

# ELETOFEROGRAMA DE PROTEÍNAS DE GLÂNDULAS HIPOFARINGEANAS DE ABELHAS *Apis mellifera* L. SUBMETIDAS À PRODUÇÃO DE GELÉIA REAL<sup>1</sup>

HÉLIO CARLOS ROCHA<sup>2\*</sup>, PAULO ROBERTO RODRIGUES RAMOS<sup>3</sup>, SÍLVIA REGINA CUNHA FUNARI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada no Curso de Pós-graduação em Zootecnia – Produção Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP. Recebido para publicação em 03/09/01. Aceito para publicação em 24/04/03.

<sup>2</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, CEP 99170-001, Passo Fundo, RS. E-mail: [helio@upf.tche.br](mailto:helio@upf.tche.br)

<sup>3</sup>Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, CEP 18618-000, Botucatu, SP.

<sup>4</sup>Departamento de Produção e Exploração Animal, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu, CEP 18618-000, Botucatu, SP.

**RESUMO:** O objetivo do presente trabalho foi estudar o eletroferograma de proteínas de glândulas hipofaringeanas e da geléia real através de eletroforese em gel de poliacrilamida em abelhas *Apis mellifera* L. As amostras de glândulas hipofaringeanas foram obtidas de abelhas adultas de 18 colônias de abelhas africanizadas e suas híbridas, italianas e cárnicas, submetidas à produção de geléia real. Os tratamentos foram abelhas das seguintes idades: recém emergida, 6, 12, 18 e 24 dias, com seis repetições. Após a extração, as glândulas foram conservadas em uma solução de Ringer diluído. A dosagem de proteínas foi determinada em espectrofotômetro pelo método bioquímico de biureto. A absorbância foi medida em 540nm e após, calculada a quantidade de proteína de cada amostra. No fracionamento eletroforético das proteínas, foram empregados o PhastSystem e mini géis de poliacrilamida em gradiente 8-25% na técnica de SDS-PAGE. Foram aplicados 500 ng de proteína em cada ponto de aplicação. Após a corrida, os géis foram corados com prata, de acordo com as especificações do fabricante. Nas abelhas adultas recém emergidas, o padrão eletroforético das glândulas hipofaringeanas distribuiu-se em proteínas com baixo, médio e alto peso molecular, apresentando 18 bandas. Com o avanço na idade, as proteínas com peso molecular em torno de 67 - 76 Kd, passaram a predominar, sendo estes padrões, idênticos aos da geléia real. Os tratamentos utilizados evidenciaram diferenças significativas ao nível de 5%.

Palavras-chave: glândula hipofaringeana, abelha (*Apis mellifera* L.), pólen, SDS-PAGE

## PROTEIN ELECTROPHEROGAM OF HYPOPHARYNGEAL GLANDS OF *Apis mellifera* L. BEES SUBMITTED TO ROYAL JELLY PRODUCTION

**ABSTRACT:** The objective of this research was study the protein electropherogram of hypopharyngeal glands and the royal jelly through eletrophorese in polyacrylamide gel of *Apis mellifera* L. The samples of hypopharyngeal glands were obtained from 18 beehives of africanized bees and its hybrids, italian and carniolas, submitted to royal jelly production, with or without access to 20% pollen protein. The treatments were: recently emerged, 6, 12, 18 and 24 days-old, with six replication. After the extraction, the glands were conserved in a diluted Ringer solution. The protein dosages were determined in spectrofotometer by the biurete biochemical method. The protein content of each sample was estimated by the absorbance at 540 nm. The PhastSystem and 8-25% gradient mini polyacrylamide gels were used to SDS-PAGE electrophoresis analysis. 500 ng protein sample were loaded in each well and after electrophoresis, the gels were stained with silver according to the manufacturer. In recently emerged adult bees, the electrophoretic pattern of hypopharyngeal glands was characterized by proteins of low, medium and high molecular weight, distributed in 18 bands. As the age progresses, proteins with molecular weight

ranging from 67 to 76 Kd, started to prevail. Showing identical patternry to the royal jelly. Differences between treatments were observed at 5% of probability.

Key words: hypopharyngeal gland, honeybee (*Apis mellifera* L.), pollen, SDS-PAGE, electrophoresis.

## INTRODUÇÃO

As proteínas da cabeça e glândulas torácicas, do veneno, do corpo gorduroso e dos ovários, bem como as relações destas proteínas com as proteínas da hemolinfa, e as possíveis trocas destas macromoléculas entre compartimentos glandulares, o hemocoele, e os órgãos localizados no hemocoele foram estudadas por LENSKY E RAKOVER (1983). A identidade das proteínas foi estabelecida por dupla difusão, imunoeletroforese, eletroforese em gel de poliacrilamida e isoeletrofocalização. Estes autores concluíram que a geléia real é composta de proteínas secretadas pelas glândulas hipofaríngeas, mandibulares e pós cerebrais, mas não pelas glândulas torácicas. As glândulas que produziram as duas secreções parecem ser de compartimentos separados do hemocoele, para o trânsito macromolecular.

Também foram examinados de hora em hora por THRASYVOULOU *et al.*, (1983), os padrões eletroforéticos das proteínas solúveis em água, da geléia real de abelhas operárias (*Apis mellifera* L.) e de zangões, usando eletroforese em gel de disco de poliacrilamida. O número de bandas de proteínas, na geléia produzida por operárias, aumentou gradualmente com a idade larval, de 3 para um máximo de 8. Este aumento iniciou-se a  $36 \pm 1$  h e foi completado a  $76 \pm 1$  h. Os padrões eletroforéticos das proteínas da geléia real, permaneceram inalterados durante o período inteiro de alimentação, enquanto que a geléia fornecida as larvas de zangões, teve comportamento idêntico ao das operárias após 86 h de idade larval. Os padrões protéicos das geléias produzidas por abelhas operárias forrageadoras e de colônias sem rainha, com postura de operárias, pouco diferiram.

A geléia real de abelhas (*Apis mellifera* L.) foi estudada quanto a sua composição em substâncias fisiologicamente ativas, por levar a diferenciação de uma larva jovem, incubada de um ovo fertilizado, em uma rainha. Numerosas quantidades de análises químicas e testes para as atividades biológicas

da geléia real têm sido relatados na literatura (HAYDAK, 1968; REMBOLD, 1976). Embora as proteínas sejam o componente principal da geléia real, representando aproximadamente metade de seu peso seco, apenas alguns estudos enfocaram a natureza físico-química das mesmas. TOWNSED E LUCAS (1940) encontraram na geléia real concentrações similares de proteínas solúveis e insolúveis em água. Com base na mobilidade em eletroforese do tipo Tiselius, ISHIGURU *et al.* (1963) constataram a presença de albumina, beta e gama globulinas na proporção 50:32:18. Através de análise eletroforética de zona, da geléia real inteira, TSAO E SHUEL (1968) encontraram 5 componentes diferentes na relação 10:16:38:27:8, sendo os três componentes secundários solúveis em água. PATEL *et al.* (1960) mostraram 4 faixas de proteínas extraídas em água, usando eletroforese de papel.

No mesmo contexto, TOMODA *et al.*, (1974), fracionaram as proteínas da geléia real em 5 grupos, de acordo com a solubilidade em diferentes solventes, obtendo as composições de aminoácidos de cada grupo. A proteína de maior fração, representava 45,8% da proteína total e era solúvel em água. Algumas propriedades destas proteínas fracionadas foram bem estudadas, usando cromatografia de filtração em gel, cromatografia por troca iônica em celulose em eletroforese de disco de gel de poliacrilamida.

Os componentes químicos da geléia real de larvas de rainhas de idades diferentes também foram investigados por TAKENAKA E ECHIGO (1992). A umidade e conteúdo de açúcar foram ínfimos em geléia real coletada em células mais jovens (24 horas após a enxertia), aumentando nas amostras de 48 horas, para em seguida, diminuir. O conteúdo de proteína bruta e a acidez, por titulação das amostras, apresentaram valores mais altos na geléia real de larvas mais jovens. A concentração de nitrogênio solúvel, proteínas e aminoácidos livres, foram constantes ao longo dos períodos examinados. A proteína solúvel da geléia real obtida de larvas, foi separada por

cromatografia Sephadex G-100 através de eletroforese em gel de poliácridamida.

A composição química e as propriedades das proteínas da geléia real produzida por *Apis cerana japonica* e *Apis mellifera*, foram analisadas por TAKENAKA E TAKENAKA (1996), os quais identificaram que a primeira apresentou mais proteína e menos carboidrato que a segunda, mostrando, também, pesos moleculares diferentes. As proteínas solúveis em água foram analisadas por eletroforese e imunologicamente.

A taxa de síntese de proteínas *in vitro*, das glândulas hipofaríngeas de abelhas foi medida por BROUWERS (1982), o qual não encontrou nenhuma correlação direta aparente entre taxa de síntese e tamanho dos ácinos das glândulas hipofaríngeas. Já as glândulas maduras de abelhas de verão, mostraram atividade sintética altamente variável, enquanto que, as glândulas de abelhas nutrízes, demonstraram as mais altas taxas de síntese de proteínas. Abelhas de inverno, com ácinos completamente cheios, mostraram atividade reduzida, mas a síntese de proteínas aumentou na primavera com o início da criação de larvas.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o perfil protéico das glândulas hipofaríngeas e da geléia real de abelhas *Apis mellifera* L., em colônias submetidas à produção de geléia real, através de eletroforese em gel de poliácridamida

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 18 colônias de abelhas (*Apis mellifera* L.) com 5 quadros, distribuídas em Africanizadas e suas híbridas Italianas e Cárnicas.

As abelhas adultas nasceram de quadros de cria das colônias experimentais, transferidos para estufas com temperatura controlada. Assim que emergiram das células pupais, cerca de 200 abelhas por colônia foram marcadas no tórax com tinta e, após a sua secagem, devolvidas para as respectivas colônias. As amostragens das abelhas adultas foram realizadas a cada seis dias, onde foram coletadas 5 abelhas adultas marcadas por colônia. A geléia real foi coletada a cada três dias, por ocasião das transferências.

As amostras de glândulas hipofaríngeas de

abelhas adultas recém emergidas, 6, 12, 18 e 24 dias de idade, foram obtidas pela extração da glândula do lóbulo direito para análise eletroforética, e do lado esquerdo da cabeça, para análise de área dos ácinos, através do Sistema de Análise de Imagem OPTIMAS-4.10. As glândulas hipofaríngeas extraídas foram misturadas com uma solução conservante de Ringer diluído. A solução de Ringer foi elaborada com: 5,0 g de NaCl; 0,42 g KCL e 0,25 g de CaCl<sub>2</sub> em q.s.p. 100 mL. A partir da adição de 1 mL desta solução concentrada em 10 mL de água destilada obteve-se o Ringer diluído.

A dosagem de proteínas foi determinada em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia), pelo método bioquímico de biureto, segundo VILLELA *et al.*, (1973) com modificações. Foram tomados 5 mL de amostra e misturados com 2,5 mL de um solução estoque de biureto (Weichselbaum), onde foram diluídos 20 mL de solução estoque para 100 mL de NaOH 0,2N, contendo 5 g de iodeto de potássio.

O aparelho foi zerado com o próprio biureto, usado como branco, medindo-se 2,5 mL de reagente mais 5 mL de água destilada. O soro padrão de proteínas totais utilizado foi o da Labtest-Brasil, para uso *in vitro*, contendo 5,3 g/dL de proteínas totais. As soluções foram homogeneizadas e os tubos colocados em banho-maria à 37 °C, durante 15 minutos.

A absorvância foi medida em 540 nm e, após, foi calculada a quantidade de proteína de cada amostra de soro a partir da seguinte fórmula:

$$\text{g de proteína em 100 mL} = A_d \times C / A_p,$$

sendo:

$A_d$  = absorvância do desconhecido

$A_p$  = absorvância do padrão

C = concentração do padrão (g de proteína/100 mL)

Para o fracionamento eletroforético das proteínas, foram empregados o PhastSystem e minigéis de poliácridamida em gradiente 8-25% (PhastGel - Pharmacia) pela técnica de SDS-PAGE. As amostras passaram por tratamento térmico (100 °C em 1 minuto) em presença de b-Mercaptoetanol e Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS). Foram aplicados

500 ng de proteína para cada ponto de aplicação. No ponto de aplicação lateral esquerdo, aplicou-se o padrão de calibração de pesos moleculares, composto das seguintes proteínas: miosina (212 Kd),  $\alpha_2$ -macroglobulina (170 Kd), b-galactosidase (116 Kd), fosforilase (94 Kd), transferrina (76 Kd), albumina sérica bovina (67 Kd), desidrogenase glutâmica (53 Kd), ovoalbumina (43 Kd), anidrase carbônica (30 Kd), inibidor de tripsina (20 Kd) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 Kd). Após a corrida, os géis foram corados com prata, de acordo com as especificações do fabricante. Após a coloração de fixação, os géis foram digitalizados e fotodocumentalizados através de VDS-Pharmacia.

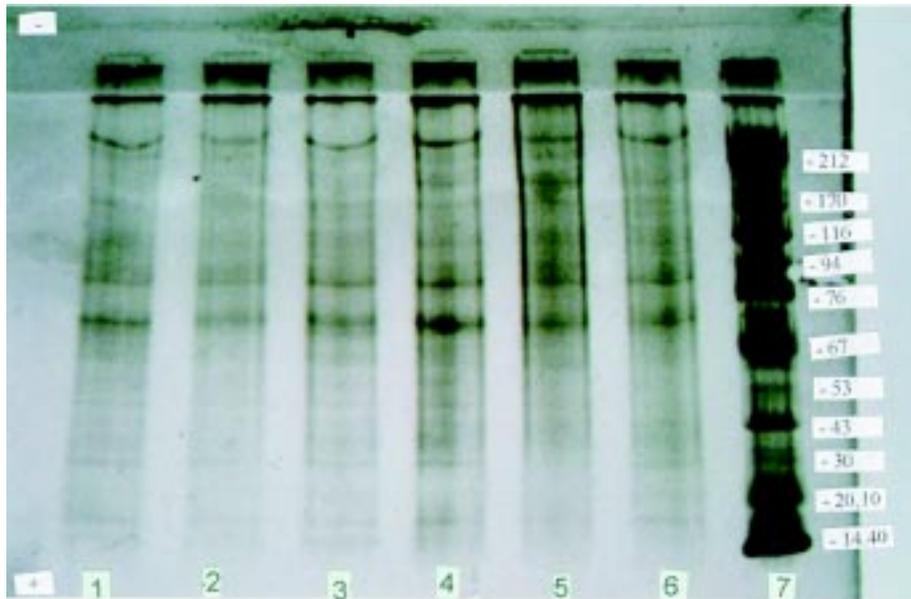
No fracionamento das proteínas com a técnica de Isoeletrofocalização (IEF), foram utilizadas amostras brutas de geleia real coradas com Comassie +  $\text{CuSO}_4$ . O padrão de calibração para os pontos isoelétricos (pI) foram as seguintes: amiloglicosidase (3,6); inibidor de tripsina (4,6); b-lactoglobulina A (5,1); anidrase carbônica II (5,9); anidrase carbônica I (6,6); mioglobinas (6,8) e (7,2); lectinas (8,2), (8,6) e (8,8); e tripsinogênio (9,3). Os demais procedimentos foram iguais ao SDS-PAGE.

Para a análise estatística das áreas dos ácidos, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos em esquema fatorial, formados pelas combinações de 3 níveis de subespécie (italianas, cárnica e africanizadas), 5 tratamentos (recém emergida, 6, 12, 18, e 24 dias de idade) com 6 repetições. A comparação das médias foi realizada pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância (COCHRAN E COX, 1957).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas abelhas adultas recém emergidas, o padrão eletroforético das glândulas hipofaringeanas, distribuiu-se em proteínas com baixo, médio e alto peso molecular, apresentando um total de 18 bandas, sendo as de pesos moleculares ao redor de 76 Kd mais visíveis no exame do gel (Figura 1).

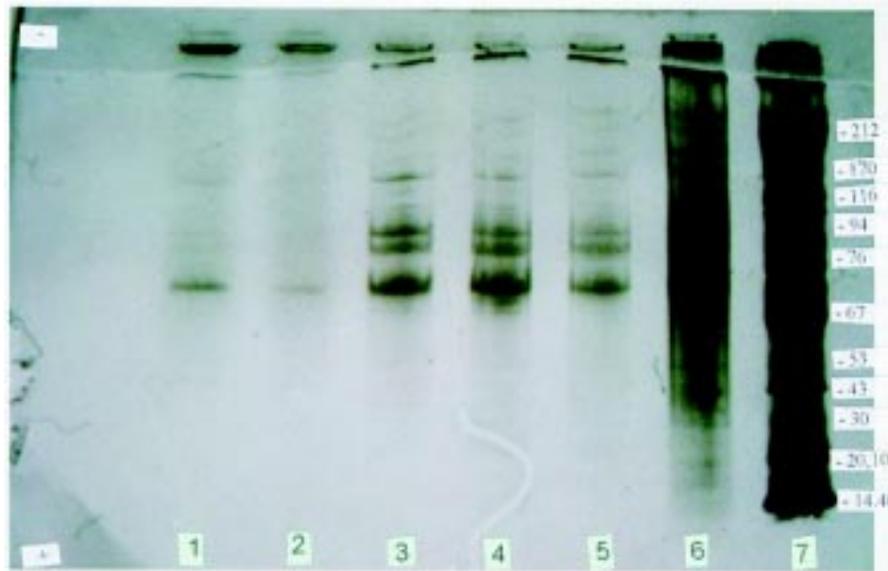
Porém, aos seis dias de idade das abelhas adultas, ocorreu uma mudança de intensidade nas bandas, com uma maior concentração para as proteínas com pesos moleculares semelhantes ao da albumina sérica bovina. O número de bandas nesta fase foi de 15. O mesmo comportamento observado



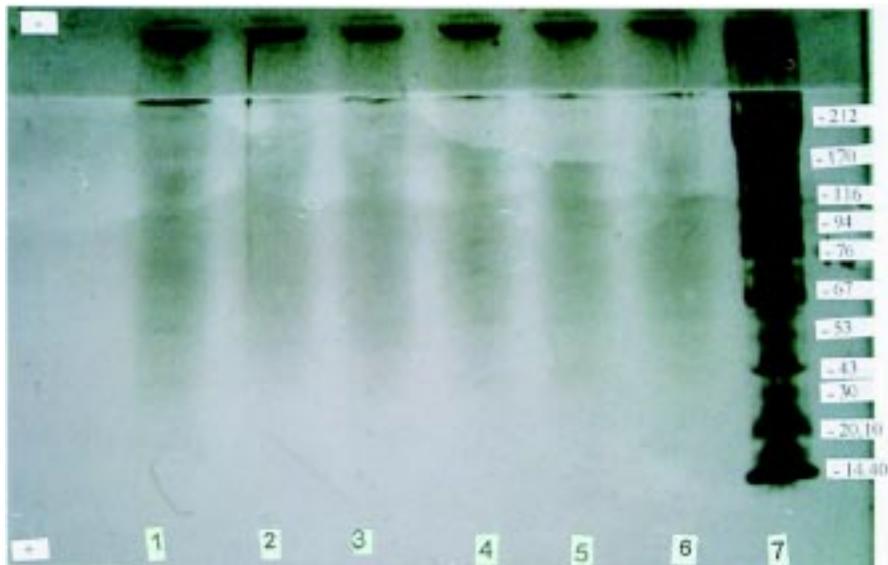
**Figura 1.** Eletroferograma de glândula hipofaringeana de abelhas operárias (*Apis mellifera* L) ao zero dia de idade, obtido em eletroforese em gel de poliácridamida e SDS, gradiente 8 a 25% de concentração (PhastGel 8-25, Pharmacia), corado com prata. 1 e 2, africanizadas

aos seis dias, se repetiu aos doze dias. Estes períodos pareceram ser os de maior produção de proteínas pelas glândulas hipofaringeanas (Figura 2). A partir desta idade, as proteínas das glândulas

hipofaringeanas foram desaparecendo, de modo que, aos 24 dias de vida, não foram possíveis de detecção por eletroforese (Figura 3).



**Figura 2.** Eletroferograma de glândula hipofaringeana de abelhas operárias (*Apis mellifera* L) aos doze dias de idade, obtido em eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, gradiente 8 a 25% de concentração (PhastGel 8-25, Pharmacia), corado com prata. 1 e 2, africanizadas; 3 e 4, cárnicas; 5 e 6, italianas; 7, padrão de peso molecular

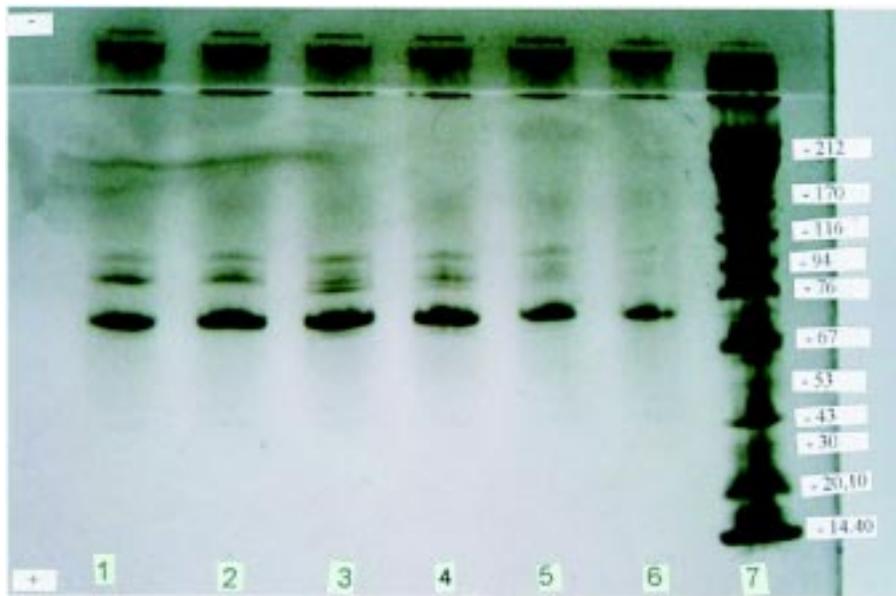


**Figura 3.** Eletroferograma de glândula hipofaringeana de abelhas operárias (*Apis mellifera* L) aos vinte e quatro dias de idade, obtido em eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, gradiente 8 a 25% de concentração (PhastGel 8-25, Pharmacia), corado com prata. 1 e 2, africanizadas; 3 e 4, cárnicas; 5 e 6, italianas; 7, padrão de peso molecular

Resultados semelhantes foram relatados por HALBERSTADT (1980), mostrando que o espectro das proteínas produzidas pelas glândulas hipofaringeanas de abelhas operárias, sofre mudanças progressivas com a idade. A produção das glândulas está sujeita a influências em relação à idade e ambiente, assim a provisão de alimento na colônia, afeta a secreção. GRACIOLI *et al.*, (1999), encontraram padrões protéicos diferentes entre abelhas operárias mais velhas, forçadas a cuidar da cria, e abelhas normais, indicando um possível retorno à atividade glandular.

Outro aspecto de interesse, foi a comparação dos

padrões das proteínas das glândulas hipofaringeanas, com os da geléia real. Os padrões foram semelhantes, entre 67 e 94 Kd, mostrando que as proteínas produzidas a nível glandular, foram do mesmo tipo das presentes na geléia real (Figura 4). O padrão para geléia real apresentou 5 bandas, sendo duas específicas para as abelhas cárnicas. Este fato pode ser indicativo de um marcador genético, ou de um fracionamento diferenciado nas bandas. Neste sentido, procedeu-se uma corrida eletroforética utilizando a IEF. No entanto, através desta técnica, não ocorreram pontos isoelétricos (pI) específicos, indicando que estas proteínas possuem pI semelhantes as demais.



**Figura 4.** Eletroferograma de geléia real de abelhas operárias (*Apis mellifera* L), obtido em eletroforese em gel de poliácridamida e SDS, gradiente 8 a 25% de concentração (PhastGel 8-25, Pharmacia), corado com prata. 1 e 2, africanizadas; 3 e 4, cárnicas; 5 e 6, italianas; 7, padrão de peso molecular

Estes valores concordam em parte com TOMODA *et al.*, (1977), que relataram a presença de duas bandas na geléia real, utilizando filtração de gel, com pesos moleculares de 14 e 33 Kd, e cinco bandas com troca iônica e cromatografia em celulose. Entretanto, THRASYVOULOU (1983), estudando os padrões de proteínas entre duas raças de abelhas (*Apis cecropia* e *Apis mellifera ligustica*), em relação ao alimento larval, através de eletroforese de disco de poliácridamida, relatou que o número de bandas de proteínas aumentou de 10 para 15 na geléia de operárias, de 8 para 10 na geléia real e de 11 para 13 em geléia de zangões, quando o SDS foi utilizado.

Os dados estatísticos referentes às médias das áreas dos ácinos das glândulas hipofaringeanas estão representados no Quadro 1. As maiores diferenças para as médias das área dos ácinos, foram aos dezoito dias de vida ( $p < 0,05$ ). No período entre zero e doze dias, praticamente não houve variação no tamanho dos ácinos para as italianas e cárnicas. No entanto, ocorreu um pico bastante acentuado nas africanizadas, ao redor dos seis dias. Estes valores, de certa forma extrapolaram àqueles relacionados com a produção das proteínas pelas glândulas hipofaringeanas, quando a maior produção esteve concentrada ao redor dos doze dias. Vá-

**Quadro 1. Área média de 100 ácidos (mm<sup>2</sup>) de glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias (*Apis mellifera* L.) africanizadas, italianas e cárnicas, em função da idade (dia), em colônias submetidas à produção de geléia real**

Idade	Ácidos (µm <sup>2</sup> )
Recém emergida	5.900 b
6	8.598 a
12	5.279 b
18	9.710 a
24	5.866 b

CV = 49,6%; Média = 7071; Desvio padrão = 2157; DMS (5%) = 2994 µm<sup>2</sup> pelo Teste de Tukey.  
Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si.

rios autores relataram períodos semelhantes, onde os ácidos apresentaram o máximo desenvolvimento (AZEVEDO BENITEZ E NOGUEIRA-COUTO, 1998).

A relação entre a atividade proteolítica e o tamanho das glândulas hipofaríngeas, foram estudadas por MORIZ E CRALSHEIM (1987), sendo que as abelhas recém emergidas apresentaram ácidos com tamanho de 81,7±1,3 micrômetros e com 8 dias, 149,0±2,8 micrômetros, acompanhado de um aumento da atividade proteolítica com diminuição de ambos quando as abelhas tornaram-se forrageadoras. Tais autores afirmaram, ainda, que a atividade proteolítica está correlacionada mais com a função e estado fisiológico das abelhas do que com a idade.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

a) Nas glândulas hipofaríngeas de abelhas adultas recém emergidas de *Apis mellifera*, o padrão eletroforético de proteínas está distribuído uniformemente entre bandas de baixo, médio e alto pesos moleculares;

b) Com o avanço na idade, os padrões

eletroforéticos das proteínas das glândulas hipofaríngeas das abelhas *Apis mellifera*, estabilizam-se, em pesos moleculares entre 67 e 94 Kd.

c) A geléia real apresenta um padrão de 5 bandas com pesos moleculares entre 67 e 94 Kd.

d) Existem variações nas áreas das glândulas hipofaríngeas, de acordo com o avanço da idade das abelhas adultas, com a maior média de desenvolvimento aos dezoito dias de idade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO-BENITEZ, A.L.G., NOGUEIRA-COUTO, R.H. Estudo de algumas dietas artificiais visando a produção de geléia real em colméias de *Apis mellifera*. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 3, Ribeirão Preto, 1998. Anais... Ribeirão Preto :USP, 1998. p.227-230.
- BROUWERS, E.V.M. Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honeybee. J. Apic. Res., Bucharest, v. 21, p. 193-198, 1982.
- COCHRAN, W.G. , COX, G.M. Experimental designs. 2.ed. New York: John Willey, 1957. 617 p.
- GRACIOLI, L. F., SILVA DE MORAES, R. L. M., CRUZ-LANDIM, C. Electrophoretic studies on protein of hypopharyngeal glands of aged *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) workers induced to return to brood-feeding activity. Naturalia, São Paulo, v. 24, p. 9-17, 1999.
- HALBERSTADT, K. Elektrophoretische untersuchungen zur sekretionstätigkeit der hypopharynxdrüse der honigbiene (*Apis mellifera* L.). Ins. Soc., v. 27, p.66-77, 1980.
- HAYDAK, M.H. Nutrition des larves d'abeille. Traité de biologie de l'abeille. R. Chauvin, Paris, v. 1, p. 302-333, 1968.
- ISHIGURO, I., NAITO, J., HARADA, H. Nutritional investigation on royal jelly IV. Bull. Gifu Pharm. Univ., v.13, p. 15-17, 1963.
- LENSKY, L., RAKOVER, Y. Separate protein body compartments of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). Comp. Biochem. Physiol., Oxford, v. 75, p. 607-615, 1983.
- PATEL, N.G., HAYDAK, M.H., GOCHNAUER, T.A.

- Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. *Nature*, London, v. 186, p. 633-4, 1960.
- MORIZ, B., CRALSHEIM, K. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Insect. Physiol.*, Oxford, p.923-931, 1987.
- REMBOLD, H. The role of determinant in caste formation in the honey bee. In: LUSCHER, M. (Ed). *Phase and caste determination in insects.* Oxford: Pergamon, 1976. p.221-224..
- TAKENAKA, T., ECHIGO, T. Changes in nitrogenous components of royal jelly from queen larvae of different ages. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, Osaka, v.56, p.913-933, 1982.
- TAKENAKA, T., TAKENAKA, Y. Royal Jelly from *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.60, p. 518-520, 1996.
- THRASYVOULOU, T. Native and dissociated protein patterns of larval food of honey bees (*Apis mellifera cecropia* L.). *Apidologie*, Paris, v. 14, p. 225-232, 1983.
- THRASYVOULO, T., COLLISON, C.H., BENTON, A.W. Electrophoretic patterns of water-soluble proteins of honeybee larval food. *J. Apic. Res.*, Bucharest, v.22, p.142-145, 1983.
- TOMODA, G., MATSUYAMA, J., MATSUKA, M. Studies on protein in royal jelly. 2. Fractionation of water-soluble protein by deae-cellulose chromatography, gel filtration and disc electrophoresis. *J. Apic. Res.*, Bucharest, v.16, p.125-130, 1977.
- TOMODA, G., MATSUYAMA, J., SHIBANAI, A. et al. Studies on protein in royal jelly (I). Solvent fractionation of protein and amino acid composition of each fraction. *Bull. Fac. Agric.*, Tamagawa Univ., v. 14, p. 86-96, 1974.
- TOWNSEND, G.F., LUCAS, C.C. The chemical nature of royal jelly. *Biochem.* v. 34. p.1155-62.
- TSAO, W., SHUEL, R.W. Breakdown of royal jelly protein in the midgut of the larval honey-bee. *J. Apic. Res.*, Bucharest, v.7, p.119-128, 1968.
- VILLELA, G.G., BACILA, M., TASTALDI, H. *Técnicas e Experimentos de Bioquímica*. Rio de Janeiro. Guanabara: Koogan, 1973. 398 p.