

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DOS COMPONENTES
ATIVOS PRESENTES NO VENENO DE ABELHA AFRICANIZADA**
Apis mellifera

FÁBIO DE OLIVEIRA

**Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.**

**Uberlândia, MG
Julho - 1994**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DOS COMPONENTES
ATIVOS PRESENTES NO VENENO DE ABELHA AFRICANIZADA
*Apis mellifera***

FÁBIO DE OLIVEIRA

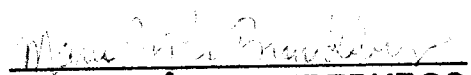
MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

**Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas.**

**Uberlândia, MG
Julho - 1994**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DOS COMPONENTES
ATIVOS PRESENTES NO VENENO DE ABELHA AFRICANIZADA**
Apis mellifera

APROVADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM ---/---/---


MARIA INÊS BRANDEBURGO
ORIENTADOR

MALCON A. M. BRANDEBURGO
(PRIMEIRO CONSELHEIRO)

MILTON VIEIRA COELHO
(SEGUNDO CONSELHEIRO)

Uberlândia, MG
Julho - 1994

Agradecimentos

A DEUS:

Ser Supremo que nos orienta tornando nossa capacidade mais acentuada.

DEUS...simplesmente o ponto básico de nossa existência.

A família, que de maneira carinhosa e bastante humana, teve grande compreensão aos meus compromissos.

A orientadora Maria Inês Homsí Brandeburgo que foi a orientação perfeita a mim dirigida.

Ao professor Malcon que gentilmente doou o material de trabalho, dando oportunidade a execução do mesmo.

Aos componentes do grupo "peçonha": Veridiana, Andreimar, Márcia, Gislaine, que com a união de idéias me levou a um ideal de luta.

Aos colegas de laboratório: Cristiane, Ricardo, Paula, Sérgio, Rodrigo, Fabiana, Valéria, Leandro, Osvaldo, Ana Cecília, James a divisão e a troca de aprendizado.

Aos conselheiros Malcon e Milton pela amizade e a colaboração para a realização deste trabalho

A Sebastiana e Cleuber pela colaboração dispensada a este trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas desta Universidade.

E a todos que tornaram mais amena esta batalha, para que fosse eficaz e consolidada...

Também as dedico.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
I-Introdução.....	1
II-Objetivo.....	18
III-Metodologia	
3.1. Obtenção do veneno.....	21
3.2. Fracionamento do veneno bruto de <i>A. mellifera</i>	22
3.2.1. Filtração em gel de Sephadex G-25.....	22
3.2.2. Filtração em gel de Sephadex G-25 com uréia.....	22
3.2.3. Filtração em gel de Sephadex G-50.....	23
3.2.4. Cromatografia de troca iônica em gel de SP Sephadex C-25.....	27
3.3. Determinação quantitativa de proteínas.....	24
3.4. Caracterização das atividades enzimáticas	
3.4.1. Atividade Fosfolipásica (PLA2).....	25
3.4.2. Atividade Coagulante sobre o plasma humano.....	26
3.4.3. Atividade Anticoagulante.....	26
3.4.4. Atividade Hemorrágica.....	27
3.4.5. Ensaio Hemolítico Direto.....	27
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sem agentes desnaturantes em pH ácido.....	29

IV-Resultados

4.1. Sistema de coleta.....	32
4.2. Coleta do veneno bruto de <i>A. mellifera</i>	33
4.3. Ensaio biológico do veneno bruto.....	34
4.4. Quantificação de proteínas.....	35
4.5. Atividade Hemolítica Direta.....	37
4.6. Fracionamento do veneno bruto	
4.6.1. Filtração em gel Sephadex G-25.....	38
4.6.2. Filtração em gel Sephadex G-50.....	41
4.6.3. Cromatografia de troca iônica em	
SP Sephadex G-25.....	43
4.7. Atividade Fosfolipásica (PLA2).....	45
4.8. Atividade Anticoagulante sobre o	
plasma humano.....	46
4.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	47

V-Discussão e Conclusão.....	49
------------------------------	----

VI-Referências Bibliográficas.....	57
------------------------------------	----

Resumo

As abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) apresentam um comportamento de defesa da colônia muito eficiente, respondendo agressivamente a qualquer perturbação que possa significar uma ameaça para a sua colônia. Essa característica tem provocado muitos acidentes, inclusive com vítimas fatais. O efeito do veneno é bastante complexo devido aos seus diferentes componentes, principalmente proteínas e peptídeos, sendo portanto necessário isolar e caracterizar cada um desses componentes individualmente para um melhor entendimento de seu mecanismo de ação. São objetivos do nosso trabalho: otimizar as condições para obtenção do veneno de *Apis mellifera*, desenvolver metodologia para seu fracionamento e caracterizar suas frações do ponto de vista estrutural e funcional. O veneno utilizado neste trabalho foi coletado em nosso laboratório, através de estimulações elétrica e armazenado em frascos escuros no congelador. Inicialmente o veneno bruto (VB) foi dissolvido em solução de NaCl a 0,9% (salina) e a dosagem de proteínas realizada pelo método do microbiureto, obtendo-se uma concentração de 4,6 mg/ml. Para a atividade hemorrágica, 100 µg de VB em 0,1 ml de salina foram injetados por via subcutânea no dorso de camundongo de aproximadamente 20 g. Após 5 horas os animais foram sacrificados, as peles removidas e a presença de halos hemorrágicos não foi observada na parte interna da pele. Nossos ensaios também demonstraram que o VB não apresentou

atividade coagulante. A atividade fosfolipásica foi determinada por titulação potenciométrica dos ácidos graxos liberados enzimaticamente com solução de NaOH, utilizando-se gema de ovo como substrato e encontrou-se que o VB apresentou uma atividade específica de 175 unidades/mg, correspondente a uma média de 02 ensaios. A atividade anticoagulante foi determinada pelo tempo de recalcificação do plasma humano, a 37⁰C. Nossos resultados mostraram que o VB tornou o plasma incoagulável. Também foi estudado o efeito do VB sobre hemácias humanas, onde verificou-se que o mesmo causou hemólise direta. Esta hemólise se dá devido a presença da melitina, o principal componente do veneno de abelhas. Seguindo com o nosso trabalho, realizamos um fracionamento de 58 mg do VB por filtração em gel de Sephadex G-25, com a obtenção de um único de obtenção a 280 nm, o qual se mostrou com atividade fosfolipásica e hemolítica. Finalmente, iniciamos um fracionamento de 103 mg do VB, por cromatografia de troca iônica em gel de SP Sephadex C-25 com a obtenção de cinco picos principais de absorbância a 280 nm, que foram denominados A₁ a A₅ respectivamente, e cinco picos menores. A atividade fosfolipásica foi observada nos picos A₁, A₂ e A₅, o que sugere a presença de três isoformas dessa enzima. A atividade hemolítica direta não foi encontrada em nenhuma das frações até agora. Já a atividade anticoagulante foi realizada sob duas formas: com o plasma pobre e rico em plaquetas. Nossos testes demonstraram que as frações A₁, A₂

e A₅ tornaram, tanto o plasma pobre quanto o rico, incoagulável, enquanto que para o ensaio rico em plaquetas, A₃ e A₄ mostraram que o tempo de recalcificação foi de aproximadamente o dobro daquele realizado com um controle (plasma + salina).

Introdução

As abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) apresentam um comportamento de defesa da colônia muito eficiente, respondendo agressivamente a qualquer perturbação que possa significar uma ameaça para a sua colônia. Essa característica tem provocado muitos acidentes, inclusive com vítimas fatais (BRANDEBURGO, 1992). A secreção de feromônios é considerada um dos principais estímulos que induz a essa atitude agressiva entre as abelhas operárias (GARY, 1974).

A maioria dos inimigos das abelhas melíferas são os insetos, muitos dos quais são da mesma ordem, Himenóptera e Lepidóptera, incluindo formigas, vespas e, naturalmente, abelhas melíferas de diferentes colônias, as quais são identificadas pelo cheiro. Uma única ferroada contém uma pequena quantidade de veneno, mas que pode ser letal a uma grande variedade de invertebrados. Para o homem, a picada de abelha é uma experiência desconfortável, mas em geral não acarreta maiores complicações até mesmo depois de ter sido picado por 10 a 20 abelhas.

Apesar do desconforto de uma única (ou algumas) ferroadas, um potencial terapêutico tem sido atribuído para o veneno de abelhas, particularmente para condições reumáticas e artríticas. O veneno tem sido utilizado em aplicações terapêuticas desde a antiguidade, com preparações de diferentes espécies de abelhas, sendo utilizado para o tratamento de dor de dente, pedras nos rins, doença nos olhos e gota. A "apiterapia" como é denominada, é ainda praticada em várias partes do mundo, particularmente no

leste Europeu, mas uma justificativa científica para a eficácia de tais terapias é ainda carente, apesar de numerosos esforços para identificar os componentes farmacologicamente ativos do veneno.

Estudos da composição do veneno de abelhas e as propriedades individuais dos componentes dão um entendimento da origem do desconforto da ferroada mas não, infelizmente, uma compreensão das propriedades terapêuticas aparentes.

Origem do veneno e método de coleta

As glândulas de veneno começam a funcionar logo após o aparecimento da fase adulta das abelhas operárias, sendo detectadas depois de três dias (PURSLEY, 1973) com o máximo de produção depois de duas a três semanas (KAISER e MICHL, 1958). A produção de veneno é completa dentro das duas primeiras semanas e então as glândulas começam a degenerar nas abelhas mais velhas (OWEN e BRAIDWOOD, 1974). Não só a idade afeta a composição do veneno mas também fatores relacionados com as estações do ano. No geral a quantidade de veneno das abelhas operárias é maior durante os dias de verão, quando há um aumento das atividades da colméia. A síntese dos diferentes componentes do veneno de abelhas não alcançam o máximo de suas produções simultaneamente (OWEN e BRAIDWOOD, 1974). Uma situação diferente existe com a abelha rainha, sua máxima produção de veneno ocorre logo após a sua eclosão. Isso se dá devido a necessidade do veneno para o

uso em batalhas com outras abelhas rainhas rivais, para garantir a supremacia da sua colônia (RACHNAYER et al, 1972).

A quantidade de veneno presente em abelhas operárias tem sido estimada ser entre 3 - 4 µl. É difícil obter todo o veneno de um único indivíduo e somente cerca de 0,5 - 1,0 µl do veneno pode ser extraído. O veneno de abelhas é constituído de 88% de água (O'CONNOR, 1978) e desse modo somente 0,1 µg do veneno seco pode ser extraído de cada abelha. É necessário cerca de 10.000 abelhas para produzir 1,0 mg de veneno cristalizado.

As técnicas já desenvolvidas para a obtenção do veneno compreendem a dessecação de todo o aparelho de veneno ou aplicação de pressão no abdômen, a qual resulta no aparecimento de uma gota na ponta do ferrão. Entretanto, para grandes quantidades de veneno, um método elétrico de extração foi desenvolvido por BENTON e MORSE (1966). As abelhas ao serem estimuladas por descargas elétricas ferrom uma película de plástico deixando depositado na superfície inferior da mesma gotículas do veneno líquido, que cristaliza alguns minutos depois. O veneno, quando secretado, é um líquido incolor e quando cristalizado torna-se um cristal de cor amarelo palha. Algumas preparações comerciais são marrons devido a foto-oxidação do triptofano das cadeias laterais das proteínas do veneno (BANK e SHIPOLINI, 1986). Tal material não é ideal para o estudo bioquímico e farmacológico.

Purificação dos componentes ativos presentes no veneno de abelhas:

O fracionamento do veneno é mais freqüentemente indicado para o isolamento de alguns componentes particulares com atividades biológicas específicas . Esta prática é adequada se há um interesse especial em um ou em outro componente . Se , por um lado , os efeitos biológicos do veneno bruto são importantes, por outro, sua purificação permite caracterizar suas frações do ponto de vista estrutural e funcional .

O veneno é composto por vários componentes, muitos dos quais são peptídeos e proteínas. É possível separar esses componentes uns dos outros fazendo o uso de suas diferentes propriedades físicas e químicas, a saber, tamanho (o qual está relacionado com o peso molecular), carga (uma proteína pode ser positivamente ou negativamente carregada) e hidrofobicidade (uma medida de afinidade com a água). É possível construir colunas de materiais que possam separar os componentes segundo cada uma destas propriedades. Esse é um procedimento comumente usado em bioquímica para a obtenção dos componentes puros do veneno (GAULDIE et al, 1976).

Propriedades das proteínas e peptídeos do veneno de abelhas:

Resposta alérgica:

Os constituintes de alto peso molecular, hialuronidase e fosfolipase, são capazes de iniciar uma forte resposta imune (KING et al, 1976). É provável que essas proteínas sejam responsáveis pela hipersensibilidade de alguns indivíduos. O principal componente do veneno de abelhas, a melitina, é um fraco alérgeno.

Uma pequena minoria de pessoas desenvolvem uma séria hipersensibilidade ao veneno. Existem casos em que uma única ferroada pode provocar um quadro de envenenamento, o qual pode resultar em morte devido ao choque anafilático (hipersensibilidade) (RICHES , 1982) . Inicialmente o inchaço local torna-se extensivo e com subseqüentes ferroadas torna-se mais difundido , eventualmente sendo acompanhado por náuseas , erupção da pele e dificuldades respiratórias . Tais pessoas com essas reações desenvolvem grande quantidade de anticorpos IgE e relativamente pouca quantidade de IgG (MULLER et al., 1972).

Hialuronidase:

Hialuronidase é uma enzima que hidrolisa um polímero viscoso, o ácido hialurônico, em fragmentos não viscosos contendo principalmente seções de quatro a seis unidades. (BARKER et al, 1963). O ácido hialurônico é o colágeno das substâncias dos tecidos, ele tem a propriedade de manter as células unidas. Quando destruído pela hialuronidase, os espaços entre as células se tornam não viscosos e portanto facilitam a penetração dos outros componentes do veneno de abelhas. Por essa razão a hialuronidase é denominada de "fator de difusão". Ela é o maior componente do veneno de abelhas, seu peso molecular é de 41.000 (KENENEY, 1984). Sua atividade ótima está em pH em torno de 4,0 a 5,0, que é o pH ótimo do veneno (HABERMANN, 1957). A quantidade de hialuronidase no veneno de abelha rainha é muito menor que o das abelhas operárias (OWEN, 1977).

O principal interesse na hialuronidase do veneno de abelhas está na sua associação com a hipersensibilidade e na ocorrência de choque anafilático.

Fosfolipase A2:

O termo fosfolipase A2 se refere a uma classe de enzimas que catalisa a hidrólise de resíduos de ácidos graxos provenientes de lecitina e substratos similares. A enzima é encontrada em venenos de serpentes, abelhas, escorpiões e em vários tecidos de mamíferos.

Sua sequência primária é constituída por uma cadeia simples de polipeptídeo formada por 128 resíduos de aminoácidos (SHIPOLINI et al, 1979), apresentando ligações cruzadas por quatro pontes de dissulfeto. A porção de carboidratos está ligada na posição 13.

A massa molecular calculada é de 14.555, aumentando para 15.800 quando a porção de carboidratos é incluída no polipeptídeo. Os altos valores aparentes são encontrados em gel de filtração (19.500) e análise de ultracentrifugação (38.500), presumivelmente devido aos efeitos dos componentes de carboidratos no tamanho aparente em solução aquosa e dimerização em altas concentrações. A molécula como um todo é carregada positivamente, com um ponto isoeletrico de 10,5. A enzima quando liofilizada e congelada é estável e pode ser armazenada por vários anos sem perda substancial de atividade.

A fosfolipase A2 destrói um dos principais blocos constituintes de todas as membranas biológicas, os fosfolipídeos. A enzima converte a forma cilíndrica dos fosfolipídeos em moléculas em forma de cone. A fosfolipase

do veneno de abelhas é a fosfolipase mais ativa conhecida (SHIPOLINI et al, 1971). É mais ativa que as fosfolipases de serpentes ou fosfolipase de pâncreas de mamíferos. Diferentemente da enzima pancreática, a enzima do veneno de abelhas pode penetrar nas membranas e então destruí-las. A eficiência das fosfolipase em lisar as células é marcadamente aumentada pela presença da melitina, o principal componente do veneno de abelhas (VOGT et al, 1970).

A fosfolipase A2 é importante clinicamente por ser o principal componente alérgeno do veneno total de abelhas. A alergia ao veneno é um exemplo extremo do tipo imediato de hipersensibilidade que pode fatal (BARNARD, 1973).

Acredita-se que a PLA2 tem um importante papel na patologia de várias doenças inflamatórias, incluindo pancreatite aguda (NEVALAINEN, 1980, 1988) e choque séptico (VADAS e PRUZANSKI, 1986). Vários modelos "in vivo" foram usados para testar a toxicidade da PLA2. (PRUZANSKI et al., 1986; BOMALASKI et al., 1971; MARSH e WHALER, 1980). MARTIKAIN e col. (1993) estudaram o efeito da toxicidade de PLAs2 de diversas origem. Somente a PLA2 de cobra apresentou efeitos tóxicos direto em cultura de células MCF 7. As PLAs2 de outras serpentes, abelhas e de pâncreas humano não apresentaram efeitos tóxicos. A possível toxicidade dessas PLAs2 "in vivo" requer adição de outros fatores para a atividade catalítica da PLA2.

Melitina:

É um polipeptídeo que representa cerca de 50% do veneno de abelhas (peso seco). Ele é um detergente natural contendo 26 resíduos de aminoácidos (HABERMANN, 1967), com parte predominantemente hidrofóbica em N-terminal e resíduos hidrofílicos em C-terminal. A molécula possui duas funções principais: a lise de membranas lipídicas, natural ou artificial (DUFOURE et al., 1986) e age sinergisticamente com a PLA2 do veneno de abelhas, aumentando a potencialidade dessa enzima. Ela possui propriedades surfactantes e anticoagulante (OUYANG et al., 1979). A molécula diminui a tensão superficial da água (HABERMANN, 1958) e mostra uma tendência de agregar-se em solução aquosa assumindo forma de tetrâmero (HABERMANN e REIZ, 1965). A massa molecular da melitina é de 2840, mas seu peso molecular, determinado por análise de ultra centrifugação, é de 12500 (GAULDIE et al., 1976), o qual é condizente com a forma tetramérica em solução aquosa concentrada com elevada força iônica (condição usada na ultra centrifugação). Está claro que em baixa concentração e baixa força iônica a molécula é monomérica. Não somente a alta concentração iônica favorece a formação de tetrâmero, mas fosfato e outros íons em solução têm sido descritos estabilizar a forma tetramérica (DRAKE e HIDER, 1979) com o íon fosfato sendo mais efetivo. Estudos realizados por BELLO e col. (1982) têm mostrado que a conformação monomérica da melitina é influenciada pelo pH.

com alto pH induzindo a formação de alfa hélice e favorecendo a agregação.

Muitos estudos foram realizados com o intuito de se esclarecer o mecanismo de ação lítica da melitina sobre as hemácias, a saber: se a hemólise é causada pela melitina monomérica, tetramérica ou por ambas. KNOPPEL e col. (1979) sugeriu que a disposição tetramérica, formada por ligação cruzada por reação com dimetilsuberamidato, era um agente em potencial de lise, assim como o peptídeo nativo. Segundo DE BONY e col. (1979) o tetrâmero se liga a micelas lipídicas da membrana. HABERMANN encontrou que o tampão fosfato, particularmente em altas concentrações (10 ug ml^{-1}), aumenta a atividade superficial da melitina sem alterar a atividade lítica desse peptídeo (HABERMANN e KOWALLEK, 1970). HIDER (1983) relatou que a forma tetramérica não é lítica, tendo mostrado que a hemólise não ocorre em presença de altas concentrações de fosfato (0.5 M). Entretanto, ele confirmou os achados de KNOPPEL que a melitina tetramérica, por ligação cruzada com reagentes específicos, era tão lítica quanto a sua forma nativa, em salina isotônica, mas a atividade lítica da melitina em ligação cruzada não era reduzida por altas concentrações de fosfato. HIDER interpretou essas observações sugerindo que o tetrâmero em ligação cruzada poderia ser um agregado mais forte que aquele presente na forma tetramérica nativa.

Quanto à utilização deste peptídeo como instrumento de pesquisa, podemos citar o trabalho de SMITH et al. (1988)

que observou que a melitina pode desestabilizar a membrana de células em cultura, permitindo que os núcleos sejam isolados com a membrana nuclear intacta e alta reatividade transcriptacional. Também é conhecido (GERST e SALOMON, 1987) o efeito antagonista da melitina sobre a calmodulina, um mediador envolvido na regulação e ligação do cálcio às proteínas do organismo. HAIT e col. (1985) verificaram que a melitina inibe o crescimento de células leucêmicas, devido a seu efeito inibidor sobre a calmodulina. Segundo PIPPIA e col. (1989) a melitina é capaz de estimular a transformação de células neoplásicas de tumores em ratos.

Apamina:

É o menor peptídeo constituinte do veneno, seu peso molecular é 2.000, e representa cerca de 2% do veneno total. Uma maior atenção tem sido dirigida a esse peptídeo no que diz respeito aos aspectos farmacológicos, a partir do momento que ele passou a ser associado a atividade do sistema nervoso central.

A sequência de aminoácidos da apamina, um octadecapeptídeo, foi determinada independentemente em dois laboratórios (HAUX et al., 1967; SHIPOLINI et al., 1967), com os trabalhos ingleses mostrando em C-terminal a histidina e mais tarde estabelecendo a posição das pontes dissulfeto.

A apamina não é lítica e não afeta grande número de

células de mamíferos. Entretanto, ela exerce influência em algumas membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico (JENKINSON, 1981). Assim como muitas neurotoxinas encontradas no veneno de serpentes, a apamina se liga com alta afinidade à receptores específicos como o canal de K^+ dependente de Ca^{+2} , em tecidos nervosos (LAZDUNSKI, 1983).

A apamina bloqueia muitos dos efeitos inibitórios de hiperpolarização incluindo alfa-adrenérgico, colinérgico e purinérgico. Sob condições normais, na presença de adrenalina, por exemplo, o canal de potássio se abre resultando no efluxo de K^+ levando a transformação do potencial de membrana. Na presença de apamina, esse canal é bloqueado e portanto o hormônio não pode concluir sua resposta. O canal de K^+ dependente de Ca^{+2} tem um importante papel na atividade repetitiva em neurônios de vertebrados e invertebrados (MEECH, 1978). A apamina bloqueia tais atividades.

Recentemente DEFENDINI e col. (1990) demonstraram que uma forte resposta imune policlonal pode ocorrer em coelhos após a injeção de apamina livre ou associada a soroalbobina bovina.

MCD-peptídeo:

Há muito tempo já se sabe que a histamina é o principal agente na resposta para a picada de abelhas, o vermelhidão, inchaço e dor local é típico de resposta mediada por histamina. O veneno de abelhas contém uma pequena quantidade de histamina para ser o maior contribuinte dessa resposta alérgica (MARKOVIK e REXOVA, 1963), mas a fosfolipase e a melitina, separada ou juntas, causam a liberação da histamina da pele por efeito citolítico. Ainda, sobre o efeito citolítico, outro componente do veneno de abelhas foi reconhecido por FREDHOLM (1966) como um potente degranulador de mastócitos, que é, um agente que induz a liberação de histamina proveniente dos grânulos das células de mastócitos, na qual ela está armazenada. O peptídeo foi primeiro isolado por BREITHAUPT e HABERMANN, (1968). Sua ação nos mastócitos da pele é sugerida por HIGGENBOTHAM e KARNELLA (1971) ser benéfica sendo que a heparina, que também é liberada na degranulação de mastócitos, pode complexar com as proteínas básicas do veneno e neutraliza o seu efeito tóxico.

Esse peptídeo tem mostrado possuir propriedades antiinflamatórias em ratos (BILLINGHAM et al., 1973).

Outros peptídeos (secapina, tertiapina, procamina):

Há muitos outros peptídeos encontrados no veneno de abelhas, muitos dos quais têm sido bem caracterizado. Alguns deles não são encontrados em todas as amostras do veneno e sua presença, portanto, varia com a raça ou subespécie de *Apis mellifera*. A secapina contém 25 aminoácidos e uma ponte dissulfeto (GAULDIE et al., 1976; VIASAK et al., 1984). Ela possui baixa toxicidade para os mamíferos e ainda pode estar presente no veneno em níveis acima de 2 %. A tertiapina possui 21 aminoácidos e duas pontes dissulfeto (GAULDIE et al., 1976; OVCHINNIKOV ET AL., 1980). A posição dessa ponte dissulfeto é tal que essa molécula forma uma estrutura tridimensional similar à da apamina e peptídeo MDC. Assim como a secapina, essa molécula é relativamente não tóxica para os mamíferos. Seu modo de ação ainda não está claro, mas ela tem sido descrita possuir atividade pré-sináptica (OVCHINNIKOV et al., 1980). Outros peptídeos que são homólogos à apamina têm sido isolados do veneno de abelhas melíferas européias. O mecanismo de ação desses componentes continua sob investigação (DOTIMAS, 1986). Uma série de peptídeos menores, a procamina, a qual possui 5 resíduos de aminoácidos tem sido isolado do veneno de abelhas melíferas canadenses (PECK e O'CONNOR, 1974), mas não em européias (BANKS e SHIPOLINI, 1986). Esses peptídeos possuem característica única de uma histamina em C-terminal. Tal como a secapina e a tertiapina essas moléculas possuem baixa

toxicidade para os mamíferos.

Muitos di e tripeptídeos estão presentes no veneno e juntos eles totalizam mais de 15 % do seu peso seco (REFXOVA e MARKOVIC, 1963). Muitas toxinas, incluindo a melitina, são secretadas pela glândula na forma de pro-toxina inativa (kreil, 1981). As pro-toxinas geralmente contém de 10-20 resíduos de aminoácidos a mais em N-terminal. Quando esse precursor é clivado a completa atividade da toxina é criada. Alguns desses pequenos peptídeos encontrados no veneno correspondem à parte da pro-seção da toxina secretada.

O uso dos componentes ativos do veneno de abelhas em biologia molecular e farmacologia:

Muitos dos polipeptídeos presentes no veneno de abelhas são moléculas compactadas fortemente, ricas em ligações de dissulfeto. Devido ao seu tamanho relativamente pequeno, eles têm um considerável potencial a ser estudado detalhadamente. De fato, os peptídeos do veneno de abelhas estão sendo comumente utilizados no estudo de cálculos de energia (FREMAN et al., 1986), estudo de ressonância magnética nuclear (WEMMER e KALLENBACK, 1983) e como modelo para as interações de membranas protéicas (TALBOT, 1982).

Quando as proteínas são sintetizadas dentro das células, elas são secretadas através da membrana e espontaneamente se dobras em uma estrutura precisa. Atualmente, o mecanismo desse processo não é completamente

conhecido. Tais conhecimentos serão ferramentas valiosas para o desenvolvimento da biologia molecular.

Testes Farmacológicos:

Alguns componentes do veneno de abelhas são capazes de se ligar especificamente e com alta afinidade à nervos e membranas musculares, em particular o peptídeo MCD (TAYLOR, 1984) e apamina (LAZDUNSKI, 1983). Tais moléculas podem ser usadas como marcadores específicos em ensaios farmacológicos. De fato, alguns aspectos importantes da farmacologia moderna estão agora relacionados à purificação de toxinas do veneno de abelhas. Essas toxinas podem ser usadas para a localização de proteína específicas, atualmente os receptores de apamina têm sido detectado em músculos de pacientes que sofrem distrofia muscular (RENAUD, 1986)

II- Objetivos:

O objetivo inicial deste trabalho foi obter o veneno de abelhas cristalizado, com elevado grau de qualidade e quantidade suficiente para realizar os fracionamentos. O veneno obtido foi analisado quanto ao perfil protéico eletroforético e atividades enzimáticas, sendo posteriormente fracionado e suas frações caracterizadas individualmente.

Foram testadas diferentes técnicas e condições de fracionamento, objetivando sempre estabelecer uma metodologia inicial simples e rápida, mas de alta eficácia, na separação das proteínas e peptídeos biologicamente ativos presentes no veneno de *Apis mellifera*.

III- Metodologia

3.1 Obtenção do veneno:

O veneno utilizado no trabalho foi coletado segundo uma metodologia inicialmente desenvolvida por BENTON e MORSE (1966) e aprimorado por BRANDEBURGO (1992), com algumas modificações.

O sistema envolve a instalação dentro da colméia de uma armação de madeira sobre a qual fios de aço estão esticados em intervalos de 6 mm. Um controlador de tempo dispara uma descarga elétrica de 8 volts em intervalo intermitente de 10 a 15 segundos. As abelhas são estimuladas por choque elétrico e ferrom uma película de plástico, ficando então depositado na superfície inferior da mesma o veneno líquido, o qual alguns minutos depois se cristaliza. O veneno é então raspado do plástico, ficando armazenado em recipiente de vidro escuro no congelador.

O compartimento de coleta é totalmente fechado, o que permite que a operação seja realizada com segurança uma vez que este método torna a colônia bastante agressiva.

3.2 Fracionamento do veneno bruto de *Apis mellifera*:

3.2.1 Filtração em gel de Sephadex G-25:

Foram dissolvidos 58 mg do veneno bruto em 2,0 ml de solução de ácido acético 0,01 M. A suspensão obtida foi centrifugada a 3.000 rpm durante 10 minutos. Uma alíquota de 200 μ l foi armazenada para ensaios enzimáticos posteriores e o restante foi aplicado em uma coluna (37x1,3 cm) de Sephadex G-25, equilibrada com a mesma solução. Frações de 2,0 ml foram coletadas, num fluxo de 30 ml/hora num coletor de frações BIO RAD a temperatura ambiente. A absorbância de cada fração coletada foi lida em 280 nm no espectrofotômetro BECKMAN.

3.2.2 Filtração em gel de Sephadex G-25:

O único pico obtido da filtração anterior (item 3.2.1) foi liofilizado e submetido a um segundo fracionamento em gel de Sephadex G-25 nas mesmas condições, porém à solução de ácido acético 0,01 M foi adicionado uréia 6 M e as frações foram coletadas num volume de 3,0 ml por tubo.

3.2.3 Filtração em gel de Sephadex G-50:

Cerca de 103 mg do veneno bruto de *Apis mellifera* foram suspensos em 1,5 ml de solução de ácido acético a 2,0 %. A suspensão obtida foi centrifugada a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Aliquotas de 80 µl do sobrenadante límpido foram retirados para dosagem de proteínas. O restante desse sobrenadante foi aplicado a uma coluna de Sephadex G-50 (37X1,3 cm) equilibrada com a mesma solução. Frações de 2,5 ml/tubo foram coletadas num fluxo de 25,0 ml/hora num coletor de frações BIO RAD a temperatura ambiente. A absorbância de cada fração coletada foi lida em 280 nm em um espectrofotômetro BECKMAN.

3.2.4 Cromatografia de troca iônica em gel de SP Sephadex C-25:

3.2.4.1 Preparação da resina:

À princípio a resina foi preparada segundo a indicação do fabricante. Após, utilizando-se de um sistema a vácuo em funil de placa sinterizada, a resina foi reciclada em 500 ml de NaOH 0,1 N, abaixando-se o pH da mesma para 7,0 com exaustivas lavagens com água destilada; repetiu-se a operação com 500 ml de HCl 0,1 N, ressuspensando o pH para 7,0 da mesma forma anterior. Finalmente a resina foi suspensa em tampão acetato de amônio 0,05 M pH= 5,0.

3.2.4.2 Fracionamento em gel de SP Sephadex C-25:

O material obtido do fracionamento anterior (item 3.2.3) foi reunido e liofilizado. A amostra foi ressuspenso em 2,0 ml de tampão acetato de amônio 0,05 M pH=5,0, centrifugado a 4.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente e aplicado a uma coluna de SP Sephadex C-25 (37x1,3 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída com um gradiente crescente de concentração do tampão (0,05 M a 2,0 M), e frações de 3 ml foram coletadas, num fluxo de 30 ml/hora, num coletor de frações BIO RAD. A absorbância de cada fração coletada foi lida em 280 nm, num espectrofotômetro BECKMAN.

3.3 Determinação quantitativa de proteínas:

As dosagens protéicas, em solução contendo 0,1 a 2,0 mg de proteínas, foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964).

A reta padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina, que apresenta um coeficiente de extinção $\epsilon_{10\text{ mg/ml}}^{278\text{ nm}}$ em 278nm de 0,666 (DOTY e GEIDUSCHC, 1953).

3.4 Caracterização das atividades enzimáticas:

3.4.1 Atividade fosfolipásica (PLA₂):

Ensaio por titulação potenciométrica:

Foi realizado segundo o método descrito por DE HAAS e col. (1968). Como substrato foi utilizado uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema para 50 ml de solução) em presença de desoxicolato de sódio e íons Ca^{++} . Para o ensaio, 10 ml da emulsão acima foram diluídos para 30 ml, sendo a concentração final de desoxicolato de sódio e CaCl_2 $2,7 \times 10^{-3}$ M e $6,0 \times 10^{-3}$ M, respectivamente. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com solução padrão de NaOH 0.0935 N em pH=8,0 e temperatura ambiente (28°C). A atividade fosfolipásica foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto e a atividade específica pelo número de microequivalentes de base consumida por minuto, por miligrama de proteína. Em cada ensaio foram utilizados 10 ug de proteínas.

3.4.2-Atividade coagulante sobre o plasma humano:

Foi realizada segundo ARAÚJO (1990), inoculando-se cerca de 1,0 ug do veneno bruto ou respectivas frações sobre 200 ul de plasma humano. O pronto aparecimento da rede de fibrina era indicativo de atividade coagulante.

3.4.3 Atividade anticoagulante:

Esta atividade foi realizada segundo ALVARADO e GUTIÉRREZ (1988). Para este ensaio foi preparado inicialmente o plasma humano rico em plaquetas, centrifugando-se o sangue a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4⁰C . Após a separação do plasma, este foi submetido a uma nova centrifugação, 4.000 rpm por 15 minutos a 4⁰C. Dessa forma obteve-se o plasma pobre em plaquetas

O teste foi realizado com cerca de 1,0 ug do veneno bruto ou respectivas frações sobre 200 ul de plasma humano (pobre ou rico em plaquetas) incubado a 37⁰C por 10 minutos. A seguir adicionou-se 100 ul de CaCl₂ 0,25 M e o tempo de recalcificação era determinado de acordo com um controle, contendo salina.

3.4.4 Atividade hemorrágica:

Esta atividade foi realizada segundo a técnica descrita por NIKAI et al. (1984). As amostras com cerca de 100,0 ug de veneno bruto eram injetadas num volume de 0,1 ml de salina por via subcutânea no dorso de camundongos machos de 20,0 g ligeiramente anestesiados com éter. Após 5 horas, os animais eram sacrificados, as peles removidas e era observada a presença de halos hemorrágicos, na face interna da pele.

3.4.5 Ensaio hemolítico direto:

3.4.5.1 Teste-1:

A atividade hemolítica direta do veneno total foi estimada utilizando-se somente eritrócitos lavados conforme descrito por GUTIÉRREZ e col. (1984). Para o preparo da suspensão de eritrócitos utilizou-se sangue humano colhido por punção venosa com citrato de sódio a 0,2 % (m/v) como anticoagulante. Após a separação do plasma por centrifugação, as hemácias foram lavadas por 3 vezes com soro fisiológico tamponado com fosfato de sódio pH=7,4, 0,01 M (PBS), a 3.000 rpm por 10 minutos. Com os eritrócitos assim lavados foi preparada uma suspensão a 2,5 % (v/v) em PBS. Para o ensaio cerca de 0,5 a 10 ug da amostra, era adicionada em 0,6 ml de suspensão de eritrócitos,

completando-se seu volume para 3 ml com PBS. Para o controle foi preparado um branco que não continha amostra (0% de hemólise) e um hemolisado total (100% de hemólise) colocando-se água destilada no lugar do tampão. Após 30 minutos a 37°C, os tubos foram centrifugados por 5 minutos em centrífuga de mesa e as absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas a 540 nm.

3.4.5.2 Teste-2:

Este ensaio foi realizado segundo AZILA e OHTMAN (1990), com algumas modificações:

As hemácias foram preparadas como descrito no ensaio anterior (item 3.4.5.1). Uma suspensão de hemácias (3 - 5 %) foi preparada e padronizada para em hemólise total, apresentar uma absorbância de 0,6 em 540 nm. 200 µl da suspensão de eritrócitos foram incubados com até 100 µl da solução-teste, durante 30 minutos a 37°C. Os tubos foram suavemente homogeneizados para equilíbrio após a adição da amostra. Ao final do tempo de incubação, 1,6 ml de PBS foram adicionados e as amostras centrifugadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante, que indica a quantidade de hemoglobinas liberadas, foi lida a 540 nm. Para acompanhar o perfil da atividade hemolítica dos efluentes das colunas de separação, a atividade foi estimada em porcentagem. Como controle (branco) foi utilizado 100 µl de PBS. A hemólise total (100%) foi obtida com 50 µl de triton x- 100 (0,1% v/v).

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sem agentes desnaturantes em pH ácido:.

Foi realizada uma PAGE a 15 % (m/v), segundo metodologia descrita por REISFELD et al. (1962), com algumas modificações.

Gel de empilhamento a 2,5% em acrilamida.

Soluções estoques	Volume (ul)
Água desionizada	2.000,0
Acetato de potássio 1N pH 6,8	400,0
Acrilamida:Bis (1:0,25)	800,0
TEMED	5,0
Persulfato de amônio (10%)	75,0

Gel de separação a 15% em acrilamida.

Soluções estoques	Volume (ul)
Água desionizada	750,0
Acetato de potássio 1N pH 4,3	750,0
Acrilamida:Bis (30:0,2)	1.500,0
TEMED	50,0
Persulfato de amônio (0,28%)	3.000,0

A solução do eletrodo era constituída de Beta-Alanina e ácido acético pH 4,3, 0,35M, sendo diluída 10 vezes no momento do uso.

As amostras eram dissolvidas em 50 ul de água desionizada a 10% de glicerol.

O tempo de corrida foi determinado pela fucsina básica (indicador) e a eletroforese foi realizada em temperatura ambiente e corrente constante de 20 mA, obtida de uma fonte de eletroforese BIO-RAD MODEL 1000/500 POWER SUPPLY.

Após as eletroforeses terem sido realizadas, os géis foram corados por aproximadamente 10 minutos em Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1% (p/v) dissolvido em água-metanol-ácido acético (40:50:10 v/v) e o excesso desta solução corante foi retirada com água-etanol-ácido acético (60:30:10 v:v). Em seguida, os géis foram secados em papel celofane previamente umedecido com água destilada.

IV Resultados

4.1 Sistema de coleta.

A figura abaixo mostra o sistema de coleta por nós utilizado para obtenção do veneno bruto de *Apis mellifera*.



Sistema de coleta do veneno de abelhas.

4.2 Coleta do veneno bruto de *Apis mellifera*.

Inicialmente extraímos o nosso material de trabalho, o veneno bruto de *A. mellifera* a partir de duas colméias situadas em nosso laboratório, como descrito no item 3.1. Durante os meses de setembro e outubro/1993, as abelhas não foram alimentadas, enquanto que em janeiro/1994, elas foram alimentadas com açúcar (melado).

TAB. 01 Quantidade de veneno coletado por estimulação elétrica de duas colméias com população média de 50.000 abelhas cada. Choque de 8,0 volts aplicados com duração de 10 segundos em intervalos de 15 a 20 segundos.

MÊS	TOTAL DE ESTIMULAÇÕES	TEMPO MÉDIO DE ESTIMULAÇÕES(min)	QUANTIDADE TOTAL DO VENENO COLETADO(mg)	QUANTIDADE MÉDIA DO VENENO COLETADO/min DE ESTIMULAÇÃO
09/93	19	7,2	24,7	0,18
10/93	12	6,0	10,2	0,14
01/94	18	6,0	70,2	0,65

4.3 Ensaios biológicos do veneno bruto.

Depois do veneno coletado e seco, foram retiradas alíquotas para a realização de alguns ensaios biológicos. Esses resultados estão mostrados na tabela 02.

TAB. 02 Atividades hemolítica, hemorrágica, anticoagulante, coagulante e fosfolipásica presentes no veneno bruto de *Apis mellifera*.

Atividade biológica	veneno bruto
hemolítica direta	presente
hemorrágica	ausente
fosfolipásica	presente
anticoagulante	presente
coagulante	ausente

4.4 Quantificação de proteínas.

A quantificação de proteínas das amostras foi realizada segundo o método do Microbiureto como descrito no item 3.4 da metodologia. A padronização da técnica foi realizada utilizando-se de soroalbumina bovina e a curva padrão obtida é mostrada na Fig.1.

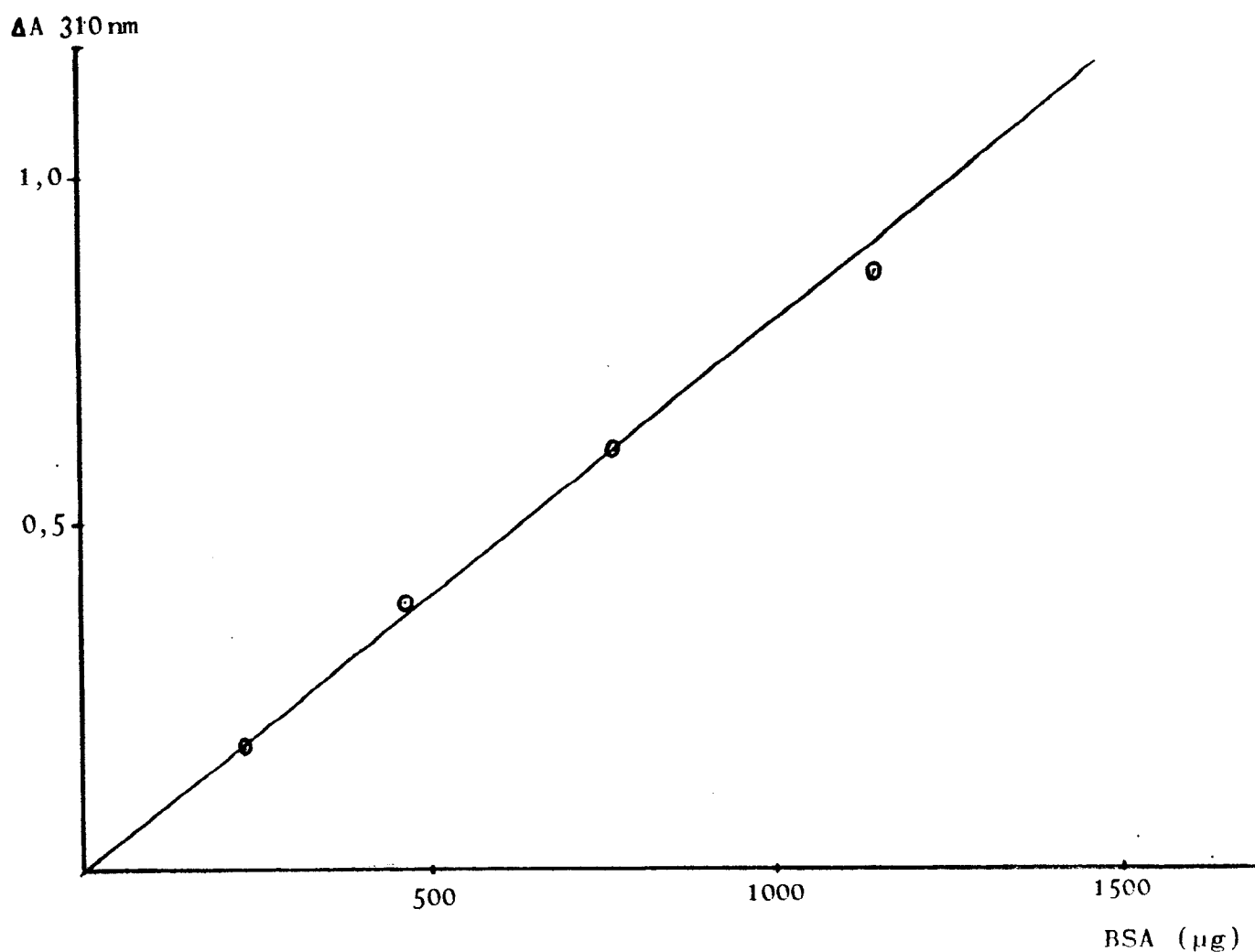


FIG.01 Curva padrão para dosagens de proteínas pelo método do microbiureto com soroalbumina bovina; reagentes: R1 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 1,05% e NaOH a 38%) e R2 (NaOH a 30%).
Leitura em absorbância a 310 nm.

4.5 Atividade hemolítica direta.

Para a atividade hemolítica direta foram realizados dois testes como descrito no item 3.5.5.

TAB.03 Análise comparativa da atividade hemolítica direta, do veneno bruto de *A. mellifera*, realizada com as técnicas descritas por GUTIÉRREZ e col., (1984)-teste 1 e AZILA e OHTMAN, (1990)-teste 2.

VENENO BRUTO (ug)		HEMÓLISE (%)
TESTE 1	TESTE 2	
13,4	2,5	100,0

A partir dos dados mostrados na tab.03 verificamos que o teste 2 é muito mais sensível que o teste 1. Deste modo passamos a realizar somente o teste 2, para o veneno bruto e suas frações.

TAB.04 Atividade hemolítica direta* sobre o veneno bruto de *A. mellifera*

VENENO BRUTO (ug)	HEMOLISE (%)
0.5	12.6
1.0	27.2
1.5	86.0
2.0	89.7
2.5	100.0

* Atividade hemolítica direta realizada segundo AZILA e OHTMAN (1990)-teste 2.

4.6 Fracionamento do veneno bruto:

4.6.1. Filtração em gel de Sephadex G-25:

A figura 02 mostra o perfil obtido na filtração de 58 mg do veneno bruto em gel de Sephadex G-25, eluído com ácido acético 0,01 M. Obteve-se somente um pico que foi submetido a uma nova filtração conforme descrito no item 3.2.2, utilizando-se porém como solução de eluição ácido acético 0,01 M em uréia 6 M. A figura 3 mostra os resultados desta nova filtração. Onde se pode observar que novamente foi obtido um único pico de absorbância a 280 nm.

Os ensaios efetuados nestes dois picos provenientes das duas filtrações realizadas, indicaram presença de PLA2 (testada como descrita no item 3.4.1) e de melitina (ensaiada como descrito no item 3.4.5.2).

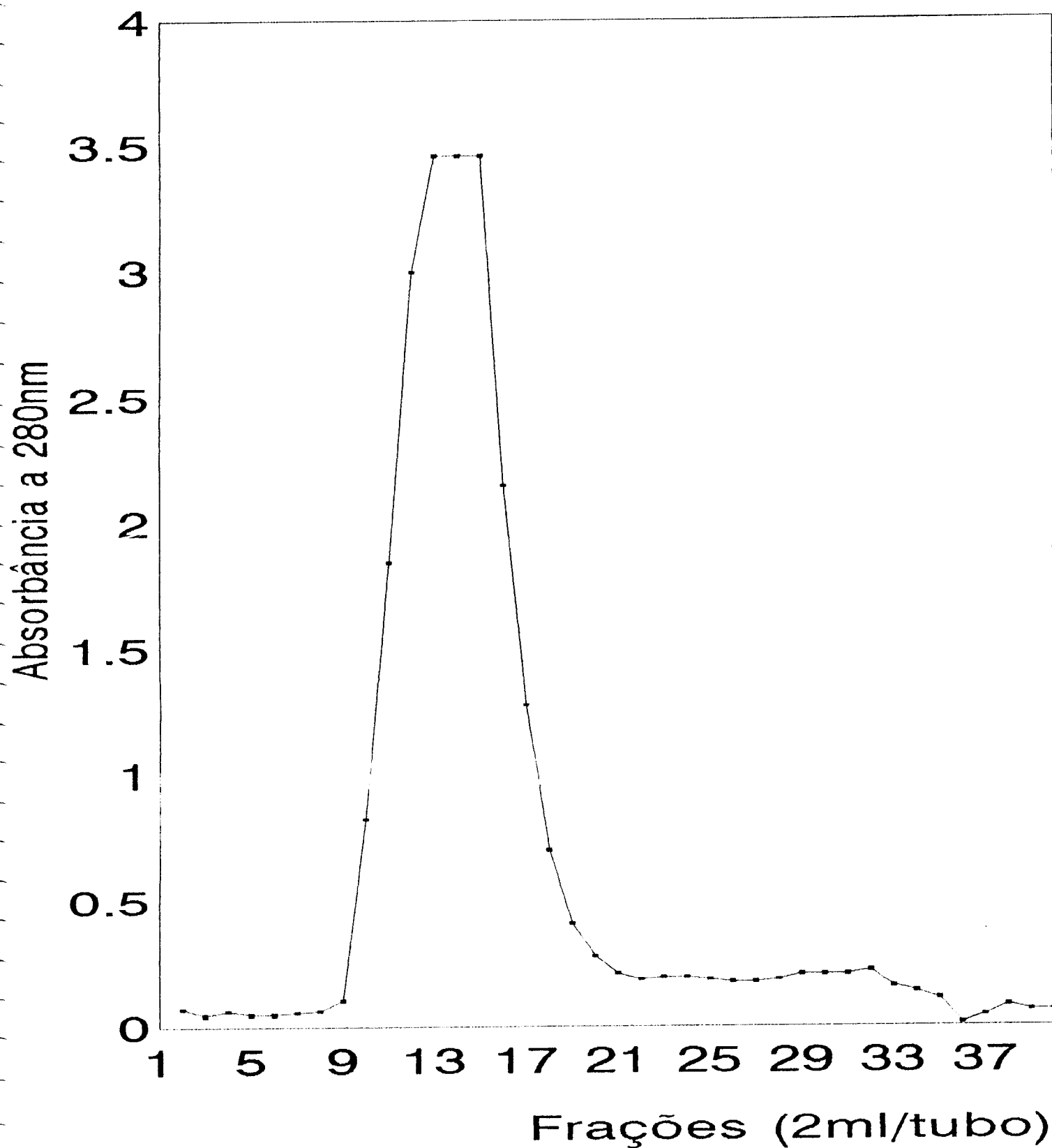


Fig 2: Filtração em Sephadex G-25 de 58 mg do veneno bruto de *A. mellifera*. Fluxo de 30ml/h, frações 2ml/tubo; temperatura ambiente; eluída com solução de Ácido acético 0.01M.

— ABS(280 nm)

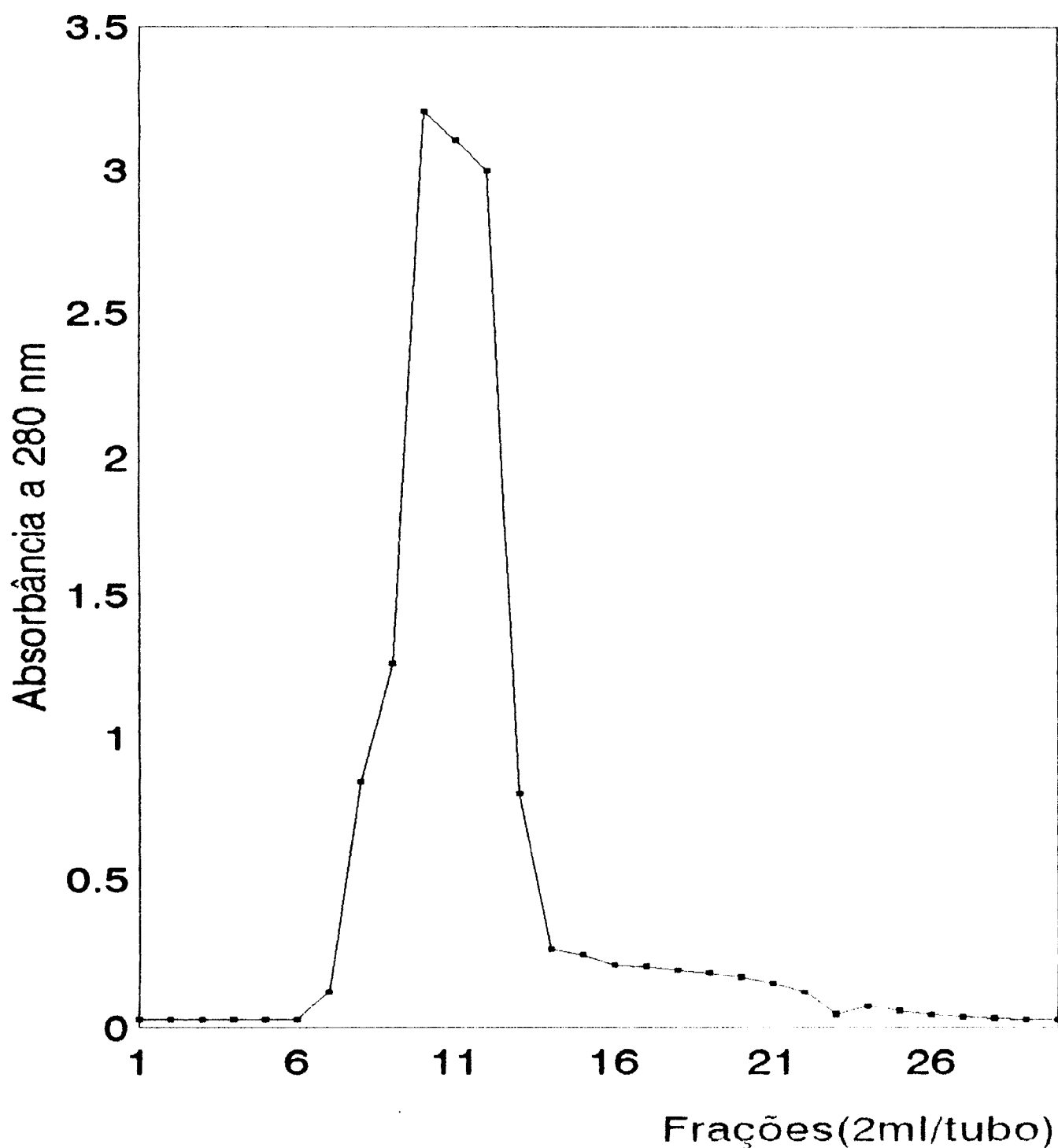
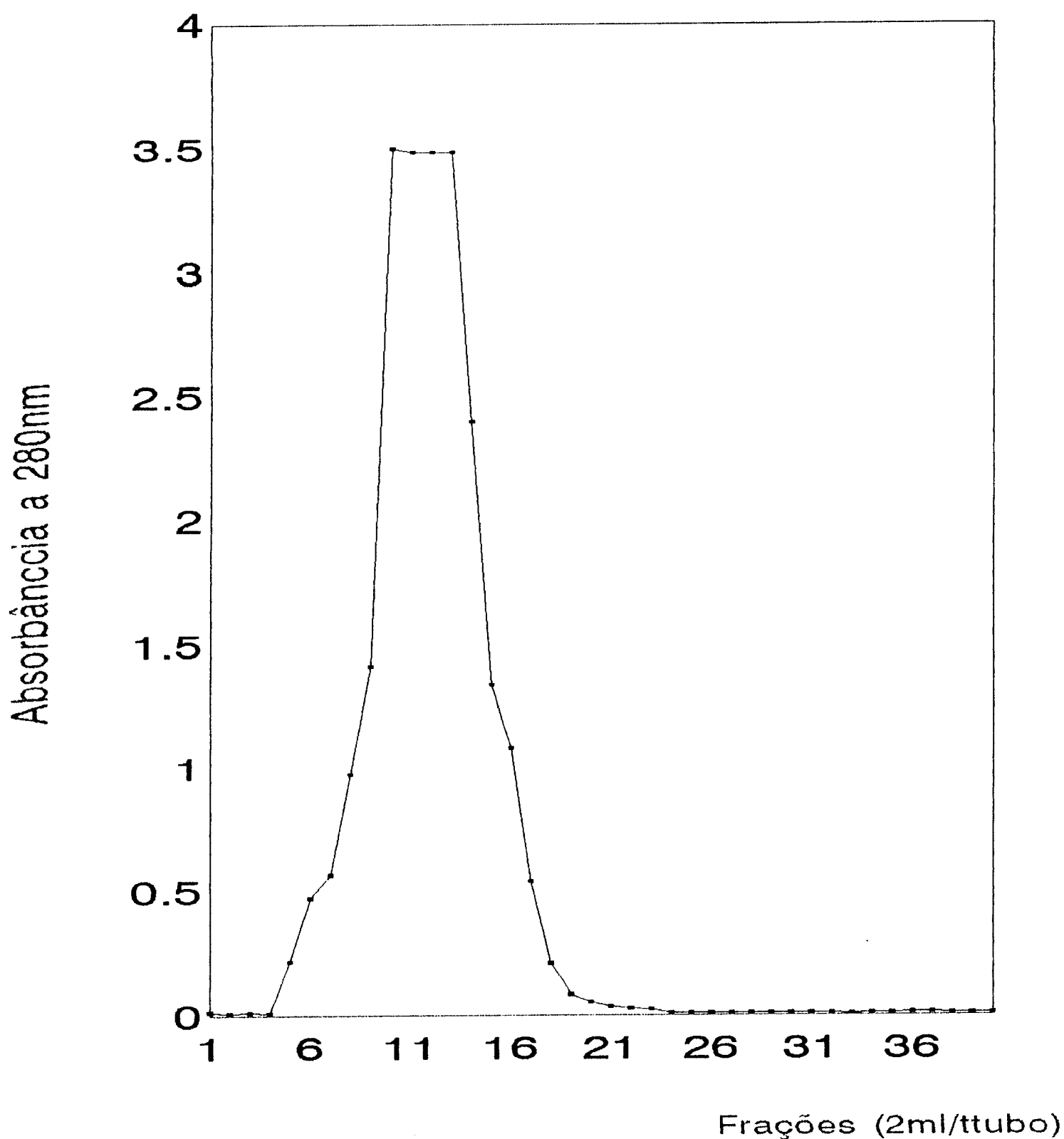


Fig 3: Filtração em Sephadex G-25 de 58 mg do veneno bruto de *A. mellifera*. Fluxo 30 ml/h, fração 3ml/tubo, temperatura ambiente, eluída em solução de Ácido acético 0.01M e Uréia 6M.

4.6.2. Filtração em gel de Sephadex G-50.

A figura 04 mostra o perfil obtido na filtração de 103 mg do veneno bruto em gel de Sephadex G-50, eluído com solução de ácido acético a 2 %. O único pico obtido, apresentou atividade PLA2 e hemolítica direta.



Filtração em Sephadex G-50 de 103 mg do veneno bruto de *A. mellifera*. Fluxo de 25ml/h, frações 2,5ml/tubo, temperatura ambiente; eluída com ácido acético à 2%

—•— Absorbância

4.6.3. Cromatografia de troca iônica em SP Sephadex C-25:.

A figura 05 mostra o perfil cromatográfico de 103 mg de veneno bruto em SP Sephadex C-25, onde houve resolução de cinco frações principais, denominadas A₁ a A₅, que foram testadas quanto a presença de PLA2, dando os resultados apresentados na tabela 5. As frações A₃ e A₄ não apresentaram atividade PLA2 e a fração A₅ que apresentou a maior atividade específica, mostra um fator de purificação de 4,4 vezes em relação ao VB.

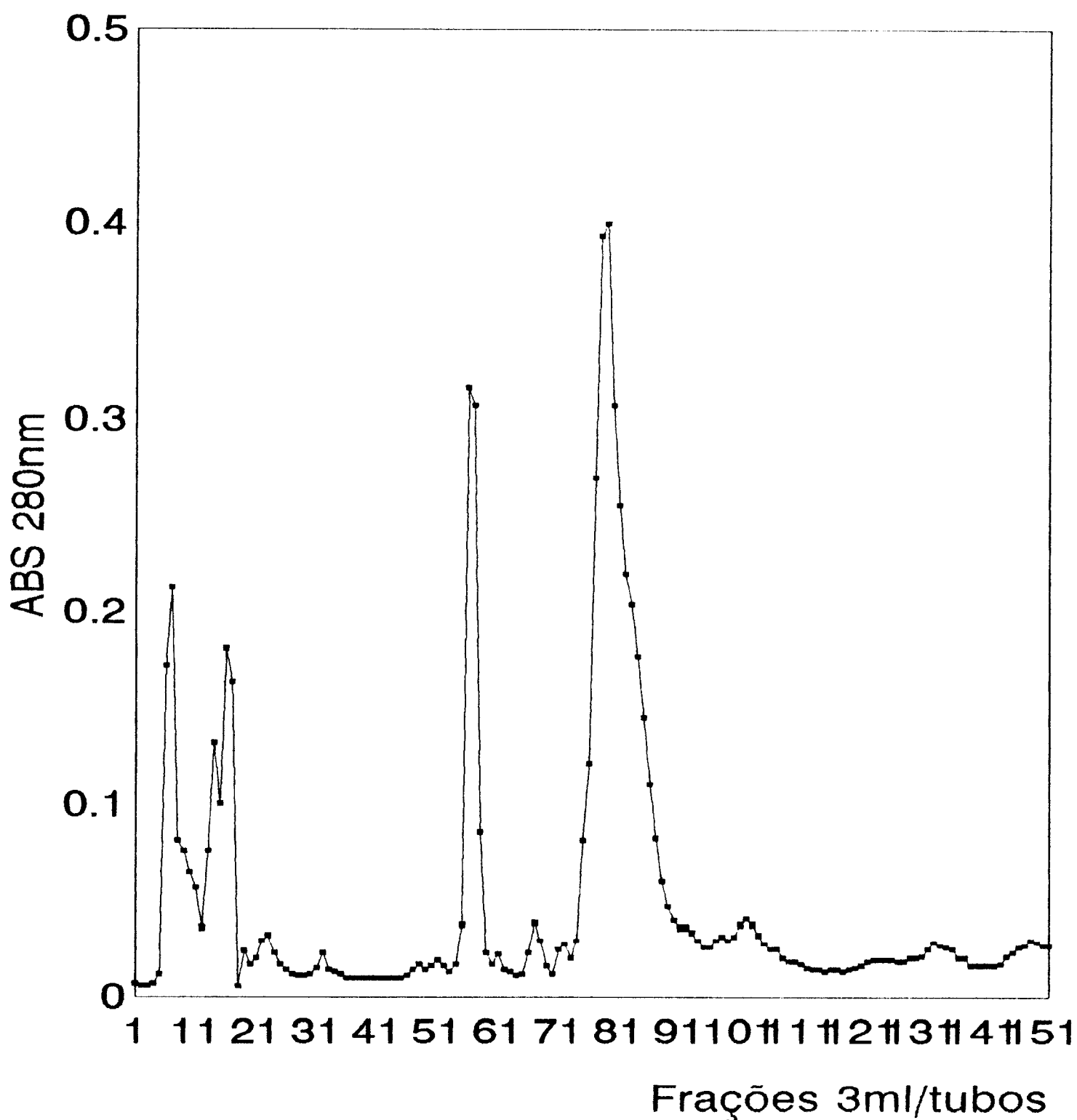


Fig 5: Cromatografia em Gel de SP- Sephadex C-25, de 103 mg do veneno bruto de *A. mellifera*. Fluxo de 30ml/h, 3ml/tubo; temperatura ambiente; tampão Acetato de Amônio em gradiente de concentração (0.05M a 2.0M)

Series 1

4.7 Atividade fosfolipásica (PLA2).

TAB 05. Ensaio potenciométrico da atividade fosfolipásica do veneno bruto de *Apis mellifera* e suas respectivas frações

AMOSTRA	QUANT. PROTEÍNAS*	ATIV. ESPECÍFICA
	(ug)	(unid./mg/min.)
VB	8,19	175,0
A ₁	15,92	62,8
A ₂	10,0	42,0
A ₅	1,0	777,8

* Dosagem de proteínas realizada pelo método do microbiureto. Estes resultados se referem à média de 2 ensaios.

4.8 Atividade anticoagulante sobre o plasma humano.

Para a atividade anticoagulante utilizamos o plasma humano rico e pobre em plaquetas. Os resultados estão mostrados na tabela abaixo.

TAB. 06 Atividade anticoagulante sobre o plasma humano rico e pobre em plaquetas do veneno bruto de *Apis mellifera* e suas frações.

AMOSTRAS	TEMPO DE RECALCIFICAÇÃO (min)	
	Plasma rico	Plasma pobre
Controle	4,0	8,6
VB	> 45,0	> 45,0
A ₁	> 45,0	> 45,0
A ₂	> 45,0	> 45,0
A ₃	8,5	8,7
A ₄	9,0	8,7
A ₅	> 45,0	> 45,0

Estes resultados se referem à média de 2 ensaios.

4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida.

A figura 06 mostra o perfil eletroforético obtido quando os venenos brutos de *Apis mellifera* e *Bothrops jararacussu* são submetidos à eletroforese no sistema para proteínas básicas (PAGE-Básica).

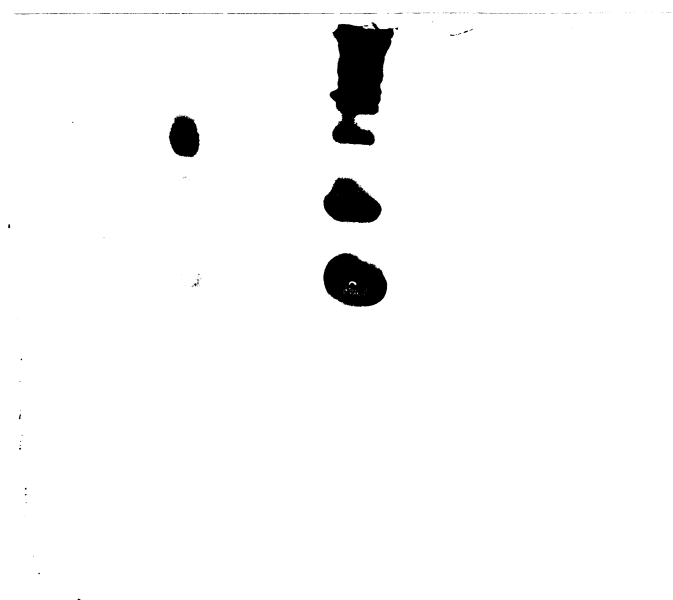


Fig. 06- Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% sem agentes desnaturantes.

Condições: tampão acetato de potássio 0,49 M, pH= 4,3

tampão do eletrodo: Beta-alanina/ácido acético 0,034 M, pH= 4,5.

corrida: 30 min. a 20 mA constante.

corante: Coomassie Blue G-250 (0,2% em água: metanol, 1:1 v/v (corado por duas horas).

descorante: ácido acético a 7%.

amostras: 1- VB *A. mellifera*

2- VB *B. jararacussu*

A figura 07 mostra o perfil eletroforético obtido quando o veneno bruto de *Apis mellifera* é submetido à PAGE-Básica.

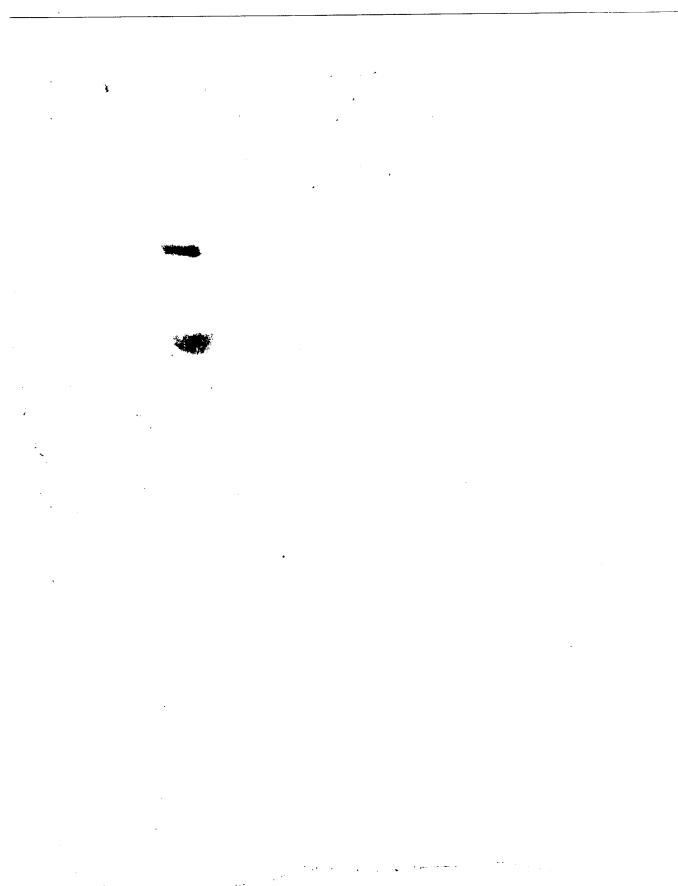


Fig.07 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% sem agentes desnaturantes.

Condições: ídem a fig.09.

Amostra: VB de *A. mellifera*.

V -DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de métodos práticos e seguros para a obtenção do veneno bruto da abelha africanizada *Apis mellifera*, determinação de atividades biológicas presentes e posterior fracionamento do mesmo para uma melhor caracterização de seus componentes.

O nosso material de trabalho, veneno bruto de *Apis mellifera*, foi coletado a partir de duas colméias situadas em nossos laboratórios, segundo método já descrito anteriormente por BRANDEBURGO (1992). A extração do veneno se deu durante todo o período de trabalho. Com sucessivas estimulações elétricas, cerca de duas extrações ao dia, notamos que o rendimento do veneno coletado foi diminuindo com o passar do tempo. Em contrapartida, quando alimentamos as abelhas com açúcar (melado), o rendimento foi surpreendentemente maior (tab. 01). O mês de janeiro de 1994 refere-se ao período de alimentação das colméias. De posse do veneno coletado e seco iniciamos alguns ensaios enzimáticos. Para a realização de tais ensaios, o veneno bruto foi dosado pelo método do microbiureto que apresenta sensibilidade entre 0,1 e 2,0 mg de proteína/2,0 ml de solução (fig.08). Para a dosagem do veneno bruto (fig. 01) houve a necessidade de filtrar as amostras, visto que, dosagens anteriores apresentaram-se com resultados não condizentes com a técnica descrita, uma vez que as mesmas, em presença do reagente R2 (NaOH a 30,4%), parecem precipitar.

Nossos ensaios demonstraram que o veneno de abelhas

apresenta atividade PLA_2 . Estes resultados estão em concordância com os dados da literatura que descrevem a presença de PLA_2 , numa variedade de fontes incluindo veneno de serpentes e bactérias, sendo que a PLA_2 de veneno de abelhas tem sido descrita como principal constituinte enzimático e alergênico deste veneno, representando cerca de 10 a 18 % de seu peso seco (SHIPOLINI, 1971).

Estudos comparativos realizados em nosso laboratório demonstram que PLA_2 do veneno de abelhas tem uma atividade muito mais elevada que a de serpentes botrópicas.

Não foi detectada atividade coagulante sobre o plasma humano. Inicialmente essa atividade foi realizada à temperatura ambiente e, posteriormente, a $37^{\circ}C$. Em nenhuma dessas condições houve o pronto aparecimento da rede de fibrina, que era indicativo de atividade coagulante. Também não foi detectada atividade hemorrágica uma vez que para essa atividade foram utilizados 100 μg do veneno bruto sem que houvesse o aparecimento de halos hemorrágicos. Em contraposição, para o veneno de *B. neuwiedi paulocensis* (jararaca pintada) 20 μg do veneno eram suficientes para o surgimento de hemorragias (RODRIGUES, V. M., comunicação pessoal). A presença dessas toxinas para o veneno de abelhas também não se encontra descrita na literatura. Por outro lado, verificamos que o veneno bruto de abelhas apresentou atividade anticoagulante e os fatores anticoagulantes isolados até agora, do veneno de serpentes, são classificados em duas categorias: uma que não apresenta

atividade enzimática e a segunda que apresenta atividade PLA2 básica.

A atividade hemolítica direta observada "in vitro" é atribuída a melitina. Esse peptídeo tem a propriedade de lisar as células vermelha do sangue causando 100 % de hemólise em concentrações com até 10 ug/ml (tab. 04). É a porção hidrofóbica da melitina que se liga a membrana causando o enfraquecimento e subsequente quebra da estrutura. A melitina tem sido utilizada por pesquisadores como instrumento valioso nas investigações científicas de fenômenos biológicos específicos, que não estão diretamente relacionados com seus efeitos em mamíferos (CHOI et al., 1992; MIX et al., 1984; FLETCHER et al., 1992).

Iniciamos o fracionamento do veneno bruto pela técnica de cromatografia de filtração em gel. A amostra é aplicada à uma coluna constituída de grãos de poros feitos de um polímero insolúvel altamente hidratado. Moléculas pequenas podem entrar nesses grãos, mas não as grandes. O resultado é que as moléculas pequenas distribuem-se tanto na solução aquosa dentro dos grãos quanto entre eles, enquanto as moléculas grandes se localizam só na solução entre os grãos. As moléculas grandes fluem mais rapidamente por esta coluna e emergem primeiro porque há um volume menor acessível a elas (STRYER, 1992).

Realizamos um fracionamento de 58 mg do veneno bruto, por filtração em gel de Sephadex G-25 com a obtenção de um único pico de absorbância a 280 nm. Esse gel tem uma

resolução para moléculas de peso molecular entre 1.000 a 5.000 daltons. Dessa forma pretendíamos separar a melitina (2.840 daltons) e outros peptídeos menores dos demais constituintes do veneno bruto. O perfil do gráfico está mostrado na figura 02. O aparecimento de um único pico indica que não houve separação dos componentes do veneno de abelha. Isto se deve ao fato de que, provavelmente, as proteínas e peptídios presentes no veneno estavam agregados. Este único pico foi reunido em um "pool", liofilizado e submetido a um segundo fracionamento em gel de Sephadex G-25, nas mesmas condições anteriores. Agora, porém, a solução de eluição estava numa concentração 6M de uréia. A uréia como agente desagregante, inibidora de ponte de hidrogênio, foi utilizada para separar os diferentes componentes do veneno bruto. Para o segundo fracionamento obtivemos uma resolução semelhante à do primeiro (Fig. 03). Realizamos, também, um terceiro fracionamento de 103 mg do veneno bruto em gel de Sephadex G-50. Este gel foi utilizado porque possui uma maior faixa de separação (1.500 a 30.000 daltons). Assim sendo, era esperado um melhor fracionamento dos constituintes do veneno, visto que o mesmo possui componentes de vários tamanhos, desde 20.000 (PLA2) até 2.000 daltons (apamina). O perfil cromatográfico ainda não se mostrou satisfatório, haja visto que os componentes do veneno parecem permanecer agregados (fig. 04). O resultado obtido não está de acordo com a literatura. SHIPOLINI (1971) em seus experimentos demonstrou a presença de 8 picos

utilizando o mesmo tipo de gel e nas mesmas condições por nós trabalhada, porém uma diferença deve ser ressaltada. Ele aplicou o veneno depois de submetê-lo à uma diálise. Nós não realizamos esse procedimento para evitar possíveis perdas dos constituintes menores do veneno. O único pico obtido em cada fracionamento foi testado para atividades PLA2 e hemolítica direta.

Finalmente realizamos o fracionamento de 103 mg do veneno bruto liofilizado em cromatografia de troca iônica em gel de SP Sephadex C-25 com a obtenção de cinco picos principais de absorbância a 280 nm, denominados de A1 a A5 respectivamente, e cinco picos menores (fig. 05). O princípio do fracionamento por troca iônica se baseia em interações eletrostáticas. Dependendo do pH do tampão de eluição e do pI das moléculas, elas adquirem cargas diferentes, de acordo com sua natureza. Trocadores catiônicos têm afinidades por moléculas com carga líquida positiva. Uma proteína com carga positiva ligada a coluna pode então ser liberada pelo aumento da concentração do tampão de eluição. Os íons competem com os radicais com carga positiva da proteína pela ligação à coluna (STPYER, 1992).

A atividade fosfolipásica foi observada nos picos A1, A2 e A5 (tab.05), o que sugere a presença de três isoformas desta enzima. A atividade hemolítica direta não foi encontrada em nenhuma das frações testadas até agora. No intuito de se localizar a melitina, foram realizados novos

ensaios hemolíticos segundo uma metodologia descrita por AZILA e OHTMAN (1990) com algumas modificações. Este ensaio (tab.03) se mostra mais sensível do que o apresentado por GUTIÉRREZ et al. (1984). Segundo HIDER (1983), a melitina em altas concentrações de íons assume a forma tetramérica e não é lítica. Nossos ensaios demonstraram que a atividade lítica da melitina é influenciada pela alta concentração de acetato de amônio (2 M), tampão usado para eluir as frações.

Já a atividade anticoagulante inicialmente realizada com o plasma rico em plaquetas foi encontrada em todas as frações. As frações A3 e A4 apresentaram um tempo de recalcificação de aproximadamente o dobro daquele realizado com o controle (plasma + salina); enquanto que as frações A1, A2 e A5 tornaram o plasma incoagulável. Para o ensaio pobre em plaquetas, as frações A3 e A4 não apresentaram atividade anticoagulante, enquanto que A1, A2 e A5 mostraram o mesmo resultado obtido para o ensaio de plasma rico em plaquetas (tab.06).

As plaquetas são importantes mediadores na coagulação sanguínea. Quando estimuladas elas aderem aos vasos sanguíneos danificados e a seguir umas às outras de modo a formar um "tampão" que pode parar sangramentos menores. Dessa forma, as plaquetas assumem um importante papel na coagulação sanguínea e deste modo a concentração dessas células está diretamente relacionada a mensuração dos processos coaguláveis (VOET, 1990). Portanto o ensaio para detectar componentes anticoagulantes é melhor evidenciado

com o plasma pobre em plaquetas. Assim, somente as frações A1, A2 e A5 tornaram o plasma incoagulável. É interessante observar a relação entre a ação anticoagulante sobre o plasma humano e a presença das PLAs2, visto que ambas as atividades se mostraram presentes nas mesmas frações.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada exaustivamente em diferentes condições e não apresentou boa resolução para o veneno de abelhas e suas frações. O melhor resultado foi o mostrado nas figuras 06 e 07 (PAGE, pH ácido), onde encontramos 6 bandas. A falta de reagentes apropriados impediram que obtivéssemos resultados melhores.

Estamos realizando trabalho de colaboração em nosso laboratório utilizando inicialmente o veneno de abelhas e posteriormente suas frações como ferramentas na caracterização de miosinas isoladas de músculo cardíaco esquelético ou de cérebro de coelhos.

A utilização destas toxinas como instrumento de pesquisa é um campo aberto e inesgotável na tentativa de elucidar os mecanismos de ação de fenômenos biológicos.

VI-Referências Bibliográficas:

- ALVARADO, J.; GUTTEREZ, J. H. (1988). Anticoagulant effect of myotoxin phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* **36(2B)**: 563.
- ARAÚJO, A. L. (1990). Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- BACHMAYER, H.; KRELL, G.; SUCHANEK, G. (1972). Synthesis of promelittin and melittin in the venom gland of queen and worker bees: patterns observed during maturation. *Journal of Insect Physiology* **18**: 1515.
- BANKS, B. E. C.; SHIPOLINI, R. A. (1986). Chemistry and pharmacology of honeybee venom. In: *Venom of the hymenoptera* ed. L. Piek. London: Academic Press, 329.
- BARKER, S. A.; BAYYUK, S. I.; BRIMACOMBE, J. G.; PALMER, D. J. (1963). Characterization of the products of the action of the bee venom hyaluronidase. *Nature*, **199**: 693.
- BARNARD, J. H. (1973). Allergic and pathologic finding in fifty insect sting fatalities. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **52**: 259.

- BELLO, J.; BELLO, H.R.; GRANADOS, E. (1982). Conformation and aggregation of melittin: dependence on pH and concentration. **Biochem.**, **21**:461.
- BENTON, A. W.; MORSE, R. A. (1966). Collection of the liquid fraction of the venom. **Nature**, **210**: 652.
- BILLINGHAM, M. E. J.; MORLEY, J.; HANSON, J. R.; SHIPOLINI, R. A.; VERNON, R. A. (1973). An anti-inflammatory peptide from bee venom. **Nature** (London), **245**: 163.
- BOMALASKI, J. S.; LAWTON, P.; BROWNING, J. L. (1991). Human extracellular recombinant phospholipase A2 induce an inflammatory response in rabbit joints. **Journal Immunol.**, **146**: 3904.
- BRANDEBURGO, M. A. M. (1922). A safe device for extracting from venom honeybees (*Apis mellifera*). **Bee World**, **73**(3): 128.
- BREITHAUP, H.; HABERMANN, E. (1968). Histamin- und Histaminogegensubstanz: ein histaminogegensubstanz- und histaminogegensubstanz-degranulierendes peptide (MCD Peptide) und Biogenoff: Isolierung, biochemische und pharmakologische Eigenschaften. Naunyn-Schmiedeberg. **Arch. Pharmakol. Exp. Pathol.**, **261**: 252.

- BROADMAN, J. (1962). **Bee venom—The natural curative for arthritis and rheumatism.** New York: Putnam.
- CHANG, Y. H.; BLIVEN, M. L. (1979). Antiarthritic effect of bee venom. **Agents and Actions**, **9**: 205.
- CHOI, O. H.; PADGETT, W. L.; DALFY, J. W. (1992). Effects of the amphipathic peptides melittin and mastoparan on calcium influx, phosphoinositide breakdown and arachidonic acid release in rat pheochromocytoma PC12 cells. **Journal Pharmac. exp. Ther.**, **260**: 369.
- DE BONY, J.; DUFOURCQ, J.; CLIN, B. (1979). Lipid-protein interaction: NMR study of melittin and its binding to lysophosphatidyl choline. **Biochim. Biophys. Acta**, **552**: 531.
- DE HAAS, G. H.; SLOTBOOM, A. J.; ROUSEL, P. P. H.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L. J. H.; MARIJNIX, S.; PUTGSERVER, A.; DLOUHA, V.; DESPUETTE, P. (1968). Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. **Biochim. Biophys. Acta**, **221**: 31.

DEFENDINI, M. L.; BAIRAQUI, E. H.; LARBI-JULIÉ, C.;
REGNIER-VIGOUROUX, A.; EL AYER, H.; VAN RIECKHOVEN, J.;
ROCHA, H.; GRANIER, C. (1990). Identification of
antigenic residues on apamin recognized by polyclonal
antibodies. **Molec. Immun.**, **27**: 37.

DOTIMAS, E. M. (1986). **Isolation, structure and action of bee
venom components**. University of Essex, UK: ph.D. thesis.

DOTY, P.; GEIDUSCHEK, E. P. (1953). In **The proteins**
(Neurath, H. and Bailey, K. Eds), **I-A**: 434.

DRAKE, A. F.; HIDER, R., C. (1979). The structure of
melittin in lipid bilayer membranes. **Biochem. Biophys.**
Acta, **555**: 371.

DUFOURC, E. J.; SMITH, I.C.P.; DUFOURCQ, J. (1986).
Biochem., **25**: 6448.

FAUCON, J. F.; DUFOURCQ, J.; LUSSAN, C. (1979). The self-
association of melittin and its binding to lipids. **FEBS**
Lett, **102**: 187.

FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S. (1992). Activation of tissue phospholipases C and D by a snake venom cardiotoxin and bee venom melittin. In: **Recent Advances in Toxinology Research**, 2: 215-221 (GOPALAKRISHNAKONE, P.; TALL, G. K., Eds.). Singapore: Venom & Toxin Research Groups, National University of Singapore.

FREDHOLM, B. (1966). Studies on the histamine release effects of bee fractions and compound 48/80 on skin and lung tissue in the rat. **Acta Physiol. Scand.**, 76:288.

FREEMAN, G.; CATLOW, C. R. A.; HEMMINGS, A. M.; HIDER, R. C. (1986). The conformation of apamin. **FEBS Letters**, 197: 289.

GARY, N. E. (1974). Pheromones that affect the behaviour and physiology of honey bees. In : **Pheromones**, ed. M. C. BIRCH. Amsterdam: N. Holland, 200.

GAULDIE, J.; HANSON, J. M.; RUMJANEK, F. D.; SIPOLINI, R. A.; VERNON, C. A. (1976). The peptide components of the venom. **European Journal of Biochem.**, 61: 369.

GAULDIE, J.; HANSON, J. M.; SIPOLINI, R. A.; VERNON, C. A. (1978). The structure of some peptides from bee venom. **European Journal of Biochem.**, 83: 405.

- GERST, J. E.; SALOMON, Y. (1987). Inhibition by melittin and fluphenazine of melanotropin receptor function and adenylete cyclase in M2R melanoma cells membranes. **Endocrinology**, 121(5): 1766.
- GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. (1984). Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, 22: 115.
- HABERMANN, E. (1957). Eigenschaften und Anreicherung der Hyaluronidase Von Bienengift. **Zeitschrift für Biochemie**, 329: 1
- HABERMANN, E. (1958). Zur Wirkung tierischer gifte und von lysolecithin auf grenzflächen. nZ. **Gesante Exp. Med.**, 130: 19.
- HABERMANN, E.; REIZ, K. G. (1965). **Biochem. Z.**, 341: 451
- HABERMANN, E.; JFNTSCH, J. (1967). Sequenzanalyse des melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie**, 348: 37.

- HABERMANN, E.; KOWALLEK, H. (1970) .Modification der amino gruppen und des tryptophans in melittin als mittel zur erkenntung von struktur-wirkungs beziehungen. **Z. Physiol. Chem.**, **351**: 884.
- HABERMANN, E. (1972). Bee and wasp venoms: The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. **Science**, **177**: 314.
- HATT, W. N.; GRATS, L.; BENZ, C.; CORMAN, F. C. (1985). Inhibition of grow of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: phebenothiazines and melittin. **Cancer Chemother Pharmacol.**, **14**(3): 202.
- HAUX, P.; SOWENTHAL, H.; HABERMANN, E. (1967). Sequenzanalyse des Bienegift-neurotoxins (Apamin) aus seinen tryptischen und chymotryptischen Spaltstücke. **Z. Physiol. Chem.**, **348**: 737.
- HIDER, R.C.; KHADER, F.; TATHAM, A.S. (1983). Lytic activity of monomeric and oligomeric melittin. **Biochim. Biophys. Acta**, **778**:206.
- HIGGINPODH, R.D.; KARNELLA, S. (1971). The significance of the mast cell response to bee venom. **Journal Immunol.**, **106**: 233.

HOLLANDER, J. L. (1941). Bee venom in treatment of chronic arthritis. **American Journal of Medical Science**, 21: 318.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. (1964). A micro-bimol method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, 9 : 401.

JENKINSON, V.H. (1981). Peripheral actions of apamin. **Trends Pharmacol. Science**, 231.

KATSER, E.; MICHL, H. (1958). **Die Biochemie der Tieschen Gifte**. Vienna: Deuticke

KEMENEY, D. M.; DALTON, N.; LAWRENCE, A. J.; PEARCE, F. L.; VERNON, C. A. (1984). The purification and characterization of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. **European Journal of Biochem.**, 139: 217.

KING, T. P.; SOBOTKA, A. K.; KOCHOUNATH, I.; LICHTENSTEN, L.M. (1976). Allergens of honey bee. **Arch. of Biochim. and Biophys.**, 172 :661.

KNOPPEL, E.; EISENBERG, D.; WICKNER, W. (1972). Interactions of milittin, a preprotein model, with detergents. **Biochem.**, 18: 4177.

KREIL, G. (1981). Transfer of proteins across membranes.

Annual Review of Biochem., 50: 317.

LAZDUNSKI, M. (1983). Apamin a neurotoxin specific for one class of calcium-depedent potassium channels. **Cell**

Calcium, 4: 421.

MARSH, N. A. and WHALER, B. C. (1980). The effects of honey bee (*Apis mellifera*) venom and two of its constituents, melittin and phospholipase A₂ on the cardiovascular system of the rat. **Toxicon**, 18: 427.

MARTIKAINEN, P.; NYMAN, K.; NEVALAINEN, T.J. (1993). Toxic effects of human pancreatic and snake and bee venom phospholipases A₂ on MEC-7 cells in culture. **Toxicon**, 31: 835.

MEECH, R. W. (1978). Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. **Annual Review of Biophysic and Bioengineering**, 7: 1.

MIX, L. L.; DINERSTEIN, R. J.; VILLEREAL, H. L. (1984). Mitogens and melittin stimulate an increase in intracellular free calcium concentration in human fibroblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commum.**, 119: 62.

- MULLER, U.; JOHANSSON, S. G. O.; STRELL, O. (1972). Hymenoptera sting hypersensitivity: IgE, IgG and haemagglutinating antibodies to bee venom constituents in relation to exposure and clinical reaction to bee sting. **Clinical Allergy**, **8**: 267.
- NEVALAINEN, T. L. (1980). The role of phospholipase A2 in acute pancreatitis. **Scand. J. Gastroenterol**, **15**: 641.
- NEVALAINEN, T. L. (1988). Phospholipase A2 in acute pancreatitis. **Scand. J. Gastroenterol**, **23**: 897.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. (1984). Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* (Wesster diamondback rattlesnake). **Arch. Biochim. Biophys.**, **231**: 309.
- O'CONNOR, R.; HENDERSON, G.; NELSON, D.; DABBER, R.; PECK, M. L. (1967). The venom the honey bee (*Apis mellifera*): general character. In: **Animal Toxins**, ed. L. F. Russell, R. Sauder. New York: Pergamon Press, 17.
- O'CONNOR, R.; PECK, M. L. (1978). Venoms of Apidae. In: **Handbook of Pharmacology**, Arthropod Venoms, ed. S. Bellini, **48**: 613.

- OUYANG, C.; LIN, S.-C.; TENG, C.-M. (1979). Anticoagulant properties of *Apis mellifera* (honey bee) venom. *Toxicon*, 17: 197.
- OWEN, M. D.; BRAIDWOOD, J. L. (1974). A quantitative and temporal study of histamine and histidine in honey bee (*Apis mellifera* L.) venom. *Canadian Journal of Zoology* 52: 387.
- OWEN, M. D. (1979). Relationship between age and hyaluronidase activity in the venom of queen and worker bees *Apis mellifera*. *Toxicon*, 17: 94.
- OVCHINNIKOV, Y. A.; MIROSNIKOV, A. I.; KHOFILIN, A. B.; KOSTINA, M. B.; BOIKOV, V. A.; MAGAZANIK, I. G.; GOTOIF, I. M. (1980). Structure and presynaptic activity of tertiapin, a neurotoxin from bee venom (*Apis mellifera*). *Bioorganicheskaya Khimiya*, 6: 359.
- PECK, M. L.; O'CONNOR, R. (1974). Procaine and other basic peptides in the venom of the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22: 51.
- PIPPA, P.; SCIOLA, L.; MELONI, H. A.; BARNI, S.; TILLOCA, G. (1989). Adesione cellulare in fibroblasti di ratto: effetto dei tumor promoters. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 65(5): 453.

- PRUZANSKI, W.; VADAS, P.; FORNASTER, V. (1986). Inflammatory effect of intradermal administration of soluble phospholipase A2 in rabbits. **Journal. Invest. Dermat.**, **86**: 380.
- PURSLEY, R. E. (1973). Stinging Hymenoptera. **American Bee Journal**, **113**: 131.
- RENAUD, J. F.; DESNUELLE, C.; SCHMID-ANTONARCTI, H.; HUGHES, M.; SERRATRICE, G.; LAZDUNSKI, M. (1984). Expression of apamin receptor in muscles of patients in the myotonic muscular dystrophy. **Nature**, **319**: 678.
- REXOVA, L.; MARKOVIC, O. (1963). Chemical characterisation of some low-molecular components of honey bee posion. **Chemické Zvesti**, **17**: 884.
- RICHES, H. R. C. (1982). Hypersensitivity to bee venom. **Bee world**, **63**: 7.
- SHIPOLINI, R.A.; BRADBURY, A.F.; CALLEWAERT, G.L.; VERNON, C.A. (1967). The struture of apamin. **Chem. Commun.**, 679.
- SHIPOLINI, R. A.; CALLEWAERT, G. L.; COTTERELL, R. C.; DOONAN, S.; VERNON, C. A.; BANKS, R. F. C. (1971). Phospholipase A from bee venoms. **European Journal of Biochem.**, **20**: 459.

- SHIPOLINI, R. A.; CALLEWAERT, G. L.; COTTREL, R. S.; DOONAN, S. VERNON, C. A. (1979). The amino acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A₂ from bee venom. **Europe Journal Biochem.**, 48: 465.
- SMITH, P. J.; FRIED, M. H.; SCOTT, B. J.; VON HOLT, C. (1988). Isolation of nuclei from melittin-destabilized cell. **Anal Biochem.**, 162: 390.
- STRYER, L. (1992). **Bioquímica**. Traduzido por JOÃO PAULO DE CAMPOS, LUIZ FRANCISCO MACEDO, PAULO ARMANDO MOTTA. 3^aed., Guanabara Koogan.
- TALBOT, J. C.; LALANNE, J.; FAUCON, J. P.; DUFOURCA, J. (1982). Effect of state of association of melittin and phospholipids on their reciprocal binding. **Biochim. Biophys. Acta**, 689: 106.
- TAYLOR, J. W.; BIDARDE, J. N.; LAZDUNSKI, H. (1984). The characterization of high-affinity binding sites in rat brains for mast cell-degranulating peptide from bee venom using the purified mono-iodinated peptide. **Journal of Biological Chemistry**, 259: 13957.
- VADAS, P.; PRUZANSKI, W. (1986). Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. **Lab. Invest.**, 55: 391.

VLASAK, R.; UNGER-ULHAHN, C.; KRIEL, G.; FETSCHAUER, A. H.
(1983). Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for
honey bee pre-promelittin. **European Journal of Biochem.**,
135: 123.

VLASAK, R.; KRIEL, G. (1984). Nucleotide sequence of cloned
cDNA coding for preposecapiin, a major product of queen-
bee venom gland. **European Journal of Biochem.**, **145**: 279.

VOET, D.; VOET, J. G. (1990). **Biochemistry**. John Wiley &
Sons, Inc.

VOGT, W.; PATZER, P.; LEGER, L.; OLDIGS, H.; WILHE, G. (1970).
Synergism between phospholipase A and various peptides
and SH reagents in causing haemolysis. **Naunyn-
Schmiedebergs Archiv fur Pharmakologie**, **265**: 442.

WEMMER, D. and KALLERBÄCK, H. R. (1981). Assignment and
structure of apamin and related peptides in bee venom.
Biochem., **22**: 1901.

ZURIER, R. B.; HEDDER, H.; BLOOMGARDEN, D.; WEINSHALL, G.
(1973). Effect of bee venom on experimental arthritis.
Annal Rheumatic Diseases, **32**: 466.