

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO VENENO DE ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*) SOBRE
CEPAS DE *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

GIOVANI HIDEO TUTIHASHI

**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 1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DO VENENO DE ABELHAS AFRICANIZADAS (*Apis mellifera*) SOBRE
CEPAS DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***

GIOVANI HIDEO TUTIHASHI

MALCON ANTÔNIO MANFREDI 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 1995

CEPAS DE *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

Aprovada pela comissão examinadora em 13/04/75

John H. Brown

Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

Orientador

[Signature]

Lindalva de Fátima Davi Rabelo

1º Conselheiro

J. M. L.

Geraldo Batista Melo

2º Conselheiro

Uberlândia - MG

Julho 1995

CANTON
...
...
Romulo
...
...
...
...

Dedico este trabalho,

à Deus, que nos ampara em seu imensurável coração todos os dias, guiando-nos sempre no caminho da humildade e do amor

à minha família, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis, com carinho, respeito e gratidão

ao Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo pela orientação e pelo melhor amigo que eu poderia ter

Agradecimentos,

Aos conselheiros, Lindalva e Geraldo, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos professores Warwick E. Kerr, Ana Maria Bonetti, Angela M. Beicher e Vivian Reis Silva e Rocha, pelo incentivo a este trabalho.

Aos meus amigos Andreimar, Lisandra e Kely pelo convívio e compreensão.

Aos alunos e funcionários dos Laboratórios de Microbiologia e Genética, em particular ao Ricardo, Claudete e Gerson, pelo companherismo.

A todos os professores dos Departamentos de Biociências e Ciências Fisiológicas, pelo conhecimento transmitido.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho

... muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo.....	iv
Introdução.....	01
Metodologia.....	11
1.0 - Veneno da <i>Apis Mellifera</i>.....	12
1.1 - Obtenção do veneno.....	12
1.2 - Esterilização do veneno.....	12
1.3 - Grupo controle de esterilização do veneno.....	12
2.0 - Métodos bacteriológicos.....	13
2.1 - Obtenção das amostras de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	13
2.2 - Teste de viabilidade das amostras.....	13
2.3 - Preparo dos meios do cultivo para repique das amostras.....	14
3.0 - Amostragem	14
4.0 - Preparo dos meios de cultivo contendo veneno.....	15
5.0 - Concentrações de veneno.....	16
6.0 - Verificação do crescimento bacteriano em meio de cultivo com veneno.....	16
Resultados.....	17
Discussão.....	21
Conclusão.....	25
Referências Bibliográficas.....	27

RESUMO

Para a maioria dos inimigos naturais das abelhas melíferas, o seu veneno tem ação letal, porém, no homem, os efeitos podem ser desde uma pequena dor sem consequências até um quadro clínico grave de alergia por hipersensibilidade aos seus componentes. No entanto, aplicação terapêutica do veneno é praticada desde a antiguidade persiste até os dias atuais, embora, não haja relatos científicos que comprovem sua aplicação farmacológica. Por outro lado, bactérias altamente resistentes causadoras de muitas doenças estão em emergência, uma vez que as maioria das drogas existentes, já não tem surtido efeito como agente antimicrobiano. Assim sendo, este trabalho se propõe a avaliar o efeito bactericida do veneno de *Apis mellifera* em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (MRSA) em concentrações de 50, 75, 90 e 100ug/ml e 100, 125, 150 e 175ug/ml, respectivamente. O veneno foi coletado das colméias através de extração elétrica. Verificamos inicialmente, a possibilidade de esterilizar o veneno por meio de radiação ultra-violeta, que demonstrou ser ineficaz, nesse sentido, ao se aplicar o mesmo em meio de cultivo agar-sangue impedindo o desenvolvimento de bactérias mas, não o de fungos. Observou-se também neste procedimento, alteração da coloração do meio de cultivo (provavelmente hemólise) causada pelo veneno. Este método foi utilizado por não alterar a estrutura química do veneno. O veneno foi aplicado em 25 amostras de *E. coli* (sendo 1 o controle ATCC 25922) e de *S. aureus* (MRSA)(1 controle ATCC 25923). O cultivo das amostras em meio com veneno, revelou que 95,2% das cepas são resistentes às diferentes concentrações do mesmo e que 4,8% não apresentaram resistência. Estas diferenças podem indicar que as cepas resistentes possuam um mecanismo de defesa mais aprimorado que as cepas não-resistentes. A lise das últimas é, possivelmente, devida a ação de alguns dos componentes do veneno de abelha, como a

fosfolipase A₂ que digere os fosfolípídeos da membrana celular ou a melitina que provoca um afinamento na mesma ou ainda a ação em conjunto destes dois componentes.

INTRODUÇÃO

O VENENO DA *Apis mellifera*

As abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) possuem um aparelho de peçonha que é parte essencial do mecanismo de defesa da colônia, sendo que a ação de picar ocorre com mais frequência nos arredores da colméia (STORT, 1974). Os inimigos devem ser reconhecidos rapidamente e um número de fatores estão envolvidos no processo de reconhecimento como os estímulos visuais, sonoros e odoríferos. O feromônio isopentilacetato é um dos principais sinais de alarme no comportamento agressivo das abelhas (GARY, 1974).

A maioria dos inimigos das abelhas melíferas são os próprios insetos, muitos dos quais são da mesma ordem Hymenoptera, incluindo vespas, formigas, mamangabas e, é claro, abelhas melíferas de diferentes colônias, as quais são identificadas pelo cheiro. Uma simples picada contém uma pequena quantidade de peçonha que pode ser letal a uma ampla variedade de invertebrados. Embora no homem a ferroadada seja uma desconfortável experiência, pessoas não-sensíveis não apresentam complicações mesmo após serem picadas por 10 a 20 abelhas.

Segundo FREYVOGEL & PERRET (1973), venenos são produtos metabólicos, produzidos e acumulados em vários órgãos, que afetam quando ingeridos naturalmente ou quando aplicados artificialmente por via parenteral, enquanto peçonhas são compostos produzidos em glândulas especializadas que atuam parenteralmente até por simples contato mas, quando ingeridas podem não ter efeito, pois são destruídas por enzimas digestivas. No entanto, não há diferença na aplicação de um termo ou de outro, uma vez que a única distinção existente é a conceitual.

O veneno é secretado pela glândula de veneno, conhecida como ácida, mas que na realidade possui uma secreção básica (LELLO, 1968).

Esta glândula consiste de um par de tubos convolutos longos e finos, situados na parte posterior da cavidade abdominal (SNODGRASS, 1956). Estes túbulos se unem formando um duto comum que se abre no saco de veneno, o qual serve apenas como um órgão reservatório da substância secretada até que seja utilizada pela abelha no ato de picar. O reservatório liga-se à base do ferrão através de um tubo semelhante ao restante da glândula. Desembocando próximo à base do ferrão fica a glândula de Dufour, constituída por um tubo convoluto, curto e alargado. O conteúdo dessa glândula não se mistura com o da glândula de veneno; crê-se que funcione principalmente na construção de ninhos (LELLO 1968). Ocorre ainda uma terceira, de função desconhecida, constituída por duas massas de células glandulares depositadas sobre a superfície interna das paredes superiores das placas quadradas (estrutura do ferrão); cada célula tem um duto que desemboca fora das placas (SNODGRASS, 1956; BENTON, 1965). A exteriorização do veneno produzido pela glândula, dá-se através do ferrão, que funciona como um órgão de injeção.

O aparelho de ferrão é um ovopositor modificado, logo apenas as fêmeas o possuem.

Quando as abelhas picam superfícies elásticas, como por exemplo, a pele humana, perdem o ferrão juntamente com parte do intestino e do último segmento abdominal. A morte da abelha ocorre em poucas horas por exaustão ou perda contínua de hemolinfa que não apresenta agentes coagulantes capazes de impedir seu fluxo.

O veneno das abelhas têm encontrado aplicação terapêutica desde a antiguidade com preparados de diferentes espécies de abelhas para o tratamento de odontalgia, nefrolitíase, conjuntivites e gota. A "apiterapia" é ainda praticada em algumas partes do

mundo, particularmente no leste europeu. Em anos mais recentes um potencial terapêutico para os processos reumáticos vem sendo estudado, porém, não há provas científicas suficientes que comprovem a eficiência terapêutica do veneno das abelhas, embora numerosos esforços estejam sendo dispensados para identificar os componentes farmacologicamente ativos do veneno.

A quantidade de veneno presente em uma abelha operária tem sido estimada entre 3 - 4 μ l. A obtenção do veneno de um único indivíduo é muito difícil e, normalmente, coleta-se 0,5 - 1,0 μ l do veneno. O veneno da abelha é constituído de 88% de água (O'CONNOR & PECK, 1978), portanto 0,1 μ l do veneno seco pode ser isolado de cada uma, o que exige 10.000 abelhas para produzir 1,0mg de veneno cristalizado.

A extração do veneno pode ser feita através da dissecação do aparelho de veneno ou aplicação de pressão no abdômem que resulta no aparecimento de uma gota na ponta do ferrão. Porém, este procedimento não é viável para grandes quantidades de veneno e, para isso, um método de extração elétrica foi desenvolvido por BENTON & MORSE (1963), e aprimorado por BRANDEBURGO (1992). O veneno líquido é transparente, incolor, prontamente miscível em água, peso específico ao redor de 1,1313 e contém 0,3 a 0,4mg de sólidos por 1,0mg de peçonha líquida (HAYDAK, 1951; ARTEMOV, 1965). Há relatos de que o veneno obtido através da extração elétrica apresenta um certo grau de pureza.

O veneno da abelha contém uma série de componentes que podem ser isolados levando-se em conta suas propriedades físicas como peso molecular, carga elétrica e hidrofobicidade. É possível a separação destes componentes através de métodos bioquímicos, segundo cada uma de suas propriedades.

A hyaluronidase é uma enzima que hidrolisa um polímero viscoso, o ácido hyalurônico, em segmentos não viscosos contendo, principalmente, secções de quatro a seis

unidades (BARKER et al., 1963). O ácido hylurônico é a sequência base intersticial dos tecidos em animais e suas propriedades adesivas mantém as células unidas. Quando destruído pela hyaluronidase, os intervalos entre as células tornam-se não viscosos e, portanto, facilitam a entrada de outros constituintes do veneno (DOTIMAS & HIDER, 1987).

A fosfolipase A2 digere a parte estrutural lipídica mais importante entre os componentes da membrana citoplasmática da célula animal. A enzima converte fosfolipídeos de formato cilíndrico em moléculas de formato cônico, rompendo assim, o envoltório fosfolipídico da membrana, conduzindo a formação de poros e consequente lise celular (DOTIMAS & HIDER, 1987). A fosfolipase de abelha é mais ativa que qualquer fosfolipase de serpentes ou pancreática de mamíferos (SHIPOLINI et al., 1971). A eficiência da fosfolipase em lisar células é intensificada na presença da melitina (VOGT et. al., 1970).

A melitina, o principal componente do veneno das abelhas, é um peptídeo anfifílico com vinte aminoácidos, predominantemente, hidrofóbicos e seis resíduos hidrofílicos (DOTIMAS & HIDER, 1987). Este arranjo confere ao peptídeo uma estrutura semelhante a detergente, que são compostos amplamente utilizados na solubilização de muitas proteínas ligadas à membrana (HABERMAN & JENTSCH, 1967).

Apamina, secapina, tertiapina e procapina são alguns dos outros peptídeos encontrados no veneno de *Apis mellifera*, porém, nem todos são encontrados em todas as amostras de veneno e sua presença, portanto, deve variar conforme as sub-espécies.

Constituintes de alto peso molecular como a fosfolipase A2 e a hyaluronidase, são capazes de iniciar uma forte resposta imune (KING et al., 1976). A hipersensibilidade de alguns indivíduos está provavelmente relacionada com uma dessas proteínas.

Segundo Ortel & Markwardt (1955), o veneno tem ação bacteriostática ou bactericida, dependendo do microorganismo que se analisa. Sabe-se que em soluções de

1/100 e 1/1000 o veneno exerce ação bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. ; em concentrações de 1/1000 a 1/5000 não atua sobre *Escherichia coli* (ARTEMOV, 1965).

Bactérias

Segundo TRABULSI (1991), as bactérias são consideravelmente menores que as células eucarióticas. Seu diâmetro é, geralmente, da ordem de 1µm, embora os tipos esféricos (micoplasmas, riquetsias e clamídeos) tenham um diâmetro de 0,4µm e as maiores possam atingir vários micrômetros de diâmetro. O comprimento varia de 1,0 a 6,0µm. As bactérias possuem estruturas morfo-fisiológicas menos complexas do que as células eucarióticas, sendo classificadas como procarióticas porque não possuem membrana nuclear, aparelho mitótico, mitocôndria e retículo endoplasmático.

Outra característica diferencial das bactérias (exceção aos micoplasmas) é a presença de uma estrutura de superfície mais complexa que a das células animais: a parede celular rígida externa à membrana citoplasmática. A parede permite a tolerância excepcionalmente ampla do meio ambiente; protege contra lesões mecânicas (inclusive congelamento). É responsável ainda por muitas das características taxonomicamente significativas das bactérias: determina sua forma e sua fundamental divisão em Gram-negativas e Gram-positivas (GRAM, 1884, citado por DAVIS, et alii, 1973); suas sutis diferenças químicas são responsáveis por especificidades antigênicas de importância na interação de patógenos com seus hospedeiros e na classificação microbiana.

Formas e arranjos das bactérias

Embora existam milhares de espécies de bactérias diferentes, os organismos isolados apresentam três formas gerais: esférica (cocos), bastonete (bacilo) e espiralada (espirilo).

As células bacterianas esféricas e muitas que pertencem a esta categoria, apresentam tipos de arranjos de grande importância em seu diagnóstico.

As bactérias em bastonete não se dispõem de acordo com os padrões encontrados entre os cocos. Ocasionalmente, ocorrem aos pares (diplobacilos) ou em cadeias (estreptobacilos). Há consideráveis diferenças nas dimensões das várias espécies de bacilos; alguns são apenas um pouco mais longos do que largos; outros possuem comprimento várias vezes maior do que a largura.

As células bacterianas espiraladas ocorrem, predominantemente, como células isoladas. As células individuais de diferentes espécies exibem nítidas diferenças no comprimento, número e amplitude das espirais e na rigidez das paredes celulares. Alguns organismos pertencentes a esta categoria, por exemplo, são bastonetes curtos com espirais cerradas; outros são muito longos e exibem uma série de torções e encurvações.

Estruturas bacterianas

A célula bacteriana revela certas estruturas definidas dentro e fora da parede celular, e algumas estruturas estão apenas em certas espécies e outras partes celulares, tais como a parede celular e o citoplasma, são comuns a maioria das células.

As bactérias apresentam um cromossomo circular constituído por uma única molécula de DNA. Os plasmídeos, moléculas de DNA extracromossômicas, são autônomos e

seus genes não codificam características essenciais, mas conferem vantagens seletivas à bactéria que os possuem. Os ribossomos atuam na síntese proteica; os grânulos de reserva, no acúmulo de substâncias; os mesossomos têm papel na divisão celular e respiração.

Diversas células bacterianas apresentam uma cápsula de natureza, geralmente, polissacarídica, podendo ser também de proteína. É ainda um antígeno de superfície e está relacionada com a patogenicidade da bactéria.

Os flagelos são estruturas protéicas longas e delgadas que se projetam externamente à parede celular e, são responsáveis pela motilidade da bactéria que os possuem.

Os termos pili e fimbrias tem sido usados como sinônimos para designar estruturas curtas e finas, de natureza protéica, que muitas bactérias gram-negativas apresentam. Muitas fimbrias estão relacionadas com a capacidade de adesão (p.ex., adesão para colonizar o intestino). Outras fimbrias são sexuais e estão relacionadas com a transferência do material genético durante a conjugação.

A membrana citoplasmática das bactérias é semelhante às demais membranas biológicas sendo constituída de lipídeos, principalmente fosfolipídeos, e proteínas. Nas bactérias, a membrana citoplasmática, além de ter papel no transporte ativo, é também onde se situam os componentes da cadeia respiratória e onde ocorre a produção de ATP pelo processo de oxidação fosforilativa.

De acordo com a constituição da parede celular, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: as Gram-positivas e as Gram-negativas.

A principal diferença entre bactérias gram-positivas e gram-negativas é a parede celular de formação rígida que dá forma à célula. A resistência da parede é devida a

uma camada composta por uma substância que recebe diferentes denominações, tais como, mureína mucopeptídeo, glicopeptídeo ou peptidoglicano.

O peptidoglicano é um heteropolímero formado por dois tipos de aminoaçúcares e de alguns aminoácidos. Os aminoaçúcares são a N-acetil-glicosamina e o ácido N-acetil-murâmico, este último um lactil-éter de glicosamina. Os aminoácidos são variados, sendo mais frequentes L- e D-alanina, ácido D-glutâmico, ácido meso-diaminopimérico e L-lisina (TRABULSI, 1991).

Outra diferença a ser observada entre os dois grupos de bactérias é a membrana externa, presente apenas nos Gram-negativas. Esta membrana é constituída por uma dupla camada lipoprotéica da qual fazem parte outros compostos exclusivos desta estrutura, tais como lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e porinas.

Staphylococcus aureus

O *S.aureus* é uma bactéria que Gram-positiva, um dos agente mais comuns de infecções piogênicas, que está emergindo como agente causador de infecções hospitalares graves (como a osteomielite, bacteremias, endocardite e pneumonia), devido a resistência a maioria dos antimicrobianos existentes.

Escherichia coli

A *Escherichia coli* é uma espécie de grande importância por representar um dos mais importantes agentes etiológicos de diarreias, infecções do trato genito-urinário em adultos e crianças, e de septicemias em recém nascidos.

OBJETIVOS:

- Avaliar o efeito bactericida do veneno de *Apis mellifera* em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

JUSTIFICATIVA:

Pretendemos com este trabalho conhecer a ação bactericida do veneno de abelha africanizada em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, pois este procedimento poderia implicar na descoberta de novos medicamentos tendo como princípio ativo o veneno de abelha., que poderia exercer a erradicação de cepas de *E.coli* e *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos existentes, advindo a cura de pacientes da medicina humana ou veterinária acometidos de infecções graves por estes patógenos. E ainda, este fato poderia trazer benefícios que futuramente possam clarear os rumos na descoberta de antídotos contra o veneno de abelha.

Também têm sido citada a utilização do veneno em Biotecnologia na manipulação celular. Um efeito observado foi o rompimento da membrana celular eucariótica e a liberação do núcleo em estado funcional. Seria importante averiguar tal efeito em procariotos.

METODOLOGIA

1.0 - VENENO DA *Apis mellifera*

1.1 - OBTENÇÃO DO VENENO

O veneno da *Apis mellifera* foi obtido pelo método de extração elétrica das colméias do apiário da Universidade Federal de Uberlândia, segundo a técnica aprimorada por BRANDEBURGO (1992).

1.2 - ESTERILIZAÇÃO DO VENENO

A esterilização do veneno foi feita através de radiação ultravioleta (U.V.) em câmara de fluxo laminar durante 30, 60 e 90 minutos.

1.3 - GRUPO CONTROLE DA ESTERILIZAÇÃO DO VENENO

Foram feitos 7 cultivos utilizando-se agar TSA acrescido de sangue humano (5%) em placas de Petri, sendo que três contendo veneno irradiado, três com veneno não-irradiado e um controle sem veneno. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h.

2.0 - MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS

2.1 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE *E. coli* E *S. aureus* (MRSA)

Os espécimes clínicos fezes e secreção de orofaringe utilizados para o isolamento das amostras de *E. coli* e *S. aureus* (MRSA), foram coletados através de swabes anal e orofaringe estéreis de 30 crianças internadas no berçário e na Unidade de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. O termo MRSA é usado para designar cepas de *Staphylococcus aureus* que possuem resistência intrínseca à meticilina, oxacilina, nafcilina, cefalosporina, imipenem e outros beta-lactâmicos (BOYCE, 1990; PANLILIO, 1992). A identificação dos microorganismos foi realizada através de provas bioquímicas clássicas. As referidas amostras foram gentilmente cedidas pela médica Lindalva de Fátima Davi Rabelo, obtidas com apoio do CNPq.

2.2 - TESTE DA VIABILIDADE DAS AMOSTRAS

O controle de viabilidade das amostras de *E. coli* e *S. aureus* (MRSA) foi realizado pelo repique das cepas conservadas em agar-estoque da médica Lindalva de Fátima Davi Rabelo para meios de cultivos agar MacConkey e Manitol Salgado, apropriados ao crescimento das referidas cepas, respectivamente.

Tais meios de cultivos foram incubados a 37 e 35°C durante 24 e 48h para as amostras de *E. coli* e *S. aureus* (MRSA), respectivamente.

2.3 - PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO PARA REPIQUE DAS AMOSTRAS

Os meios de cultivo agar MacConkey (*E. coli*) e Manitol Salgado (*S. aureus*) foram preparados adicionando-se água deionizada na proporção indicada pelo fabricante (OXOID). Após a homogeneização, os meios foram levados ao autoclave e esterilizados a 121°C por 15 minutos. Em seguida, foram distribuídos em placas de petri de 90x100mm e conservadas em refrigerador e oportunamente utilizadas para os repiques.

3.0 - AMOSTRAGEM

A amostra consistiu de 24 cepas de *E. coli* e 24 de *S. aureus* (MRSA), sendo que utilizou-se a representatividade para Fezes (F) e orofaringe (G - garganta). O número após o traço (-) e o ponto (.), identificam a criança e a colônia, respectivamente. Representatividade sem número após a identificação da criança, significa que apenas uma colônia foi coletada. Os controles ATCC 25922 (*E. coli*) e 25923 (*S. aureus*) também foram utilizados.

E. coli

F-18.1	F-35.1	G-7.1	G-53.1
F-18.2	F-35.2	G-7.2	G-53.2
F-18.3	F-35.3	G-7.3	G-53.3
F-30.1	F-54.1	G-31.1	G-68.1
F-30.2	F-54.2	G-31.2	G-68.2
F-30.3	F-54.3	G-31.3	G-68.3

***S. aureus* (MRSA)**

F-1	F-52	G-3	G-27
F-7	F-65	G-7	G-31
F-8	F-66	G-11	G-49
F-17	F-71	G-20	G-55
F-23	F-72	G-22	G-56
F-39	F-75	G-26	G-65

4.0 - PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO CONTENDO VENENO

Foram feitos 100ml de meio MacConkey e Manitol-Salgado conforme indicação do fabricante. Após a homogeneização, distribuiu-se cada meio em cinco frascos Erlen-Meyer de 125ml (cada frasco com 20ml) e então, levados ao autoclave a 121°C por 15 minutos. Terminada a esterilização, deixou-se resfriar até 45°C, adicionou-se o veneno em oito frascos (dois foram para controle), distribuídos em oito placas devidamente identificadas com as respectivas amostras e concentrações de veneno. Cada placa foi dividida em seis espaços destinados a semeadura de seis amostras, procedimento este utilizado com o objetivo de economia do veneno.

5.0 - CONCENTRAÇÕES DE VENENO

Foram realizadas quatro concentrações de veneno, para cada espécie de bactéria, sendo as mesmas diferentes na totalidade dos grupos.

<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA)
50ug/ml	100ug/ml
75ug/ml	125ug/ml
90ug/ml	150ug/ml
100ug/ml	175ug/ml

6.0 - VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO EM MEIO COM VENENO

Após o preparo das placas de agar com veneno, foram semeadas 10^7 Ufc/ml (colônia de tamanho médio) com alça de platina de cada amostra anteriormente referida e incubadas por 24-48h a 37 e 35°C, respectivamente, para *E. coli* e *S. aureus* (MRSA). Em seguida analisou-se a presença ou ausência de crescimento de microorganismos nos mesmos.

RESULTADOS

COLETA DE VENENO

Na Tabela 01, estão apresentados os dados referentes as coletas de veneno no meses de Abril, Maio e Junho. Afim de evitar variáveis indesejáveis no procedimento, as coletas foram sempre feitas às 14:00h. No mês de Abril foram colhidas 22,2mg de veneno num período de oito dias e a quantidade média de veneno coletado por dia foi de 2,77mg. Já no mês de Maio a quantidade foi de 23,8mg em seis dias de coleta e a média por dia foi de 3,96mg. Estes valores representam um aumento de 7,2% de Abril a Maio. No entanto, em Junho, a quantidade de veneno coletado foi inferior ao mês do anterior, 23,1mg, mesmo realizando as coletas no mesmo número de dias. Entretanto, no mês de Junho ainda obteve-se 4,0% a mais de veneno do que em Abril.

Tabela 01. Coleta de veneno de *Apis mellifera* realizadas nos meses de Abril, Maio e Junho de 1995.

Mês	Nº de dias coleta	Hora da coleta	Tempo de coleta (min.)	Total veneno coletado (mg)	Quant.méd./dia
Abril	8	14:00	4	22,2	2,77
Maio	6	14:00	4	23,8	3,96
Junho	6	14:00	4	23,1	3,85

TESTE DA ESTERILIZAÇÃO DO VENENO

A Tabela 02 mostra que após 48h, apenas as placas 1 com e sem veneno irradiado não apresentaram crescimento de qualquer microorganismo e, as quatro restantes apresentaram crescimento de cocos Gram-positivos (confirmados através da coloração de Gram), sendo que na placa 2 com veneno irradiado detectou-se a presença de outro microorganismo, também confirmado pela coloração de Gram, como sendo pertencente aos fungos.

Tabela 02. Avaliação da presença de crescimento de microorganismos em agar TSA, (acrescido de sangue humano(5%)) com veneno

Placas com agar+veneno	Crescimento		nº de colônias visíveis	Presença macroscópica de fungos.
	bacteriano	de fungos		
PVI* 1	-	-	zero	ausente
PVI 2	+	+	1	presente
PVI 3	-	+	zero	presente
PVNI' 1	-	-	zero	ausente
PVNI 2	-	+	zero	presente
PVNI 3	-	+	zero	presente
Placa control. sem veneno	-	-	zero	ausente

(*)PVI - Placa com veneno irradiado

(')PVNI - Placa com veneno não-irradiado

Após 24h de incubação, constatou-se em todas placas com veneno, a ocorrência de hemólise nos locais de infusão do mesmo.

VIABILIDADE DAS AMOSTRAS

As placas de agar MacConkey e Manitol Salgado semeadas, respectivamente, com amostras de *E. coli* e *S. aureus* (MRSA), na ausência de veneno, mostraram crescimento na totalidade das amostras, demonstrando que todas as cepas estavam viáveis.

CRESCIMENTO BACTERIANO EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO VENENO DE *Apis mellifera*

Na Tabela 03, observa-se que 100% das amostras de *E. coli* isolados de intestino, foram resistentes ao veneno nas concentrações de 50 e 75ug/ml. No entanto, entre as amostras de orofaringe, a cepa G-31.1 não cresceu no cultivo em concentração de 90ug/ml de veneno, resultando, portanto, em 83,3% de crescimento das amostras nesta concentração (Tabela 04). Na totalidade das amostras (n=24) de *E. coli* isolados de intestino e de orofaringe, apenas 1/24 (4,1%) não apresentou crescimento.

Na Tabela 05, verificou-se que entre as amostras de *S. aureus* (MRSA) isoladas de orofaringe em cultivo com veneno, uma única amostra (16,6%) não apresentou crescimento, mas entre os isolados oriundos do intestino, observou-se que houve crescimento em 100% das amostras (Tabela 06).

Tabela 03.Crescimento de amostras de *E. coli** isolados de intestino em meio de cultivo contendo 50 e 70ug/ml de veneno de *Apis mellifera*.
TOTAL

concentração de veneno (ug/ml)	TOTAL											
	F-18.1	F-18.2	F-18.3	F-30.1	F-30.2	F-30.3	F-35.1	F-35.2	F-35.3	F-54.1	F-54.2	F-54.3
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922

(*) amostras semeadas em agar MacConkey, incubadas a 37°C/24h
(+) crescimento da amostra

Tabela 04.Crescimento de amostras de *E. coli** isoladas de orofaringe em meio de cultivo contendo 90 e 100ug/ml de veneno de *Apis mellifera*.
TOTAL

concentração de veneno (ug/ml)	TOTAL											
	G-7.1	G-7.2	G-7.3	G-31.1	G-31.2	G-31.3	G-53.1	G-53.2	G-53.3	G-68.1	G-68.2	G-68.3
	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922	ATCC 25922

(*) idem Tabela 03
(+) idem Tabela 03
(-) ausência de crescimento da amostra

Tabela 05.Crescimento de amostras de *S. aureus** (MRSA) de orofaringe em meio de cultivo contendo 100 e 125ug/ml de veneno de *Apis mellifera*

concentração de veneno(ug/ml)	TOTAL											controle ATCC 25923			
	G-3	G-7	G-11	G-20	G-22	G-26	G-27	G-31	G-49	G-55	G-56	G-65	positivo n° %	negativo n° %	
100	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5 83.3	1 16.6	+
125													6 100	0 0.0	+

(*) assecuras semeadas em agar Manitol Salgado, incubadas a 35°C/48h

(*) amostras semeadas em agar Manitol Salgado, incubadas a 35°C/48h

(+) crescimento da amostra

(-) ausência de crescimento da amostra

Tabela 06.Crescimento de amostras de *S. aureus** (MRSA) de intestino em meio de cultivo contendo 150 e 175ug/ml de veneno de *Apis mellifera*.

TOTAL																
concentração		F-1	F-7	F-8	F-17	F-23	F-39	F-52	F-65	F-66	F-71	F-72	F-75	positivo n° %	negativo n° %	controle ATCC 25923
de																
veneno(ug/ml)																
150		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6 100	0 0.0	+
175														6 100	0 0.0	+

(*) idem Tabela 06

(+) idem Tabela 06

DISCUSSÃO

Segundo BRANDEBURGO (1989), os pesos médios mensais das colméias de *Apis mellifera*, atingem dois picos, um no mês de Maio e o outro em Outubro, durante um período de 13 meses (fig.1). Estes picos ocorrem nos meses de maior florada, quando há alimento em abundância para o desenvolvimento das colméias. Na figura 2, verifica-se que entre os meses de coleta, Maio, foi o mês de maior quantidade de veneno coletado e, comparando os mesmos meses da figura 1, é provável que as coletas ao longo do ano possam ter um perfil semelhante, uma vez que a quantidade de veneno produzida pelas abelhas poderia estar relacionada com o desenvolvimento das colméias.

Segundo a literatura, a esterilização através de radiação ultravioleta é de superfície, o que poderia explicar o crescimento de colônias de cocos e de fungos possivelmente, provenientes do veneno. A contaminação por tais microorganismos, poderia ainda ter ocorrido durante o manuseio técnico do material. A presença de hemólise em todas as placas com veneno nos locais de infusão é, provavelmente, devida a ação da melitina (NEUMANN & HABERMANN, 1954).

Em relação aos dados apresentados referentes às amostras de *E. coli* isoladas de intestino, verificou-se crescimento em 100% das mesmas, demonstrando a ineficaz ação bactericida do veneno de abelha na concentração de 50 e 75ug/ml, enquanto nas cepas isoladas da orofaringe somente a cepa G-31.1 foi sensível ao veneno.

Nas amostras de *S. aureus* (MRSA) isoladas da orofaringe, não houve resistência em uma das cepas testadas (G-7), enquanto nas amostras isoladas de intestino, todas as cepas foram resistentes.

Como foi mencionado anteriormente, a fosfolipase A₂ converte fosfolipídeos de formato cilíndrico em moléculas cônicas, isto é, hidrolisa o fosfolipídeo transformando-o em lisofosfolipídeo, ocorrendo a formação de poros na membrana citoplasmática celular e,

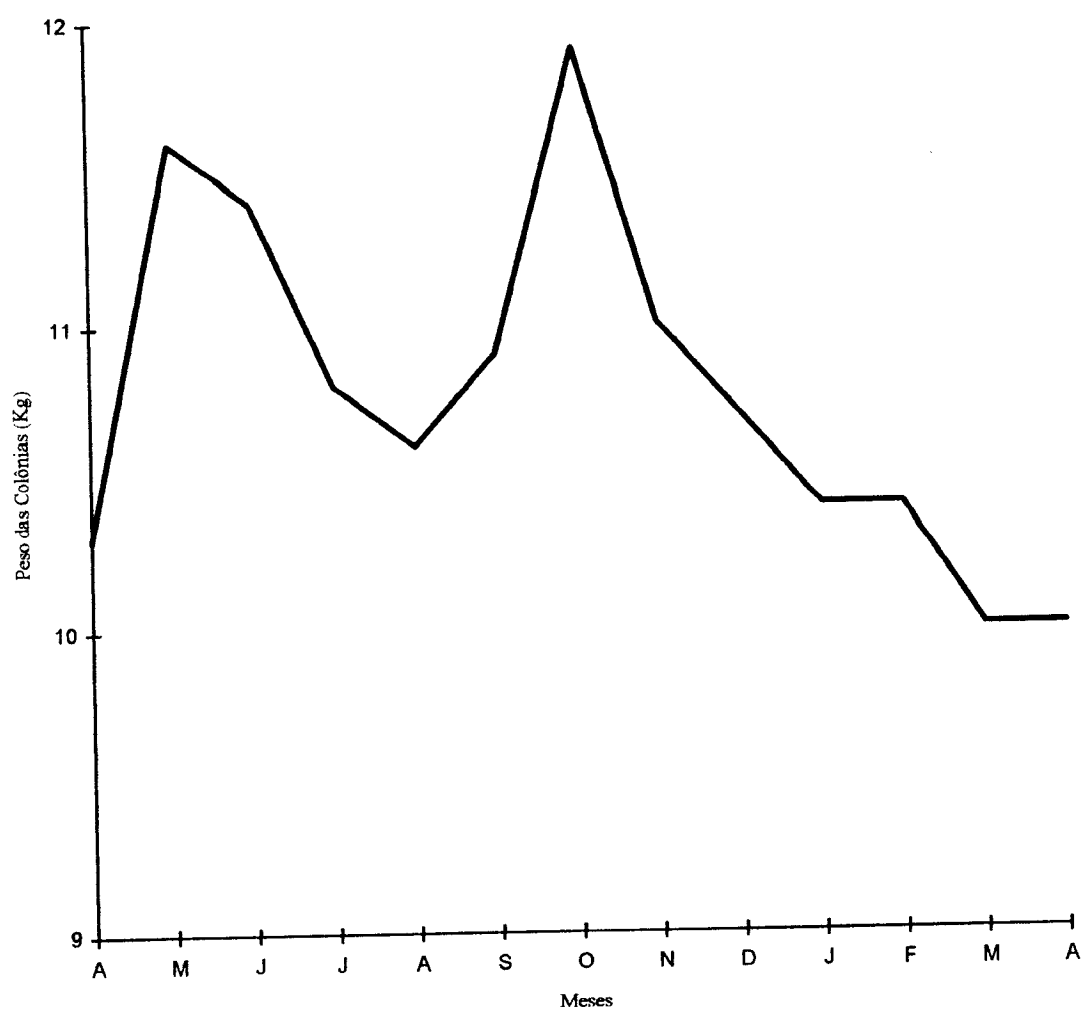


Fig. 1 - Peso médio mensal das oito colônias (núcleos) de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) na região de Ribeirão Preto-SP.

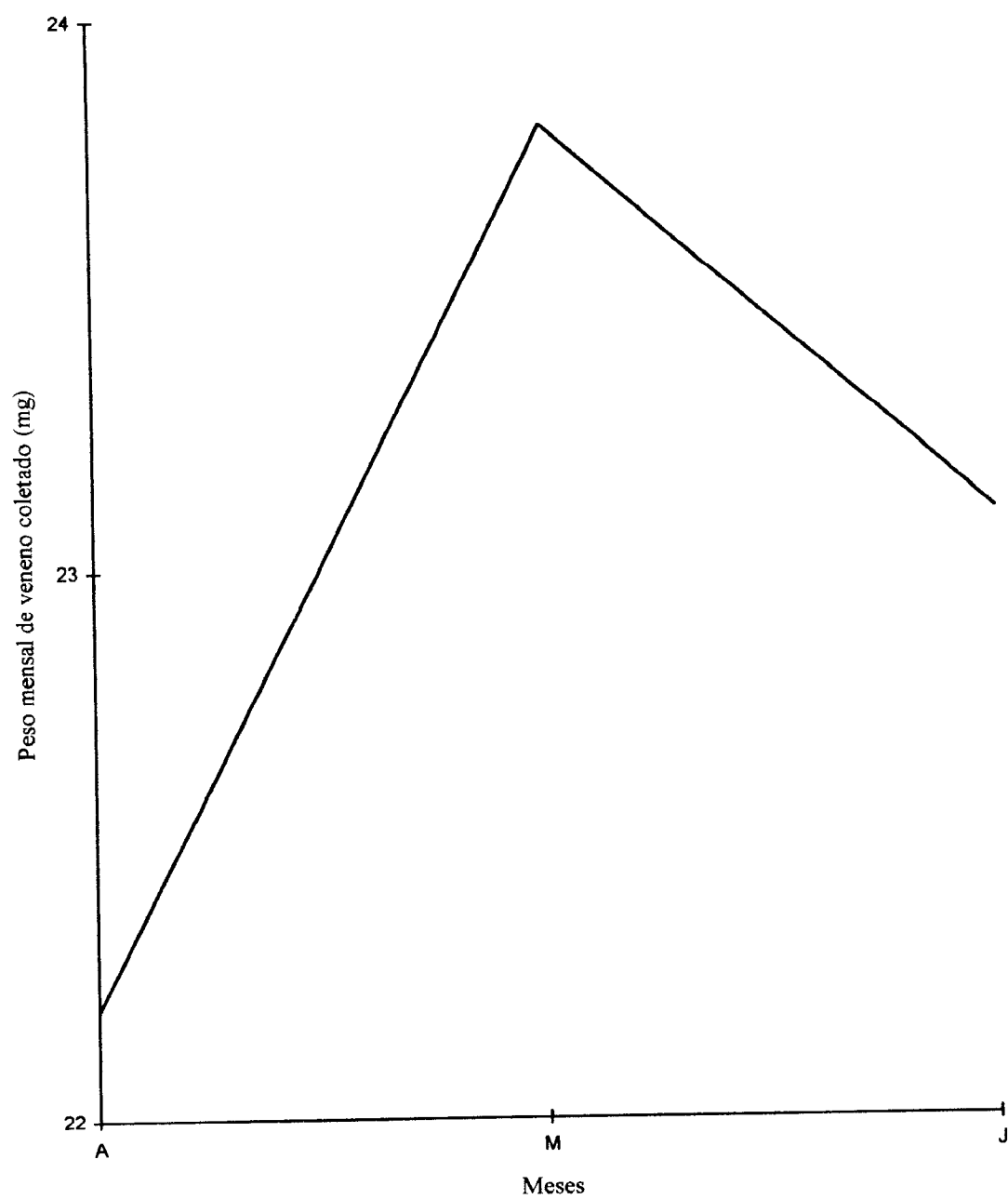


Fig.2 - Peso mensal de coleta de veneno de *Apis mellifera*.

consequentemente, a lise da mesma. É possível que este processo tenha ocorrido na membrana citoplasmática das cepas G-31.1 e G-7 de *E. coli* e *S. aureus* (MRSA), que não apresentaram resistência ao veneno de abelha. Ainda existe a possibilidade de outro componente protéico do veneno, a melitina, ter intensificado a ação da fosfolipase A₂ (DOTIMAS & HIDER, 1987) e evidências demonstram que a melitina causaria um afinamento na membrana celular (DOTIMAS & HIDER, 1987). Estes dois componentes poderiam explicar o mecanismo de lise da membrana citoplasmática das bactérias.

As espécies de bactérias estudadas diferem entre si, principalmente, na sua constituição estrutural. Segundo TRABULSI (1991), bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, possuem em sua parede celular uma camada de peptidoglicano fina e delgada, enquanto que as Gram-positivas, como a *S. aureus* (MRSA), possuem uma camada basal mais espessa. Estas diferenças estruturais, poderiam explicar a ocorrência de lise dos microorganismos (G-31.1 de *E. coli* e G-7 de *S. aureus* (MRSA)) em concentrações diferentes de veneno. É provável que pela maior espessura da camada de peptidoglicano, os Gram-positivos exijam maior concentração de veneno no meio de cultivo para que ocorra a lise celular.

Questiona-se ainda como se deu a permeabilidade à fosfolipase A₂ e à melitina (se foram realmente estes os dois componentes responsáveis pela lise celular) através da parede celular das G-31.1 e G-7. Recobrando a parede celular de *E. coli*, há uma membrana, denominada de membrana externa (TRABULSI, 19991). Esta membrana apresenta uma proteína constitutiva chamada de porina (PELCZAR et al., 1980), que pode ser a responsável pela permeabilidade do veneno, o qual teria acesso, através dos poros, a fina camada de peptidoglicano, atingindo a membrana citoplasmática, onde a fosfolipase A₂ atuaria por mecanismo de digestão.

Em relação às cepas resistentes, o fato de terem sido originadas de espécimes clínicos de crianças com processos patológicos graves, sugere que as mesmas sejam de elevado espectro de resistência aos antimicrobianos (LESTER, et al., 1990; NEU, 1992; COHEN, 1993) classicamente utilizados, podendo talvez explicar o comportamento de resistência ao veneno de abelhas.

CONCLUSÃO

1 - Observamos que Maio foi o mês de maior coleta de veneno de abelha e é também um dos picos dos pesos médios mensais das colméias, segundo BRANDEBURGO (1989). Supõe-se que os períodos de maior coleta do veneno possam ser os mesmos de maiores pesos mensais das colônias ao longo do ano.

2 - A esterilização do veneno de *Apis mellifera* através da radiação ultra-violeta mostrou-se ineficaz devido ao crescimento de colônias de cocos e fungos nos meios de cultivo utilizados. Um novo método de esterilização deverá ser testado, de modo a não alterar as propriedades químicas e estruturais do veneno.

3 - Da totalidade das amostras de *E. coli* e de *S. aureus* (MRSA) 95,25% apresentaram-se resistentes as diferentes concentrações do veneno de *Apis mellifera* e, 4,8% (cepas G-31.1 e G-7) não apresentaram resistência nas concentrações de 90 e 100ug/ml, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARTEMOV, N. M. (1965). The bee venom as a produce of the apiculture. **Apimondia XX Int. Beekeep. Jub. Congress.**
- BARKER, S. A., BAYYUK, S. H. I., BRIMACOMBE, J. S. and PALMER, D. J., (1963). Characterization of the products of the action of bee venom hyaluronidase. **Nature** (London), **199**: 693-694.
- BENTON, A. W., MORSE, R. A. and STEWART, J. B. (1963). A method of collecting honey bee venom. **Science**, **142**: 228-230.
- BENTON, A. W. (1965). Bee Venom, its Collection, Toxicity and Proteins. **Ph. D. Thesis**, 47pp.
- BRANDEBURGO, M. A. M.. (1992). A safe device for extrating from venom honey bees (*Apis mellifera*). **Bee World**, **73 (3)**: 128.
- BRANDEBURGO, M. A. M.. (1989). A infulência de fatores ambientais no desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). **Rev. Brasil. Biol.**, **49(4)**: 1035-1038.
- BOYCE, J.M. (1990). Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** **11**: 639-642.

- COHEN, M.L..(1992). Epidemiology of drug resistance implications for a post-antimicrobial era. **Rev. Science, 257 (5073):** 1050-1055.
- DAVIS, B. D., DULBECCO, R., EISEN, H. N., GINSBERG, H. S. and WOOD, W. B. (1973). Microbiologia-Fisiologia Bacteriana. **EDART, 1:** 23-24.
- DOTIMAS, E.M.; HIDER, R.C. (1987). Honeybee venom. **Bee World 68:** 51-70.
- FREYVOGEL, T. A. and PERRET, B. A. (1973). Notes on toxinology. **Experientia, 29 (11):** 1317-1452.
- GARY, N. E. (1974). Pheromones that affect the behaviour and physiology of honey bees. In: **Pheromones (BIRCH, M. C., ed.), North-Holland Publ.:** 200-221.
- HABERMANN, E. and JENTSCH, J. (1967). Sequential analysis of melitin from tryptic and peptic fragments. **Biochem. Z., 348:** 37-52.
- HAYDAK, M. H. (1951). Bee venom. **Yowa State Apiaristic Report, 33:** 105-126.
- KING, T. P., SOBOTKA, A. K., KOCHOUMIAN, L. and LICHTENSTEIN, L. M. (1976). Allergens of honey bee venom. **Arch. Biochem. Biophys., 172:** 661-671.

- LELLO, E..(1968). Glândulas anexas ao aparelho de ferrão das abelhas. **Tese de Doutorado. Fac. Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, 76pp.**
- LESTER, S.C.; PLA, M.P.; WONG, F; SCHAND, I.P.; JIANG, H. & O'BRIEN, T.F..(1990). The carriage of Esch. coli resist. to antimicrobial agents by health children in Boston, in Caracas, Venezuela and in Qin Pu, China. **N. Engl. J. Med. 323: 285-289.**
- NEU, H.C..(1992). The crisis antibiotic resistance. **Rev. Science, 257 (5073): 1064-1072.**
- NEUMANN, W. and HABERMANN,E.(1954). Beitrage zur Characterisierung der Wirkstoffe des Bienengiftes. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 222:, 367-387.**
- O'CONNOR, R. and PECK, M. L.(1978). Venoms of Apidae. In: **Handbook of Pharmacology, Arthropod venoms (BETTINI, S.), 48: 613.**
- ORTEL, S. and MARKWARDT, F. (1955). Investigations on the bactericidal properties bee venom. **Pharamize, 10: 743-746.** In Chemical Abstract, 1956.
- PANLILIO, A.L.; CULVER, D.H. & GAYNER, R.P. et al..(1992). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. Hospitals, 1975-1991. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.13:582-586.**