
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LORENZO E. R. P. P. L. D. B. BRIGANTI

**ESTRUTURA E FUNÇÃO DE PEPTÍDEOS
POLICATIÔNICOS DE *Apis mellifera***



Rio Claro
2010

LORENZO E. R. P. P. L. D. B. BRIGANTI

ESTRUTURA E FUNÇÃO DE PEPTÍDEOS POLICATIÔNICOS DE *Apis mellifera*

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

574.192 Briganti, Lorenzo E. R. P. P. L. D. B.
B854e Estrutura e função de peptídeos policatiônicos de *Apis mellifera* /
Lorenzo E. R. P. P. L. D. B. Briganti. - Rio Claro : [s.n.], 2010
35 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Mario Sergio Palma

1. Bioquímica. 2. Veneno. 3. Espectrometria de massas. 4. HPLC. 5.
Sequenciamento peptídico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Self Pity

I never saw a wild thing
sorry for itself.
A small bird will drop frozen dead from a bough
without ever having felt sorry for itself.

(D. H. Lawrence, in Selected Poems)

“É hora de partir, meus irmãos, minhas irmãs
Eu já devolvi as chaves da minha porta
E desisto de qualquer direito à minha casa.
Fomos vizinhos durante muito tempo
E recebi mais do que pude dar.
Agora vai raiando o dia
E a lâmpada que iluminava o meu canto escuro
Apagou-se.
Veio a intimação e estou pronto para a minha jornada.
Não indaguem sobre o que levo comigo.
Sigo de mãos vazias e o coração confiante.”

(Rabindranath Tagore)

“ (...) Só uma pessoa no mundo deseja sentir saudade:
aquela que nunca amou.

E esse é o maior dos sofrimentos:
não ter por quem sentir saudades,
passar pela vida e não viver.

O maior dos sofrimentos é nunca ter sofrido.”

(Pablo Neruda)

Dedico este trabalho à minha mãe, grande exemplo, a melhor pessoa que eu conheço e sem a qual eu não chegaria nem perto de estar aqui, e ao meu pai (in memoriam), pelo exemplo, pelos ensinamentos e por todo o amor em mim depositado nesses anos. Esse trabalho é para vocês.

Os agradecimentos poderiam se tornar um livro, tamanha é a quantidade de coisas que eu tenho para falar. Um trabalho sempre tem diversos aspectos que não são retratados em um relatório, então falarei um pouco disso nos agradecimentos.

Começarei por ordem cronológica. Agradeço, primeiramente, à minha família. Em especial, aos meus pais, pois sem eles eu provavelmente nem estaria na faculdade. Passamos muitas dificuldades juntos, a caminhada até aqui não foi nem um pouco fácil, mas mesmo assim eu consegui. Depois de tudo é que podemos ver que tudo valeu à pena. Minha mãe, em especial, acreditou bastante em mim quando ninguém mais acreditava. Por isso, tenho de fazer um agradecimento todo especial para ela, um grande exemplo para mim. Se um dia eu for para os meus filhos metade do que meus pais foram para mim, já estarei realizado. Por extensão, gostaria de agradecer ao Tony e à Zuca, por todo o companheirismo e amor incondicional, por todas as alegrias proporcionadas e por todos esses anos de diversão. Vocês são os amores da minha vida!!! Agradeço ainda ao Saddam (o negão), às minhas gatas, aos meus passarinhos, à chinchila, aos hamsters, aos meus peixes, ao meu carangueijo, e às minhas galinhas, que sempre estarão no meu coração e me fazem muita falta.

Agradeço também aos meus outros familiares, em especial minhas tias (principalmente a minha tia Raquel, que sempre foi e sempre será a minha tia favorita, e mais recentemente o Donário, grande figura e que assumiu um lugar especial na minha família) e aos meus primos (em especial, a Bárbara e o João Victor), por todas as alegrias e diversões proporcionadas na minha vida. Agradeço à minha avó, que mesmo não estando mais entre nós, sempre cuidou e sempre cuidará da nossa família. Agradeço à minha tia Claudete e família, em especial à tia Cláudia, Broa e o Mike, grande companheiro de conversas intermináveis e uma das pessoas mais divertidas que eu já conheci. Ao meu tio Edmílson, que faz muita falta, mas sempre estará no meu coração! Aos meus tios Inês e Tim, por terem me incentivado, dando livros de presente (o Merck Index e o Alberts foram bastante úteis nessa graduação... rs).

Gostaria de agradecer também aos meus amigos de São Paulo. À Juliana, Rodolfo, Edson, do Santo Agostinho, e à professora Denise, por todo o incentivo, desde o início. Ao meu grande mestre Chico, por todo o ensinamento e o exemplo

dado, por ter acreditado no meu potencial e ter me recebido de braços abertos na sua casa e na sua vida.

Agradeço também aos meus amigos do meu segundo colégio de São Paulo, o XII de Outubro. Meu grande amigo Marcelo (Perna), Nabil, Fernando (não posso citar seu apelido... rs), ao time de hand, e especialmente às minhas grandes amigas Paloma, Carol (fora daqui, vai!), que sempre me deram inúmeras alegrias, foram grandes companheiras de classe e sempre terão um lugar no meu coração, mesmo distantes.

Além disso, gostaria de fazer mais dois agradecimentos especiais: Ao meu grande amigo Carlos (Bolívia), que infelizmente não está mais entre nós, mas foi a pessoa mais divertida que eu já conheci e que sempre fará muita falta. Sua história de vida me ensinou a prezar pelo que realmente importa, ou seja, a amizade. Sei que ele sempre estará olhando por nós, fazendo suas palhaçadas e brincadeiras aonde quer que esteja (Che, Papito! Saudades de vc, cholo pelotudo!). Um outro agradecimento especial à minha grande amiga Tati, que me mostrou que o tempo não apaga as coisas importantes. Apesar de ser extremamente brincalhona e perder o amigo, mas não a piada, é uma pessoa fenomenal, divertida e que merece todo o sucesso do mundo. É a minha irmã paulistana, portanto estendo meus agradecimentos à Dona Sônia, Sr. Márcio e à Natasha (gorducha mais linda do mundo) e à X-Bode (e também à Poodle que eu sempre esqueço o nome... rs). Essa é praticamente a minha família paulistana!

Agradeço aos meus amigos da Unicamp (Paçoca, Betão, Thiaguinho, Tiagão, Guizzo, Chuchu... não esqueci de vocês não!) . Em especial, à Mariana e família (Sr. Wagner, Dona Anaíza, Marcelo, Fernando e Dona Edméia, além do Sr. José Augusto), por todas as alegrias, risadas, incentivo, conversas e exemplos. Mesmo longe, vocês tiveram um papel muito importante na minha vida e sempre serei grato a todos! E desejo todo o sucesso do mundo para vocês!

Agradeço ainda ao Edgar Rubesam por todas as conversas animadas sobre os assuntos mais diversos, à força nos momentos mais complicados e todo o apoio nesse tempo todo, pois sem isso não seria possível chegar onde cheguei também.

Aos amigos de Rio Claro, por ordem cronológica, a Família Aceito, o Sumô (grande mestre-cuca, que faz muita falta aqui no Brasil), Xaxá (grande lutador e futuro presidente do Banco do Brasil, uma pessoa sensacional que cativa a todos e merece toda a felicidade do mundo com a melhor namorada que ele poderia ter, a

Vivi), o Xurume (um Viking sério), o Yamaha (menino sem testa e com sotaque de japonês), o Jaú (o rei do Interbio, grande aracnologista e um dos caras mais engraçados que conheci), o Fefê (o 88, futuro magnata da biotecnologia, sensação do Interbio e de todos os Congressos do Brasil, grande exemplo para todos nós, que casou com uma pequena grande mulher, a Robertinha, pessoa fantástica e que, apesar do pouco tempo de convívio, mora no meu coração junto com o marido dela) e demais moradores (Rafa, o rei da herpetologia e do Velho, e o C-ilá, grande ictiólogo, parente da Vera Holtz).

Agradeço aos amigos da Makuta, o Itu (outro expoente da aracnologia, único conhecedor da letra inteira da dança da Emília e companheiro do Interbio), Shakira, Burns e Goiaba. Aos demais amigos do CBI 03 (Fred, Bixão, Matheus e Chal, grande químico bochechudo), do CBI 04 (Hemo, Talitha, Pinguim, Carol, Joyce, Rod, Ceroula e demais mothafockas, Thaisona e Grampolla, por todas as conversas, risadas, jogos de futebol, Interunesps e todas as alegrias proporcionadas. À Tais (e também ao Sr. Magno, Eleusa, Bobby e Rambo), por todo o incentivo, alegrias, apoio, por se importarem e ajudarem muito em momentos muito difíceis. Aos amigos do CBN 04, o Tropeço (galã da Biologia), Schin, Cis (e Jeremias também), Amarílis, Jacqueline e Myagui, a turma mais divertida que o Noturno já conheceu, agradeço pela ajuda nos trabalhos e inúmeros momentos de diversão, conversas aleatórias e toda a alegria proporcionada. Ainda no grupo 04, gostaria de agradecer à EF 04, em especial o Cóól, Cesão, Thais, Camila, Marina, Thunder (o Jesus de Rio Claro, grande companheiro de baladas e Inters), Cutia (Cutits, figuraça, grande discípulo do Zeca Pagodinho e um dos caras mais malucos que eu já conheci, que adora uma surra), e especialmente ao meu grande amigo Vinão (Gordão), por todas as alegrias, todo o apoio nos momentos difíceis, todas as conversas, risadas e todos os momentos que sempre ficarão na minha memória. Apesar de odiá-lo no início, adoro essa pessoa e desejo o melhor para ele, e que ele sempre esteja por perto!!!

No CBI 05, agradeço ao Xaxim, Latino e Mangá fiftí em especial. No CBN 05, ao Perdido, ao Luis Paulo (desertor, porém grande boxeador, só fica nos “tchá tchá”), Jacaré (figuraça) e Vanessa.

Aos meus amigos de classe do CBN 06, a Carol, Eli (maldita), Cazuza (vai fazer falta lá na casa do chapéu, porém será um grande dançarino de Arrocha), Gisele, Giovana (grande companheira de baladas, ótima companhia para conversas

sobre qualquer coisa), Juliana (que tem um sobrenome mais difícil que o meu), Pam (grande batemóloga), Natália (hermanita de mi corazóón), Manu (companheira de todas as horas, que possui uma família e amigos fantásticos – respectivamente a Dona Ana, Seu Zé, Luppy e Bianca; e Jhol (rei do nhenhégui), Horrrr (parceiraço), Velhinho e Pablo, além do inigualável Parça, uma das melhores pessoas que eu conheci e o melhor namorado, noivo e marido que ela poderia arrumar... desejo toda a felicidade do mundo para vocês!!).

Um agradecimento especial aos meus grandíssimos companheiros, a Monizze (minha irmã um pouquinho mais nova), por todas as conversas, todo o apoio, risadas, festas, conselhos e coroas que conquistamos juntos (a tríplice coroa de 2009 eu dedico à ela), por ser uma amiga espetacular e que sempre vai ter um lugar no meu coração, junto com a família, além da Bellona e da Poodle dela que eu também não lembro o nome agora... rs (ah, sim, é Vitória). Ela me ensinou muitas coisas, passamos por muitas coisas juntos e eu sempre serei grato por tudo. Ainda nos agradecimentos especiais, ao meu grande mano Coragem, parceiraço de todas as horas, pelas conversas, risadas, baladas, trabalhos, pelo ombro amigo em diversos momentos e pela parceria incondicional. Estendo os agradecimentos à sua família (Dona Márcia, Suzana e a saudosa Dona Carolina), minha família rioclarense!!

Agradeço ainda à Van, por todas as conversas, o exemplo de vida, as risadas, as baladas e sempre estar do meu lado quando eu precisei. Ela sempre terá um lugar no meu coração também!!

Agradeço à Dona Ana e ao Dirceu, pela diversão proporcionada, além do DJ. Ainda conviverei mais um tempinho com vocês! rs

Agradeço aos demais amigos de faculdade, como a Lívia (figuraça), Reto (o presidente) e Pajé (wazzup my friend, grande encrenqueiro, yo mothafó!), grandes amigos que eu fiz aqui na faculdade e de quem eu não esquecerei. Bia Temer, além de Amandita, Miss, e demais amigos 08, por todas as risadas proporcionadas.

Agradeço ainda aos professores que eu conheci na graduação, a professora Dora (a mais carinhosa e atenciosa que eu já conheci, além da Marielle), professor Leandro (um dia gostaria de ser um professor igual a ele, agradeço por todas as conversas, ensinamentos e risadas nesses anos), Dadá (inigualável em Picinguaba, pessoa muito sábia que me ensinou diversos segredos e uma coisa essencial na minha vida: “O jogo é jogado!!!”), professora Márcia, professor Jonas (grande mentor

e incentivador, uma pessoa fantástica e que me incentivou bastante na bioquímica), professora Eleonora (uma das melhores pessoas para se conversar e se aprender sobre bioquímica e sobre a vida também, agradeço por toda a confiança e por todo o apoio nos momentos difíceis), professor Pagnocca (por tudo que foi ensinado e pelo CIC de São José dos Campos, uma das melhores pessoas para se conversar), professor Cláudio (o maior entomologista que já conheci, que apesar de bugrino é uma excelente pessoa), professor Beto (pela alegria), professor Chaud (por todas as conversas), professora Sulene e professor Bertini (por todas as risadas proporcionadas). Agradeço também ao professor Guilherme Gomes, um ser humano fantástico, sempre disposto a conversar com os outros. Agradeço à todos por terem contribuído imensamente à minha formação profissional e pessoal.

Finalmente, agradeço aos meus amigos de laboratório. Primeiramente, ao meu grande mentor e pai postiço, prof. Mario Sergio Palma, por todos os conselhos, direcionamentos e conversas, além do exemplo dado. Por toda a paciência e por todas as conversas e risadas, além das histórias contadas. Pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis da minha vida, além de ter contribuído imensamente à minha formação. Agradeço ainda à Bibi (chefinha), por todas as conversas e ensinamentos (sobre tudo mesmo. Se não fosse por ela eu não saberia nada de estruturas nem de computadores... rs). Estendo ainda os agradecimentos ao grande Bob, por toda a alegria e parceria de futebol, agradeço à Lu (e ao grande Paulinho), por todas as conversas, ensinamento e confiança, ao Paulo (Paulinho, vulgo Boiadeiro, vulgo canhota de ouro, vulgo tio), por todas as risadas, os jogos e encontros no Sujos. Ao Daniel e à Nicoli, por todos os ensinamentos e conversas (e risadas também, não foram poucas), ao Beto (o Betinho, grande parceiro e cientista brilhante, um dos melhores amigos que alguém poderia ter), à Anally, Nathalia (a Bap), por toda a ajuda em diversos momentos, conversas, risadas e cafés (rs). Agradeço ao Danilo (o pupilo) e à Pat (Brigatte), por todas as risadas, diversão e ensinamentos, especialmente sobre o Von Frey (mas inventarei coisa melhor, acreditem). Aos mais novos, como a Fran e a Ana Maria. Agradeço aos meus companheiros de laboratório que não estão mais aqui, como a Tatiane (Tatão), Maurício (Minduba), Virgínia e especialmente à Meire (Meiretchan), por tudo que me ensinou, pela amizade e pela ajuda em momentos críticos, e à Alessandra (Lê), por todas as risadas e explicações (não necessariamente nessa ordem... rs). Desejo o melhor do mundo para vocês!!

Ainda no laboratório, gostaria de fazer um agradecimento especial à Vanessa (Van), por toda a ajuda, os conselhos (valiosos), as conversas, as risadas e o ombro, quando eu precisei, além de toda a ajuda em todos os momentos, mesmo nas manhãs de feriados (rs).

Por final, gostaria de agradecer às pessoas que apareceram mais recentemente na minha vida. Agradeço à galera da Bio 2010, ao Caio (Xerôncio, que isso, Jaqueline!), ao Dylon, Erick, Muzambinho (aueioeuai, com todo o seu conhecimento sobre a Maria Comprida e o Fogo Batatais), Pelotas, Baiano, às meninas (Mitra, Muzamba, Bruna, Lila e Arisca). Em especial, gostaria de agradecer à Maria Julia, por todo o companheirismo, paciência, compreensão, amizade e amor, além do ombro e do colo quando eu precisei. Estendo meus agradecimentos ao Sr. Luiz (conhecido como Bonfim, pena que não foi jogar no Flamengo) e à Dona Magali, por todo o incentivo, ajuda e alegrias proporcionadas. Agradeço à vó Magali pela consideração (e pelo cachecol... rs) e ao meu cunhado querido, o Gustavo (Dr. Gustavo, o adEvogado, e conseqüentemente à Haline, por todo o apoio e incentivo), além do Felipe, um dos piores piadistas que eu já conheci.

Todas as pessoas que eu mencionei aqui (e algumas que talvez eu tenha esquecido, afinal minha memória não é mais a mesma) foram responsáveis pela minha formação e por eu ter chegado até aqui. A todos vocês meu muito obrigado!

SUMÁRIO

1. RESUMO	10
2. INTRODUÇÃO	10
2.1 Os Himenópteros	10
2.2 A eussocialidade	11
2.3 A diversidade genética entre as abelhas	11
2.4 A africanização no Brasil	12
2.5 Os venenos de himenópteros	13
2.6 A importância dos venenos dos Himenopteros	14
2.7 Composição peptídica do veneno de <i>Apis mellifera</i>	14
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Extração do veneno	18
4.2 Fracionamento do veneno bruto	18
4.3 Análise das frações purificadas	18
4.3.1 Espectrometria de massas ESI	19
4.3.2 Espectrometria de massas IT-ToF	19
4.3.3 Seqüenciamento por Química Degradativa de Edman	20
4.4 Experimentos de LCMS-IT-TOF	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. RESUMO

Os venenos de animais são bastante estudados devido a um interesse industrial e comercial, pois sua composição é rica em moléculas de importância farmacológica.

Os peptídeos presentes nesses venenos apresentam características diversas, como antibiose, analgesia, propriedades antiinflamatórias, vasoconstritora, entre outras.

Para caracterização dos componentes peptídicos presentes no veneno de *Apis mellifera*, primeiramente o veneno foi extraído e filtrado para remoção de eventuais impurezas e depois submetido à cromatografia em HPLC com coluna de fase reversa, que gerou um perfil cromatográfico com 29 picos, dos quais os 3 mais abundantes apresentaram características peptídicas, confirmadas por espectrometria de massas e seqüenciamento. Além disso, a cromatografia de íons totais mostrou que esse veneno apresenta 123 compostos peptídicos, alguns com massas relacionadas aos já conhecidos, porém com diversos compostos de massas diferentes dos compostos já descritos na literatura.

A partir deste estudo, detectou-se a presença da Melitina como componente peptídico majoritário no veneno de abelha, além da Secapina, que será caracterizada por estudos em andamento.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Os Himenópteros

A ordem Hymenoptera é um dos maiores grupos dentre os insetos, compreendendo as abelhas, vespas e formigas. Possui cerca de 130 mil espécies descritas (GILLOT, 1995). As espécies deste grupo apresentam dois pares de asas membranosas, sendo que as asas anteriores são maiores do que as posteriores. As abelhas formam um grupo com cerca de 16 mil espécies (MICHENER, 2000).

2.2 A eussocialidade

As sociedades eussociais são reconhecidas por três características principais. Os membros da sociedade cooperam no cuidado dos juvenis. Há uma divisão reprodutiva de trabalho, na qual os indivíduos estéreis realizam o trabalho físico da sociedade enquanto a reprodução fica a cargo dos indivíduos férteis. Existe uma sobreposição de, pelo menos, duas gerações, de forma a haver o auxílio dos indivíduos mais novos aos indivíduos mais velhos. Além disso, nenhum indivíduo consegue sobreviver independentemente da colônia nem pode pertencer a uma colônia diferente daquela na qual se desenvolveu. Todos os insetos sociais apresentam algum grau de polimorfismo, e os diferentes tipos de indivíduos que ocorrem em uma colônia são denominados castas. As principais castas são o macho reprodutor, a fêmea reprodutora (ou rainha), operárias estéreis e soldados estéreis. As castas são determinadas pelo número cromossômico do ovo (haplóide ou diplóide) e pela qualidade e quantidade de alimento recebido (RUPPERT e BARNES, 2005).

2.3 A diversidade genética entre as abelhas

As diferenças na anatomia, fisiologia e comportamento de uma operária e de uma rainha estão associadas à especialização da rainha em botar ovos, levando à exclusão de muitas outras atividades, e resultam em uma divisão muito nítida de trabalho entre elas. A rainha é maior que uma operária, possui um abdômen proporcionalmente maior, contendo 300 ou mais ovários, possui taxa metabólica mais alta, permitindo-lhe botar 1000 ou mais ovos por dia, e tem uma longevidade maior. Entretanto, ela possui um repertório comportamental menos complicado e um cérebro menor que as operárias, faltam ao seu corpo os pêlos plumosos coletores de pólen da operária e o aparato coletor de pólen ou corbícula, das patas traseiras das operárias. Associadas à sua esterilidade, uma operária possui poucos ovários, geralmente subdesenvolvidos, e não pode acasalar-se (FREE, 1980).

Em climas temperados, a maioria das abelhas presentes no começo da primavera são abelhas velhas que passaram o inverno, e o tamanho de uma colônia está diretamente relacionado com o seu tamanho no outono anterior. Estas abelhas velhas possuem uma baixa expectativa de vida. No começo da primavera, existe uma taxa de mortalidade muito maior do que a taxa de nascimento, de modo que a

colônia diminua para o seu tamanho mínimo anual, porém este decréscimo no tamanho é temporário (FREE, 1980).

A taxa de oviposição das rainhas é variável ao longo do ano. Sua taxa máxima de oviposição (de cerca de 1500 ovos por dia) e ocorre perto do meio do verão. Qualquer decréscimo na criação de prole é compensada de algum modo por um aumento na longevidade das abelhas (FREE, 1980).

As fêmeas possuem um ovipositor modificado em ferrão farpado, que fica encravado no tecido mole das vítimas de suas ferroadas. Quando a abelha tenta retirá-lo, o ferrão e o sétimo segmento abdominal são cortados e deixados *in situ*. O último gânglio nervoso e os músculos que operam o saco de veneno são deixados com o ferrão, de modo que ele continua a injetar veneno no corpo da vítima (FREE, 1980)

2.4 A africanização no Brasil

O gênero *Apis* compreende 4 espécies: *A. dorsata*, *A. florea*, *A. cerana* e *A. mellifera*. Dessas espécies, apenas a *Apis mellifera* é encontrada no Brasil. Em 1956, o pesquisador Warwick Kerr, tentou desenvolver melhoramentos genéticos em abelhas da espécie *Apis mellifera*, para que a mesma se adaptasse melhor ao clima tropical do que as espécies que foram importadas da Europa. Dessa forma, ele importou rainhas africanas e promoveu um cruzamento controlado em algumas colônias. Entretanto, algumas rainhas escaparam e cruzaram com zangões das linhagens européias já existentes na região de Rio Claro, SP (*A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica*, *A. m. carnica* e *A. m. iberica*) (STORT e GONÇALVES, 1994, apud PEREIRA e CHAUD-NETO, 2005).

Colônias com constituição genética diferente podem diferir grandemente em agressividade. As características agressivas de uma linhagem de abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*), acidentalmente liberada no Brasil em 1956 estão agora se espalhando através das *Apis* da América do Sul. Em um estudo comparativo entre uma linhagem européia e uma linhagem africana, mostrou-se que as abelhas de linhagem africana apresentavam um comportamento muito mais agressivo, com um número muito maior de ferroadas, tempo de resposta mais rápido (se tornaram

ferozes e começaram a ferrear muito mais rapidamente), seguiam o observador por uma distância maior após se tornarem ferozes e demoraram muito mais tempo para se tornarem pacíficas novamente (FREE, 1980).

2.5 Os venenos de Himenópteros

Durante os últimos anos, inúmeras informações a respeito dos agentes bioativos naturais foram proporcionadas pelas técnicas de caracterização e análise bioquímica. Em consequência à aplicação desses métodos na bioquímica de insetos, muitos tipos de feromônios, hormônios, substâncias de defesa e princípios ativos de venenos vêm sendo caracterizados (NAKAJIMA, 1986).

Os venenos, de uma forma geral, sempre despertaram o interesse e instigaram diversos estudos pela sua ação tóxica e pela possibilidade de obtenção de compostos de interesse médico. Esses venenos são em geral constituídos por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, enzimas, sais minerais e outras moléculas, que em conjunto agem sinergicamente para provocar os efeitos nocivos ao organismo inoculado, mas podem apresentar diversos tipos de atividade isoladamente.

Os membros eussociais da família Apidae possuem venenos utilizados para a defesa dos ninhos, e são considerados de grande importância, uma vez que estes provocam diversas reações nas suas vítimas. De um modo geral, as principais consequências de ferroadas de Hymenoptera se resumem a dores prolongadas, edema, eritema, e, em casos mais extremos, reações alérgicas e sistêmicas (LORENZI, 2002).

As reações sistêmicas de maior importância médica são aquelas que afetam os sistemas respiratório e/ou circulatório. Em geral, são caracterizadas como reações cutâneas, vasculares ou respiratórias (SCHMIDT, 1986). Dentre as reações que afetam somente a pele se enquadram em urticária, angioderma, coceira, inchaço ou eritema.

O número de acidentes ocorridos com ferroadas de animais da espécie *Apis mellifera* é bastante incidente, o que a torna uma espécie com grande importância para ter seu veneno estudado.

A maioria dos estudos sobre peptídeos do veneno de *Apis mellifera* ocorreu na década de 1980, e desde então pouco se pesquisou sobre o assunto, sobretudo

em relação aos compostos menos abundantes. Dentre os peptídeos mais estudados, está a melitina, que representa cerca de 50% do peso seco do veneno total do inseto. Entretanto, pouco se sabe sobre a ação e composição das frações menos abundantes, uma vez que a quantidade obtida e a técnica utilizada no momento não foram suficientes para um estudo como o proposto.

2.6 A importância dos venenos dos Himenópteros

Os venenos dos Hymenoptera sociais são ricos em peptídeos biologicamente ativos, responsáveis por dores prolongadas, edema, eritema reações alérgicas e sistêmicas (LORENZI, 2002).

Em geral, os venenos dos himenopteros causam dores prolongadas, edema e eritema locais, conseqüentes de um aumento na permeabilidade dos vasos sangüíneos da pele. A dor pode continuar por várias horas e a ardência por alguns dias. Além desta ação direta da ferroadada dos himenopteros, em muitos casos podem ser observadas reações alérgicas, e até mesmo anafiláticas, que muitas vezes chegam a ser letais (OLIVEIRA, 2000). Geralmente as reações anafiláticas severas acontecem quando as toxinas estimulam diretamente os mastócitos (LORENZI, 2002).

A grande maioria das mortes causadas por ferroadadas de himenópteros está diretamente relacionada ao desencadeamento de reações imunológicas, porém algumas se devem à toxicidade direta do veneno (LORENZI, 2002). Os sintomas mais comuns são inchaço, edema, dor, urticária, ulceração, vasodilatação, aumento da permeabilidade dos vasos, tonturas, taquicardia e morte (PARK, 2002).

O veneno de abelha tem uma aplicação muito importante no tratamento da artrite, doença que causa dores intensas, restringe os movimentos e até deforma o paciente (BROADMAN, 1962). Entretanto, poucos são os estudos científicos que suportam tais aplicações.

2.7 Composição peptídica do veneno de *Apis mellifera*

O veneno de abelha (*Apis mellifera*) contém peptídeos bem conhecidos, como a melitina, apamina, e peptídeos MCD (desgranuladores de mastócitos), além da minimina (HABERMANN, 1972). Alguns desses peptídeos apresentam uma ação

detergente nas membranas plasmáticas (DAWSON, 1978), causando lise celular (especialmente dos mastócitos), enquanto outras são neurotoxinas (PALMA, 2006).

De acordo com Gauldie et al. (1976) foram encontrados oito peptídeos diferentes no fracionamento do veneno de abelha, incluindo as variantes da apamina.

A Melitina (figura 1) é o componente majoritário do veneno da abelha, representando 50% do peso seco do veneno total (BANKS, 1986). Esse peptídeo diminui a tensão superficial da água no nível da membrana plasmática, agindo como detergente natural, causando lise celular (especialmente dos mastócitos), seguida de liberação de histamina (PIEK, 1986).

G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R K R Q -NH₂

Figura1 – Seqüência de aminoácidos da melitina (PM = 2846,5)

De acordo com Talbot et al. (1982) a Melitina pode se apresentar nas formas mono e tetramérica e a ligação dela a fosfolipídeos depende de seu estado de associação e da concentração micelar crítica. Enquanto não há interação observada entre a Melitina monomérica e os fosfolipídeos livres, a Melitina tetramérica pode se ligar a lipídeos livres para formar micelas mistas.

A Apamina é conhecida por seu efeito neurotóxico tanto no sistema nervoso central quanto na medula espinhal de mamíferos, produzindo hiperatividade e convulsões em ratos (HAHN, 1937). Sua seqüência primária está ilustrada na figura 2.

Os peptídeos MCD (Peptídeos Degranuladores de Mastócitos) induzem a citólise, sendo considerados potentes desgranuladores de mastócitos, causando a liberação de histamina (BANKS, 1986). Eles possuem quatro resíduos de Cisteína, ligados por pontes dissulfeto, nas posições 1-11 e 3-15 (figura 2).

A Tertiapina (figura 2), um polipeptídeo de 20 resíduos de aminoácidos, com duas pontes dissulfeto entre resíduos de cisteínas localizadas nas posições 3-13 e 5-17, representa cerca de 0,1% do peso seco do veneno de abelha, possui baixo potencial desgranulador de mastócitos. Ela foi comparada com as prostaglandinas nas mesmas condições (MIROSHNIKOV, 1983).

A Secapina (figura 2), um polipeptídeo com 25 resíduos de aminoácidos, representa cerca de 0,5% do peso seco do veneno da abelha. Aparentemente, esse peptídeo não possui atividade farmacológica e/ou fisiológica conhecida, provavelmente porque não foi suficientemente testado até então (BANKS, 1986).

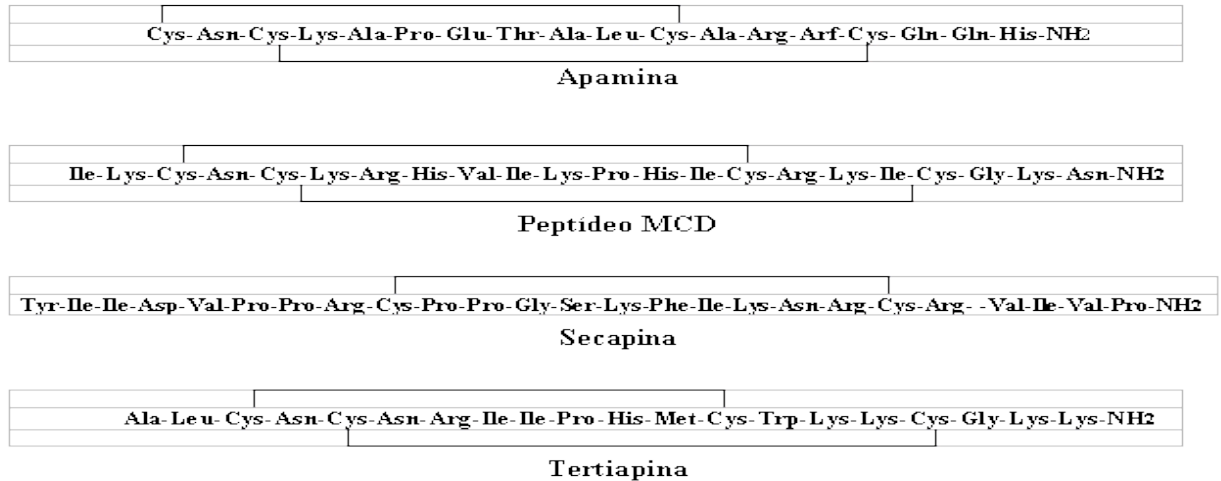


Figura 2: Seqüências de aminoácidos de polipeptídeos ativos encontrados no veneno de abelhas.

As Procaminas (A e B) são compostas por uma pequena cadeia de peptídeos ligados a uma histamina (figura 3). São responsáveis pela vasodilatação e promovem a secreção de pepsina pelo estômago.

Ala-Gly-Pro-Gln-Histamina

Ala-Gly-Pro-Ala-Gln-Histamina

Procamina A

Procamina B

Figura 3: Seqüências das procaminas

Além desses compostos citados, existem outros em menor quantidade no veneno, como inibidores de protease (SHKENDEROV, 1973) e o Cardiopep, um peptídeo com propriedades anti-arrítmicas (VICK, 1974).

As pesquisas realizadas até o momento sobre a estrutura, atividade biológica e mecanismos de ação do veneno bruto e/ou toxinas isoladas do veneno de Himenópteros, evidenciam a presença de efeitos importantes sob o ponto de vista

médico, farmacológico e imunológico, desencadeados pelas toxinas de tais venenos (OLIVEIRA, 2000).

Houve um grande avanço tecnológico desde o último período de pesquisas até o presente momento e, desta forma, faz-se necessária uma pesquisa mais aprofundada e atualizada sobre o assunto. A caracterização de venenos de abelhas se mostra essencial, uma vez que as últimas pesquisas realizadas com esse veneno datam da década de 1980. Desta forma, acredita-se que muitos compostos podem ainda ser isolados e investigados. O foco deste estudo é investigar os possíveis componentes de natureza peptídica presentes neste veneno ainda não descobertos. Esse estudo poderá servir de precursor para outros estudos mais detalhados sobre moléculas específicas encontradas nas frações do veneno de *Apis mellifera*

3. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo principal estudar os componentes peptídicos presentes no veneno da abelha *Apis mellifera* encontrada no Sudeste do Brasil, conhecida com abelha africanizada, enfocando principalmente o isolamento, purificação e caracterização funcional destes componentes.

As pesquisas realizadas até o momento sobre a estrutura, atividade biológica e mecanismos de ação do veneno bruto e/ou toxinas isoladas do veneno de Himenópteros, evidenciam a presença de efeitos importantes sob o ponto de vista médico, farmacológico e imunológico, desencadeados pelas toxinas de tais venenos (OLIVEIRA, 2000).

Houve um grande avanço tecnológico desde o último período de pesquisas até o presente momento e, desta forma, faz-se necessária uma pesquisa mais aprofundada e atualizada sobre o assunto. A caracterização de venenos de abelhas se mostra essencial, uma vez que as últimas pesquisas realizadas com esse veneno datam da década de 1980. Desta forma, acredita-se que muitos compostos podem ainda ser isolados e investigados. O foco deste estudo é investigar os possíveis componentes de natureza peptídica presentes neste veneno ainda não descobertos. Esse estudo poderá servir de precursor para outros estudos mais detalhados sobre moléculas específicas encontradas nas frações do veneno de *Apis mellifera*.

4. Materiais e Métodos

5.1. Extração do veneno

O veneno das abelhas foi coletado através de micro-choque elétrico. O veneno foi então solubilizado em água e filtrado em microfiltro do tipo Millipore (SIGMA-ALDRICH), com poros de 0,45 μm , acoplado em uma seringa, para remoção de pequenas partículas. Esta solução de veneno foi então utilizada nas etapas subseqüentes do trabalho.

5.2. Fracionamento do veneno bruto

Para o fracionamento do veneno bruto foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-10AD, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-10A, constituído por duas bombas LC-10AD (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com "loop" de 1 ml e um sistema controlador Shimadzu modelo CBM-10A. O controle da aquisição de dados foi feito através do software CLASS-LC10.

As frações foram obtidas sob fase reversa, utilizando-se uma coluna semipreparativa NUCLEOSIL C-18 (10 x 250 mm) (SHISEIDO). O gradiente de separação utilizado foi de 5 a 60% (v/v) de acetonitrila em 60 minutos, contendo TFA 0,1% (v/v) (ácido trifluoroacético grau HPLC) (VETEC) em água bidestilada e ultrapurificada, obtida em ultrapurificador de água NANOpure (BARNSTEAD). A eluição das frações foi monitorada por medidas de absorção de luz ultravioleta em 214 nm, 254 nm e 280 nm.

5.3. Análise das frações purificadas

As frações mais abundantes foram submetidas à análises de espectrometria de massas, utilizando um Espectrômetro de massas do tipo ESI-Triplo quadrupolo e ESI-IT-Tof, e as amostras que apresentaram um único componente seguiram para Seqüenciamento por Química Degradativa de Edman, para caracterização dos componentes moleculares envolvidos em cada fração.

5.3.1 Espectrometria de massas ESI

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas ESI, do tipo triploquadropolo modelo QUATTRO II (MICROMASS). O espectrômetro de massas ESI estava equipado com probe padrão, do tipo electrospray (ESI), auxiliado por uma microbomba de infusão (K D Scientific). O software MassLynx (MICROMASS) foi utilizado para controle de aquisição de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do cone foi mantida a 80°C e a voltagem na agulha a 3,55 kV, aplicando-se um fluxo de gás secante (nitrogênio) de 200 L/h e um fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 20 L/h. O espectrômetro de massas foi calibrado com os picos do envelope de íons-fragmentos da mioglobina de coração bovino, produzidos por aplicação de potencial de 40V no cone de amostra. A detecção no espectrômetro de massa foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, em 10 segundos, com uma resolução de aproximadamente 3000; o sistema de aquisição de dados foi operado em modo contínuo utilizando o software MassLynx (MICROMASS).

5.3.2 Espectrometria de massas IT-ToF

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas com fonte ESI, do tipo "Ion Trap-Time of flight " (IT-ToF SHIMADZU). O software LCMS solution (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200°C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5V. O fluxo de gás secante (nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 1,5 L/h. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, com uma resolução de aproximadamente 15000; o sistema de aquisição de dados foi operado em modo positivo contínuo, por cerca de 2 minutos.

Para os experimentos de espectrometria de massas seqüenciais (MS2 e MS3) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS. O Argônio foi utilizado como gás de colisão a uma pressão de 100 kPa. Os íons produzidos através dos experimentos MS/MS foram aprisionados e acumulados

durante 50 msec. no íon-trap, utilizando-se uma energia de colisão de 100% e frequência de 30 kHz, para os íons moleculares de carga +2 ($[M+2H]^{2+}$).

5.3.3 Seqüenciamento por Química Degradativa de Edman

As frações obtidas após a cromatografia que apresentarem um único pico de massa molecular (m/z), em análises de espectrometria de massas, foram submetidas ao seqüenciamento primário através da técnica de Química Degradativa de Edman.

Estes experimentos foram realizados em um seqüenciador automático de fase gasosa PPSQ-21A (SHIMADZU), onde os resíduos de aminoácidos ácidos foram identificados na forma de PTH-aminoácidos ácidos formados a partir de uma seqüência de reações químicas.

A reação de degradação de Edman ocorre no lado N-terminal da cadeia peptídica liberando um resíduo por ciclo reativo. Os resíduos (PTH-aminoácidos) são identificados através de um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) calibrado com padrões de PTH-aminoácidos (WAKO CHEM.), equipado com uma bomba modelo LC-10AS (SHIMADZU) e um detector de luz ultravioleta modelo SPD-10A, acoplados ao próprio seqüenciador. O controle do sistema e aquisição dos dados foram realizados através do software PPSQ-20 Data Processing e CLASS LC-10A.

5.4 Experimentos de LCMS-IT-TOF

O veneno bruto foi preparado conforme o protocolo para extração peptídica (solubilizado em acetonitrila 50% (v/v), centrifugado e coletado o sobrenadante), depois foi analisado através de experimentos de LCMS-IT-TOF para detecção de novos compostos peptídicos. Foram injetados 20 µg do veneno e para sua análise foi utilizado um sistema UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography, ou Cromatografia Líquida Ultra Rápida) (SHIMADZU) acoplado diretamente (*on line*) ao espectrômetro de massas, contendo duas bombas modelo LC-20AD (SHIMADZU), detector de arranjo de diodos SPD-M20A (SHIMADZU), amostrador automático SIL-20A_{HT} (SHIMADZU) e forno para coluna CTO-20A (SHIMADZU). A análise do veneno foi realizada sob gradiente de acetonitrila de 5 a 60% (v/v), contendo 0,1% de TFA (v/v),

por 60 min., utilizando-se uma coluna C-18 Shim-pack XR-ODS (3x100 mm), com poros de 120 Å, com partículas de 2,2 µm. A eluição dos componentes foi monitorada a 214 nm, com fluxo de 0,2 mL/min, durante 60 minutos. Os eluentes foram analisados no modo positivo (ESI+) contínuo, durante todo o experimento.

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas com fonte ESI, do tipo “*Ion Trap-Time of Flight*” (IT-TOF SHIMADZU). O software *LCMS solution* (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200°C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1,5 L/h. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, com uma resolução de aproximadamente 15000; o sistema de aquisição de dados foi operado em modo positivo contínuo, por cerca de 2 minutos.

Foram consideradas frações peptídicas aquelas que apresentaram massa superior a 400 Da, e a detecção dos mesmos foi realizada através da deconvolução a cada minuto do espectro.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento do veneno bruto de *Apis mellifera* foi realizado com a injeção de 30 µL do extrato do veneno bruto em HPLC, equipado com coluna analítica de fase reversa. Após a obtenção do cromatograma (figura 4), os picos 18, 22 e 23 foram selecionados para análise por espectrometria de massas (ESI-MS).

Foram fracionados 4,5 mg do veneno bruto de *Apis mellifera* utilizando HPLC. As frações caracterizadas no final como sendo Melitina e Secapina (respectivamente, frações 23 e 15 no cromatograma apresentado na figura 4) apresentaram massas total de 2,7 mg e 300 µg respectivamente, correspondendo a aproximadamente 67% do veneno bruto de *Apis mellifera*.

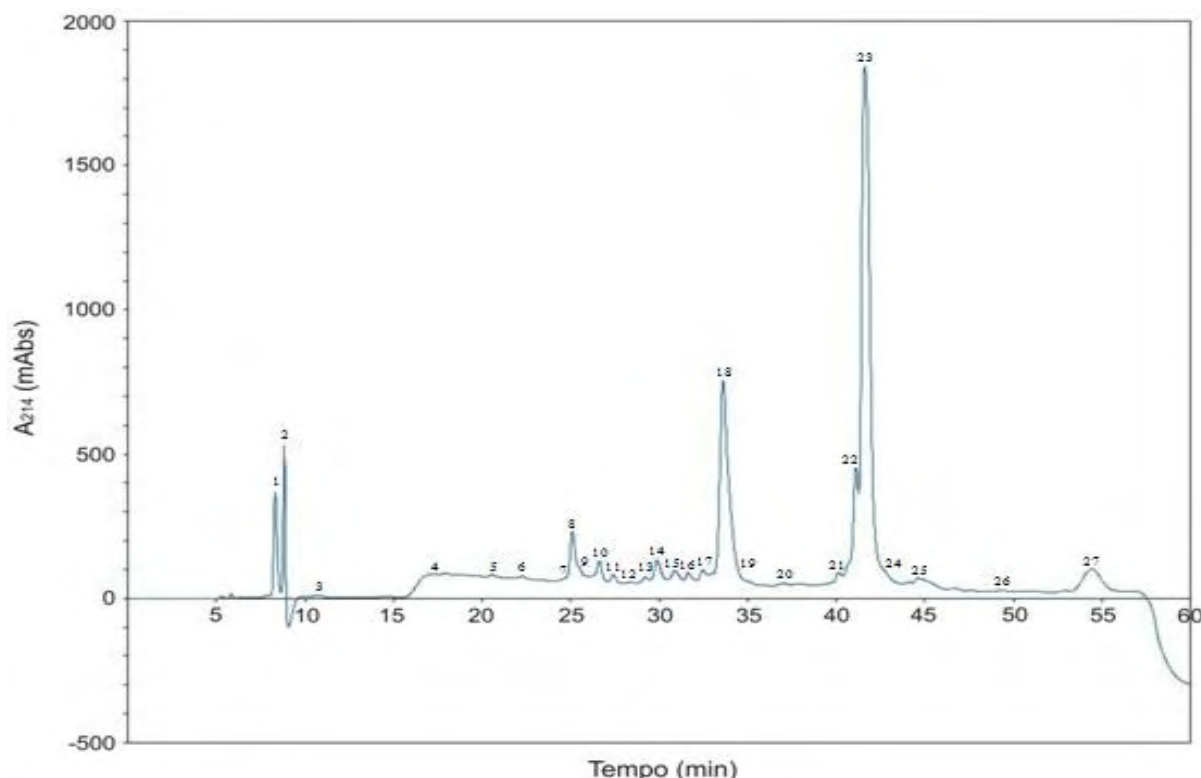


Figura 4: Perfil cromatográfico do veneno bruto de *Apis mellifera africanizada*, obtido sob fase reversa em coluna C-18 marca TOSOH (250 x 7 mm, 5 μ m diam.) em gradiente de 5 a 60% de acetonitrila, em 60 minuto, fluxo de 0,7mL/min.

As análises de espectrometria de massas indicaram que a fração 18 contém uma proteína com massa molecular de 15293,49 Da (figuras 5a e 5b). A região N-terminal desta proteína foi seqüenciada através de química degradativa de edman, a sequencia obtida foi: FKYPGTLWLCG. Como o objetivo do estudo foi estudar as frações peptídicas presentes no veneno e não frações contendo proteínas de alta massa molecular, essa fração não seguiu para análise.

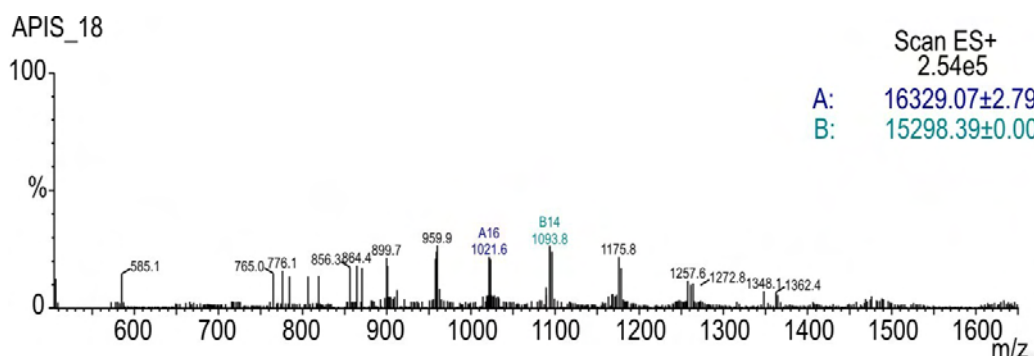


Figura 5a: Espectro de massas ESI/MS da fração 19.

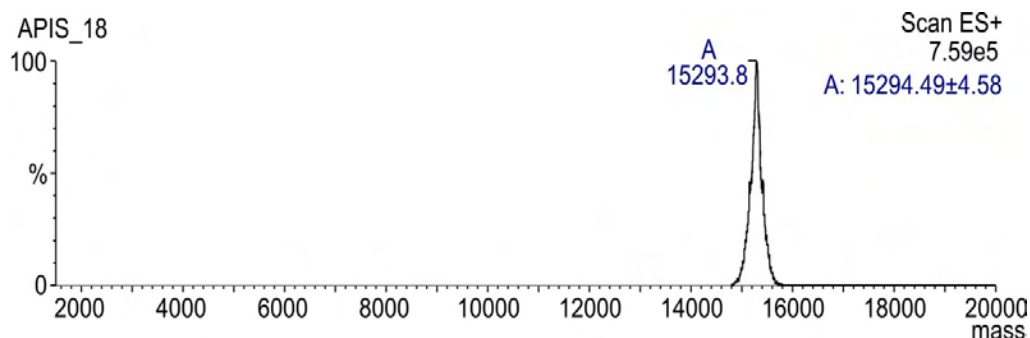


Figura 5b: Espectro de massas ESI/MS deconvolvido da fração 19.

Após estas análises preliminares, as amostras foram submetidas à análises de espectrometria de massas do tipo IT-TOF (Shimadzu), originando uma série de novos espectros. Os espectros referentes às frações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 16, 17, 20, 25 e 27 indicaram a presença apenas de compostos de baixa massa molecular não peptídicos, e não seguiram para análises subsequentes por não se tratarem do objetivo principal deste estudo. As frações que indicaram a presença de compostos peptídicos (frações 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 19, 21, 22, 23, 24 e 26) seguiram para pesagem, para determinação de seu peso seco e posterior seqüenciamento através da Química Degradativa de Edman, quando considerados puros e com abundância suficiente para tal procedimento. A fração 15, cujos espectros podem ser observados nas figuras 6, 7a e 7b, apresentou peso seco de 300 µg. A fração 23, cujos espectros podem ser observados nas figuras 8a e 8b, apresentou peso seco de 2,7 mg. Ambas seguiram para seqüenciamento peptídico, pois atenderam aos pré-requisitos de pureza e abundância suficientes.

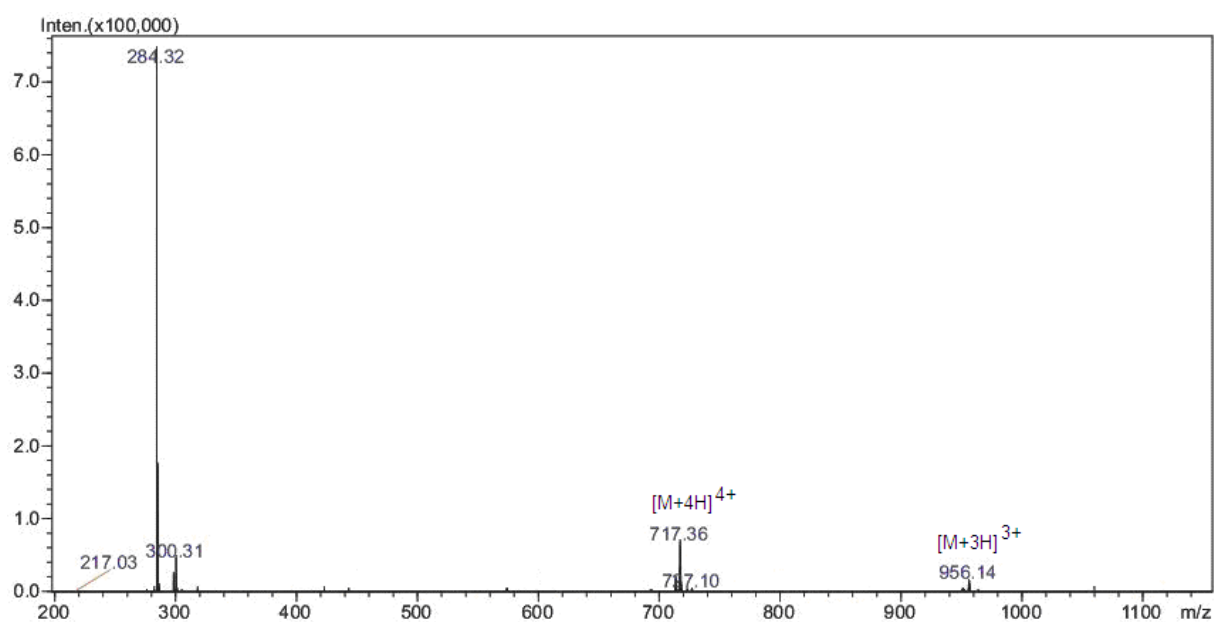


Figura 6: Espectro de massas do tipo ESI-MS adquirido com um espectrômetro de massas do tipo IT-TOF no modo positivo, para a fração 15.

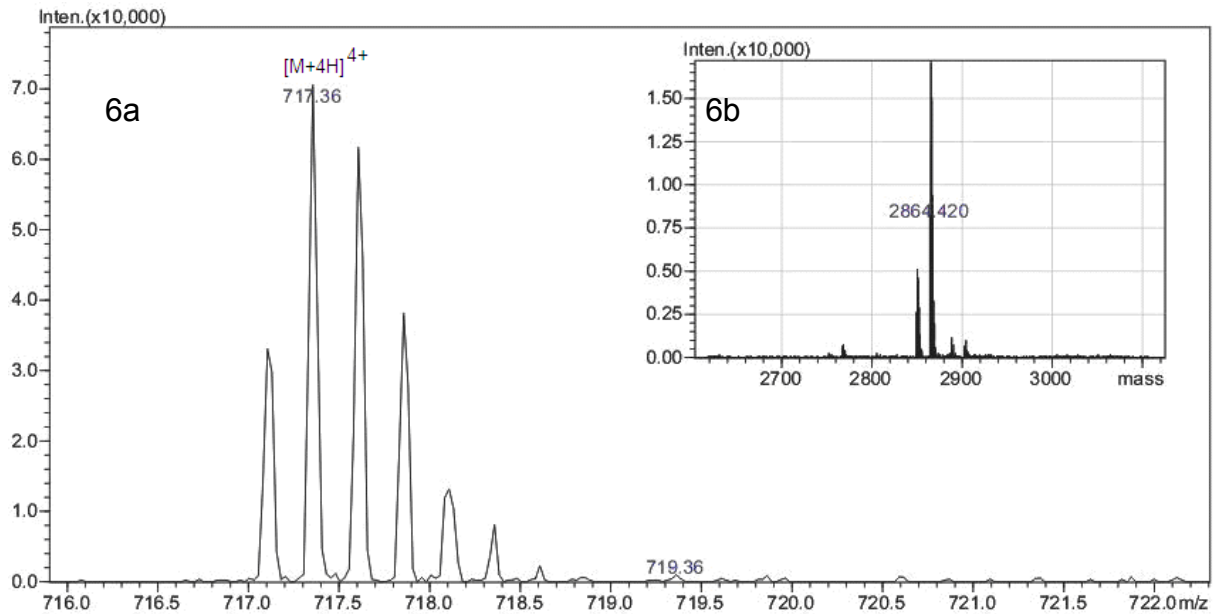


Figura 7a: Ampliação da região em torno do envelope de picos referentes ao íon-molecular do peptídeo presente na fração 15, apresentando carga +4; (7b): Espectro de massas do tipo ESI-MS deconvoluído, adquirido com auxílio de um espectrômetro do tipo IT-TOF no modo positivo, para a fração 15.

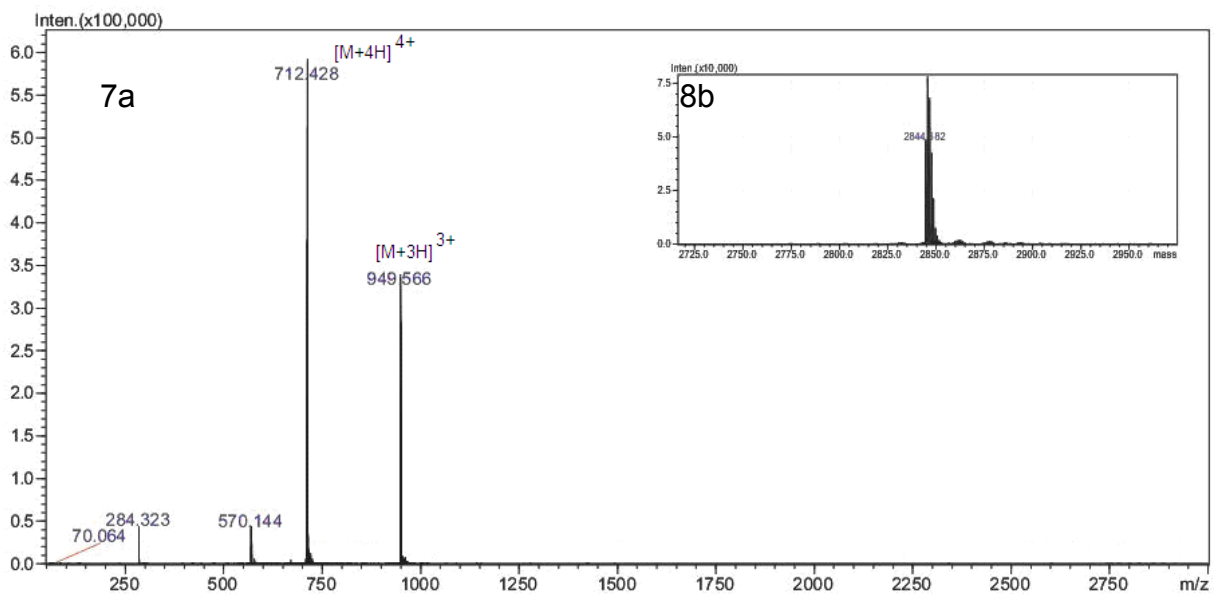


Figura 8: Espectro de massas do tipo ESI-MS adquirido com um espectrômetro de massas do tipo IT-TOF no modo positivo, para a fração 23. (8 b): Espectro massas do tipo ESI-MS deconvoluído, adquirido com auxílio de um espectrômetro do tipo IT-TOF no modo positivo, para a fração 23.

Somente as frações 15 e 23 possuíam pureza e quantidade suficiente para um seqüenciamento por Química Degradativa de Edman. A fração 23 apresentou sequencia idêntica à Melitina (G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q-NH₂) e a fração 15 apresentou sequencia idêntica à Secapina (Y I I D V P P R C P

P G S K F I K N R C R V I V P-NH₂). Isso demonstra que a Secapina pode ser isolada pelo método empregado, porém, apesar da quantidade ter sido suficiente para a sua identificação, não foi suficiente para ser utilizada em ensaios biológicos, tornando necessária a sua síntese. Os resultados apresentados pelo fracionamento do veneno bruto de *Apis mellifera* corroboram o resultado obtido pela cromatografia de íons totais, demonstrando que a grande maioria dos compostos que apareceram no cromatograma se tratavam dos compostos menos abundantes. Além disso, observamos que aproximadamente 4,5 mg de veneno, uma quantidade considerada alta, não foi suficiente para que as frações decorrentes da cromatografia estivessem presentes em quantidade suficiente para análises posteriores, como sequenciamento por química degradativa de Edman, por exemplo.

A massa experimental da Secapina (2866,42 Da) apresentou exatamente o mesmo valor que o descrito na literatura. De acordo com a literatura, a Secapina apresenta baixa toxicidade para mamíferos. Em altas doses em ratos provocou hipotermia e sinais de sedação (TREHERNE et al., 1978). Além disso não há informações à respeito da ação farmacológica da Secapina. Estudos sugerem que este peptídeo pode ser uma neurotoxina, por possuir atividade semelhante ao peptídeo MCD no sistema nervoso central (TAYLOR et al., 1984).

Os resultados obtidos por LCMS mostraram a complexidade da composição do veneno de abelha. O veneno de *Apis mellifera* apresenta a Melitina como seu componente majoritário, perfazendo cerca de 50% do veneno total (BANKS, 1986), e diversos compostos menos abundantes, alguns representando menos de 0,1% do veneno (BANKS, 1986). Até o presente momento, não existem estudos suficientes sobre os peptídeos menos abundantes e em alguns estudos não houve repetições exatas do perfil peptídico do veneno apresentado por outros estudos. Alguns peptídeos já descritos, como a Minimina, não puderam ser identificados em estudos posteriores aos da sua identificação.

Foi realizada uma cromatografia de íons totais para todas as moléculas peptídicas com valores de m/z entre 400 e 8000. A figura 9 mostra o cromatograma de íons totais em função do tempo de retenção e das massas deconvoluídas dos peptídeos. A linha preta indica o cromatograma de massas e os círculos vermelhos representam as massas moleculares de cada peptídeo detectado, a cada minuto de observação.

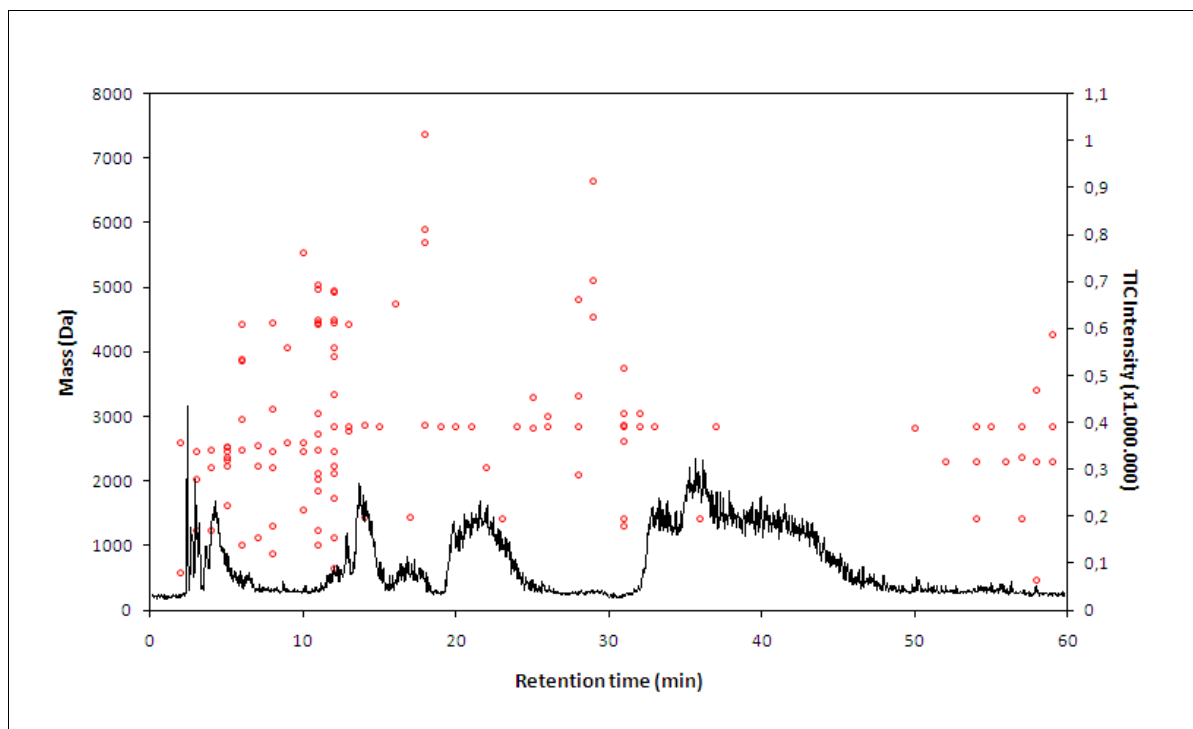


Figura 9. Cromatograma de massas do veneno bruto da abelha africanizada (*Apis mellifera*). Os círculos em vermelho representam as frações peptídicas encontradas no experimento, com suas massas correspondentes.

Na faixa de valores de massa da Melitina (2846 Da), a figura 10 mostra 24 peptídeos aparentemente isobáricos em relação à mesma. Estes podem ser isoformas ou peptídeos isóbaros da Melitina, e se estendem entre 10 e 60 minutos de eluição.

O fato da Melitina ter apresentado uma grande amplitude na faixa de tempo de eluição indica que podem haver confôrmeros dela, pois os resíduos de Prolina presentes em sua estrutura podem apresentar conformação espacial diferentes, influenciando na sua afinidade com a coluna e, conseqüentemente, no seu tempo de eluição (FADEL, 2003). Isso é um indicativo de uma grande variedade de formas de Melitina, estimulando o estudo desses peptídeos.

Além disso, podemos observar, na figura 10, a presença de algumas massas relativas aos peptídeos descritos na literatura. Dentre os componentes peptídicos, podemos visualizar 3 na faixa da Apamina (2036 Da), com intervalos de tempo eluição bastante diferentes entre si. Isso pode indicar isoformas de Apamina ainda não descritas. Além disso, 4 compostos peptídicos de massa próxima a do peptídeo MCD-401 foram identificados nesse gráfico, assim como 6 compostos de massa próxima à Tertiapina (2346), em especial 5 deles nos 10 minutos finais de eluição. Ainda dentro do grupo de peptídeos menos abundantes, podemos correlacionar 3

componentes peptídicos de massa próxima à Melitina F (2207,7 Da), sendo 2 deles nos 10 primeiros minutos de eluição e outro em aproximadamente 22 minutos de eluição. Foram encontrados ainda dois compostos com massas próximas às Procaminas A e B (464 e 535 Da, respectivamente), porém não se pode afirmar com certeza se são compostos peptídicos ou apenas compostos de baixa massa molecular. Em comparação com a literatura, podemos observar 35 compostos peptídicos relacionados na faixa entre 3000 Da e 8000 Da, sendo que existe apenas um peptídeo relacionado nessa faixa: A Minimina (de aproximadamente 6000 Da), não foi observada no presente trabalho. Entretanto, isso mostra a quantidade e a variedade de componentes peptídicos presentes no veneno de abelha, extrapolando bastante a quantidade de peptídeos que se acreditava estarem presentes no veneno.

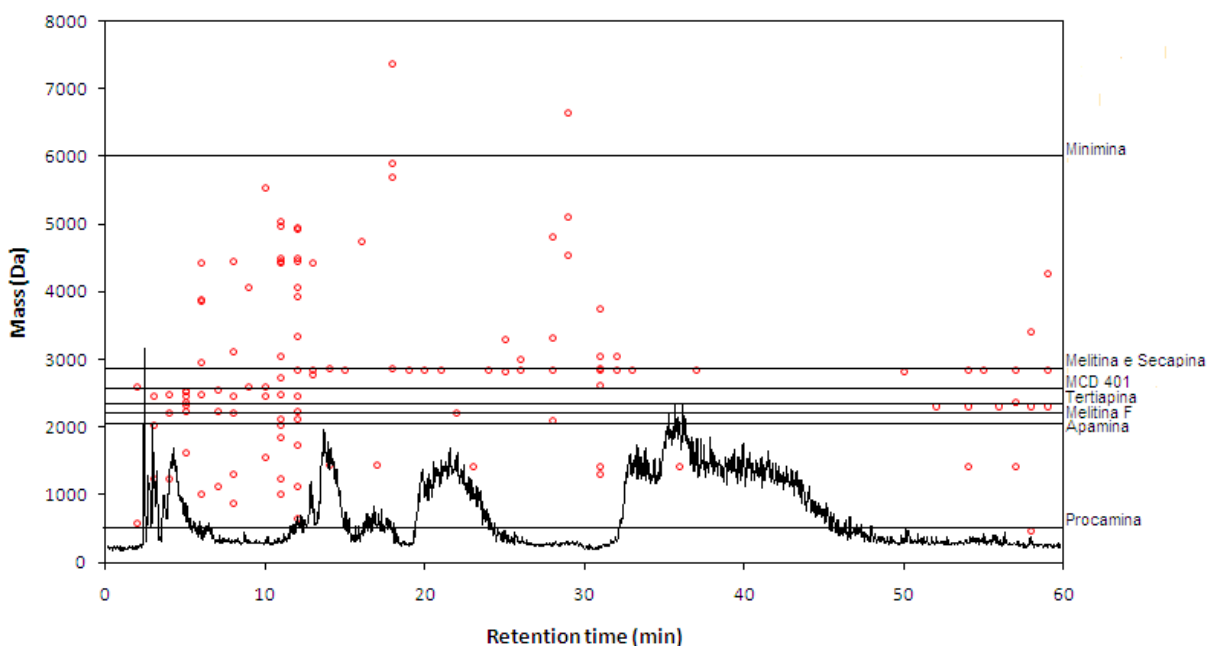


Figura 10: Cromatograma de Massas do veneno bruto de abelha africanizada (*Apis mellifera*). Os círculos em vermelho representam as frações peptídicas encontradas no experimento, com suas massas correspondentes, e as listras horizontais em preto representam as faixas de massas correspondentes às Massas dos peptídeos já conhecidos.

A figura 11 mostra 123 componentes peptídicos no veneno, sendo que a grande maioria deles ocorre em baixas massas, que representa os peptídeos menos abundantes do veneno em termos percentuais. Considerando que foram injetados 20 μg de veneno bruto e foram encontrados 123 compostos peptídicos, estes apresentaram uma concentração média de 162 ng cada, porém se considerarmos que a Melitina (2846 Da) corresponde a 50% do veneno bruto, então 10 μg seriam

correspondentes à Melitina e 10 µg seriam dos outros 122 componentes peptídicos, dando uma concentração média de 81 ng cada, para os 20 µg de veneno analisado. Isso dá uma ideia de quão difícil é o estudo dos componentes peptídicos menos abundantes do veneno de abelha, devido à sua baixíssima concentração no veneno bruto. Este estudo torna-se ainda mais complexo, uma vez que os compostos peptídicos apresentam diferentes concentrações no veneno bruto.

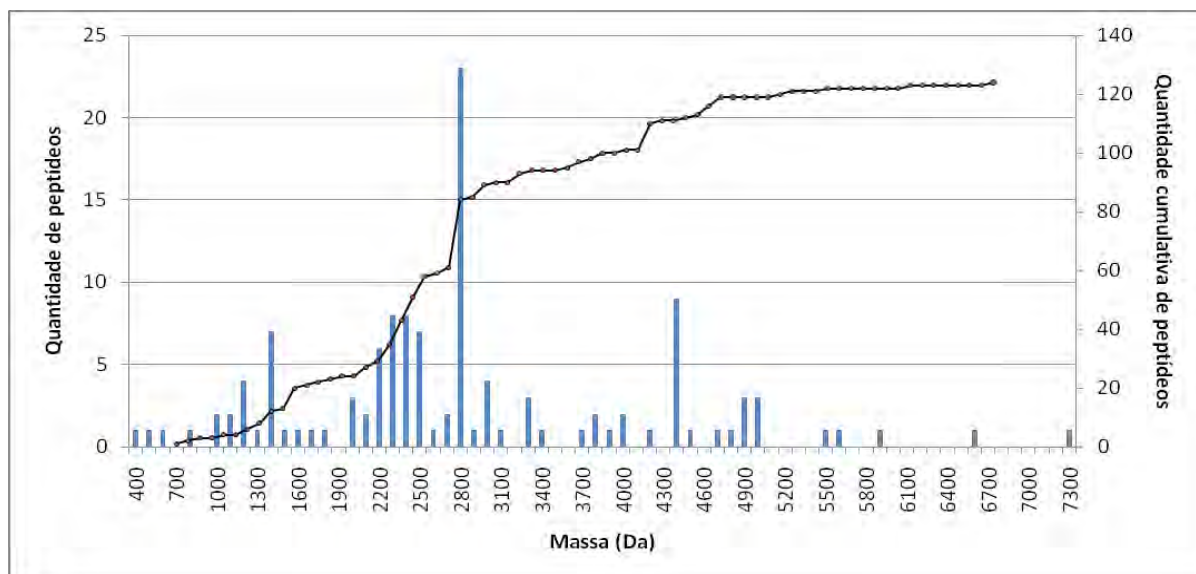


Figura 11. Gráfico da quantidade cumulativa de peptídeos presentes na amostra analisada. As barras verticais em azul representam a quantidade de peptídeos encontrados no intervalo de massa correspondente, e a linha preta pontilhada representa a quantidade de peptídeos cumulativa ao longo da corrida de 60 minutos

6. CONCLUSÃO

Os estudos realizados mostraram a dificuldade em caracterizar os componentes peptídicos menos abundantes do veneno de abelha. Mesmo com o fracionamento de uma grande quantidade do veneno não foi possível coletar amostra suficiente para a caracterização desses compostos. Isso demonstra que, mesmo com técnicas analíticas modernas, a complexidade do veneno estudado requer um trabalho extenso e bastante detalhado. Entretanto, essas técnicas provaram que o veneno de *Apis mellifera* possui uma complexidade e uma riqueza de compostos muito maior do que se pensava em estudos anteriores. Além disso, os estudos realizados até o presente com o veneno de *Apis mellifera* apresentaram resultados por vezes divergentes, uma vez que alguns compostos não se repetiram ao longo dos diferentes trabalhos.

A fração 19 apresentou espectro de massas onde a relação massa/carga (m/z), de 15.293,8 (e, consequentemente, 15.292,8 Da) pode ser relacionada à massa de uma proteína da família das Fosfolipases (aproximadamente 14 KDa). Buscas no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: [http://http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) indicaram que a proteína analisada possivelmente se trata de uma fosfolipase A2. Análises das frações 22 e 23 apresentaram espectros de massas onde as relações m/z de 2.844 podem ser relacionadas com peptídeos da família da Melitina (2.846 Da), peptídeo mais abundante no veneno de *Apis mellifera*. Isso foi confirmado pelo seqüenciamento peptídico, que mostrou se tratar exatamente da Melitina já descrita para o veneno de *Apis mellifera*. A fração 15 apresentou um espectro condizente de massas onde a relação m/z de 2.864 pode ser relacionada com peptídeos da família do MCD 401 (2.864 Da) com a Secapina, confirmado por sequenciamento peptídico. Entretanto, a quantidade isolada, apesar de suficiente para identificação, não foi suficiente para a caracterização da atividade biológica, tornando sua síntese necessária e indicando que se trata de um composto menos abundante no veneno. A presença de possíveis variantes polimórficas dos peptídeos citados pode ser explicada, em parte, pelo organismo a partir da qual ela foi isolada, a abelha africanizada. Esta é um produto de cruzamento de duas linhagens de abelhas, a européia (*Apis mellifera ligustica* e *Apis mellifera mellifera*, principalmente) e a africana (*Apis mellifera scutellata*, principalmente). Os peptídeos de *Apis mellifera* descritos na literatura foram isolados da linhagem européia, e a contribuição gênica da linhagem africana teve papel fundamental nesse polimorfismo apresentado. Os efeitos toxicológicos da africanização das abelhas ainda não é conhecido, porém pode-se inferir que a composição do veneno destes indivíduos africanizados é diferente dos indivíduos não-africanizados.

Isto seria possível porque aparentemente vários fatores genéticos e ambientais podem influenciar a ocorrência de múltiplos polimorfismos peptídico. Os efeitos do cruzamento de *Apis mellifera* de linhagens européias com linhagens africanas ainda não são conhecidos em nível venômico. Além disso, há ainda a questão reprodutiva desse grupo, pois os efeitos da poliespermia, onde a rainha é fecundada por vários machos, ainda não foram estudados em nível molecular. A sazonalidade também possui um forte impacto na composição do veneno, uma vez que a cada 30 a 40 dias, nos períodos de primavera e verão, uma nova progênie é

estabelecida na colônia, sendo que nesse período a ovoposição pode chegar a 1500 ovos por dia (FREE, 1980). No período de outono e inverno, a taxa reprodutiva diminui, com um intervalo de cerca de 60 dias para o estabelecimento de uma nova progênie e ovoposição de cerca de 1000 ovos por dia pela rainha (FREE, 1980). Isso promove uma variedade genética consideravelmente grande dentro de uma mesma colônia, o que torna importante os passos seguintes deste trabalho.

Como muitas frações não possuíam quantidade suficiente de peptídeos para serem analisadas, outros estudos deverão ser desenvolvidos para a identificação e caracterização dessas frações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKS, B.E.C., SHIPOLINI, R.A. Chemistry and Pharmacology of Honey-bee Venom, in **Venoms of the hymenoptera- biochemical, pharmacological and behavioural aspects**. Edited by Tom Piek, London, Academic Press, 1986. 569 p.

BROADMAN, J. **Bee venom** - The natural curative for arthritis and rheumatism. New York, Putnam & Sons. 1962. 224 p.

DAWSON, C.R., DRAKE, A.F., HIDER, R.C Interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes. **Biochimia et Biophysica Acta**, v.510, p.75-86, 1978

DE SOUZA, B.M. **Estrutura e função de mastoparanos dos venenos de vespas**. Rio Claro, 2006. 143p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista

DOTIMAS, E.M., HAMID, K.R., HIDER, R.C., RAGNASSON, U. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. **Biochimia et Biophysica Acta**, v.911, p.285-93, 1987

FADEL, V. **Estrutura tridimensional da crotamina extraída do veneno de *Crotalus durissus terrificus* utilizando ressonância magnética nuclear homonuclear**. São José do Rio Preto, 2003. 99p. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

FREDHOLM, B. Studies on a mast cell degranulating factor in bee venom. **Biochemical Pharmacology** v.15 (12), p.2037-43. 1966

FREDHOLM, B., HAEGERMARK, O. Histamine release from rat mast cells induced by a mast cell degranulating fraction in bee venom. **Acta Physiologica Scandinavica** v. 69, n.4, p. 304-12. 1967

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (*Apis*)**. São Paulo. EPU: Ed. Da Universidade de São Paulo, 1980. p. 15-20.

GAULDIE, J., HANSON, J. M., D. RUMJANEK, F., SHIPOLINI, R.A., VERNON, C.A. The peptide components of bee Venom, **European Journal of Biochemistry** n.61, v.2, 369–376. 1976

GILLOTT, C. **Entomology**. 2a. Ed. New York, Plenum Press. 798 p. 1995

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**, v. 177, p.314-22, 1972

HABERMANN, E., REIZ, K.G. On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. **Biochemische Zeitschrift** v.343, n.2, p.192-203. 1965

HAHN, G., LEDITSCHKE, H. Über das Bienengift. IV. Mitt. Gewinnung beider Giftkomponenten durch Dialyse, **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft** V.70, p.1637-44, 1937

HANCOCK, R.E.W., LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.314-22, 1972

HIDER, R.C., RAGNARSON, U. A proposal for the structure of apamin. **FEBS letters**, v.111, p.189-93, 1980

KOBUROVA, K., MIKHAILOVA, S., SHKENDEROV, S. Antipyretic effect of a polypeptide from bee venom—adolapin. **Eksp Med Morfol.** v.23, n.3, p.143-8. 1984

KOBUROVA, K.L., MICHAILOVA, S.G., SHKENDEROV, S.V.
Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin--bee venom polypeptide. **Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica** v.11, n.2, p.50-55. 1985

LORENZI, C. C. B. **Estudo estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias.** São José do Rio Preto, 2002. 115p. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista

MICHENER, C. D. **The Bees of the World.** Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 913 pp. 2000

MIROSHNIKOV, A.I., BOIKOV, A.V., SNEZHKOVA, L.G., SEVERIN, S.E., SHVETS, V.I., DUDKIN, S.M. Interactions between tertiapin, a neurotoxin from bee venom, and calmodulin. **Bioorganicheskaja khimiia**, v.9, p.26-32, 1983.

NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. in **Venoms of the hymenoptera- biochemical, pharmacological and behavioural Aspects.** Edited by Tom Piek, London, Academic Press, 1986. 569 p.

NELSON, D.A., O'CONNOR, R. The venom of the honeybee (*Apis mellifera*): free amino acids and peptides. **Canadian Journal of Biochemistry** v.46 (10),p.1221-6. 1968

OLIVEIRA, M. R. P. **Efeitos do veneno bruto de *Polybia paulista* em camundongos: Estudos bioquímicos, farmacológicos e morfológicos.** Rio Claro, 2000. 135p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

OVCHAROV, R., SHKENDEROV, S., MIKHAILOVA S. Anti-inflammatory effects of apamin. **Toxicon** v.14 n.6, p.441-7. 1976

OVCHAROV, R., SHKENDEROV, S., MIKHAILOVA, S. The effect of apamine on the inflammatory process. **Eksp Med Morfol.** v.14, n.1, p.1-6. 1975

PALMA, M.S., Insect venom peptides in KASTIN, A.J. **Handbook of biologically active peptides.** 1.ED. Oxford, Academic Press, p.389-96. 2006

PARK, R. **Bee and hymenoptera stings**. eMedicine, v.3, n.1, 2002 disponível em <www.emedicine.com>. Acesso em 23 jan. 2008.

PECK, M.L., O'CONNOR, R. Procaine and other basic peptides in the venom of the honey bee (*Apis mellifera*). **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v.22, p.51-3, 1974

PEREIRA, A. M., CHAUD-NETO, J. Africanized honeybees: biological characteristics, urban nesting behavior and accidents caused in Brazilian cities (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 46, n. 3. pg 535 – 550. 2005.

PIEK, **Venoms of the hymenoptera-** biochemical, pharmacological and behavioural aspects., London, Academic Press, 1986. 569p.

RUPPERT, E.E., BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. Roca, 6a. ed., São Paulo, 1029p. 2005

SCHMIDT, J.O. Allergy to Hymenoptera venoms in **Venoms of the hymenoptera-** biochemical, pharmacological and behavioural Aspects. Edited by Tom Piek, London, Academic Press, 1986. 569 p.

SHKENDEROV, S. A protease inhibitor in bee venom. Identification, partial purification and some properties. **FEBS Letters** 15. v.33 n.3, p.343-347. 1973

SHKENDEROV, S. Anaphylactogenic properties of bee venom and its fractions. **Toxicon** v.12, n.5, p.529-534. 1974

SHKENDEROV, S., KOBUROVA, K.. Adolapin--a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom. **Toxicon** v.20, n.1, p.317-21. 1982

SHKENDEROV, S., TODOROV, S. Effect of bee venom and its low- and high-molecular fractions on embryogenesis in rats. **Eksp Med Morfol**. v.18, n.3, p.160-65. 1979

TALBOT, J.C., BERNARD, E., MAUREL, J.P., FAUCON, J.F., DUFOURCQ, J. Melittin-phospholipid interactions : Binding of the mono- and tetrameric form of this peptide, and perturbations of the thermotropic properties of bilayers. **Toxicon**, n.20, v.1, p.199-202. 1982

TAYLOR, J.W., BIDARD, J.N., LAZDUNSKY, M. The Characterization of high-affinity binding sites in rat brain for the mast cell-degranulating peptide from bee venom using the purified monoiodinated peptide. **The journal of Biological Chemistry**, v.259, n.22, p. 13957-13967, 1984.

TREHERNE, J.E., BERRIDGE, M.J., WIGGLESWORTH, V.B. **Advances in Insect Physiology**, v. 13, 64 p. 1978

VICK, J.A., SHIPMAN, W.H., BROOKS, R. Jr. Beta adrenergic and anti-arrhythmic effects of cardiopep, a newly isolated substance from whole bee venom. **Toxicon**, v.12 n.2, p.139-44. 1974

WEMMER, D., KALLEMBACH, N.R. Assignments and structure of apamin and related peptides in bee venom. **Biochemistry**, v.22, p.1901-06, 1982

Lorenzo E. R. P. P. L. Dias Blattlin Briganti – Aluno

Prof. Dr. Mario Sergio Palma - Orientador