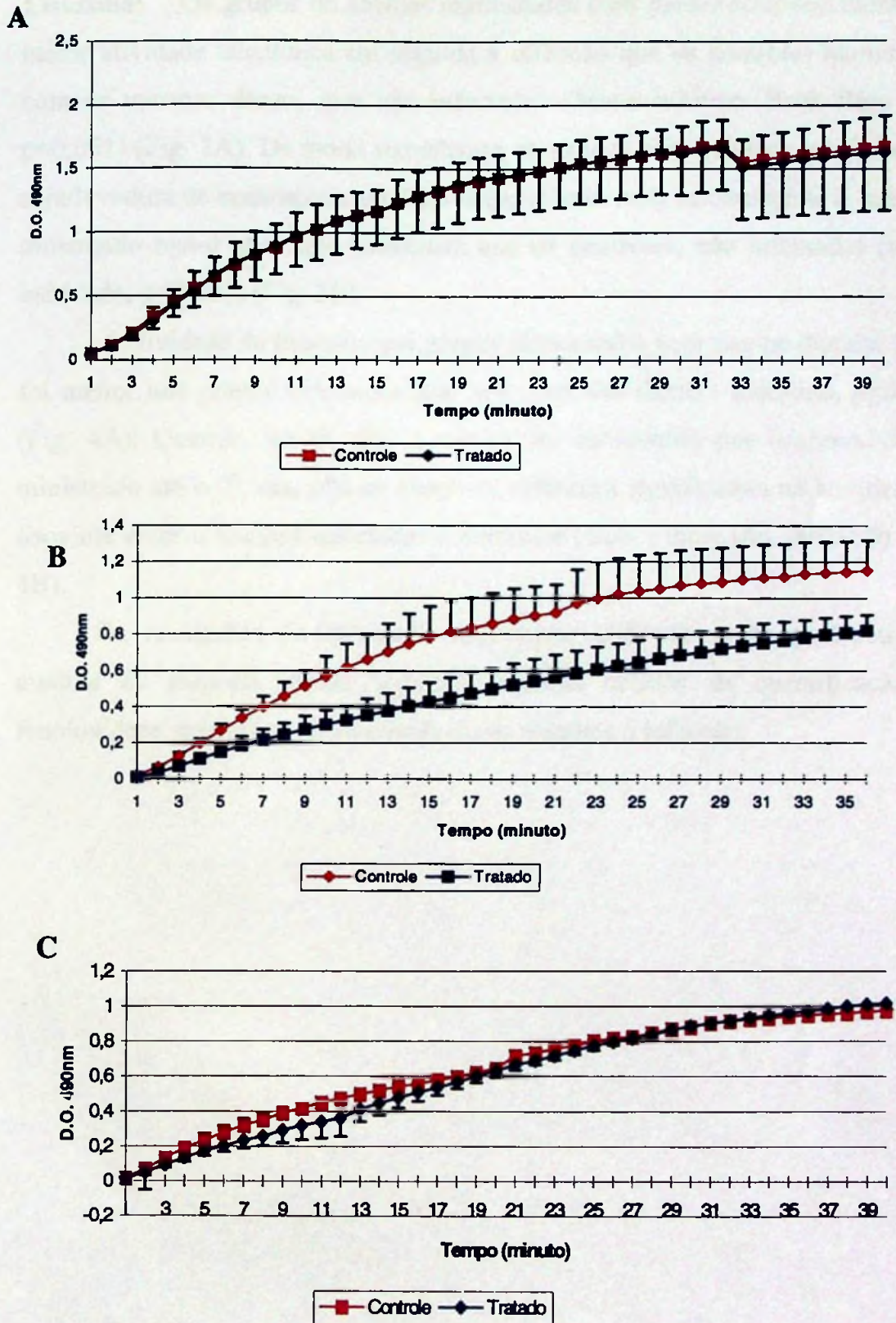
Ambas dietas (*beebread/candy* e farinha de soja/levedura de cana/açúcar) proporcionaram resposta imune bastante uniforme: cada uma das repetições experimentais resultou em maior atividade fenoloxidásica após infecção bacteriana, evidenciando uma das estratégias de defesa das abelhas às bactérias introduzidas na hemolinfa.



**Figura 1:** Atividade de fenoloxidase em abelhas infectadas com *E.coli* DH5 $\alpha$  e controles. Abelhas operárias (A) alimentadas com *beebread/candy*, ou com (B) farinha de soja/levedura de cana/açúcar, até o quarto dia de vida adulta.

O mesmo não ocorreu com os grupos de abelhas alimentadas com xarope e infectadas no 4º. dia. A atividade fenoloxidásica na hemolinfa destas abelhas não diferiu dos controles alimentados com a mesma dieta, mas não submetidos à infecção (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p=0,725$ ) (Fig. 2A). Quando o período de manutenção em dieta de xarope foi prolongado até 7 dias e, em seguida, procedeu-se à infecção, verificou-se maior atividade enzimática na hemolinfa das abelhas controle que nas infectadas (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p<0,001$ ) (Fig. 2B). A substituição da dieta de xarope, ministrada até o 4º. dia, por *beebread/candy*, fornecidos até o 7º. dia, quando então as abelhas foram infectadas, não alterou este resultado: não houve diferença significativa entre os grupos infectados ou não (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p=0,751$ ) (Fig. 2C). Estes resultados mostram que a alimentação exclusivamente com xarope, durante 4 ou 7 dias, impossibilita a resposta à infecção. Este efeito é mais consistente após 7 dias de manutenção sob esta dieta, quando a atividade enzimática é significativamente menor nos infectados que nos controles. Mesmo a substituição da dieta exclusiva de açúcar (xarope) pela dieta contendo proteína (*beebread/candy*), no 4º. dia de confinamento, e manutenção nesta dieta até o 7º. dia, não resultou em aumento significativo da atividade fenoloxidásica, ou recuperação da capacidade de responder à infecção.



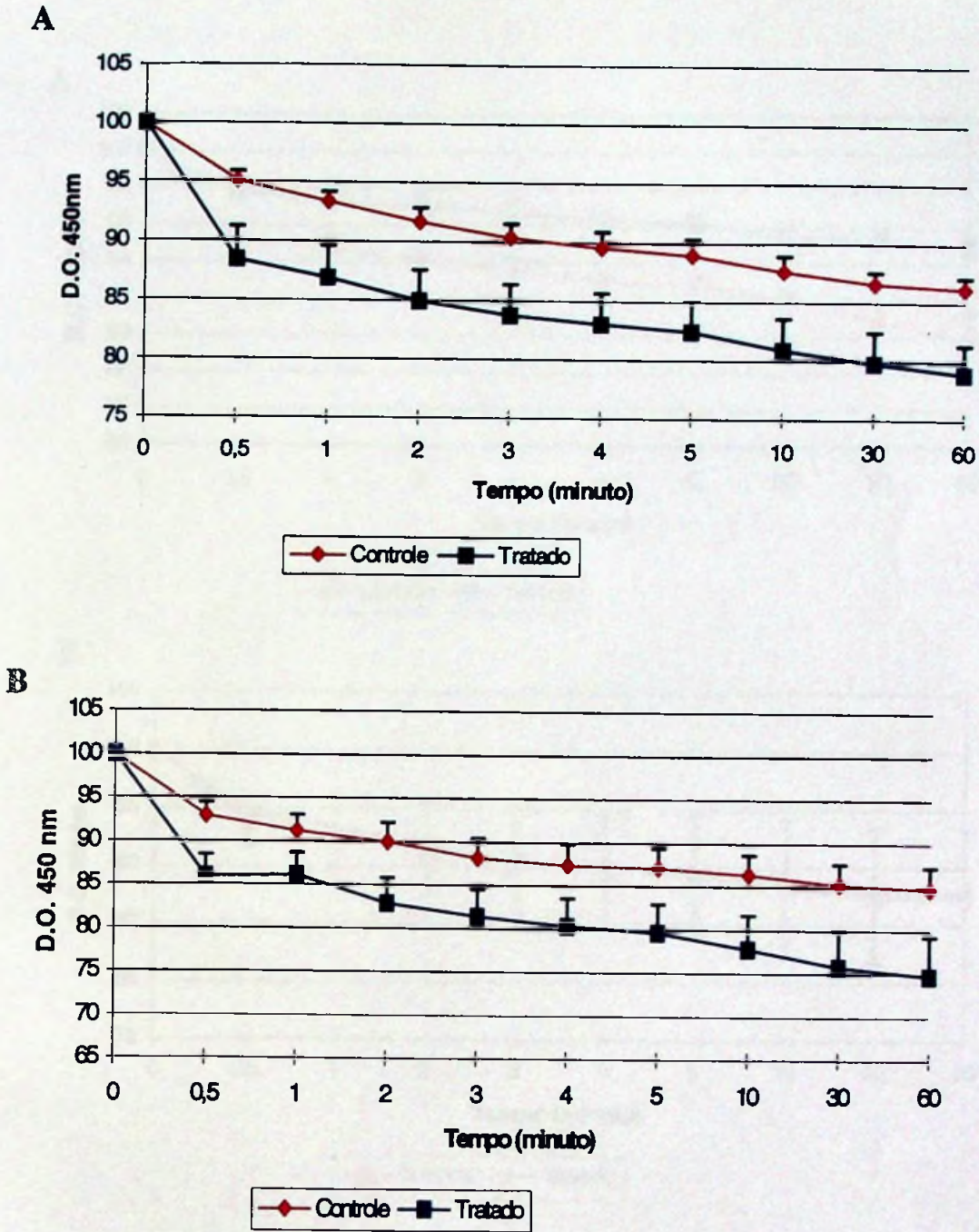


**Figura 2:** Atividade de fenoloxidase em abelhas operárias infectadas com *E. coli* DH5 $\alpha$  e controles. Abelhas alimentadas com xarope até o (A) quarto dia ou até o (B) sétimo dia de vida adulta. (C) Abelhas alimentadas com xarope até o quarto dia e, subsequentemente, com *beebread/candy* até o sétimo dia de vida adulta.

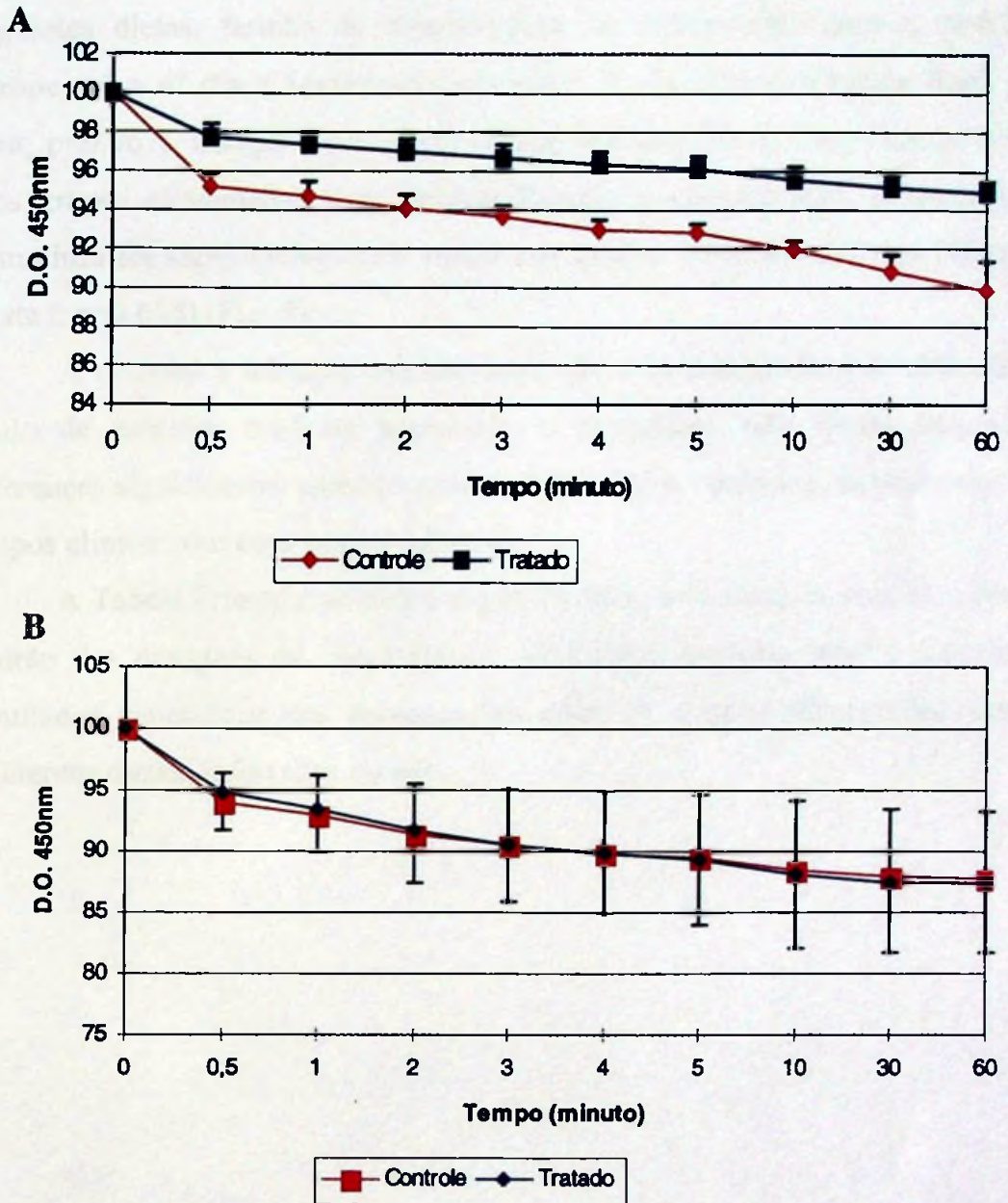
**Lisozima:** Os grupos de abelhas alimentadas com *beebread/candy* mostraram maior atividade lisozímica em seguida à infecção que os controles alimentados com as mesmas dietas, mas não infectados (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,001$ ) (Fig. 3A). De modo semelhante, os grupos alimentados com farinha de soja/levedura de cana/açúcar também responderam mais intensamente à infecção, mostrando maior atividade lisozímica que os controles, não infectados (teste t indexado,  $p < 0,001$ ) (Fig. 3B).

A atividade da lisozima nos grupos alimentados com xarope durante 7 dias foi menor nos grupos infectados que nos controles (teste t indexado,  $p < 0,001$ ) (Fig. 4A). Quando, no 4º. dia, o xarope foi substituído por *beebread/candy*, ministrado até o 7º. dia, não se observou diferença significativa na atividade da lisozima entre as abelhas infectadas e controles (teste t indexado,  $p = 0,950$ ) (Fig. 4B).

Os resultados da atividade lisozímica, utilizada como parâmetro de medida da resposta imune reforçam aqueles obtidos da quantificação da fenoloxidase, enzima também envolvida na resposta à infecção.



**Figura 3:** Atividade de lisozima em abelhas operárias infectadas com *E. coli* DH5 $\alpha$  e controles. Abelhas alimentadas com (A) *beebread/candy* e (B) farinha de soja/levedura de cana/açúcar, até o quarto dia de vida adulta.



**Figura 4:** Atividade de lisozima em abelhas operárias infectadas com *E. coli* DH5 $\alpha$  e controles. Abelhas alimentadas com xarope (A) até o sétimo dia de vida adulta ou (B) até o quarto dia e, subseqüentemente, com beebread/candy até o sétimo dia.

**Proteína total:** A concentração de proteína total na hemolinfa não diferiu significativamente entre os grupos controles e infectados, alimentados com as seguintes dietas: farinha de soja/levedura de cana/açúcar (teste t,  $p=0,263$ ); xarope até o 4º dia e *beebread/candy* até o 7º dia (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p=0,667$ ); xarope até o 4º dia (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p=0,174$ ). Nos grupos alimentados com *beebread/candy*, a concentração de proteína na hemolinfa foi significativamente maior nos grupos controles que nos infectados (teste t,  $p=0,035$ ) (Fig. 5).

A resposta à infecção normalmente não é caracterizada pela alteração do título de proteína total na hemolinfa e, realmente, não foram constatadas diferenças significantes entre os grupos infectados e controles, excetuando-se os grupos alimentados com *beebread/candy*.

A Tabela I resume os dados experimentais, indicando as médias e desvios padrão das dosagens de fenoxidase, lisozima e proteína total e também os resultados estatísticos das comparações entre os grupos alimentados com as diferentes dietas, infectados ou não.

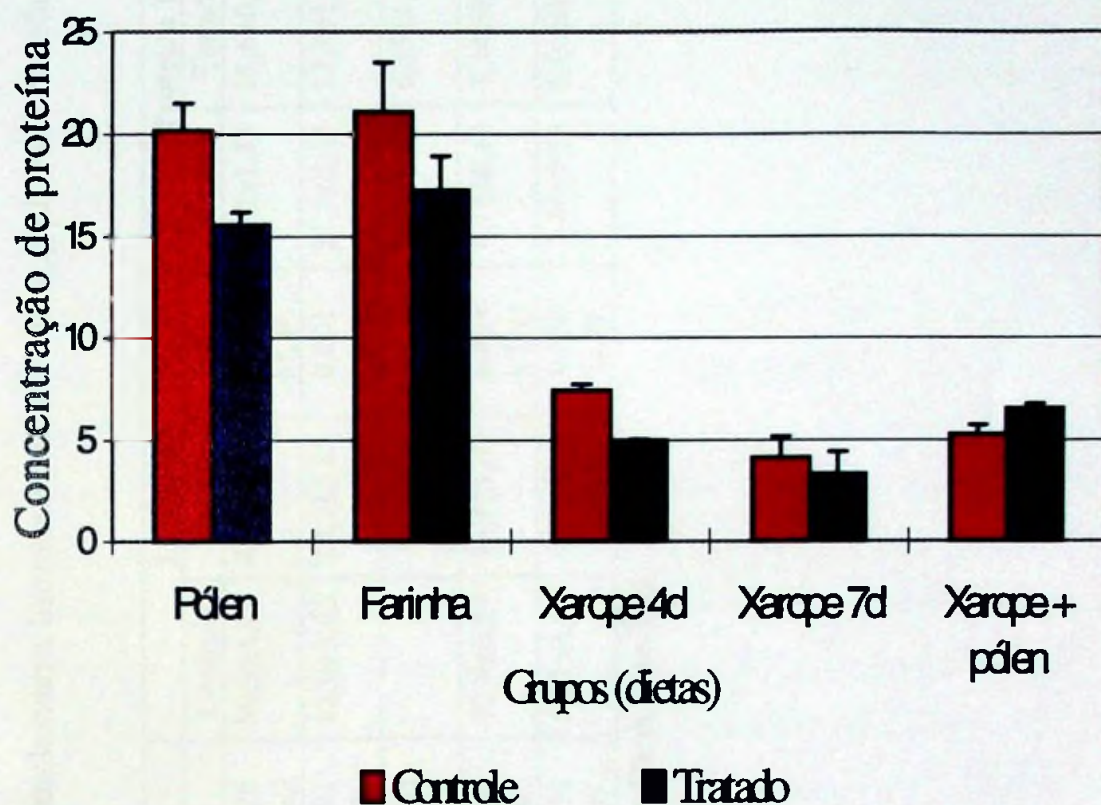


Figura 5: Concentração de proteína total na hemolinfa de abelhas operárias alimentadas com diferentes dietas (*bee bread/candy*; farinha de soja/levadura de cana/açúcar; xarope) e infectadas ou não (controles) com *E. coli* DH5 $\alpha$ .

**Tabela 1:** Médias dos resultados encontrados na dosagem de fenoloxidase, lisozima e proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) na hemolinfa de operárias de *Apis mellifera*, nos experimento, nas diferentes dietas.

Dietas	Fenoloxidase		Lisozima		Proteína Total		P
	Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado	
Beebread/candy (4 dias)	1,42±0,08	1,88±0,07	89,9±1,07	83,2±2,66	20,2±1,34	15,6±0,62	0,001 M.W.
Farinha de soja/levedura de cana/apúcar (4 dias)	1,16±0,20	1,59±0,22	88,0±3,65	80,7±5,85	21,1±2,42	17,3±1,68	0,001 t-Test
Xarope (4 dias)	1,41±0,27	1,38±0,15			5,29±1,03	6,55±1,09	t-Test 0,667 M.W.
Xarope (7 dias)	0,94±0,26	0,57±0,17	92,9±0,64	96,3±1,07	4,12±0,43	3,34±0,21	0,001 t-Test
Xarope (4 dias) + beebread (3 dias)	0,73±0,06	0,70±0,01	90,3±6,93	90,3±6,58	7,44±0,28	5,00±0,02	0,950 M.W.

Testes estatísticas utilizados: t – Test, e M.W. - Mann-Whitney Rank Sum Test.

## DISCUSSÃO

A resposta imunológica de abelhas operárias alimentadas com diferentes dietas foi estudada usando-se como parâmetro medidas dos títulos de fenoxidase, lisozima e proteína total da hemolinfa, em seguida à infecção bacteriana. As operárias alimentadas com dietas ricas em proteína (*beebread/candy* ou farinha de soja/levedura de cana/açúcar) consistentemente responderam à infecção mostrando títulos significativamente maiores de fenoxidase e lisozima que os controles. Os resultados permitem inferir que a infecção resultou em aumento da síntese de fenoxidase e lisozima, evidenciada pela atividade mais alta destas enzimas na fase solúvel da hemolinfa. Conclui-se que o corpo gorduroso – sítio de síntese de lisozima – e os hemócitos, células onde ocorre a síntese de fenoxidase foram acionados em resposta à infecção.

As abelhas operárias alimentadas com xarope não responderam à infecção. Nestas abelhas não houve o aumento de atividade fenoxidásica típico da reação à infecção. Como demonstrado anteriormente, o título de proteínas na hemolinfa de abelhas mantidas em dieta exclusiva de açúcar é baixo (Bitondi, et al., 1994 e Cremonez, et al., 1998). Proteínas da hemolinfa podem ser mobilizadas para a atividade funcional de outros tecidos dos insetos – por exemplo, o corpo gorduroso. A escassez de proteína na dieta, ou sua ausência, impede o acúmulo de proteínas na hemolinfa ou sua estocagem, tornando falho o processo de síntese de novas proteínas e a atividade fisiológica geral do organismo. A ausência de resposta imune nas abelhas alimentadas somente com xarope pode ser atribuída à deficiência dos metabólicos necessários à síntese de proteínas ou enzimas.

As abelhas alimentadas com xarope até o 4º. dia não responderam à infecção aumentando a atividade fenoxidásica, mas ainda assim mostraram nível desta atividade compatível com os controles. No entanto, a manutenção desta dieta por um período mais longo, até o 7º. dia, acentuou a diferença entre as abelhas controles e infectadas. Nestas, a atividade fenoxidásica resultou significativamente menor. Em conjunto, estes resultados permitem inferir que sob dieta exclusiva de açúcar, as abelhas mobilizam seus estoques de proteínas para a atividade funcional e sobrevivência. Se esta dieta é mantida por um período mais longo, as reservas se esgotam e as abelhas não respondem à



infecção. Ao contrário, a atividade fisiológica diminui progressivamente - e isto pôde ser evidenciado pela baixa atividade fenoloxidásica e lisozímica - e as abelhas morrem. O esgotamento das reservas pôde também ser conferido pelas dosagens dos títulos de proteína total na hemolinfa, que se mostraram baixos quando comparados ao das abelhas nutridas com as dietas ricas em proteínas.

A fonte natural de proteínas para as abelhas é o pólen (Biesmeyer et al, 1992) que fornece os constituintes e também material energético - lipídios - para a atividade sintética necessária à manutenção e do organismo. O pólen, essencial às abelhas adultas jovens, permite a síntese e o acúmulo de proteínas, principalmente vitelogenina. Nas rainhas, esta proteína é incorporada aos ovócitos em desenvolvimento onde constituirá o vitelo - nutriente para o embrião. As abelhas operárias, que normalmente não põem ovos, também sintetizam vitelogenina às custas do pólen consumido e título considerável desta proteína pode ser detectado na hemolinfa destas abelhas entre o 5º e o 15º dia de vida adulta (Engels, et al., 1990; Bitondi e Simões, 1996). Em operárias alimentadas desde a emergência com dietas pobres ou desprovidas de pólen, a síntese de novas proteínas é extremamente reduzida (Bitondi, et al., 1994) e os títulos de proteína total são menores quando comparados aos das abelhas recém emergidas (Cremonez, et al., 1998).

Portanto, a carência de pólen na dieta afeta a síntese de proteínas. Se a disponibilidade de pólen aumenta, as abelhas retomam a atividade sintética. Na natureza, a oferta de alimento protéico em seguida a um período de escassez causa a recuperação da vitalidade da colônia, que rapidamente converte o alimento em estoques de pólen e produção de crias, demonstrando a melhora no estado nutricional das abelhas. Esta situação pode ser comparável à da abelha individual alimentada exclusivamente com açúcar e à qual, mais tarde (após 4 dias), se oferece o nutriente rico em proteínas (beebread/*candy* ou farinha de soja/levedura de cana/açúcar). Entretanto, os resultados mostraram que, apesar da introdução da fonte de proteínas na dieta, após consumo exclusivo de açúcar, as abelhas não apresentaram resposta imune passível de ser detectada. Neste caso, os títulos de fenoloxidase e de lisozima não diferiram entre as abelhas infectadas

e as controles. É possível que um período maior de alimentação com dieta rica em proteínas seja necessário para que a resposta imune seja caracterizada.

As diferenças nos títulos de proteínas imunes entre as abelhas infectadas e controles não se refletiram em diferenças nos títulos de proteína total. Com exceção das abelhas alimentadas com *beebread/candy* que mostraram título de proteína total significativamente diferentes, todos os outros grupos de abelhas, alimentadas com as demais dietas, não diferiram quanto ao teor de proteína na hemolinfa. Como se esperava, a resposta imune não é evidenciada nas medidas do título de proteína total na hemolinfa. A maior quantidade de proteína total nos controles dos grupos alimentados com *beebread/candy*, que nos infectados ( $p < 0,035$ ) permanece por ser explicada, ainda que o valor de  $p$  situe-se próximo do limite máximo definido ( $p < 0,05$ ).

Os resultados mostram que a resposta imune não é atributo das abelhas alimentadas com pólen (ou *beebread/candy*), fonte natural de proteínas para as abelhas. A outra dieta protéica utilizada – farinha de soja/levedura de cana/açúcar – também, de maneira semelhante, permitiu a resposta imune. Portanto, parece que o teor de proteínas na dieta, mais que a origem das proteínas, é importante para que a resposta imune ocorra. Conclui-se que abelhas alimentadas com dietas ricas em proteína respondem à infecção de maneira uniforme enquanto que naquelas alimentadas com dietas sem proteína, a resposta imune não pôde ser caracterizada. Mesmo a mudança na alimentação após o quarto dia de vida adulta não foi suficiente para a evidenciação da resposta imune nas abelhas operárias.

## Capítulo IV

**“Abelhas *Apis mellifera* criadas em colônias órfãs tem maior longevidade e maior concentração de proteína na hemolinfa.”**

## RESUMO

A ausência da rainha em uma colônia provoca muitas alterações no comportamento e fisiologia das operárias da colônia. Possivelmente, estas alterações envolvem adaptações para superar o período que a população da colônia fica sem reposição, devido à falta de postura, até que uma nova rainha possa ser produzida, acasalada e maturada suficientemente para produzir ovos. Para avaliar se a rainha influi na longevidade das abelhas adultas e numa característica correlata, a concentração de proteínas na hemolinfa das abelhas recém nascidas, testamos estes parâmetros em abelhas criadas em colônias com rainha e, posteriormente, avaliamos abelhas das mesmas colônias, sem a rainha. Para a determinação de longevidade, as abelhas recém nascidas, criadas com ou sem a rainha, foram colocadas em colônias de observação com rainha. De cada um dos 6 núcleos (colônias pequenas com rainha), foram retiradas 20 abelhas operárias recém emergidas para dosagem de proteínas da hemolinfa e, 50 abelhas recém emergidas foram marcadas e transferidas para uma colônia de observação contendo uma rainha, cria em todos estágios de desenvolvimento e uma população de, aproximadamente, 1500 abelhas, para a determinação da longevidade. O mesmo procedimento foi, então, realizado com abelhas recém emergidas, dos mesmos núcleos, mantidos em condição de orfandade por, aproximadamente, 20 dias. A longevidade das operárias, cujo desenvolvimento larval ocorreu na ausência da rainha, (21,97 dias) foi maior (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,05$ ) que nas operárias que se desenvolveram na presença da rainha (17,53 dias). O título de proteína na hemolinfa também foi maior nas abelhas recém emergidas que se desenvolveram e foram alimentadas, quando larvas, na ausência de rainha ( $8,75\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) do que nas abelhas criadas na presença de uma rainha ( $7,00\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,05$ ). Assim, concluímos que a maior longevidade das abelhas criadas na orfandade deve envolver uma alimentação reforçada das larvas em colônias sem rainha. Na ausência da rainha, a colônia fica sem reposição de novas abelhas e, portanto, um aumento na longevidade poderia constituir estratégia para a manutenção da população, até que a nova rainha inicie a ovoposição.

## INTRODUÇÃO

Imediatamente após a perda da rainha por uma colônia, podemos observar várias mudanças no comportamento das operárias: aumento da agressividade; as operárias ficam andando pela colônia e o sinal mais evidente é a construção de realeiras para criar a nova rainha. Até que a nova rainha inicie a postura de ovos decorre-se, aproximadamente, 30 dias (Winston, 1987).

A longevidade média de operárias *Apis mellifera* africanizadas em clima tropical é de, aproximadamente, 30 dias (De Jong e De Jong 1983, e Terada et al. 1975); este é o tempo necessário para que uma nova rainha seja produzida pela colônia e inicie a postura de ovos (Winston, 1987). Sendo assim, a colônia sofre uma redução de população em torno de 50% e, corre o risco de acabar ou enfraquecer antes de se recuperar.

Outras mudanças que ocorrem nas operárias, durante o período em que a nova rainha está sendo criada, são: algumas operárias podem desenvolver seus ovários, muitas dessas operárias podem tornar-se poedeiras, produzindo machos (ovos haplóides) (Velthuis, 1985); operárias com ovários desenvolvidos recebem o comportamento de corte, que normalmente é associado com a rainha (Crewe and Velthuis, 1980); dominância social durante a transferência de alimento (trophallaxis) pode ser correlacionado com maior nível de desenvolvimento ovariano (Velthuis, 1985); e em operárias adultas, que se desenvolveram na ausência de rainha a partir da fase L3, observou-se aumento na síntese e secreção de vitelogenina (Figueiredo, 1999).

Maurizio (1950) encontrou que, em colônias em condições normais, as operárias jovens desenvolvem as glândulas hipofaringeanas e o corpo gorduroso em decorrência da alimentação com pólen. Entretanto, após o período em que realizavam a atividade de alimentar as crias, estas abelhas apresentavam glândulas hipofaringeanas reduzidas e baixas reservas de proteínas no corpo gorduroso. No outono, quando existe pouca cria na colônia, as abelhas não apresentam a diminuição das reservas de proteína nas glândulas hipofaringeanas e no corpo gorduroso e, também tem uma longevidade maior, para sobreviver no inverno. As abelhas criadas em colônias sem rainha, ou que tem uma pequena

interrupção na produção de cria, apresentam características semelhantes a estas abelhas preparadas para inverno, entretanto, entre as abelhas criadas em colônias órfãs, há uma grande quantidade de operárias com ovário desenvolvido (Butler, 1976).

O objetivo deste trabalho foi analisar se a ausência de uma rainha na colônia interfere na longevidade das operárias e na concentração das proteínas na hemolinfa de abelhas recém-emergidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas seis colônias pequenas, cada uma contendo aproximadamente 8000 abelhas, 3 quadros Langstroth com cria em todos os estágios de desenvolvimento, uma rainha, alimento (mel e pólen no favo) e um alimentador interno, onde foi fornecido xarope, continuamente, às abelhas. Os experimentos foram realizados em 2 grupos, no primeiro foram analisadas 3 colônias nos meses de maio e junho (um período de escassez de alimento no campo), o segundo grupo, com as outras 3 colônias, foi analisado nos meses de setembro e outubro.

Quadros contendo crias de operárias próximas da emergência foram retirados destas colônias, colocados em gaiolas de tela, levados ao laboratório e colocados em estufa a 34°C e 80% UR por 16 horas. Desta forma, as abelhas que emergiam ficavam presas e eram utilizadas para se determinar a concentração de proteína na hemolinfa e, a longevidade de abelhas criadas na fase de larva na presença de rainhas.

Após este procedimento, o quadro foi, imediatamente, devolvido a sua respectiva colônia. Os quadros de cada colônia que continha ovos e larvas de, aproximadamente, um dia, eram mapeados e então, a rainha era retirada da colônia. Quando as larvas e ovos mapeados estivessem próximos da emergência, aproximadamente 17 dias após a retirada da rainha, os quadros eram levados ao laboratório para as abelhas que emergissem fossem utilizadas para determinação da concentração protéica e da longevidade. Desta forma, a longevidade e a concentração de proteína total na hemolinfa das abelhas, criadas na presença de rainha na fase de larva, eram comparadas com as mesmas variantes das abelhas que foram, na fase de larva, criadas na ausência de rainha.

**Determinação da Longevidade** Uma amostra de 50 abelhas de cada colônia recebiam, logo após a emergência, uma identificação no tórax, com etiquetas plásticas coloridas e numeradas (Opalithplättchen) as quais foram fixadas com auxílio de uma cola especial e eram, então, introduzidas em colônias de observação.

As colônias de observação eram constituídas de uma caixa de madeira de 51 cm de comprimento por 30 cm de altura e 6 cm de largura, com vidro nas duas laterais maiores, ligada com o meio externo através de um tubo plástico de, aproximadamente, 3 cm de diâmetro através de um orifício na parede da sala. As colônias de observação utilizadas continham um único quadro padrão tipo Langstroth, com rainha, cria em todos os estágios de desenvolvimento, alimento, com uma população média de 1500 abelhas.

O censo das abelhas foi feito diariamente até uma semana após o desaparecimento da última abelha marcada.

**Coleta de hemolinfa.** A hemolinfa de 20 operárias recém-emergidas (0-16 horas após a emergência) de cada colônia, foi coletada por meio de uma pequena incisão no nível do terceiro tergito dorsal, usando um microcapilar previamente lavado em solução 0,1% de feniltiouréia em água. A hemolinfa de grupos de duas abelhas era estocado em um eppendorf, formando-se assim 10 “pools” de hemolinfa de cada colônia para cada uma das condições: colônias com rainha e colônias órfãs, e estas foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação da concentração protéica.

**Determinação da Proteína Total.** A concentração de proteína na hemolinfa foi determinada espectrofotometricamente a 595nm (Bradford, 1976), utilizando soro-albumina bovina para determinação da curva padrão. O reagente para proteína era composto de: 0,01% de Coomassie Brilliant Blue G-250, 47% de etanol e 8,5% de ácido ortofosfórico dissolvido em água.

Colocou-se 1mL deste reagente foi em um tubo de 10mL e 1 $\mu$ L de hemolinfa foi adicionado e, então, agitado. Assim, esta solução era colocada em um cubeta de acrílico para dosagem espectrofotométrica; a leitura era feita após 5 minutos da mistura ser feita, porém o tempo de espera nunca foi superior a 1 hora.



**Análise Estatística.** Para compararmos a concentração de proteína total na hemolinfa, bem como a longevidade entre as abelhas criadas, desde a fase de larva, na presença ou ausência da rainha, foi utilizado o t -Test. (Sigma Stat 1995). Quando o teste de normalidade falhou, foi utilizado o Mann-Whitney Rank Sum Test (Sigma Stat 1995).

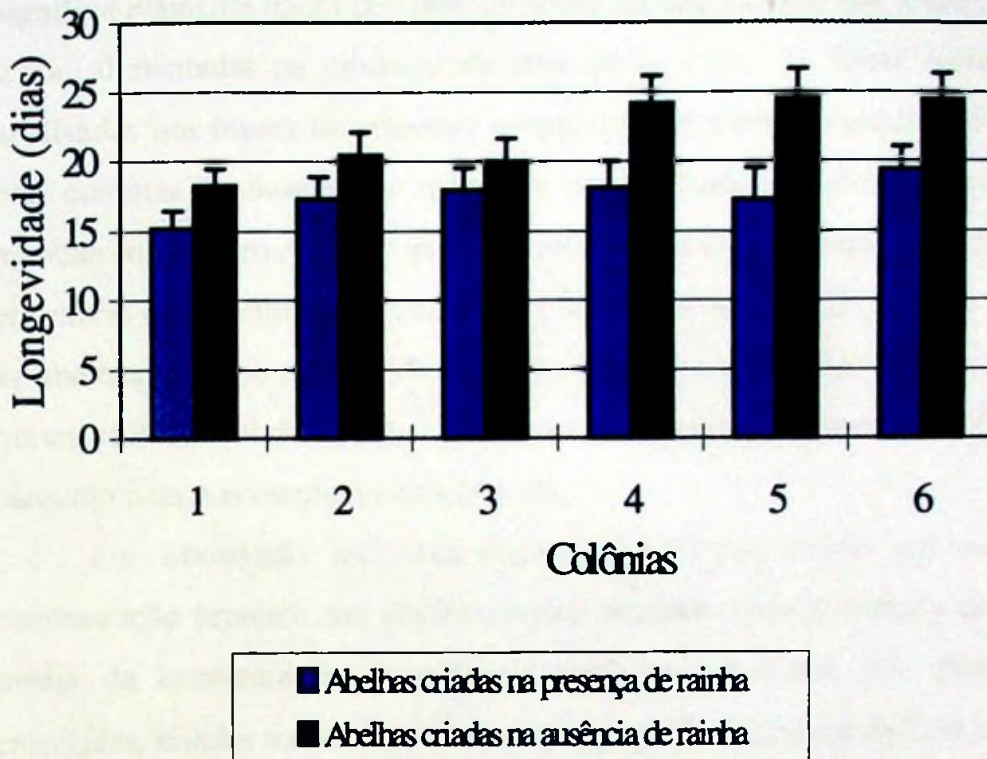
## RESULTADOS

**Longevidade das operárias** A longevidade das abelhas criadas, na fase de larva, na ausência da rainha foi, significativamente, maior ( $p < 0,05$ ) nas três colônias analisadas nos meses de setembro e outubro (colônias 4-6, Tab. 1), tendo um aumento médio de 33,7%. Nas outras três colônias que foram analisadas durante os meses de maio e junho, também observamos aumento na longevidade das abelhas criadas, na fase de larva, na ausência de rainha, todavia este aumento não foi significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparado às abelhas criadas em colônias com rainha (Tab. 1). O aumento médio da longevidade nas colônias órfãs durante inverno (colônias 1-3) foi de 17%.

Assim sendo, observamos que, em todas as colônias analisadas, a longevidade das abelhas que foram, na fase de larva, alimentadas na ausência de rainha, e na fase adulta viveram em colônias de observação com rainha, foi maior (média =  $21,97 \pm 1,11$  dias) que a longevidade das abelhas que foram, na fase de larva, alimentadas na presença da rainha ( $17,53 \pm 0,57$  dias), (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,001$ ). O aumento médio na longevidade foi de 25,3% (Fig. 2).

**Tabela 1:** Longevidade (média  $\pm$  erro padrão) de operárias *Apis mellifera* africanizadas criadas na fase de larva na presença ou ausência de rainha, e mantidas na fase adulta em colônias com rainha (n= 50 abelhas/colônia/tratamento).

Colônias	Abelhas criadas com rainha	Abelhas criadas em caixas órfãs	Estatística (t - Test)
1	$15,16 \pm 1,3$	$18,28 \pm 1,1$	$p = 0,072$
2	$17,36 \pm 1,5$	$20,48 \pm 1,7$	$p = 0,175$
3	$17,92 \pm 1,6$	$20,02 \pm 1,7$	$p = 0,379$
4	$18,10 \pm 1,9$	$24,14 \pm 2,0$	$p = 0,025$
5	$17,24 \pm 2,3$	$24,52 \pm 2,1$	$p < 0,001$
6	$19,40 \pm 1,6$	$24,42 \pm 1,9$	$p = 0,025$



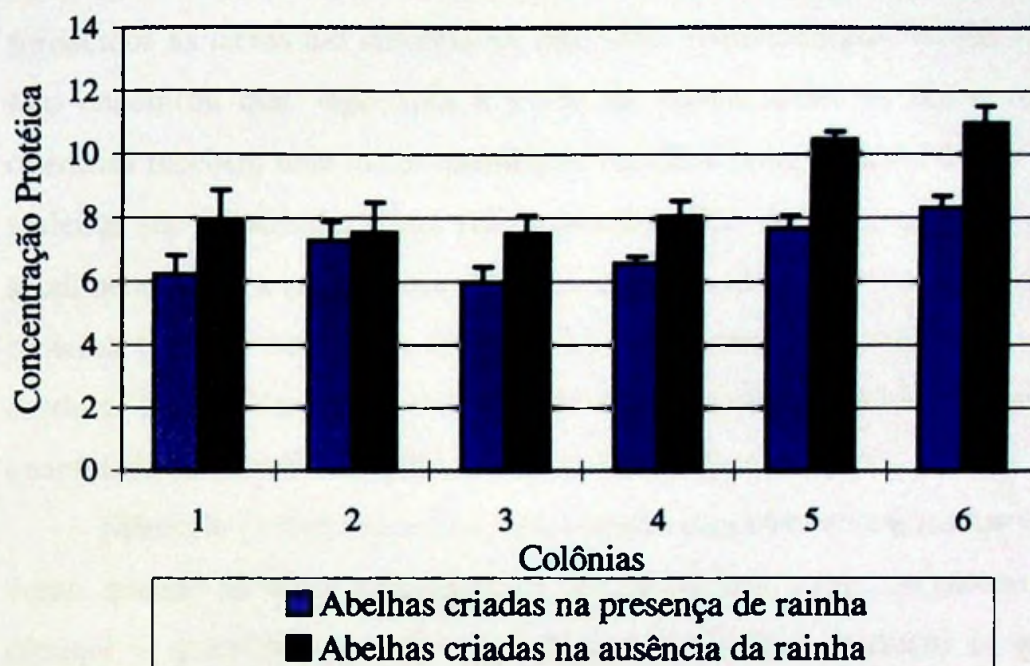
**Figura 1:** Longevidade média (+/- erro padrão) de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, criadas, na fase de larva, na presença ou ausência de rainha e mantidas, na fase adulta, em uma colônia de observação com rainha. A longevidade foi significativamente maior nas abelhas criadas sem rainha (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,001$ ).

**Concentração de Proteína Total na Hemolinfa.** Em três, das colônias analisadas, a concentração de proteína total em operárias recém-emergidas, as quais foram na fase de larva alimentadas na ausência de rainha, foi significativamente maior (t - Test,  $p < 0,05$ ) que nas abelhas que foram, na fase de larva, alimentadas na presença de uma rainha (Tab. 2). Estas colônias foram analisadas nos meses de setembro e outubro, e o aumento médio foi de 30,3%. Nas colônias analisadas nos meses de maio e junho, também observamos um aumento na concentração de proteína total nas abelhas criadas, na fase de larva, em caixas órfãs, entretanto, este não foi significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparado às abelhas criadas, na fase de larva, na presença de rainha. O aumento médio nestas colônias foi de 19,3%. O aumento de proteína na hemolinfa foi bastante parecido com o aumento na longevidade.

Foi observado que, em todas as colônias houve um aumento da concentração protéica nas abelhas recém-nascidas após a retirada da rainha. A média da concentração de proteína total na hemolinfa das abelhas recém emergidas, criadas na fase de larva, na presença de rainha foi de  $7,00 \pm 0,31 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  e a média das abelhas criadas na ausência de rainha foi de  $8,75 \pm 0,63 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; o aumento médio foi de 24,8% (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,001$ ) (Fig. 2).

**Tabela 2:** Concentração de proteína total na hemolinfa de abelhas operárias recém-emergidas criadas na fase de larva na presença ou ausência de rainha (média  $\pm$  erro padrão).

Colônias	Conc. Proteína abelhas RN criadas com rainha	Conc. Proteína abelhas RN criadas sem rainha	Estatística (t - Test)
1	$6,21 \pm 0,6$	$7,92 \pm 1,0$	$p = 0,151$
2	$7,28 \pm 0,6$	$7,54 \pm 0,4$	$p = 0,736$
3	$5,98 \pm 0,5$	$7,52 \pm 0,5$	$p = 0,050$
4	$6,57 \pm 0,2$	$8,06 \pm 0,5$	$p = 0,013$
5	$7,73 \pm 0,4$	$10,45 \pm 0,2$	$p < 0,001$
6	$8,29 \pm 0,4$	$10,99 \pm 0,5$	$p < 0,001$



**Figura 2:** Concentração de proteína total na hemolinfa ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de operárias recém emergidas (média e erro padrão), criadas na fase de larva, na presença ou ausência de rainha. Dosagem protéica por ensaio espectrofotométrico usando soro-albumina bovina como padrão. A concentração de proteína total na hemolinfa foi significativamente maior nas abelhas criadas, na fase de larva, na ausência de rainha (Mann-Whitney Rank Sum Test,  $p < 0,001$ )

## DISCUSSÃO

Como houve um aumento, tanto da longevidade como no nível de proteína das abelhas, suspeitamos que houve um aumento na quantidade de alimento fornecidos as larvas nas colônias na fase órfã. Recentemente, Woyke (1999) de fato encontrou que, logo após a perda da rainha, todas as larvas jovens de operárias recebem uma maior quantidade de alimento e, somente depois é que as realeiras são construídas. Uma vez terminada a fase de larva, as pupas não mais se alimentam até a emergência. Assim, o aumento observado na concentração de proteína total na hemolinfa de operárias recém-emergidas que foram criadas, desde a fase de larva, na ausência de rainha pode ser devido à uma maior quantidade de alimento recebida pelas abelhas na fase de larva.

Maurizio (1950) encontrou que, abelhas operárias vivem menos tempo no verão, quando há maior quantidade de cria na colônia, e que, no outono, quando diminui a quantidade de cria na colônia, as abelhas possuíam as glândulas hipofaringeanas e o corpo gorduroso desenvolvidos e viviam por mais tempo.

Observamos, também um aumento na longevidade das operárias criadas, na fase de larva, na ausência da rainha quando estas são comparadas com operárias criadas na presença da rainha. Entretanto, não podemos dizer que este aumento na longevidade foi devido à falta de cria na colônia, por falta de rainha, já que as abelhas recém-emergidas e marcadas foram colocadas em colônias de observação que continham rainha e cria; desta forma estas abelhas realizaram atividades normais dentro da colônia.

De acordo com Kunert and Crailsheim (1988) as abelhas alimentadas, na fase de larva, com pouco pólen, tem uma redução na longevidade. O pólen é a principal fonte de proteína para as abelhas, ele é importante para o desenvolvimento normal e também por influenciar a longevidade das abelhas (Herbert, 1992).

A ausência da rainha provoca muitas mudanças comportamentais e fisiológicas na colônia; nossos dados mostraram que as larvas criadas, na ausência da rainha produzem abelhas adultas com maior concentração de proteína total na hemolinfa e que sobrevivem por mais tempo. É provável que essas

mudanças ocorreram devido ao aumento na quantidade de alimento recebido por todas as larvas jovens, nos primeiros dias após a remoção da rainha. Neste caso, as abelhas produzidas na colônia que perderam sua rainha, nascem preparadas para viver mais tempo, para compensar a perda de população devido à falta de cria, até que as abelhas produzidas pela nova rainha alcançam a fase adulta.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

---



- Nas operárias recém-emergidas, os títulos de proteína na hemolinfa são influenciados pelo alimento recebido na fase larval, que por sua vez reflete a alimentação recebida pelas operárias adultas e a oferta de alimento na natureza.
- Os títulos de proteína na hemolinfa de operárias de sete dias foram influenciados pelos fatores ambientais, como a temperatura e a umidade relativa, aparentemente porque estes são associados com a quantidade de alimento disponível na natureza.
- As dietas artificiais de farinha de soja/levedura de cana/açúcar e de farelo de soja/levedura de cana/açúcar promoveram a síntese de proteína em níveis normais.
- A dieta de xarope, não permitiu a síntese de proteína em níveis normais.
- O teste laboratorial de quantificação da proteína na hemolinfa de abelhas confinadas mostrou ser tão eficiente para avaliar as dietas protéicas, quanto o método tradicional que avalia as dietas pela determinação da área de cria em colônias confinadas.
- A resposta imune foi igual em abelhas alimentadas com pólen (ou *beebread/candy*), fonte natural de proteínas para as abelhas, e com uma dieta protéica artificial – farinha de soja/levedura de cana/açúcar.
- Abelhas alimentadas com dietas ricas em proteína respondem à infecção de maneira uniforme enquanto que naquelas alimentadas com dietas sem proteína, não houve resposta imune.
- A mudança na alimentação de uma dieta pobre em proteínas para uma dieta normal, após o quarto dia de vida adulta, não foi suficiente para potencializar a resposta imune em abelhas operárias de sete dias.

- A ausência da rainha resulta na produção de abelhas com maior concentração de proteína na hemolinfa ao nascer e que sobrevivem por mais tempo. É provável que essas mudanças ocorreram devido ao aumento na quantidade de alimento recebido pelas larvas jovens, nos primeiros dias, após a remoção da rainha. Aparentemente as abelhas produzidas na colônia que perdem sua rainha, nascem preparadas para viver mais tempo, para compensar a perda de população devido à falta de cria, até que as abelhas produzidas pela nova rainha alcancem a fase adulta.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- ADAMS, T. S. AND GERST, J. W., 1993. Effect of diet on vitellogenin, vitellin and ecdysteroid levels during the second cycle of oogenesis in the housefly, *Musca domestica*. J. Insect Physiol. 39: 835 - 843.
- AL TIKRITY, W. S.; HILLMANN, R. C.; BENTON, A. W.; CLARKE, JR. W. W., 1971. A new instrument for brood measurement in a honeybee colony. Am. Bee J. 111: 20 - 26.
- ANDERSON, R. S., COOK, M.L., 1979. Induction of lysozyme-like activity in the hemolymph and hemocytes of an insect, *Spodoptera eridania*. J. Invertebr. Pathol. 33: 197-203.
- AZAMBUJA, P.; FEDER, D. AND GARCIA E. S. , 1993. Effects of erythrocyte component diets on ecdysteroid production and ecdysis of *Rhodnius prolixus* larvae. J. Insect Physiol. 39: 13 - 16.
- BIESMEIJER, J.C.; VAN MARWIJK, B.; VAN DEURSEN, K.; PUNT, W. AND SOMMEIJER, M.J., 1992. Pollen sources for *Apis mellifera* L. (Hym, Apidae) in Surinam, based on pollen grain volume estimates. Apidologie 23: 245 – 256.
- BITONDI M. M. G. AND PAULINO- SIMÕES, Z. L., 1996. The relationship between pollen consumption, vitellogenin and juvenile hormone titres in africanized *Apis mellifera* workers. J. Apic. Res. 35 (1): 27-36.
- BITONDI M. M. G.; SIMÕES, Z. L. P.; NASCIMENTO, A. M. AND GARCIA, S. L., 1994. Variation in the haemolymph protein composition of confined *Apis mellifera* and partial restoration of vitellogenin titre by juvenile hormone analogue treatment. J. Hymenoptera Res. 3: 107 - 117.
- BOMAN H. G. AND HULTMARK D., 1981. Cell-free immunity in *Cecropia* pupae. Trends Biochem. Sci. 6: 306-309.

- BOWNES M.; SCOTT A. AND SHIRRAS A., 1988. Dietary components modulate yolk protein gene transcription in *Drosophila melanogaster*. Development 103: 119 - 128.
- BRADFORD, M.M., 1976.- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248 - 254.
- BRANDEUBURGO, M. A. M.; GONÇALVES, L. S., 1989. A influência de fatores ambientais no desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). Rev. Brasil. Biol. 49: 1035 – 1038.
- BUTLER, C. G., 1976. The honey-bee colony – life history. In *The Hive And The Honey Bee*. Chap 3, Dadant & Sons. Hamiltom, Illinois, pp. 39 – 74.
- CALDERONE, N. W. & PAGE, R. E., 1988. Genotypic variability in age polythism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Behav. Ecol. Sociobiol. 22: 17 - 25.
- CASTEELS, P.; AMPE, C.; JACOBS, F. AND TEMPEST, P., 1993. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide taht is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). Journal of Biological Chemistry, 268: 7044 – 7054.
- CASTEELS, P.; ROMAGNOLO, J.; CASTLE,M. CASTEELS-JOSSON, K.; ERDJUMENT-BROMAGE, H. AND TEMPST, P., 1994. Biodiversity of Apidaecin-type Peptide Antibiotcs. Journal of Biological Chemistry. 269 (42): 26107 – 26115.
- CHADWICK, J. S., 1970. Relation of lysozyme concentration to acquired immunity against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 15: 455-56.

- CHALMERS, W. T., 1980. Fish meals as pollen- protein substitutes for honeybees. Bee Wld 61: 89 - 96.
- CHEN, C.; NEWTON, R. P. AND RATCLIFFE, N. A., 1995. A study os novellectins and their involovementin the activation of the prophenoloidase systemin *Blaberus discoidalis*. Biochem. J., 310, 23 – 31.
- COUTO, L. A., 1993. Estudo do desenvolvimento de colônias formadas artificialmente a partir do uso de pacotes de abelhas africanizadas, européia e F1 (africanizada x européia), sob diferentes condições ambientais. Ribeirão Preto. 116p. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.
- CRAILSHEIM, K., 1990. The protein balance of the honey bee worker. Apidologie 21: 417 – 429.
- CRAILSHEIM, K., 1991. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. J. Comp. Physiol. 161B: 55 – 60.
- CRAILSHEIM, K.; SCHNEIDER, L. H. W.; HRASSNIGG, N.; BÜHLMANN, G.; BROSCHE, U.; GMEINBAUER, R. AND SCHÖFFMANN, B., 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. J. Insect Physiol. 38: 409 – 419.
- CREMONEZ, T. M., 1996. Avaliação de métodos para determinação da eficiência de dietas protéicas em abelhas *Apis mellifera*. Ribeirão Preto. 103p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – Universidade de São Paulo.
- CREMONEZ, T. M.; DE JONG, D. AND BITONDI, M. M. G., 1998. Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 91(6): 1284 – 1289.
- CREWE, R.M. and VELTHUIS, H.H.W., 1980. False queens: a consequence of mandibular gland signals in worker honeybees. Naturwissenschaften 67: 467.

- DE JONG, D. and DE JONG, P. H., 1983. Longevity of africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested by *Varroa jacobsoni* (Parasitiformes: Varroidae). J. Econ. Entomol. 76 (4): 766 – 768.
- DIETZ, A., 1969. Initiation of pollen consumption and pollen movement through the alimentary canal of newly emerged honey bees. Ann. Entomol. Soc. Amer. 62: 43 - 46.
- DUNN P. E., 1986. Biochemical aspects of insect immunology. A. Rev. Ent. 31: 321-339.
- DUNN, P.E., DRAKE, D.R., 1983. Fate of bacteria injected into naive and immunized larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Invertebr. Pathol. 41: 77-85.
- DURRANT, M.J.; RATCLIFFE, N. A.; HIPKIN, C.R., 1993. Purification of the prophenol oxidase enzyme from haemocytes of the cockroach *Blaberus discoidalis*. Biochem. J., 289, 87 – 91.
- DUVE, H.; THORPE, A.; YAGI, K. J.; YU, C. G. AND TOBE, S. S., 1972. Factors affecting the biosynthesis and release of juvenile hormone bisepoxide in the adult blowfly *Calliphora vomitoria*. J. Insect Physiol. 38: 575 - 585.
- ENGELS, W.; KAATZ, H.; ZILLIKENS, A.; SIMÕES, Z. L. P.; TRUBE, A.; BRAUN, R.; DITTRICH, F., 1990. Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: M. Hoshi and O. Yamashita (eds) *Advances in Invertebrate Reproduction* 5: 495 – 502.
- FIGUEIREDO, L.H.M., 1999. – Desenvolvimento dos ovários de operárias *Apis mellifera* mantidas órfãs durante a fase larval. 50p. Monografia para conclusão do curso de Biologia, apresentada a Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.
- FREE, J. B., 1980. A organização social das abelhas (*Apis*) E.P.U., EDUSP, São Paulo, 79p.

- FRUMHOFF, H. H.; BAKER, J., 1988. A genetic component to division of labor within honey bee colonies. Nature, Lond 333: 358 - 361.
- GLIŃSKI, Z. JAROSZ, J. 1985. Distribution of protein fractions in the blood of worker brood of *Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research 24(2): 80 – 85.
- GLIŃSKI, Z. JAROSZ, J., 1995. Cellular and humoral defences in honey bees. Bee World 76 (4): 195 – 205.
- GOTZ P. AND BOMAN H. G., 1985. Insect immunity. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (Eds by Kerkut G. A. and Gilbert L. J.), Vol. 3: pp. 453-485. Pergamon Press, Oxford.
- HAGERDORN, H. H. , AND F. E. MOELLER., 1967. The rate of pollen consumption by newly emerged honey bees. J. Apic. Res. 6:159-162.
- HARP, E. R., 1978. Potatoes: a pollen supplement for honeybees? Am. Bee J. 118; 152 - 153.
- HAYDAK, M. H., 1936. Value of food other pollen in nutrition of the honeybees. J. Econ. Ent. 29: 870 - 877.
- HAYDAK, M. H., 1949. Causes of deficiency of soybean four as a pollen substitute for honeybees. J. Econ. Ent. 42: 573 - 579.
- HAYDAK, M. H., 1967. Bee nutrition and pollen substitutes. Apiacta (1): 3 - 8.
- HERBERT JR., E. W.; SHIMANUKI, H. AND CARON, D., 1977. Optimum protein levels required by honey bees (hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing. Apidologie 8(2): 141- 146.
- HERBERT JR., E. W.; SHIMANUKI, H., 1979. Seasonal protein preferences of free flying colonies of honey bees. Am. Bee. J. 119: 298 - 302.



- HERBERT JR., E.W., 1992. – Honey Bee Nutrition. In *The Hive And The Honey Bee*. Graham, J. M. (ed), Chap 6, Dadant & Sons. Hamiltom, Illinois, pp. 197 – 233.
- HERBERT,E.W. JR., W. G. BICKLEY, AND H. SHIMANUI., 1970. The brood rearing capacity of caged honey bees fed dandelion and mixed pollen diets . J. Econ. Entomol. 63: 215 - 218.
- HERBERT,E.W. JR., W. G. BICKLEY, AND H. SHIMANUKI, 1970. The brood rearing capacity of caged honey bees fed dandelion and mixed pollen diets . J. Econ. Entomol. 63: 215 - 218.
- JOHANSSON,T.S.K. & JOHANSSON, M. P., 1977. Feeding honeybees pollen and substitutes. Bee Wld. 58: 105 - 118.
- KANOST, M.R., 1983. The induction of lysozyme and other antibacterial hemolymph proteins in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. PhD thesis. Purdue Univ., West Lafayette, Indiana. 154pp.
- KNECH, D.; KAATZ, H.H., 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. Apidoogie 21: 457 – 468.
- KOLMES, S. A.; WINSTON, M. L.; FERGUSON L. A., 1989. The division of labor among worker honey bees (Hymenoptera: Apidae): the effects of multiple patrines. J. Kansas Ent. Soc. 62: 80 - 95.
- KUNERT, K. and CRAILSHEIM, K. 1988. Seasonal changes in carbohydrate, lipid, and protein content in emerging worker honey bees and their mortality. J. Apic. Res 27: 13 – 21.
- LINDAUER, M., 1952. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. Z. Bergl. Physiol. 34: 299 - 345.

- MAURIZIO, A., 1950. – Untersuchungen über den Einfluss der Pollenkrugung und Brutpflege auf die Lebensdauer and den physiologischen Zustand von Bienen. Schweiz. Bienenztg. 73:58.
- MOHRING, W. AND MESSNER, B., 1968. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Factor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. Biologische Zeitschrift, 87: 439-470.
- MORSE, R. A., 1975. Bees and beekeeping. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- PENDLANT J. C., HEATH M. A. AND BOUCIAS D. G., 1988. Function of a galactose- binding lectin from *Spodoptera exigua* larval haemolymph: Opsonization of blastospores from entomogenous hymphomycetes. J. Insect Physiol. 34: 533-540.
- POINAR, G. O. JR., LEUTENEGGER, R., GOTZ, T., 1968. Ultrastructure of the formation of a melanotic capsule in *Diabrotica* (Coleoptera) in response to a parasitic nematode (Mermithidae). J. Ultrastruc. Res. 25: 293 – 306.
- POWNING, R. F., DAVIDSON, W. J., 1973. Studies of insect bacteriolytic enzymes – I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. B 45: 669 – 686.
- RATCLIFFE N. A. AND ROWLEY A. F., 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents. In Insect Haemocytes, Development, Forms, Functions, and Techniques (Ed. Gupta A. P.), pp. 331-414. Cambridge University Press, Cambridge, Mass.
- RATCLIFFE N. A. AND WALTERS, J.B., 1983. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: Clearance of pathogenic and nonpathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 29: 407 – 415.
- RATCLIFFE N. A., ROWLEY A. F., FITZGERALD S. W. AND RODES C., 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol. 97: 183-350.

- ROBINSON, G. E.; PAGE, E. R. JR., 1988. Genetic determination of guarding and undertaking in honeybee colonies. Nature 333: 356 - 358.
- ROBINSON, G. E.; PAGE, E. R. JR., 1989. Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-size scouting in honey bee colonies. Behav. Ecol. Sociobiol. 24: 317 - 323.
- ROBINSON, G. E.; PAGE, E. R. JR.; STRAMBI, A., 1989. Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. Science 246: 109 - 111.
- RÖSCH, G. A., 1925. Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienestaat, I. Teil: Die Tätigkeit im normalen Bienestaat und ihre Beziehung zum Alter der Arbeitsbienen. Z.Vergl. Physiol. 2: 571 - 631.
- RÖSCH, G. A., 1930. Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienestaat, II. Teil: Tätigkeit der Arbeitsbienen unter experimentell veränderten Bedingungen. Z.Vergl. Physiol. 12: 1 - 71.
- ROTHENBUHLER, W. C.; PAGE, E. R. Jr., 1989. Genetic variability for temporal polythism in colonies consisting of similarly-age worker honey bee. Apidologie 20: 433 - 437.
- SEELEY, T. D., 1985. Honeybee Ecology. Princeton University, New Jersey.
- SIGMA STAT., 1995. Sigma Stat user's manual, version 2.0. Jandel, San Rafael, CA.
- SIMPSON, S. J. and RAUBENHEIMER, D., 1993. The central role of the haemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. Physiological Entomology 18: 395 - 403.
- STANDIFER, L. N.; HAYDAK, M. H. ; MILLS, J. P.; LEVIN, M. D., 1973. Value of three protein rations in maintaining honey bee colonies in outdoor flight cages. J. Apic. Res. 12: 137 - 143.

- STANGER, W. & LAIDLAW, H. H., 1974. Supplemental feeding of honeybees. Am. Bee. J. 114: 138 - 141.
- SZOLDERITS, M. J. & CRAILSHEIM, K., 1993. A comparison of pollen consumption in honeybee (*Apis mellifera carnica*) drones and workers. J. Insect Physiol. 39: 877 - 881.
- TERATA, Y.; GAROFALO, C.A.; SAKAGAMI, S.F., 1975. Age-survival curves for workers of two eusocial bees (*Apis mellifera* e *Plebia droryana*) in a subtropical climate, with notes on worker polyethism in *P. droryana*. J. Apic. Res. 14: 161 - 170.
- TODD, F. E. & BRETHERICK, O., 1942. The composition of pollens. J. Econ. Entomol. 35: 312 - 316.
- VELTHUIS, H.H.W., 1985. - The honeybee queen and social organization of her colony. In Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology. (B. Hölldobler and M. Lindauer, Eds., pp. 343 - 358. Sinauer, Sunderland, MA.
- VIVINO, E. A. & PALME, L. S., 1944. Chemical composition and nutritional value of pollen. Arch. Of Biochem. 4: 129 - 136.
- WINSTON, M. L., 1987. The biology of the honey bee. Harvard University Press. London, England. 281p.
- WOYKE, J., 1999. - Increased food supply to all larvae after dequeening honey bee colonies. J. Apic. Res., 38 (3-4): 117 - 123.

**ABSTRACT**

---

A lack of pollen in nature affects honey bee colony productivity, as well as the physiology of the bees themselves, as they need protein to develop body tissues and glands, such as the hypopharyngeal gland.

The objective of this thesis was to determine how protein diets (natural or artificial) and some colony conditions (presence or absence of the queen) affects honey bees, *Apis mellifera*. The parameters we evaluated were brood production, hemolymph protein concentrations, longevity of the workers and their immune capacity.

The hemolymph protein concentration was determined in newly emerged bees and in 7-day-old bees, monthly from September 1999 to September 2000. Climatic data: mean temperature and relative humidity, were obtained from a nearby experimental station.

Hemolymph protein concentration was lower during the cold months, when little food is available, than during the summer in both newly emerged and in 7-day-old worker bees, though protein levels were considerably higher in the latter. The protein levels in the recently emerged workers are a function of the amount and quality of the food that the bees consumed as larvae. In the 7-day-old workers the hemolymph protein levels were affected by temperature and humidity and the associated availability of natural food sources. The increased protein titres in the 7-day-old workers is due to an increased protein synthesis in bees 5-15 days old, when they are normally feeding larvae.

During dearth periods, supplying alternative protein diets can help improve colony productivity. Some artificial protein diets are as nutritive as pollen, though generally they are less attractive to the bees than this natural protein source.

The criteria that are traditionally used to determine if certain food products are adequate as pollen substitutes are: the quantity of diet that is consumed and colony brood production. The measurement of brood area is an adequate criterium, as it reflects the quality of the diet that is consumed: a lack of protein or a diet with a low protein content will cause a reduction in brood area. However, interference from the environment, through natural pollen sources, can make it difficult to interpret data on the usefulness of supplemental diets. This

problem can be resolved by testing small colonies confined in cages, however the procedure takes considerable time and resources. Ten to 16 weeks are necessary for an adequate test. Another procedure that has recently been developed, is the determination of protein diet efficiency by measuring hemolymph protein levels of workers confined in small cages in the laboratory.

A comparative test was made of the nutritional value of several diets: (1) 40% pollen collected from brood combs (*beebread*) mixed with 60% "candy" (sucrose and honey); (2) 30% soy meal, 10% sugar cane yeast and 60% candy; (3) 50% sucrose in water by examining brood production in confined colonies and by dosing protein levels in bees maintained in small cages in the laboratory.

The small colonies maintained in cages that were fed protein rich diets produced brood, though in much smaller quantity than colonies maintained in natural conditions. The bees that were fed sucrose syrup alone initially produced a small area of brood and then stopped brood production. There was also a reduction in hemolymph protein in the 7-day-old bees kept in small boxes in the laboratory and fed with sucrose alone, even though protein titers normally increase considerably at this age. The diet made of soybean meal, sugar cane yeast and sucrose was just as efficient as the pollen diet in both the brood rearing and the protein determination tests, which led us to conclude that the laboratory procedure (using boxes with 100 bees kept in an incubator) was just as discriminatory as the caged colony test for testing protein diets, while it has the advantage of being much cheaper and faster.

The effect of protein nutrition on the immune response of *Apis mellifera* workers was tested with newly emerged bees maintained in groups of 100 and kept in an incubator at 32°C and 80% relative humidity for 4 to 7 days. Bees fed with protein-rich diets (pollen or soy bean meal) produced significantly higher titers of the immune response enzymes phenoloxidase and lysozyme than did the bees fed only sucrose. Bees fed with syrup and injected with bacteria on day 4 did not increase phenoloxidase production. When they were maintained on this diet for 7 days and were exposed to infection, the titers of phenoloxidase and lysozyme were significantly lower than in the control group. Protein titers were also lower than in the bees fed on protein diets. A change in the diet from sucrose

alone for the first 4 days, to a pollen diet till day 7 was not enough to for a significant immune response.

We conclude that a good quality diet is essential for an adequate immune response. Also it became evident that an artificial protein source is just as good as pollen in allowing an immune response.

We examined how the loss of the queen affects the longevity of honey bee workers and the protein content in newly emerged workers. We found that the bees that were reared as larvae, during a period that the colony was queenless, lived longer than the control bees. Hemolymph protein levels were also higher in these bees reared without a queen. It appears that the longer life span of bees reared without a queen is due to an improved diet. Colonies that are temporarily without a queen are weakened by a lack of replacement bees, so that an increased longevity provoked by improved larval nutrition could be a strategy for maintaining the colony population until replacement bees are available from the new queen.

In conclusion, a diet deficient in protein interferes with protein synthesis, longevity and immune functions of the bees.



**APÊNDICE**

---

**Tabela i:** Resultado média das dosagens de fenoloxidase, lisozima e proteína total nas abelhas alimentadas com beebread e candy (média dos 3 experimentos).

Beebread e candy 4 dias (Experimento média)							
Fenoloxidase			Lisozima			Prot. Total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
Tempo	Controle	Tratado	Tempo	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1m	0,041	0,065	0,5m	95,07	88,37	20,18	15,57
2m	0,073	0,150	1m	93,37	86,87		
3m	0,132	0,245	2m	91,7	84,9		
4m	0,246	0,382	3m	90,37	83,77		
5m	0,369	0,553	4m	89,57	83,03		
6m	0,473	0,727	5m	88,97	82,47		
7m	0,563	0,873	10m	87,5	80,93		
8m	0,657	1,018	30m	86,57	79,8		
9m	0,758	1,140	60m	86,23	78,93		
10m	0,852	1,219					
11m	0,939	1,267					
12m	1,027	1,342					
13m	1,086	1,406					
14m	1,117	1,500					
15m	1,181	1,561					
16m	1,261	1,652					
17m	1,321	1,750					
18m	1,372	1,825					
19m	1,424	1,883					
20m	1,467	1,962					
21m	1,543	2,028					
22m	1,592	2,087					
23m	1,665	2,136					
24m	1,723	2,188					
25m	1,760	2,233					
26m	1,784	2,277					
27m	1,833	2,312					
28m	1,870	2,361					
29m	1,916	2,411					
30m	1,937	2,447					
31m	1,953	2,483					
32m	1,967	2,493					
33m	1,978	2,510					

**Tabela ii:** Resultado média das dosagens de fenoloxidase e proteína total nas abelhas alimentadas com xarope (açúcar e água) (média dos 4 experimentos).

Xarope 4 dias (média)							
Fenoloxidase			Lisozima			Prot, Total (µg/µl)	
Tempo	Controle	Tratado	Tempo	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1m	0,055	0,051	0,5m			7,44	5,00
2m	0,119	0,104	1m				
3m	0,218	0,201	2m				
4m	0,340	0,307	3m				
5m	0,447	0,434	4m				
6m	0,562	0,540	5m				
7m	0,651	0,665	10m				
8m	0,745	0,759	30m				
9m	0,822	0,825	60m				
10m	0,881	0,895					
11m	0,964	0,972					
12m	1,026	1,031					
13m	1,092	1,090					
14m	1,137	1,130					
15m	1,169	1,163					
16m	1,230	1,224					
17m	1,288	1,284					
18m	1,323	1,334					
19m	1,365	1,381					
20m	1,403	1,417					
21m	1,431	1,434					
22m	1,452	1,456					
23m	1,481	1,479					
24m	1,513	1,505					
25m	1,542	1,539					
26m	1,559	1,561					
27m	1,573	1,574					
28m	1,598	1,603					
29m	1,616	1,616					
30m	1,639	1,615					
31m	1,673	1,642					
32m	1,686	1,666					
33m	1,555	1,513					
34m	1,575	1,532					
35m	1,589	1,550					
36m	1,608	1,574					
37m	1,626	1,592					
38m	1,641	1,606					
39m	1,661	1,618					
40m	1,676	1,632					

**Tabela iii:** Resultado média das dosagens de fenoloxidase, lisozima e proteína total nas abelhas alimentadas com farinha de soja, levedura de cana e açúcar (média dos 3 experimentos).

Farinha 4 dias (média)							
Fenoloxidase			Lisozima			Prot, Total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
Tempo	Controle	Tratado	Tempo	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1m	0,038	0,048	0,5m	92,87	85,83	21,12	17,28
2m	0,071	0,092	1m	91,17	86,03		
3m	0,143	0,185	2m	89,93	82,8		
4m	0,228	0,313	3m	88,1	81,33		
5m	0,340	0,479	4m	87,37	80,27		
6m	0,413	0,571	5m	87,07	79,63		
7m	0,479	0,664	10m	86,37	77,8		
8m	0,541	0,760	30m	85,23	75,77		
9m	0,596	0,839	60m	84,77	74,77		
10m	0,650	0,922					
11m	0,700	0,993					
12m	0,751	1,055					
13m	0,800	1,115					
14m	0,849	1,190					
15m	0,897	1,241					
16m	0,945	1,295					
17m	0,988	1,331					
18m	1,029	1,404					
19m	1,069	1,442					
20m	1,102	1,496					
21m	1,130	1,557					
22m	1,156	1,585					
23m	1,189	1,620					
24m	1,216	1,643					
25m	1,242	1,672					
26m	1,262	1,696					
27m	1,287	1,729					
28m	1,316	1,742					
29m	1,334	1,768					
30m	1,353	1,782					
31m	1,382	1,804					
32m	1,397	1,816					
33m	1,415	1,835					
34m	1,435	1,852					
35m	1,452	1,873					
36m	1,463	1,880					
37m	1,479	1,898					
38m	1,491	1,906					
39m	1,505	1,925					
40m	1,520	1,930					
41m	1,528	1,940					
42m	1,700	2,120					
43m	1,712	2,128					

**Tabela iv:** Resultado média das dosagens de fenoloxidase, lisozima e proteína total nas abelhas alimentadas com xarope (4dias) e beebread (3 dias) (média dos 2 experimentos).

Xarope 4 dias + Beebread 7 dias (média)							
Fenoloxidase			Lisozima			Prot. Total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
Tempo	Controle	Tratado	Tempo	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1m	0,015	0,014	1,5m	94,05	94,85	5,29	6,55
2m	0,069	0,048	1m	92,85	93,45		
3m	0,129	0,092	2m	91,3	91,7		
4m	0,188	0,134	3m	90,45	90,6		
5m	0,235	0,171	4m	89,85	89,85		
6m	0,277	0,204	5m	89,4	89,3		
7m	0,321	0,233	10m	88,54	88,1		
8m	0,349	0,256	30m	87,9	87,5		
9m	0,391	0,292	60m	87,75	87,4		
10m	0,420	0,318					
11m	0,451	0,339					
12m	0,475	0,359					
13m	0,497	0,412					
14m	0,520	0,445					
15m	0,543	0,476					
16m	0,558	0,508					
17m	0,581	0,537					
18m	0,599	0,568					
19m	0,623	0,601					
20m	0,645	0,633					
21m	0,718	0,668					
22m	0,736	0,691					
23m	0,759	0,720					
24m	0,778	0,748					
25m	0,803	0,777					
26m	0,819	0,798					
27m	0,829	0,817					
28m	0,848	0,839					
29m	0,872	0,865					
30m	0,887	0,886					
31m	0,906	0,903					
32m	0,917	0,919					
33m	0,927	0,936					
34m	0,936	0,948					
35m	0,946	0,962					
36m	0,952	0,974					
37m	0,958	0,988					
38m	0,964	1,000					
39m	0,972	1,011					
40m	0,976	1,018					

**Tabela v:** Resultado média das dosagens de fenoloxidase, lisozima e proteína total nas abelhas alimentadas com xarope (média dos experimentos).

Xarope (açúcar e água 7 dias (média))							
Fenoloxidase			Lisozima			Prot. Total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
Tempo	Controle	Tratado	Tempo	Controle	Tratado	Controle	Tratado
1m	0,020	0,012	1,5m	95,2	97,73	4,12	3,34
2m	0,064	0,032	1m	94,7	97,37		
3m	0,126	0,069	2m	94,07	97		
4m	0,197	0,109	3m	93,67	96,7		
5m	0,267	0,149	4m	93	96,37		
6m	0,335	0,184	5m	92,87	96,13		
7m	0,397	0,216	10m	91,97	95,57		
8m	0,458	0,245	30m	90,83	95,17		
9m	0,514	0,274	60m	89,87	94,93		
10m	0,567	0,300					
11m	0,618	0,326					
12m	0,662	0,351					
13m	0,705	0,377					
14m	0,748	0,402					
15m	0,783	0,427					
16m	0,813	0,450					
17m	0,835	0,472					
18m	0,858	0,496					
19m	0,883	0,520					
20m	0,902	0,543					
21m	0,918	0,565					
22m	0,970	0,586					
23m	0,998	0,606					
24m	1,020	0,626					
25m	1,038	0,646					
26m	1,052	0,666					
27m	1,069	0,684					
28m	1,080	0,702					
29m	1,089	0,720					
30m	1,102	0,737					
31m	1,112	0,753					
32m	1,118	0,767					
33m	1,127	0,782					
34m	1,133	0,797					
35m	1,139	0,810					
36m	1,144	0,823					
37m	1,152	0,832					
38m	1,007	0,762					
39m	1,013	0,772					
40m	1,018	0,782					
41m	1,023	0,792					
42m	1,031	0,799					