



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS
CAMPUS DE CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGICA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

WALTER MATHEUS SCHNEIDER BLEMA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE *Apis mellifera* DO
MATO GROSSO DO SUL E OS EFEITOS CINÉTICOS DA MELITINA
NA ATIVIDADE DA Na, K-ATPase**

ORIENTADOR: PROF. DR. MALSON NEILSON DE LUCENA

CAMPO GRANDE - MS

MARÇO - 2025

WALTER MATHEUS SCHNEIDER BLEMA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE *Apis mellifera* DO
MATO GROSSO DO SUL E OS EFEITOS CINÉTICOS DA MELITINA
NA ATIVIDADE DA Na, K-ATPase**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena

CAMPO GRANDE - MS

MARÇO – 2025

Blema, Walter Matheus Schneider.

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE *Apis mellifera* DO MATO GROSSO DO SUL E OS EFEITOS CINÉTICOS DA MELITINA NA ATIVIDADE DA Na, K-ATPase / Walter Matheus Schneider Blema; orientador Malson Neilson de Lucena. Campo Grande, 2025.
123 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (MS), 2025.

1. Bioquímica. I. Lucena, Malson Neilson de, orient. II. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE *Apis mellifera* DO MATO GROSSO DO SUL E OS EFEITOS CINÉTICOS DA MELITINA NA ATIVIDADE DA Na, K-ATPase.

TERMO DE APROVAÇÃO

WALTER MATHEUS SCHNEIDER BLEMA

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE *Apis mellifera* DO
MATO GROSSO DO SUL E OS EFEITOS CINÉTICOS DA MELITINA
NA ATIVIDADE DA Na, K-ATPase**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2025

Comissão Examinadora:

Nome do orientador Instituição

Nome do professor Instituição

Nome do orientador Instituição

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a toda minha família, que me auxiliaram e me incentivaram durante todo o processo.

Dedico este trabalho também ao meu orientador, Malson Neilson de Lucena, pela confiança, paciência e excelente orientação.

Dedico também aos meus colegas de laboratório por todos os incentivos, experimentos e dificuldades que passamos juntos.

Por fim, dedico a Deus pela saúde e benção da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Malson Neilson de Lucena, por toda orientação e acolhimento.

Agradeço aos meus colegas de laboratório e técnicos, Henrique Covali, Alynne Coelho, Jéssica Carretone, Brayhan Meneguelli, Ohanna Gabriely e Ana Lorena por todo apoio nessa jornada.

Agradeço também a todos meus amigos que me incentivaram.

Agradeço ao professor Rodrigo Zaluski, professora Gabriela Puhl e ao técnico Frederico Nakasone Ferreira pela colaboração e apoio com toda a sistemática das abelhas e do apiário.

Agradeço ao professor Carlos Frederico Leite Fontes pela doação da Na, K-ATPase purificada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC – Brasil.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a Universidade Federal do Mato Grosso do Sul pela infraestrutura e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul pela bolsa.

“Não é merecedor do favo de mel aquele que evita a colmeia porque as abelhas têm ferrões.”

William Shakespeare (1564-1616)

RESUMO

Blema, Walter Matheus Schneider Blema. Análise da composição da peçonha de *Apis mellifera* do Mato Grosso do Sul e os efeitos cinéticos da melitina na atividade da enzima Na, K-ATPase. (Dissertação de Mestrado). Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

No Brasil, as abelhas africanizadas, *Apis mellifera*, são responsáveis por um grande número de acidentes envolvendo seres humanos. Tais acidentes possuem maior gravidade em casos de múltiplas ferroadas ou em indivíduos alérgicos à peçonha. A composição da peçonha das abelhas varia de acordo com a diversidade genética e fatores ambientais como o clima, estação e alimentação. A apitoxina contém mais de 50 moléculas, incluindo a melitina e a fosfolipase A2 que desempenham papéis importantes na toxicidade. A Na, K-ATPase EC (7.2.2.13) é uma enzima com diversas funções no organismo, desde o balanceamento dos íons até mesmo a reabsorção de água e sódio nos rins. A melitina foi descrita como um inibidor dessa enzima, porém o mecanismo de inibição é pouco conhecido. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar a composição da peçonha de *A. mellifera* do Mato Grosso do Sul e verificar os efeitos biológicos e bioquímicos da interação entre a melitina e a Na, K-ATPase. Para a coleta da apitoxina, foi desenvolvido um coletor de apitoxina que utiliza o método de extração por eletroestimulação, totalizando 14 coletas. Sugere-se na peçonha de *A. mellifera* do Mato Grosso do Sul alguns componentes a partir da eletroforese, como fosfolipase A2, hialuronidase, fosfatase ácida, MRJP, α -glicosidase e melitina. Foi identificada também atividade fosfolipásica na apitoxina em ensaios em meios líquido e meio sólido. Além disso, observou-se que a peçonha bruta inibiu a atividade da Na, K-ATPase com IC_{50} de 12,39 $\mu\text{g/mL}$ e K_I de 12,63 $\mu\text{g/mL}$. Estudos *in silico* mostram que a melitina compromete a mudança conformacional de E2P para E2 da Na, K-ATPase, e aumenta o comprimento da ligação salina entre resíduos de aminoácidos críticos (Glu²²³ e Arg⁵⁵¹), além de influenciar a conformação de regiões de ligação ao Mg^{+2} , um cofator essencial da enzima. Assim, a inibição verificada *in vitro* pode ser explicada pela interação entre a melitina e a Na, K-ATPase *in silico*, que mostra a melitina se ligando a uma região próxima ao motivo TGES. Concluindo, a compreensão desses mecanismos *in silico* foi importante para estudar o processo de inibição da Na, K-ATPase pela melitina, contribuindo para estudos sobre os efeitos da peçonha nos sistemas nervoso e renal. Além disso, o estudo da composição da apitoxina de *A. mellifera* do Mato Grosso do Sul enriquecerá o banco de dados de componentes bioquímicos da peçonha da abelha africanizada do Brasil, auxiliando no desenvolvimento de soroterapias e de inovações medicinais ou terapêuticas utilizando a apitoxina.

Palavras-chave: *Apis mellifera*; Apitoxina; Na, K-ATPase; Peçonha.

ABSTRACT

Blema, Walter Matheus Schneider Blema. Analysis of the composition of *Apis mellifera* venom from Mato Grosso do Sul and the kinetic effects of melittin on the activity of the enzyme Na, K-ATPase. (Dissertação de Mestrado). Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

In Brazil, Africanized honey bees, *Apis mellifera*, are responsible for a large number of accidents involving humans. These accidents are more serious in cases of multiple stings or when there are individuals allergic to the venom. The composition of honey bee venom varies according to genetic diversity and environmental factors such as climate, season and diet. Apitoxin contains more than 50 molecules, including melittin and phospholipase A2, which play important roles in toxicity. Na, K-ATPase EC (7.2.2.13) is an enzyme with several functions in the body, from balancing ions to reabsorption of water and sodium in the kidneys. Melittin has been described as an inhibitor of this enzyme, but its inhibition mechanism has few studies. The objective of this study was to characterize the composition of *A. mellifera* venom from Mato Grosso do Sul and to verify the biological and biochemical effects of the interaction between melittin and Na, K-ATPase. To obtain apitoxin, an apitoxin collector was developed using electrostimulation extraction method, totaling 14 extractions. By electrophoresis, some components are suggested in the venom of *A. mellifera* from Mato Grosso do Sul, such as phospholipase A2, hyaluronidase, acid phosphatase, MRJP, α -glucosidase and melittin. In the apitoxin, phospholipase activity was identified in liquid and solid state assays. Furthermore, crude venom inhibits Na,K-ATPase activity with IC_{50} of 12.39 $\mu\text{g/mL}$ and K_i of 12.63 $\mu\text{g/mL}$. *In silico* studies show that melittin compromises the conformational change from E2P to E2 of Na,K-ATPase, increases the length of the salt bond between critical amino acid residues (Glu²²³ and Arg⁵⁵¹), and this interaction also influences the conformation of Mg⁺²-binding regions, an essential cofactor of the enzyme. Thus, the inhibition seen *in vitro* can be explained by the interaction between melittin and Na,K-ATPase *in silico*. In that interaction, melittin binds to a region near the TGES motif. In conclusion, the understanding of these mechanisms *in silico* was important to clear the process of Na,K-ATPase inhibition by melittin, contributing to studies on the effects of apitoxin on the nervous and renal systems. Furthermore, the study of the composition of the venom of *A. mellifera* from Mato Grosso do Sul might enrich the database of biochemical components in the venom of the Africanized honey bee of Brazil, this can help in the development of antivenoms and medicinal or therapeutic innovations using apitoxin.

Keywords: *Apis mellifera*; Apitoxin; Na, K-ATPase; Venom.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de comportamentos das abelhas, demonstrando que em sua maioria apresentam comportamento solitário.....	6
Figura 2. Morfologia simplificada da operária de <i>A. mellifera</i>	10
Figura 3. Estrutura do aparelho inoculador de peçonha da abelha <i>A. mellifera</i>	11
Figura 4. O peptídeo mais abundante na peçonha de abelhas, a melitina. A) Fórmula estrutural da melitina. B) Estrutura secundária da melitina. C) Melitina em tetrâmeros, visão frontal. D) Melitina em tetrâmeros, visão lateral. E) Sequência da melitina demonstrando os resíduos e suas características bioquímicas.....	16
Figura 5. Representação esquemática da enzima Na, K-ATPase.....	19
Figura 6. Esquema do ciclo funcional da Na, K-ATPase.....	21
Figura 7. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 10% corado em Comassie Brilliant Blue G-250. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras A1, A3, A7, A10, A11 e A12.....	34
Figura 8. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 15% corado em Comassie Brilliant Blue G-250. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras A1, A3, A7, A10, A11 e A12.....	35
Figura 9. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 20% corado em Comassie Brilliant Blue G-250.. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras A1, A3, A7, A10, A11 e A12.....	35
Figura 10. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS em gradiente (4-20%) corado em Comassie Brilliant Blue G-250. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras correspondentes a Tabela 2.....	37
Figura 11. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molecular (16%) corado em Comassie Brilliant Blue G-250. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras correspondentes a Tabela 2.....	38

- Figura 12.** Efeito da adição de KCl antes ou após a interação da peçonha bruta com a Na, K-ATPase. O ensaio foi realizado em triplicatas com um $p < 0.0001$ (*) em relação a atividade sem peçonha bruta.....42
- Figura 13.** Efeito da peçonha bruta sobre a atividade da Na, K-ATPase. ● Controle (s/ peçonha); ■ 10 $\mu\text{g/mL}$; ▲ 13 $\mu\text{g/mL}$; ▼ 15 $\mu\text{g/mL}$; ◆ 18 $\mu\text{g/mL}$; ○ 20 $\mu\text{g/mL}$; □ 30 $\mu\text{g/mL}$; △ 40 $\mu\text{g/mL}$43
- Figura 14.** Determinação do IC50 e do KI. A) Determinação do IC50 da peçonha bruta sobre a atividade da enzima Na, K-ATPase, sendo o IC50 igual a 12,39 $\mu\text{g/mL}$. B) Determinação do valor de KI da peçonha bruta, sendo este igual a 12,63 $\mu\text{g/mL}$44
- Figura 15.** Estrutura da Na, K-ATPase em conformação E1 com diferentes cores representando os segmentos transmembranares, e os domínios A, N e P, além de seus respectivos ligantes e em cinza estão representadas as alças. A melitina pode ser observada em verde, com região C-Terminal em vermelho e N-Terminal em azul. A direita segue uma legenda para os ligantes representados nas próximas figuras.....45
- Figura 16.** Representação em 3D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E1. A) Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E1 em interação com a melitina. B) Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. C) Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.....47
- Figura 17.** Representação esquemática em 2D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E1. As linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio entre os resíduos, os semicírculos vermelhos representam as interações hidrofóbicas, e os semicírculos rosa correspondem os resíduos hidrofóbicos.....48
- Figura 18.** Representação em 3D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E1P. A) Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E1P em interação com a melitina. B) Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. C) Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.....49
- Figura 19.** Representação esquemática em 2D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E1P. As linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio entre os resíduos, os semicírculos vermelhos representam as interações hidrofóbicas, e os semicírculos rosa correspondem os resíduos hidrofóbicos.....50
- Figura 20.** Representação em 3D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2P. A) Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E2P em interação

com a melitina. B) Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. C) Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.....51

Figura 21. Representação esquemática em 2D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2P. As linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio entre os resíduos, os semicírculos vermelhos representam as interações hidrofóbicas, e os semicírculos rosa correspondem aos resíduos hidrofóbicos.....52

Figura 22. Representação em 3D dos diferentes comprimentos das ligações salinas entre os resíduos Glu223 e Arg551 na Na, K-ATPase em conformação E2P. A) Comprimento da ligação salina antes da interação com a melitina. B) Comprimento da ligação salina após a interação com a melitina.....53

Figura 23. Representação em 3D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2P-Oua. A) Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E2P-Oua em interação com a melitina. B) Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. C) Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.....54

Figura 24. Representação esquemática em 2D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase E2P após a interação com a ouabaína demonstrada pelo software LigPlot+, em verde estão representadas as ligações de hidrogênio, os semicírculos vermelhos são as interações hidrofóbicas e os semicírculos rosa são os resíduos hidrofóbicos.....55

Figura 25. Representação em 3D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2. A) Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E2 em interação com a melitina. B) Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. C) Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.....56

Figura 26. Representação esquemática em 2D do docking molecular entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2. As linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio entre os resíduos, os semicírculos vermelhos representam as interações hidrofóbicas, e os semicírculos rosa correspondem aos resíduos hidrofóbicos.....57

Figura 27. Representação em 3D da distância entre os resíduos Glu223 e Arg551 na Na, K-ATPase em conformação E2. A) Distância dos resíduos de aminoácidos antes da interação com a melitina. B) Distância dos resíduos de aminoácido após a interação com a melitina, sendo evidenciado uma ligação de hidrogênio.....58

- Figura 28.** Sequência de aminoácidos da subunidade α da Na, K-ATPase, os resíduos destacados em amarelos tiveram interação com a melitina, sendo o número abaixo a quantidade de interações contabilizando todas as cinco diferentes conformações. Os motivos altamente conservados, TGES e DKTGRT(I/L), estão marcados na figura, assim como o motivo MIDPPRAA descrito por Kamanina et al., 2015. As cores correspondem ao padrão demonstrado na figura 15.....61
- Figura 29.** Ciclo catalítico e mudanças conformacionais de Na, K-ATPase interagindo com a melitina de *Apis mellifera*. A Na, K-ATPase contém os domínios de fosforilação (P), atuador (A) e de ligação ao nucleotídeo (N), enquanto a melitina está marcada com M.....62
- Figura 30.** Atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *Apis mellifera* em meio sólido em diferentes concentrações. A) 50 μ g de peçonha bruta. B) 100 μ g de peçonha bruta. C) 150 μ g de peçonha bruta.....64
- Figura 31.** Quantificação da atividade fosfolipásica utilizando meio líquido com 100 μ L de peçonha de *A. mellifera* a 1 mg/mL. Em triplicatas com um $p < 0.0012$ (*)......65
- Figura 32.** Esboço para construção do coletor de apitoxina. A) O item “a” corresponde ao vidro do coletor, sendo este inserido dentro da base “B”. B) Os itens “b”, “c”, “d” e “e” correspondem à base do coletor, sendo estes de plástico ou madeira. C) Os itens “f”, “g”, “i” e “h” correspondem à base para a bateria que deve ser anexada na base do coletor. D) Corresponde à montagem do coletor. E) Coletor de apitoxina montado.....85
- Figura 33.** Demonstração do método utilizado para coletar apitoxina assim como o equipamento confeccionado.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais proteínas e peptídeos encontrados na peçonha de abelha e de vespa.....	15
Tabela 2. Coletas realizadas no apiário da RPPN da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. A coleta da A14 foi realizada no apiário da fazenda escola, próximo a Terenos.....	33
Tabela 3. Atividade fosfolipásica da peçonha bruta de <i>Apis mellifera</i> ($\mu\text{g/mL}$) em cada amostra e o tamanho do halo formado em mm.....	63

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Confecção e eficiência do coletor de apitoxina.

Anexo 2. Depósito da patente do coletor de apitoxina.

Anexo 3. SISGEN.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP = Adenosina difosfato.

ATP = Adenosina trifosfato.

EC₅₀ = Metade da concentração máxima efetiva.

FXYP = Região conservada da sequência de aminoácidos (Fenilalanina-X-Tirosina-Aspartato) de um peptídeo de 35 aminoácidos, essa sigla se refere a família desses peptídeos.

HPLC = High-performance liquid chromatography, ou, cromatografia líquida de alta eficiência.

IC₅₀ = Concentração inibitória média.

K_I = Constante de inibição.

MIC = Concentração inibitória mínima “minimum inhibitory concentration”.

M_R = Massa molecular relativa.

MRJP = *Major Royal Jelly Proteins*, ou, principais proteínas da geléia real.

PDB = *Protein Data Bank*.

R_F = Distância de migração relativa.

RPPN = Reserva Particular do Patrimônio Natural.

RSV = Vírus sincicial respiratório humano.

SDS-PAGE = Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil-sulfato de Sódio.

TMV = Vírus do mosaico do tabaco.

VSV = Vírus da estomatite vesicular.

OUA = Ouabaína.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
SUMÁRIO	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Abelhas	3
2.1.2 Comportamento das abelhas	6
2.1.2.1 Abelhas solitárias	6
2.1.2.2 Abelhas parasitas de cria	7
2.1.2.3 Abelhas parasitas sociais	8
2.1.3 Abelhas sociais	8
2.2 <i>Apis mellifera</i>	9
2.3 Acidentes com abelhas	12
2.4 Peçonha da <i>Apis mellifera</i>	13
2.5 Melitina	15
2.6 Na, K-ATPase (EC (7.2.2.13))	17
2.7 Reguladores de atividade da Na, K-ATPase	21
2.8 Inibidores da atividade da Na, K-ATPase	22
2.9 Técnicas de separação de proteínas e predição <i>in silico</i>	23
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Confeção do coletor de apitoxina	26
4.2 Coleta da Apitoxina	26
4.3 Dosagem de proteínas	26
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	27
4.3.1 Preparo da amostra	27
4.3.2 SDS-PAGE	27
4.3.3 Tricina-SDS-PAGE eletroforese para proteínas de baixa massa molecular	28

4.3.4 Determinação das massas moleculares relativas.....	28
4.4 Efeito da peçonha bruta sobre a atividade da Na, K-ATPase	28
4.4.1 Obtenção e preparo da Na, K-ATPase.....	28
4.4.2 Atividade da Na, K-ATPase com e sem peçonha bruta.....	29
4.4.3 Cálculo do K_I e do IC_{50} da peçonha bruta.....	30
4.5 Estudo <i>in silico</i> – Interação Na, K-ATPase e melitina.....	30
4.5.1 Determinação das estruturas tridimensionais.....	30
4.5.2 Preparação do <i>docking molecular</i>	30
4.5.3 Análise das orientações pelo software PyMOL	31
4.5.4 Análise das interações por meio do LigPlot ⁺	31
4.6 Atividade fosfolipásica da peçonha bruta em meio sólido	32
4.7 Atividade fosfolipásica da peçonha bruta em meio líquido	32
4.8 Análise estatística dos dados	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Coleta de apitoxina	33
5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	33
5.3 Efeito da peçonha bruta sobre a atividade da Na, K-ATPase	42
5.4 Estudo <i>in silico</i> da interação entre a melitina e a Na, K-ATPase	44
5.4.1 Interação da Na, K-ATPase em conformação E1 com a melitina	46
5.4.2 Interação da Na, K-ATPase em conformação E1P com a melitina.....	48
5.4.3 Interação da Na, K-ATPase em conformação E2P com a melitina.....	50
5.4.4 Interação da Na, K-ATPase em conformação E2P-Oua com a melitina.....	53
5.4.5 Interação da Na, K-ATPase em conformação E2 com a melitina	55
5.4.6 Modelo geral da interação entre melitina e Na, K-ATPase	58
5.5 Análise da atividade fosfolipásica da peçonha bruta de <i>A. mellifera</i> em meio sólido	62
5.6 Análise da atividade fosfolipásica da peçonha bruta de <i>A. mellifera</i> em meio líquido	64
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO I.....	84
ANEXO II.....	87
ANEXO III	105

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) são responsáveis por vários acidentes com seres humanos, sendo que no ano de 2023 foram notificados 33.317 casos de acidentes com abelhas no Brasil, sendo que 125 destes casos evoluíram a óbito (DATASUS, 2024). Segundo o DATASUS, Mato Grosso do Sul notificou 574 casos de acidentes com abelhas no ano de 2023, com 3 óbitos (DATASUS, 2024). Esses acidentes podem ser fatais, principalmente quando ocorre uma grande quantidade de ferroadas ou o indivíduo afetado é alérgico à peçonha das abelhas (MORENO e GIRALT, 2015). Ataques por múltiplas ferroadas envolvem uma grande quantidade de peçonha que causa graves danos aos órgãos vitais, sendo o rim o órgão mais afetado (TOLEDO et al., 2018). As abelhas *A. mellifera* apresentam uma alta diversidade genética, essa diversidade influencia a composição da peçonha, além de que as características ambientais também podem influenciar na composição da apitoxina, logo, estes fatores podem alterar os efeitos da peçonha em cada indivíduo (JUNIOR et al., 2010).

Atualmente, não há uma soroterapia específica disponível para o tratamento de ferroadas por abelhas africanizadas, embora um estudo realizado pelo Instituto Butantan esteja em fase 3, que deve durar cerca de 5 anos e ser submetido à ANVISA para a liberação de um soro antiapilíco (BARBOSA et al., 2021). Essa problemática traz em ênfase a necessidade da caracterização da composição da peçonha da *A. mellifera* do Mato Grosso do Sul, pois com esse conhecimento pode ser possível especificar o tratamento para casos de ferroadas com *A. mellifera* do estado.

A toxina de *A. mellifera* é composta por mais de 50 compostos químicos identificados tais como as enzimas fosfolipase A2, fosfolipase B e hialuronidase, os peptídeos como a melitina e suas isoformas, apamina, peptídeo degranulador de mastócitos (MCD), secapina, as aminas como histamina, dopamina, noradrenalina, serotonina e catecolamina, entre outros componentes (MORENO e GIRALT, 2015; RADY et al., 2017; RATCLIFFE et al., 2011; SCIANI et al., 2010; SUNG e LEE, 2021). Os componentes mais abundantes na peçonha de abelhas são a fosfolipase A2, correspondendo cerca de 11% da peçonha bruta, e a melitina, o principal componente da peçonha bruta correspondendo de 40 a 60% do peso seco (JUNIOR et al., 2010; SCIANI et al., 2010).

A melitina, é responsável por inibir proteínas transportadoras de íons ATP-dependente, as ATPases tipo P (VARFOLOMEIEVA et al. 2023). Uma dessas enzimas inibidas pela melitina é a Na, K-ATPase. Essa enzima apresenta a função do transporte de íons Na^+ e K^+ , podendo-se citar a sua importância no processo de excitabilidade das células neuronais e a reabsorção de sódio e água nos rins. Além disso, a Na, K-ATPase é composta por três subunidades, α , β e uma

unidade da família FX γ D, também denominada como subunidade γ . Essas subunidades possuem diferentes isoformas com diferentes funções no organismo (LINGREL, 2010).

Assim, a identificação dos principais componentes da peçonha da abelha africanizada do Mato Grosso do Sul e compreensão das possíveis diferenças entre a apitoxina da *A. mellifera* do estado e de outras regiões do Brasil fomentaria o estudo destes componentes para produção de um soro antiapílico. O estudo das características bioquímicas de cada componente isolado da apitoxina pode permitir sua aplicação na saúde e biotecnologia. Além disso, a avaliação da melitina da peçonha de abelha, suas isoformas, e sua interação com uma enzima importante para o sistema nervoso e renal como a Na, K-ATPase pode auxiliar em tratamentos que seja necessário inibir a atividade da Na, K-ATPase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Abelhas

A polinização é um processo ecossistêmico essencial para a reprodução de uma gama de plantas e as abelhas desempenham um papel importante neste processo, visto que cerca de 70 a 80% das angiospermas são polinizadas por abelhas (KWAPONG et al., 2010). Além do interesse ecológico, também existe o interesse agroeconômico pelas abelhas, uma vez que a humanidade explora recursos como o mel, pólen, própolis, cera, apitoxina e geleia real (COSTA-MAIA et al., 2010). Vale ressaltar que uma pequena porcentagem de abelhas produz mel, sendo estas pertencentes ao gênero *Apis*, as abelhas melíferas, e à tribo Meliponini, as abelhas sem ferrão (SOUZA et al., 2021). As primeiras abelhas solitárias e abelhas sociais sem ferrão, possuem registros fósseis datados no Cretáceo (144 milhões a 65 milhões de anos), surgindo concomitantemente a outros insetos, incluindo as formigas e as vespas (CRANE, 2000).

O corpo das abelhas é composto por cabeça, tórax e abdome, contendo três pares de apêndices locomotores e dois pares de asas no tórax, enquanto na cabeça se encontra um par de antenas, um par de olhos compostos, três ocelos e o aparato bucal (EPAGRI, 2017; MOISSET et al., 2010). O abdome apresenta seis segmentos em fêmeas e sete segmentos em machos, com diversos pelos ramificados para intensificar a polinização e permitir a proteção térmica. Algumas abelhas fêmeas possuem um ovipositor modificado em ferrão utilizado para defesa (HALVACI et al., 2023; MOISSET et al., 2010). Dentre as abelhas sociais, a morfologia se altera de acordo com a casta a qual pertence. A abelha rainha apresenta um abdome muito mais desenvolvido por conta de sua função de postura de ovos, enquanto o zangão é maior que as operárias e apresenta um olfato mais desenvolvido para ser capaz de encontrar a rainha durante o voo nupcial (HALVACI et al., 2023).

A ordem Hymenoptera é dividida em duas subordens, Symphyta e Apocrita, o grupo Apocrita representa pela primeira vez na história evolutiva de Hymenoptera o desenvolvimento de sistemas com aparato inoculador de toxinas. Dentro de Apocrita existem dois grupos, Aculeata e Parasitica, sendo em Aculeata a presença das superfamílias Vespoidea e Apoidea (MORENO e GIRALT, 2015).

2.1.1 Famílias

As abelhas são um grupo de insetos pertencentes a ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea, subgrupo Anthophila, e compõem mais de 20.000 espécies em todo o mundo

(MULHERN, 2022). O sistema de classificação atual definiu sete famílias de abelhas, sendo estas: Andrenidae; Apidae; Colletidae; Halictidae; Megachilidae; Melittidae; Stenotritidae (BLAIMER et al., 2023; MELO e GONÇALVES, 2005). Todas as famílias de abelhas possuem ferrão e peçonha, com exceção da tribo Meliponini pertencente à família Apidae, as abelhas sem ferrão, as quais possuem um ferrão atrofiado (MICHENER, 2007).

2.1.1.1 Andrenidae

Andrenidae é uma das famílias que compõe o subgrupo Anthophila, tendo cerca de 1.200 espécies e a maioria delas pertencentes ao gênero *Andrena* (ASCHER e PICKERING, 2020). As características morfológicas de identificação deste grupo são a presença de um ou dois pares de suturas na face, língua curta, espécimes achatados dorsoventralmente e com abdome oval, com tamanho entre 10 a 20 mm, além de apresentar uma ampla gama de cores, mas geralmente prevalecendo o marrom ou o preto (STEPHEN et al., 1969; WOOD et al., 2022). São um grupo de abelhas solitárias chamadas também de abelhas mineiras, por nidificarem cavando tocas no solo (ASCHER e PICKERING, 2020).

2.1.1.2 Colletidae

Colletidae possui cerca de 2.500 espécies, e a maioria apresenta comportamento solitário (ALMEIDA et al., 2012). Muitas características desse grupo são consideradas mais primitivas por serem compartilhadas com vespas, sendo as características mais marcantes do grupo a presença de uma glossa bilobada ou bífida, larga e truncada, além de apresentar a arqueação da parte posterior das asas anteriores em direção ao ápice (STEPHEN et al., 1969).

2.1.1.3 Halictidae

As abelhas da família Halictidae também são chamadas de abelhas sudoríparas por conta de sua atração com o suor humano, esta família abrange cerca de 4.400 espécies (MURAO et al., 2017; SCHWARZ et al., 2007). Podem nidificar no solo ou na madeira, e as espécies podem apresentar comportamento solitário, eussociais ou parasitas (SCHWARZ et al., 2007).

A família Halictidae possui representantes muito diferentes entre si, mas compostos por algumas sinapomorfias como a presença de longos pré-palpos, que compõem a gálea, a ausência de mento e submento, a presença de suturas pré-episternais completas ou parciais e a ausência de fóveas faciais. Por conta de apresentar algumas características comuns próximas à família

Colletidae, acredita-se que este grupo divergiu em algum momento da história evolutiva (STEPHEN et al., 1969).

2.1.1.4 Megachilidae

Megachilidae é uma família com cerca de 4.000 espécies descritas, que apresentam como características a presença de duas células submarginais, com suturas na antena direcionadas para a borda externa dos encaixes antenais e a escopa das fêmeas não parasitárias se encontra no esterno abdominal (GONZALEZ et al., 2012; STEPHEN et al., 1969).

2.1.1.5 Melittidae

Melittidae é uma família com cerca de 200 espécies descritas, e com características semelhantes à família Andrenidae, diferenciando-se pela ausência de fóveas faciais e placas subantenais (MICHEZ et al., 2009; STEPHEN et al., 1969). Dentro da família Melittidae se encontra espécies raras e restritas a região Paleártica, além de ser um grupo de abelhas antigo com registro fóssil datado no Oligoceno (MICHENER, 2007; MICHEZ et al., 2009).

2.1.1.6 Stenotritidae

Menor família de abelhas, possui cerca de 20 espécies, distribuídas nos dois gêneros, *Ctenocolletes* e *Stenotritus*, que estão geograficamente restritos à Austrália (HAAS et al., 2022). São abelhas peludas, com porte robusto grande à moderado, escopa tibial bem desenvolvida, glossa curta, espessa e arredondada, fóvea facial larga e não bem definida e ausente nos machos, e possuem características comuns com algumas abelhas da família Colletidae (MICHENER, 2007). Os dois gêneros pertencentes ao grupo possuem muitos caracteres semelhantes e se diferenciam na morfologia dos machos (MICHENER, 2007).

2.1.1.7 Apidae

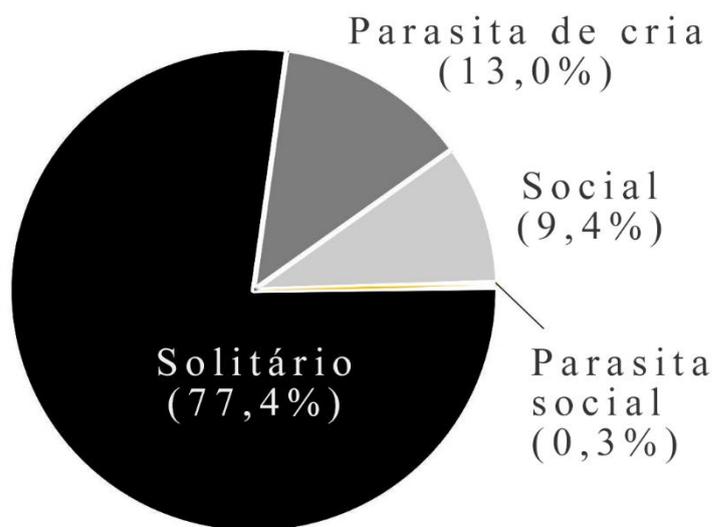
A família Apidae é composta por cerca de 5.900 espécies, dentro desta família se destacam duas tribos, Apini e Meliponini, por possuírem espécimes utilizados na apicultura (KELBER e SOMANATHAN, 2019; STEPHEN et al., 1969). Dentro de Apidae, existem abelhas com comportamento solitário, mas também existem cerca de 508 espécies com comportamento social, sendo as abelhas do gênero *Apis*, e as abelhas sem ferrão da tribo Meliponini as mais estudadas por conta de sua função de polinização, e produção de produtos

apícolas como o mel, própolis, cera e o pólen (ENGEL et al., 2023; KELBER e SOMANATHAN, 2019). Na história, a própolis foi utilizada em práticas medicinais antigas dos indígenas, gregos, romanos, persas e egípcios, sendo muito estudada para sua aplicação na medicina até os dias atuais (KUROPATNICKI et al., 2013; ROJCZYK et al., 2020).

2.1.2 Comportamento das abelhas

As abelhas podem apresentar comportamento solitário, eussocial, parasitário de cria ou parasitário social, sendo o comportamento solitário comum a quase 80% das espécies de abelhas (Figura 1) (MURRAY et al., 2009; THAMM et al., 2023).

Figura 1. Tipos de comportamentos das abelhas, demonstrando que em sua maioria apresentam comportamento solitário.



Fonte: Adaptado de DANFORTH et al., 2019.

2.1.2.1 Abelhas solitárias

As abelhas solitárias tendem a ser menos defensivas que as abelhas sociais, haja vista que uma única fêmea busca um local adequado e nidifica, realizando a postura de ovos e buscando alimento (BATRA, 1984; SALEH e RAMÍREZ, 2019). Após a oviposição, os ninhos são operculados e abandonados pela fêmea, de modo que não ocorre sobreposição entre as gerações (MUNIZ, 2021). O local de escolha para nidificação varia entre as espécies, podendo

ser acima ou abaixo do solo, ou em troncos, caules desenvolvidos, paredes ou até mesmo conchas de caracóis (ANTOINE e FORREST, 2021; DANFORTH et al., 2019).

Apesar do conceito de polinização estar vinculado as abelhas sociais, as abelhas solitárias são muito importantes na agricultura, além de realizarem a polinização de culturas que as abelhas melíferas não são especializadas, como por exemplo a alfafa (BOSCH et al., 2021; SILVA et al., 2014). As abelhas do gênero *Peponapis*, família Apidae, são abelhas solitárias que apresentam um comportamento de coleta de pólen apenas das plantas da família Cucurbitaceae, família de plantas com frutos como abóbora, melão, melancia e pepino (GIANNINI et al., 2010).

A aparência das abelhas solitárias difere devido às diferentes adaptações morfológicas que estas desenvolveram ao longo do tempo para melhor se adaptarem ao seu nicho ecológico. O alargamento dos olhos e dos ocelos em espécies crepusculares e noturnas, ou maior desenvolvimento da mandíbula em espécies que nidificam em troncos é um exemplo dessa adaptação (LAPECO e GONÇALVES, 2022).

Em todas as sete famílias de abelhas estão distribuídas abelhas solitárias, sendo as famílias Andrenidae, Colletidae, Megachilidae, Melittidae e Stenotritidaeas que possuem abelhas com comportamento solitário em sua maioria, enquanto as famílias Apidae e Halictidae apresentam tanto abelhas com comportamento solitário quanto abelhas com comportamento social (REYNOLDS et al., 2021).

2.1.2.2 Abelhas parasitas de cria

As abelhas parasitas de cria apresentam diversos métodos diferentes para a sobrevivência de sua prole. Esse grupo se estabelece principalmente invadindo ninhos de abelhas solitárias fechados e depositando seus ovos, esses ovos eclodem e a cria elimina a larva ou ovo presente, se alimentando posteriormente da reserva de néctar ou pólen (LITMAN, 2019). Neste caso, as abelhas parasitárias de cria não realizam a polinização visto que não buscam alimento e nem constroem um ninho, perdendo durante a evolução do grupo estruturas responsáveis por esta função, como por exemplo, as estruturas utilizadas para o comportamento de nidificação (LITMAN, 2019; SLESS et al., 2022). Um ponto chave para o sucesso evolutivo está nas larvas desse grupo que podem apresentar como característica uma mandíbula mais desenvolvida para auxiliar no abate das larvas da abelha hospedeira. Outra estratégia, a abelha parasita adulta destrói a prole da abelha hospedeira, evitando a competição pelo alimento coletado (LITMAN, 2019; SLESS et al., 2022).

Um exemplo de abelha parasita de cria é a *Melecta separata*, pertencente à família Apidae. Essas abelhas atacam os ninhos de cria do gênero *Anthophora*, sendo que sua larva eclode e elimina as larvas da abelha hospedeira (ROZEN e DING, 2012).

2.1.2.3 Abelhas parasitas sociais

Por outro lado, as abelhas parasitas sociais podem atingir seu objetivo por diferentes métodos, sendo a estratégia deste grupo de abelhas invadir uma colônia (CINI et al., 2019; NEUMANN et al., 2001). Em um dos métodos, uma rainha parasita adentra em uma colônia e elimina a rainha hospedeira, utilizando então do trabalho das operárias para produção de seus descendentes (CINI et al., 2019).

A *Apis mellifera capensis* apresenta um parasitismo social que consiste em as operárias férteis invadirem colônias hospedeiras de *A. mellifera ligustica*, ocorrendo a posse desta colônia por parte das operárias invasoras (NEUMANN et al., 2001). Esta espécie realiza um artifício onde as operárias também se reproduzem, inviabilizando o sistema onde uma única rainha produz a prole, competindo por meio de feromônios com a rainha hospedeira (DIETEMANN et al., 2006).

2.1.3 Abelhas sociais

A divisão de trabalho, cuidado cooperativo das crias e sobreposição geracional são características específicas das abelhas sociais, grupo que compreende cerca de 10% das espécies de abelhas (DANFORTH et al., 2019). Existem enxames altamente sociais como por exemplo o gênero *Apis* e também algumas abelhas que apresentam primitivamente conceitos sociais, como, por exemplo, as abelhas pertencentes a família Halictinae (DANFORTH, 2002). Dentro de uma colônia é possível identificar três tipos de papel social, sendo uma única rainha, os zangões e as operárias (HALVACI et al., 2023).

A abelha rainha é a única fêmea dentro da colônia que atinge a maturidade sexual, alimentada, com geleia real, desde a fase larval pelas abelhas operárias. A rainha possui o papel de garantir a continuação das gerações, colocando de 1500 a 3000 ovos por dia, 7 dias após o acasalamento com os zangões em uma estratégia chamada voo nupcial. Devido à comunicação feromônica enquanto houver uma rainha na colônia, seus feromônios impedirão a geração de uma nova rainha, exceto em períodos de enxameação – divisão da colônia (AAMIDOR et al., 2022; HALVACI et al., 2023).

Os zangões são indivíduos produzidos, geralmente, a partir de um processo denominado partenogênese, isto é, um óvulo não fertilizado, possuindo uma expectativa de vida de 21 a 30 dias (HALVACI et al., 2023). Sua principal função dentro da colônia é o acasalamento e logo após o zangão morre ou é expulso da colônia, por ser um indivíduo macho ele não tem a capacidade se proteger devido à ausência do ferrão, além disso, não apresentam estruturas para coletar alimento. Em geral, os zangões são maiores que as operárias e mais curto em comprimento que a rainha, podendo ter de 500 a 2000 zangões em uma colônia e com maior abundância durante os meses de verão (HALVACI et al., 2023; MCAFEE et al., 2022),

As abelhas operárias são alimentadas durante a fase larval com uma mistura de mel e pólen e completam seu desenvolvimento em 21 dias, sendo os organismos mais abundantes dentro da colônia (HALVACI et al., 2023). As operárias são responsáveis por cuidar e alimentar a rainha, amadurecer o mel, transportar pólen, néctar e água para a colônia, cuidar das crias, limpar e regular a temperatura de umidade da colmeia, proteção da colônia por meio do ataque a indivíduos externos, entre outras funções que variam conforme a idade da abelha operária (HALVACI et al., 2023; RUEPPELL et al., 2007). Vale ressaltar que a defesa da colônia é realizada instintivamente pelas operárias, visto que como mencionado anteriormente, os zangões não possuem ferrão e a rainha não sai da colônia a menos que vá acasalar, enxamear, ou haja abandono do local por toda a colônia de *Apis* (HALVACI et al., 2023).

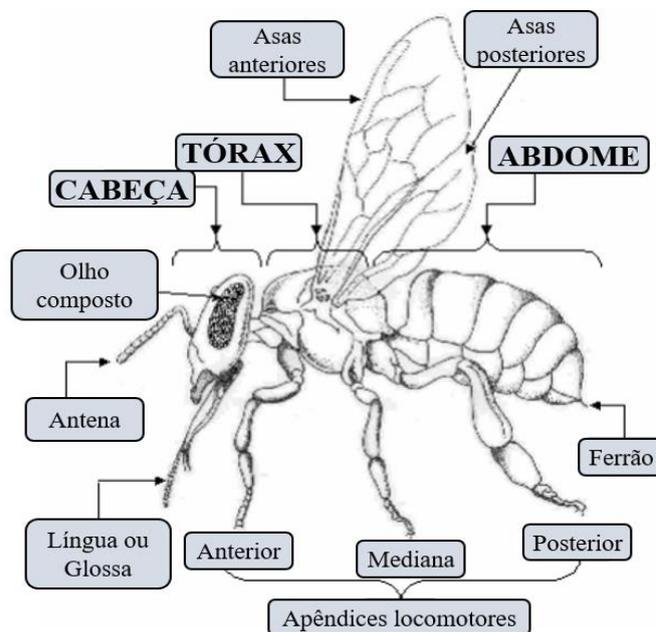
2.2 *Apis mellifera*

O mais antigo ancestral das abelhas produtoras de mel possui registros datados desde o Eoceno (55 milhões de anos). A partir desse ancestral houve a diversificação deste grupo com o decorrer do tempo se tornando uma espécie extremamente importante nos dias atuais na apicultura e também na agricultura (SMITH, 2020). O gênero *Apis* surgiu por volta do Oligoceno (38 a 28 milhões de anos) e se diversificou nas diferentes espécies de abelhas que colonizam o mundo atualmente (SMITH, 2020). Um exemplo de abelha produtora de mel é a *A. mellifera* também denominada de abelha melífera ocidental, é uma espécie que apresenta distribuição em todo o globo, com exceções na Antártica e Ártica, sendo também bioindicadores ambientais (CRANE, 2000; KLEIN et al., 2020; RUVOLO-TAKASUSUKI e SOUZA, 2019; SMITH, 2020). Essa espécie surgiu apenas no início do Mioceno (23 a 5 milhões de anos) com o processo de dispersão para a Ásia e Europa (CRANE, 2000). Atualmente, a espécie *A. mellifera* pertence à família Apidae, ordem Hymenoptera, classe Insecta, sendo que essa espécie de *Apis* geralmente não ultrapassa 3 cm de comprimento, com seu corpo dividido em três partes; cabeça, tórax e abdome (Figura 2). Possuem coloração

avermelhada à marrom, com faixas pretas e anéis alaranjados à amarelados em seu abdome, em seus apêndices locomotores traseiros é possível evidenciar as corbículas, estruturas responsáveis pelo transporte de pólen e resinas para a colônia (CAMARGO et al., 2002; MORTENSEN et al., 2019; RAMOS e CARVALHO, 2007).

Na cabeça estão localizados os olhos compostos, ocelos, antenas e o aparelho bucal (probóscide e mandíbula) especializado com glândulas internas. No tórax, é possível identificar os apêndices locomotores, as asas, e uma grande quantidade de pelos com função de fixação do pólen. Além disso, o apêndice locomotor posterior das operárias contém as cavidades chamadas de corbículas responsáveis pela deposição e transporte de pólen até a colônia. No tórax, também são evidenciadas as estruturas respiratórias denominadas espiráculos, o esôfago e as glândulas salivares. No abdome, existem membranas flexíveis que facilitam o movimento das abelhas, nessa região é possível identificar os órgãos do sistema digestivo, circulatório, reprodutor, excretor, glândulas produtoras de cera e os órgãos de defesa (CAMARGO et al., 2002; HALVACI et al., 2023; MOISSET et al., 2010).

Figura 2. Morfologia simplificada da operária de *A. mellifera*.

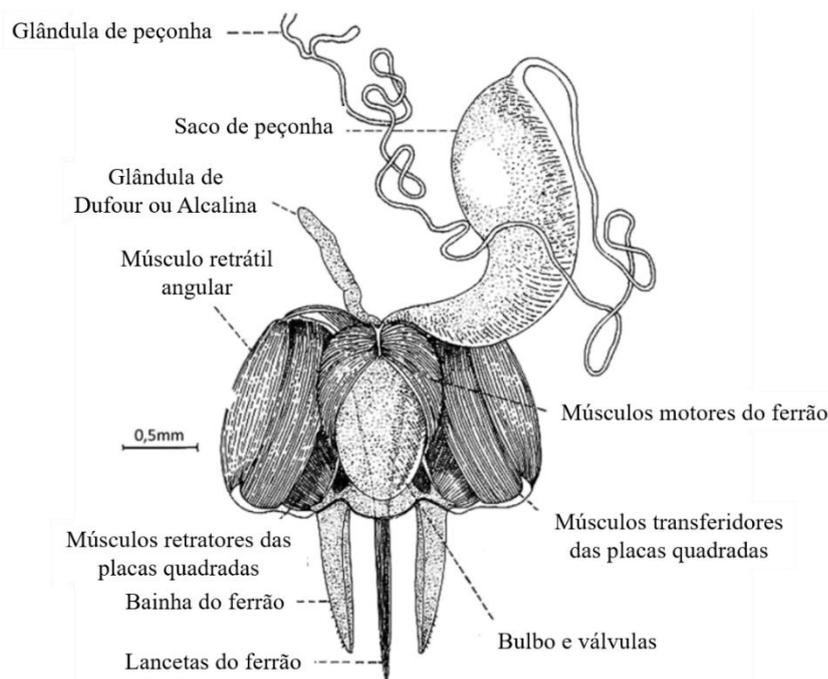


Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2002.

O ferrão de *A. mellifera* pode ser dividido em uma estrutura muscular e quitinosa que permite a penetração do ferrão e a inoculação da peçonha, e em uma região glandular que é responsável pelo armazenamento, produção e distribuição da apitoxina (FERREIRA JR et al., 2012) (Figura 3). A glândula de peçonha possui uma estrutura simples, bifurcada, longa e fina abrindo-se em um reservatório ovóide (BRIDGES e OWEN, 1984). A glândula de peçonha das

rainhas possui uma diferença morfológica quando comparada as das operárias, sendo mais bifurcada e com o ducto excretor mais longo, além de possuir um saco de peçonha até três vezes maior (BRIDGES e OWEN, 1984; ROAT et al., 2006). A glândula de Dufour, nomeada anteriormente como glândula básica ou alcalina, está relacionada à peçonha, à bainha do ferrão e às glândulas de Koschevnikov, tendo função ainda incerta. Acreditava-se que sua função era a produção do componente alcalino da peçonha, porém, sabe-se atualmente que sua função está relacionada a lubrificação do ferrão e, na rainha, à produção de um feromônio de marcação de ovos (MARTIN et al., 2005; RATNIEKS, 1995). Associado a este complexo do aparelho inoculador, estão as glândulas de Koschevnikov e a bainha do ferrão que são as responsáveis pela produção e liberação do feromônio de alarme. Sabe-se que nas rainhas, a glândula de Koschevnikov possui uma maior diversidade de componentes químicos, porém, essa se degenera após 1 ano de vida da rainha (BORTOLOTTI e COSTA, 2014).

Figura 3. Estrutura do aparelho inoculador de peçonha da abelha *A. mellifera*.



Fonte: Adaptado de FERREIRA JR et al., 2012.

Esse conjunto entre ferrão, saco de peçonha e músculos permite que o ferrão atue de maneira autônoma, sem a necessidade da abelha após a ferroada, com os músculos coordenando a contração para bombear a peçonha e perfurar o tecido e o saco de peçonha com o conteúdo que será injetado a cada segundo (RAMÍREZ-ESQUIVEL e RAVI, 2023).

No Brasil, as abelhas europeias foram introduzidas no ano de 1839, com a subespécie *A. mellifera mellifera*, sendo posteriormente introduzidas subespécies de *A. mellifera* oriundas

da Itália e Áustria no final de 1900, respectivamente, *A. mellifera ligustica*, *A. mellifera caucasica* e *A. mellifera carnica* (CRANE, 2000; KENT, 1988; MODANESI, 2012). A insatisfação dos apicultores com a baixa produtividade das espécies de abelhas existentes e a difícil adaptação das abelhas europeias às condições tropicais estimulou os apicultores brasileiros a buscarem outras subespécies que se adaptassem melhor à região (GUZMAN-NOVOA et al., 2020; KENT, 1998). No ano de 1956, houve uma tentativa de aumentar a atividade apícola, sendo introduzida a abelha africana *A. mellifera scutellata* no estado de São Paulo por um grupo de pesquisadores liderados por Warwick Estevam Kerr (CRANE, 2000; FLORES et al., 2017; GUZMAN-NOVOA et al., 2020; KENT, 1988). Warwick E. Kerr e seus colaboradores trouxeram 62 rainhas de *A. mellifera scutellata* para Rio Claro, São Paulo, sendo 48 rainhas introduzidas com sucesso em colônias de abelhas europeias e gerando uma prole abundante e produtiva (CRANE, 2000). Porém, em 1957, abelhas africanas de 26 colônias enxamearam e acasalaram com rainhas europeias (ARAÚJO et al., 2023; CRANE, 2000). Esse grupo de abelhas híbridas foi nomeado pelos apicultores como abelhas brasileiras ou abelhas africanizadas, possuindo uma organização social baseada em uma única rainha, zangões e operárias (MORTENSEN et al., 2019). Essas abelhas híbridas de *A. mellifera scutellata*, *A. mellifera ligustica*, *A. mellifera caucasica*, *A. mellifera mellifera* e *A. mellifera carnica*, são caracterizadas por um comportamento altamente defensivo e enxameatório, alta produção de mel, alta resistência a doenças e parasitas e adaptação ao clima tropical (ALMEIDA et al., 2011; CRANE, 2000; FLORES et al., 2017; MOPOSITA et al., 2020; MORTENSEN et al., 2019). Entre os anos de 1950 e 1960, as abelhas africanizadas se tornaram o tipo predominante de abelhas, distribuindo-se amplamente pelo Brasil e alcançando o México em 1986 e os Estados Unidos em 1990, conforme avançavam cerca de 300 a 500 km por ano (ARAÚJO et al., 2023; CRANE, 2000).

2.3 Acidentes com abelhas

A abelha africanizada possui um grande instinto em defender sua colônia e por ano são registrados muitos acidentes com essas abelhas. Na maioria das vezes, são pessoas que vivem na região rural que recebem múltiplas ferroadas que podem ser fatais para o ser humano (CRUZ et al., 2022). Dados disponíveis no DATASUS mostram que no período de 2010 a 2023 foram registrados 233.856 casos de acidentes com abelhas africanizadas no Brasil, sendo que 732 casos evoluíram para óbito. Dentre as mortes, estão indivíduos que foram atingidos por múltiplas ferroadas e indivíduos que possuíram manifestações clínicas mais intensas por reação alérgica aos componentes da peçonha (DATASUS, 2024; TERÇAS et al., 2017). Em Mato

Grosso do Sul, neste mesmo período foram registrados 3.936 casos de acidentes com abelhas africanizadas contabilizando 12 óbitos notificados (DATASUS, 2024).

Os quadros clínicos de envenenamento se alteram de acordo com a quantidade de apitoxina inoculada, idade, peso e comorbidades do paciente, sendo então classificados em reações inflamatórias locais, manifestações alérgicas, choque anafilático e reações tóxicas sistêmicas (PUCCA et al., 2019). Nas reações inflamatórias locais as manifestações clínicas são dor aguda e ardente, coceira, vermelhidão e inchaço local que desaparece espontaneamente em alguns minutos, todavia, as manifestações alérgicas causadas por múltiplas ferroadas ou reação alérgica o paciente apresenta como manifestações clínicas vermelhidão e inchaço intenso ao redor da ferroadada que cessa espontaneamente após 10 dias. Em alguns casos o paciente pode desenvolver urticária sistêmica, prurido, angioedema, vômito e diarreia (LUDMAN e BOYLE, 2015; MORONI et al., 2021; PUCCA et al., 2019; SCIANI et al., 2010). Vale ressaltar que em caso de manifestação alérgica há uma chance de 5 a 10% da pessoa desenvolver uma reação grave em uma futura ferroadada (LUDMAN e BOYLE, 2015; TOLEDO et al., 2018). Em alguns indivíduos alérgicos a manifestação clínica pode evoluir para uma reação anafilática, apresentando broncoconstrição e choque anafilático (PUCCA et al., 2019). As reações tóxicas sistêmicas envolvem indivíduos não alérgicos que apresentam múltiplas ferroadas (50 ou mais), resultando como manifestações clínicas fadiga, tontura, vômito, diarreia, náusea, hipertensão, lesão hepática, lesão miocárdica, rabdomiólise, insuficiência renal aguda, hemólise e coma (PUCCA et al., 2019). Cerca de 50 ferroadas simultâneas podem causar envenenamento, e cerca de 500 ferroadas simultâneas são necessárias para considerar uma morte por toxicidade direta, porém, em crianças entre 30 à 50 ferroadas são fatais (FRANÇA et al., 1994; PUCCA et al., 2019). Após o envenenamento por múltiplas ferroadas a recuperação completa pode levar 3 a 6 semanas, enquanto o óbito pode ocorrer dentro de 6 horas a 12 dias por insuficiência renal ou parada cardíaca devido a complicações do envenenamento (SCIANI et al., 2010).

Os casos de acidentes com abelhas africanizadas não se limitam apenas em lesões significativas em humanos, mas também em animais domésticos, tais como cães, gatos e bovinos que podem ser alvos de um enxame ou uma única abelha desencadeando sintomas anafilático ou não (CALDAS et al., 2013; JUNIOR et al., 2010).

2.4 Peçonha da *Apis mellifera*

A quantidade de peçonha inoculada pela glândula após uma ferroadada é um fator que pode auxiliar a diagnosticar os casos por anafilaxia. A *A. mellifera* consegue inocular pelo menos 90% do conteúdo da glândula de peçonha em 20 segundos (SCHUMACHER et al.,

1994). Um estudo comparativo entre abelhas africanizadas e abelhas híbridas europeias demonstrou que as abelhas africanizadas conseguem liberar uma maior quantidade de peçonha que as europeias mesmo possuindo um reservatório de peçonha com menor volume (FUNARI et al., 2001).

A medicina tradicional da Grécia, Egito e Chinesa utiliza a apitoxina para tratamentos de doenças autoimunes, cânceres, doenças de pele, acupuntura, infecções, artrite e reumatismo (DANTAS et al., 2013; SUNG e LEE, 2021). A apiterapia é uma medicina alternativa com uso de recursos apiterápicos como o mel, geleia real, pólen e até mesmo a apitoxina. O uso da apitoxina na acupuntura é denominado apipuntura e utiliza doses industrializadas da toxina com alta liberação local de endorfina, sendo este um anestésico de uso aprovado segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2018).

O conteúdo exposto na seção 2.3 remete aos acidentes com abelhas, considerando as características bioquímicas da apitoxina, é imprescindível compreender o mecanismo de ação de cada componente para elucidar sobre os possíveis efeitos benéficos e maléficos da apitoxina. Todavia, tendo em vista que os componentes químicos que compõem a apitoxina possuem um potencial terapêutico, torna-se imprescindível o estudo aprofundado para reconhecer os efeitos de cada componente no organismo humano (CHEN e LARIVIERE, 2010; RATCLIFFE et al., 2011). Dentre os componentes presentes na toxina das abelhas há mais de 50 compostos químicos identificados tais como as enzimas fosfolipase A₂, fosfolipase B e hialuronidase, os peptídeos como a melitina, apamina, peptídeo degranulador de mastócitos (MCD), secapina e isoformas da melitina, as aminas como por exemplo a histamina, dopamina, noradrenalina, serotonina e catecolamina, entre outros componentes (BRIDGES e OWEN, 1984; JUNIOR et al., 2010; MORENO e GIRALT, 2015; RADY et al., 2017; RATCLIFFE et al., 2011; SCIANI et al., 2010; SUNG e LEE, 2021). A Fosfolipase A₂ junto à melitina são os componentes mais abundantes na peçonha de *A. mellifera*, correspondendo, respectivamente, 11% e 40 a 60% do peso seco da peçonha (JUNIOR et al., 2010; SCIANI et al., 2010). Os componentes e suas concentrações na peçonha de *A. mellifera* podem se alterar de acordo com a estação do ano e também de fatores como a idade dos indivíduos (JUNIOR et al., 2010; SCIANI et al., 2010).

Como mostrado na Tabela 1, a peçonha de abelha e de vespa são muito semelhantes, diferenciando-se apenas quanto a alguns peptídeos, como, por exemplo, a melitina que está presente apenas na peçonha da abelha e o mastoparano que é um peptídeo predominante na peçonha de vespa (MORENO e GIRALT, 2015).

Tabela 1. Principais proteínas e peptídeos encontrados na peçonha de abelha e de vespa.

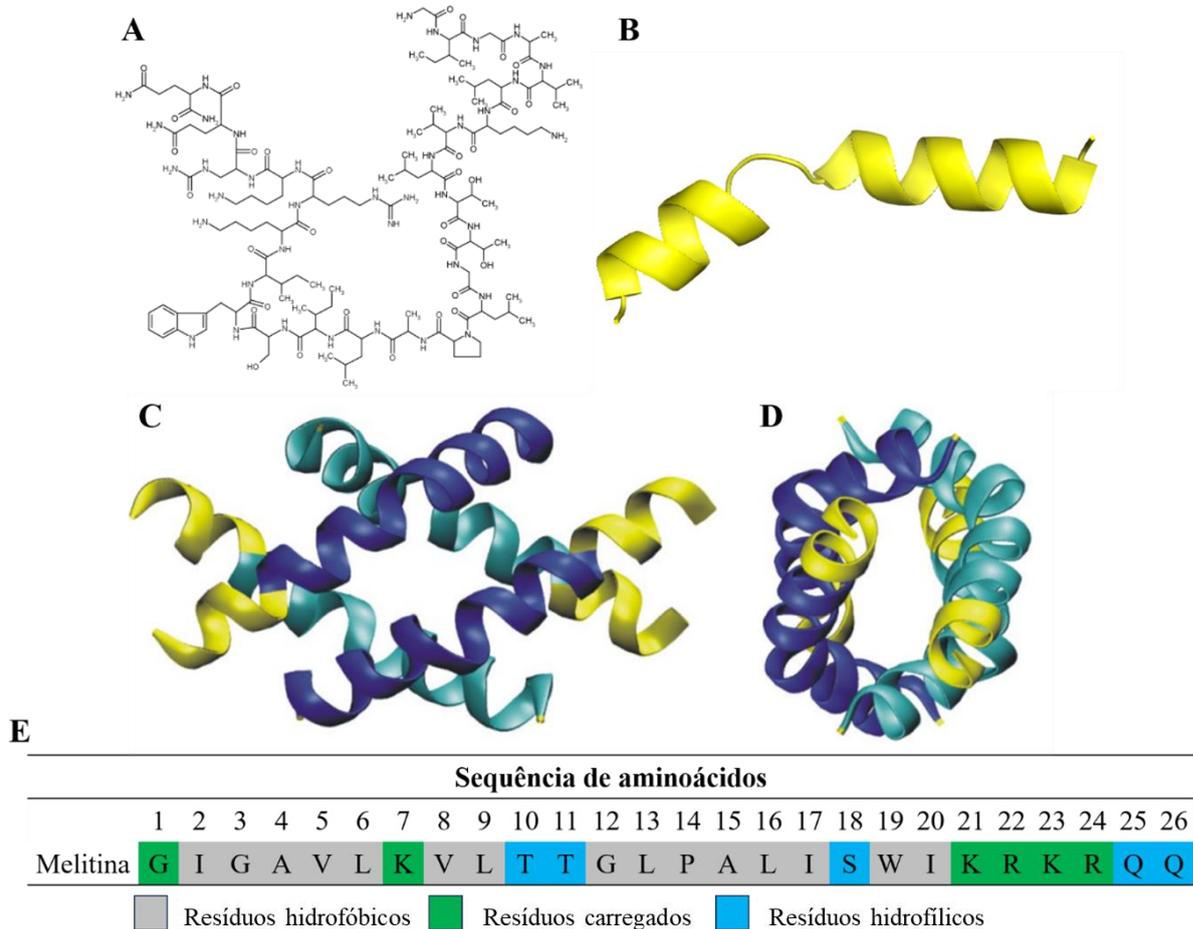
Peçonha de abelha	Peçonha de vespa	Tipo e MM (Da)	Composto (%)	Tóxico
Fosfolipase A2	Fosfolipase A2	Enzima (~18 kDa)	10-12	Sim
Fosfolipase B	Fosfolipase B	Enzima (~26 kDa)	1	Sim
Hialuronidase	Hialuronidase	Enzima (~54 kDa)	1.5-2	Sim
Fosfatase	Fosfatase	Enzima (~60 kDa)	1	Não
α -Glucosidase	α -Glucosidase	Enzima (~170 kDa)	0.6	Não
Melitina	-	Peptídeo (2847 Da)	40-50	Sim
Apamina	-	Peptídeo (2027 Da)	2-3	Sim
Peptídeo MCD	-	Peptídeo (2593 Da)	2-3	Sim
-	Mastoparano	Peptídeo (1422 Da)	-	Sim
-	Bradicinina	Peptídeo (1060 Da)	-	Não

Fonte: Adaptado de MORENO e GIRALT, 2015.

2.5 Melitina

A melitina é um dos principais componentes da apitoxina, e também o mais letal, compondo cerca de 40% a 60% da apitoxina, entretanto, este é um peptídeo com grande potencial terapêutico (SCHMIDT, 1995; SON et al., 2007; ZHANG et al., 2024). Como mostrado na Figura 4, esse peptídeo contém 26 resíduos de aminoácidos (GIGAVLKVLTTGLPA-LISWIKRKRQQ-NH₂) distribuídos em uma conformação de dois segmentos α -helicoidais. A estrutura geral da melitina é de haste dobrada com um lado apolar e outro polar (Figura 4B), sendo uma molécula hidrossolúvel, catiônica e anfipática que pode ser encontrada em tetrâmeros (Figura 4C e 4D) (GUHA et al, 2021; TERWILLIGER e EISENBERG, 1981). Devido sua anfipaticidade e conformação em α -hélice, a melitina é capaz de romper as bicamadas fosfolipídicas, promovendo inúmeros efeitos nas células, sendo a melitina altamente hemolítica mesmo em baixas concentrações (RATCLIFFE et al., 2011; SWIATLY-BLASZKIEWICZ et al., 2020; TERWILLIGER e EISENBERG, 1981). No saco de peçonha da abelha é possível encontrar a melitina em tetrâmeros, no momento que esta peçonha é liberada este tetrâmero é dissociado produzindo quatro monômeros (PICOLI et al., 2017; ZHANG et al., 2024). Estudos demonstram que a melitina atua de forma sinérgica com a fosfolipase A2, e junto com a hialuronidase são os principais componentes responsáveis pelas reações alérgicas (MORENO e GIRALT, 2015; OWEN, 1979).

Figura 4. O peptídeo mais abundante na peçonha de abelhas, a melitina. A) Fórmula estrutural da melitina. B) Estrutura secundária da melitina. C) Melitina em tetrâmeros, visão frontal. D) Melitina em tetrâmeros, visão lateral. E) Sequência da melitina demonstrando os resíduos e suas características bioquímicas.



Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos de JAMPILEK e KRALOVA, 2021 e GIOVAMBATTISTA et al., 2008.

Sendo a melitina o componente mais abundante na peçonha de *A. mellifera* diversos estudos sobre sua ação no organismo foram realizados, demonstrando os efeitos terapêuticos da melitina no tratamento de doenças como aterosclerose, reumatismo e câncer, além de ser descrito na literatura suas propriedades antifúngicas, antibacteriana, antivirais e anti-inflamatórias (CHOI et al., 2015; MEMARIANI e MEMARIANI, 2020; MORENO e GIRALT, 2015; ZHANG et al, 2024). As células cancerígenas do pulmão, fígado, bexiga, próstata, renais, leucêmicas, ovário e glioma foram inibidas *in vitro* com o uso da melitina ($IC_{50} = \geq 1 \mu M$) (GAJSKI e GARAJ-VROHAV, 2013; HAIT e LEE, 1985). Dentre os fungos inibidos pela melitina, é possível citar *Aspergillus* (MIC = 1.25 μM), *Botrytis* (MIC = 60 μM), *Candida* (MIC

= 0.4-10 μM), *Colletotrichum* (MIC = 16 μM), *Fusarium* (MIC = 0.8-8 μM), *Malassezia* (MIC = 0.625-20 μM), *Neurospora* (IC₅₀ = 0.8 μM), *Penicillium* (MIC = 20 μM), *Saccharomyces* (MIC = 0.35-6.25 μM), *Trichoderma* (MIC = 4-32 μM), *Trichophyton* (MIC = 2.25-6.3 μM) e *Trichosporon* (MIC = 0.63-10 μM) (MEMARIANI e MEMARIANI, 2020). As bactérias *Streptococcus* (MIC = 0.78-6.25 $\mu\text{g/mL}$) e *Straphylococcus* (MIC = 0.78-6.25 $\mu\text{g/mL}$) também foram inibidas pela melitina *in vitro*, porém, a administração *in vivo* intensificou o processo de infecção bacteriana (CHOI et al., 2015). A melitina de *A. mellifera* teve atividade anti-viral contra o vírus da herpes simplex tipo 1 e tipo 2 (HSV-1 e HSV-2) *in vitro* com IC₅₀ de 4.9 $\mu\text{g/mL}$ e 4.39 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Além disso, estudos mostram a atividade da melitina contra os vírus *Flaviviridae* (2 $\mu\text{g/mL}$ reduziu o título de BoHV-1), *Herpesviridae* (IC₅₀ = 4.39-4.9 μM), *Orthomyxoviridae* (EC₅₀ = 1.81 $\mu\text{g/mL}$ para PR8), *Picornaviridae* (EC₅₀ = 0.49 $\mu\text{g/mL}$ para EV-71), *Pneumoviridae* (EC₅₀ = 0.35 $\mu\text{g/mL}$ para RSV), *Rhabdoviridae* (EC₅₀ = 1.18 $\mu\text{g/mL}$ para VSV) e *Virgaviridae* (5 μM de melitina reduziu em 10% a infectividade do TMV) (MEMARIANI et al., 2020; PICOLI et al., 2018; PRAPHAWILAI et al., 2024; UDDIN et al., 2016).

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos, e o uso da peçonha de abelha na acupuntura já foi descrito na literatura como benéfico para o tratamento desta doença (CHO et al., 2012). Kim et al. (2019) mostraram que o uso de fosfolipase A₂ da peçonha de abelha obteve efeitos de melhora da função motora e proteção substancial contra a neurodegeneração, porém, a melitina purificada não alcançou os mesmos efeitos. O Alzheimer é outra doença neurodegenerativa que afeta a função cognitiva humana. Um estudo que induziu a neurodegeneração por meio do fragmento beta amiloide A β_{25-35} demonstrou benefícios no sistema colinérgico com a administração da melitina, mostrando um caráter neuroprotetor da melitina por meio da regulação das vias Nrf2/HO-1 e TrkB/CREB/BDNF em células HT22 (NGUYEN e LEE, 2021).

2.6 Na, K-ATPase (EC (7.2.2.13))

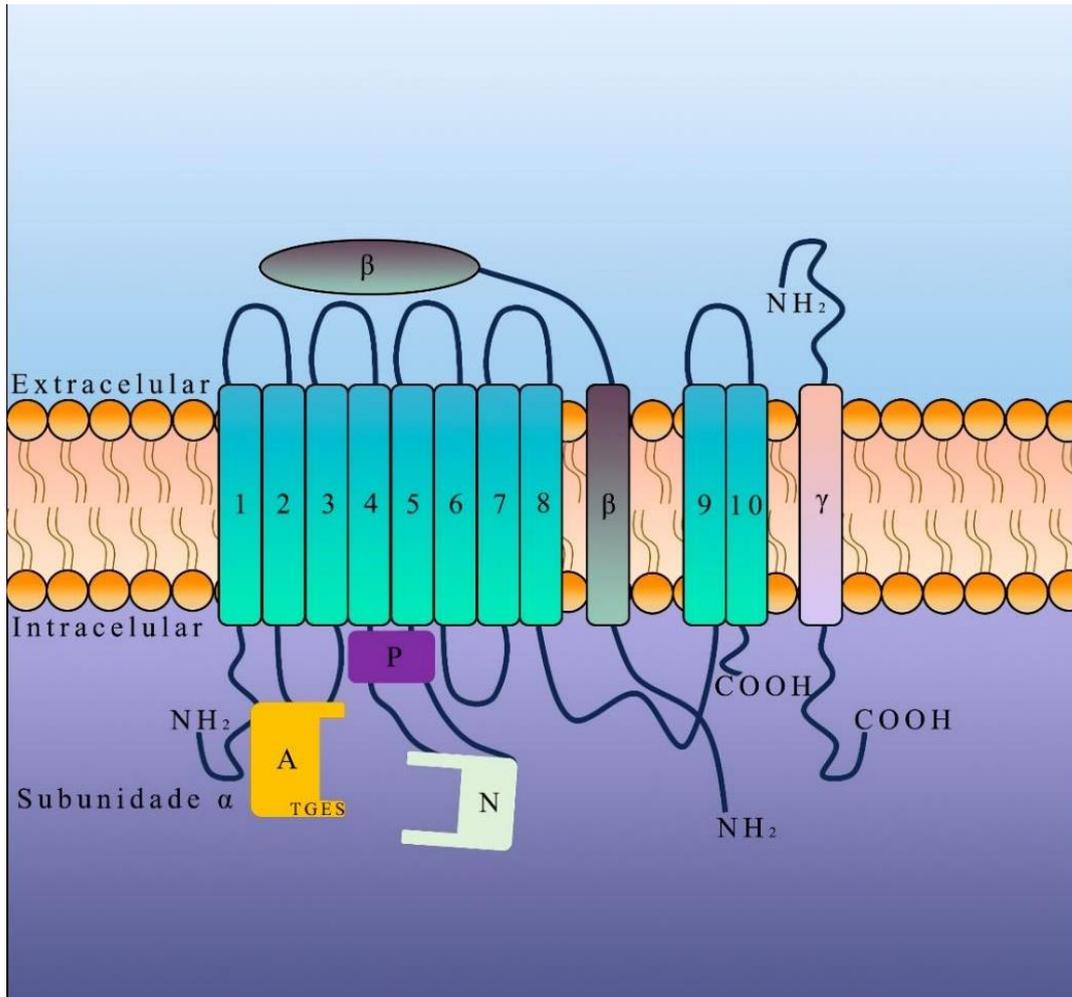
A Na, K-ATPase é uma enzima responsável por realizar o balanceamento dos íons do interior e exterior da membrana plasmática, sendo fundamental para realizar uma diferença de potencial elétrico que permite a difusão do impulso nervoso nas células neuronais. A Na, K-ATPase é uma enzima que atua contra o gradiente de concentração dos íons transportados, sendo necessário a hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) para lançar três íons de sódio para o meio extracelular e dois íons de potássio para o meio intracelular (LINGREL, 2010; SKOU e

ESMANN, 1992; YONEDA, 2014). Além da função no processo de excitabilidade das células neuronais, a Na, K-ATPase também gera gradientes em outros órgãos do corpo, não se limitando apenas a questão do impulso nervoso do cérebro, mas também atuando na reabsorção de sódio e água do filtrado glomerular no néfron, e participa da atividade de absorção de líquido nos pulmões e intestino e também, possui uma importante função na regulação osmótica das células (BAGROV et al., 2009; LINGREL, 2010).

Essa enzima possui três subunidades sendo estas α , β e um peptídeo da família FXYD (γ), sendo que para cada subunidade existem isoformas que modificam a Na, K-ATPase a ponto de especificar sua função (Figura 5) (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; LINGREL, 2010). A subunidade α contém aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos, e apresenta massa molecular de 110 kDa (KAPLAN, 2002). Nesta subunidade há os sítios de ligação para os íons Na^+ e K^+ e também para seu inibidor específico, a ouabaína. Logo, essa subunidade é a responsável pela atividade catalítica, e também apresenta três domínios funcionais; o domínio atuador (A), o domínio em que se liga o nucleotídeo (N) onde há os sítios de ligação para a adenosina trifosfato (ATP), e, o domínio que ocorre a fosforilação (P) (BLANCO et al., 1994). O domínio atuador (A) da subunidade α contém o motivo TGES que participa da desfosforilação da enzima, atuando como um regulador da afinidade da Na, K-ATPase com o ATP (MORTH et al., 2009). Vale ressaltar que o motivo TGES atua na desprotonação do aspartato³⁶⁹ que está fosforilado na enzima durante o ciclo catalítico, sendo assim, o motivo TGES é altamente conservado na Na, K-ATPase assim como em outras P-ATPases como por exemplo a Ca^{+2} -ATPase, visto que é uma região fundamental para o processo de fosforilação e desfosforilação destas enzimas (ANTHONISEN et al., 2006; CLAUSEN et al., 2004; JORGENSEN et al., 2003). No segmento transmembrana 1 estão presentes duas glicinas, Gli^{93} e Gli^{94} , as quais interagem com os íons Na^+ e K^+ e auxiliam no equilíbrio da conformação E_2P descrita posteriormente (EINHOLM et al., 2005).

A subunidade β da Na, K-ATPase é uma glicoproteína tipo II que possui função pouco conhecida, é descrita como capaz de facilitar a integração e o empacotamento da subunidade α catalítica recém sintetizada, além de também definir a intensidade da afinidade da subunidade α com o sódio e o potássio (GEERING, 2008). Tanto a subunidade β quanto a γ possuem apenas um domínio transmembranar, enquanto a subunidade α apresenta dez domínios transmembranares (ARNAIZ e ORDIERES, 2014).

Figura 5. Representação esquemática da enzima Na, K-ATPase.



Fonte: Acervo do autor.

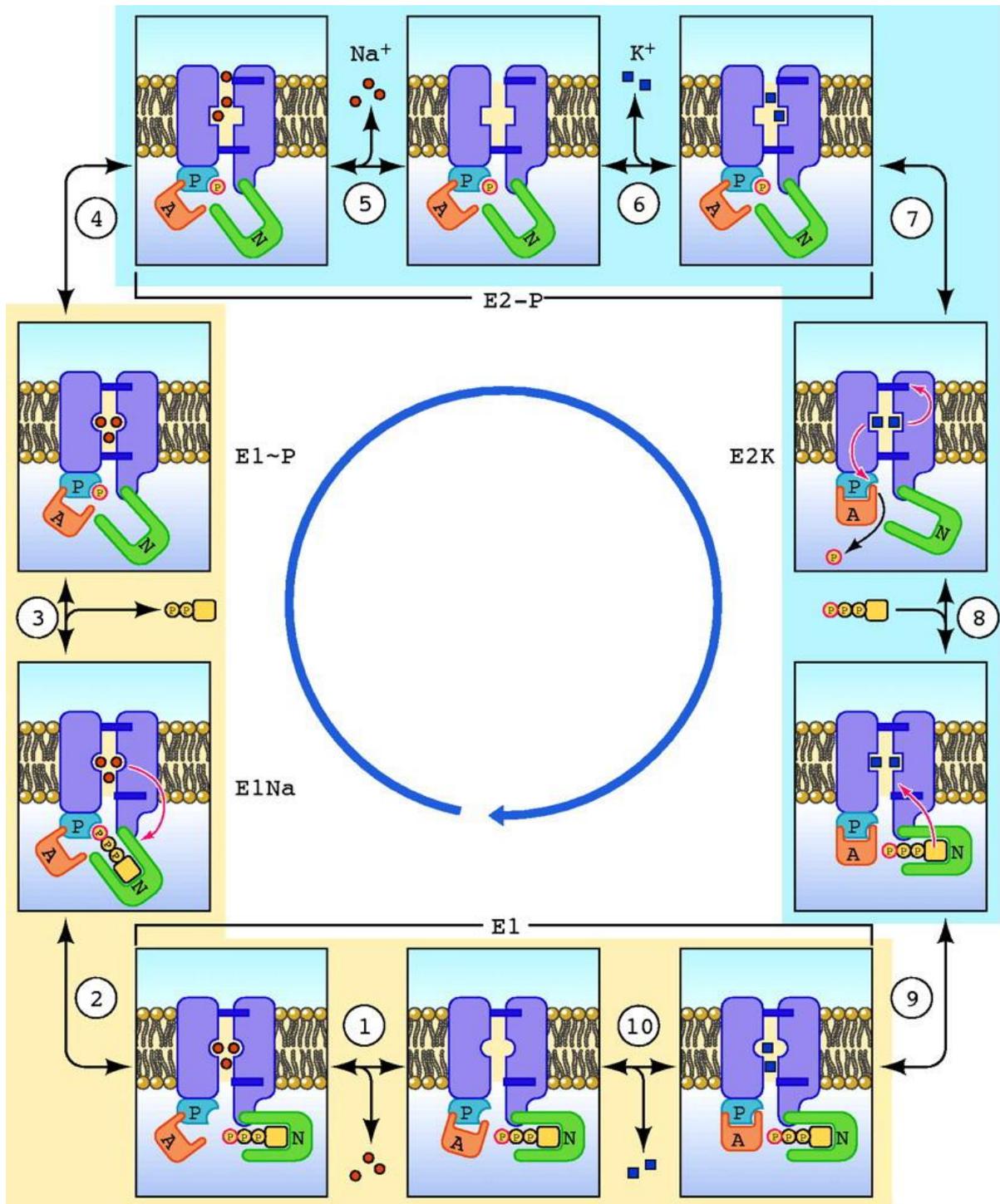
Associado as subunidades α e β , há a subunidade γ , um peptídeo da família FXYD. A família FXYD é composta por sete membros, FXYD1 (*Phospholemman*), FXYD2 (subunidade γ da Na, K-ATPase), FXYD3 (marcador tumoral da glândula mamária), FXYD4 (fator induzido por hormônio corticosteróide), FXYD5 (regulador de canais iônicos), FXYD6 (regulador de canais de sódio) e FXYD7 (expressa no cérebro) (BÉGUIN et al., 2002; CRAMBERT e GEERING, 2003; DELPRAT et al., 2007; LI et al., 2023; PIHAKASKI-MAUNSBACH et al., 2006). Os peptídeos da família FXYD são amplamente distribuídos pelos tecidos dos mamíferos, principalmente nos tecidos que desempenham funções de transportar fluidos ou solutos, ou que possam ser excitáveis (CORTES et al., 2011; CRAMBERT e GEERING, 2003). A subunidade γ pode ou não estar presente na estrutura da Na, K-ATPase, sendo considerada um componente não essencial dessa enzima (CORTES et al., 2011). É descrito na literatura sua

função regulatória, modulando a afinidade da Na, K-ATPase com os íons Na^+ e K^+ além de modular a afinidade com o ATP (ARNAIZ e ORDIERES, 2014; GARÇON, 2007).

A Na, K-ATPase é uma enzima que realiza uma fosforilação transitória durante o seu ciclo funcional, alterando sua conformação para aumentar ou diminuir sua afinidade para os íons Na^+ e K^+ , sendo as principais conformações dessa enzima os estados E_1 e E_2 (Figura 6) (HORISBERGER, 2004).

De acordo com o modelo de Horisberger (2004), o ciclo funcional da Na, K-ATPase possui 10 etapas, onde a etapa 1 corresponde a enzima na forma $E_1\text{ATP}$, na qual os domínios citoplasmáticos A, N e P estão afastados e o ATP está ligado ao domínio N. Três íons Na^+ de origem extracelular se ligam ao sítio de alta afinidade proporcionado pela ligação do ATP, proporcionando uma mudança na conformação que aproxima o fosfato do ATP próximo ao sítio de fosforilação (Etapa 2). Ocorre então a hidrólise do ATP resultando na fosforilação do aspartato presente no domínio P, essa fosforilação induz uma mudança conformacional que resulta no fechamento do canal intracelular e consequente oclusão dos íons Na^+ que estão ligados a enzima, logo, neste momento a enzima Na, K-ATPase está na conformação $E_1\text{P}(3\text{Na}^+)$ (Etapa 3). Com os íons Na^+ ligados à enzima é possível descrever o estado $E_1\text{P}(3\text{Na}^+)$ como de alta energia, que posteriormente é convertido no estado $E_2\text{P}(2\text{Na}^+)$, nesta conformação a afinidade com os íons Na^+ diminui, além disso, nesta conformação a porta para o meio extracelular é aberta (Etapa 4). A saída do primeiro íon Na^+ para o meio extracelular induz a Na, K-ATPase a alterar sua conformação que diminui ainda mais a afinidade com os íons Na^+ remanescentes, liberando-os (Etapa 5). Essa mudança na conformação da enzima aumenta a sua afinidade para os íons K^+ presentes no meio extracelular, de modo que dois íons K^+ se ligam à enzima no estado $E_2\text{P}$ (Etapa 6). A ligação destes íons resulta na desfosforilação do domínio P, além de alterar a conformação da enzima fechando a porta extracelular e resultando na oclusão dos íons K^+ , neste momento a enzima está na forma $E_2\text{K}$ (Etapa 7). A ligação de uma molécula de ATP ao domínio N altera a conformação da Na, K-ATPase, afastando os domínios A e P, e diminuindo a afinidade da enzima com os íons K^+ , além de abrir o portão para a saída dos íons (Etapa 8). Com essa diminuição da afinidade com os íons K^+ a enzima altera a sua conformação da forma $E_2\text{ATP}(2\text{K}^+)$ para a forma $E_1\text{ATP}(2\text{K}^+)$ (Etapa 9). Após a saída dos íons K^+ para o meio intracelular, a enzima retorna a conformação E_1 , ainda ligada ao ATP, finalizando o ciclo de bombeamento de íons e preparada para iniciar um próximo ciclo (Etapa 10).

Figura 6. Esquema do ciclo funcional da Na, K-ATPase.



Fonte: Adaptado de HORISBERGER, 2004.

2.7 Reguladores de atividade da Na, K-ATPase

A Na, K-ATPase pode ter sua atividade regulada por meio de fatores hormonais, autócrinos e parácrinos (MCDONOUGH e FARLEY, 1993). Na literatura são descritos três níveis de regulação para a Na, K-ATPase por meio dos hormônios, sendo estes a regulação do

Na^+ celular total, a regulação da distribuição celular da Na, K-ATPase e a regulação da atividade intrínseca da Na, K-ATPase. A regulação do conteúdo total de Na, K-ATPase permite que as células mantenham a sua homeostase, se adaptando continuamente às demandas de transporte de íons (PIRKMAJER e CHIBALIN, 2019).

Os hormônios são responsáveis pela regulação da expressão e da atividade enzimática da Na, K-ATPase, principalmente por meio da fosforilação por proteínas cinases (CORDEIRO et al., 2024). Sabe-se que a subunidade α da Na, K-ATPase possui diversos resíduos de serina, treonina e tirosina que podem ser fosforilados pelas enzimas cinases (CORDEIRO et al., 2024). A tiroxina e a aldosterona são alguns dos hormônios que regulam a expressão da enzima Na, K-ATPase em mamíferos, porém, pode-se citar também as catecolaminas, dopamina, epinefrina, norepinefrina, hormônios tireoidianos e a insulina (CORDEIRO et al., 2024; PIRKMAJER e CHIBALIN, 2019). A aldosterona estimula a atividade da Na, K-ATPase por meio do aumento da expressão desta enzima na superfície celular (FERAILLE e DIZIN, 2016). Hormônios tireoidianos, como por exemplo, a tiroxina estimula a atividade da Na, K-ATPase no músculo esquelético (CLAUSEN, 2003; LEI et al., 2003). Compostos como a insulina, a dopamina e os agonistas adrenérgicos agem modulando a atividade da Na, K-ATPase (LEI et al., 2003).

A regulação da Na, K-ATPase também pode ocorrer pela fosforilação reversível no sítio não catalítico da subunidade α , ou por meio de alterações na concentração intracelular do Na^+ (LEI et al., 2003). O aumento da concentração de Na^+ , K^+ ou de ambos, aumenta a atividade da enzima Na, K-ATPase, seja por meio do bombeamento dos íons ou até pela exposição a agentes externos que aumentem ou diminuam a permeabilidade destes íons (CLAUSEN, 2003).

A subunidade γ , isto é, o peptídeo da família FXYD, mais especificamente o FXYD2, afeta a cinética enzimática da Na, K-ATPase de forma diferente, que se altera de acordo com sua variante FXYD2a ou FXYD2b (CORDEIRO et al., 2024). Apesar disso, ambas as variantes diminuem a afinidade da Na, K-ATPase com os íons sódio, o que regula de forma negativa a atividade da Na, K-ATPase (CORDEIRO et al., 2024).

2.8 Inibidores da atividade da Na, K-ATPase

Os esteroides cardiotônicos são substâncias capazes de inibir a enzima Na, K-ATPase. Esses compostos são produzidos por espécies vegetais para defesa, visto que as plantas não possuem a Na, K-ATPase endógena, logo, não sofrem com o efeito tóxico proporcionado pela inibição desta (CLAUSEN et al., 2017; KANAI et al., 2021). Vale ressaltar que algumas espécies de sapos e insetos possuem toxinas que adquirem de plantas por meio da alimentação,

tolerando de certa forma a toxina por meio de mutações no gene que codifica a Na, K-ATPase (CLAUSEN et al., 2017). Dois exemplos de esteroides cardiotônicos que são inibidores específicos da Na, K-ATPase são a digoxina e a ouabaína (XU et al., 2021). O sítio de ligação para os esteroides cardiotônicos se encontra na subunidade α , mais especificamente entre o primeiro e o segundo, quinto e sexto, e sétimo e oitavo domínio transmembrânico (BAGROV et al., 2009; OBRADOVIC et al., 2023).

A digoxina é um esteroide cardiotônico extraído da planta conhecida popularmente como dedaleira (*Digitalis purpurea*), sendo também uma substância reconhecida como potente inibidor da Na, K-ATPase (SHIM e LIU, 2014). Esse composto tem um histórico de uso para o tratamento de doenças cardíacas como arritmia e insuficiência cardíaca (SHIM e LIU, 2014).

A ouabaína é uma substância esteroide, cardiotônico muito utilizada para tratar arritmias e insuficiência cardíaca. Esta molécula é encontrada em sementes maduras de *Strophantus gratus*, mas também é produzida em pequena quantidade pela glândula adrenal em regiões do hipotálamo do organismo humano. Devido ao conhecimento da mesma ligar-se especificamente à subunidade α catalítica da Na, K-ATPase, ela é amplamente utilizada em estudos como inibidor específico dessa enzima (AMARAL, 2006; OU et al., 2017; PENG et al., 1996; QUINTO, 2018). Vale ressaltar que a ouabaína se liga à Na, K-ATPase quando a mesma está no estado E2P, isto é, com menor afinidade aos íons Na^+ e maior afinidade aos íons K^+ . O sítio de ligação da ouabaína está localizado na face extracelular da fenda transmembrana por onde atravessam os íons, realizando uma conformação na Na, K-ATPase que “fecha” o portão extracelular inibindo sua função (OGAWA et al., 2009).

Estudos anteriores mostraram que a melitina é um inibidor de Na, K-ATPase, de modo que a ação desse inibidor pode afetar a atividade sináptica do indivíduo e em doses excessivas levam ao óbito (BAKER et al., 1995; CHEN e LIN-SHIAU, 1985; CUPPOLETTI e ABBOTT, 1990). Entretanto, é importante investigar se existem diferentes isoformas da melitina de acordo com subespécie de *A. mellifera* e como estas agem sobre a Na, K-ATPase. Reconhecer os efeitos da melitina sobre a Na, K-ATPase e a forma de atuação de sua inibição complementa os dados necessários para compreender o modo que a peçonha de *A. mellifera* atua no organismo.

2.9 Técnicas de separação de proteínas e predição *in silico*

Sabendo que a melitina é um peptídeo, e que a peçonha de *Apis mellifera* apresenta tanto peptídeos quanto proteínas, é relevante conhecer métodos eficientes de separação dessa classe de compostos moleculares. Uma técnica de separação de proteínas é a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) descrita por Laemmli, U. K. (1970),

neste caso as amostras são primeiramente tratadas com o detergente SDS que irá desnaturar as proteínas e a envolver em uma carga negativa, para posteriormente serem colocadas em poços presentes em um gel de poliacrilamida que desempenhará o papel de uma malha. Por fim, será aplicada uma corrente elétrica que irá atrair as proteínas do poço para o polo positivo, visto que elas estão carregadas negativamente pelo SDS, sendo então separadas pelo tamanho de acordo com a disposição da malha do gel de poliacrilamida (Adaptado de LAEMMLI, 1970).

Outra técnica de separação é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), essa técnica utiliza uma coluna cromatográfica preenchida com uma fase estacionária, e uma fase móvel que irá carregar a amostra através dessa coluna e conseqüentemente a separar de acordo com as características da coluna (SNYDER et al., 2011). A espectrometria de massas é uma técnica que determina a razão massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em formas gasosas, sendo o espectrômetro de massas um instrumento que contém uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (CANTÚ et al., 2008).

Esses métodos descritos acima correspondem a uma das ciências ômicas, a proteômica, que busca compreender as interações proteicas e suas características bioquímicas (AEBERSOLD e MANN, 2003).

Por outro lado, as técnicas *in silico* utilizam cálculos computacionais para compreender as proteínas e seus ligantes, sendo necessário conhecer a estrutura da proteína primeiramente, algo que é possível através de técnicas como a cristalografia, ressonância magnética nuclear (RMN) e também de predições para moléculas pequenas como a realizada pelo servidor Swiss-Model (FORLI et al., 2016). Para realizar um *Docking molecular* além da estrutura da molécula é necessário um software ou servidor para realizar a interação do ligante com a proteína, sendo possível encontrar uma gama de ferramentas, como por exemplo o AutoDock, HADDOCK, SwissDock, ZDOCK, entre outros (FORLI et al., 2016; HONORATO et al., 2024; PIERCE et al., 2011; BUGNON et al., 2024).

3. OBJETIVOS

Caracterizar a composição da peçonha de *Apis mellifera* do Mato Grosso do Sul e verificar os efeitos biológicos e bioquímicos da interação entre a melitina e a Na, K-ATPase.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um coletor de apitoxina.

Obter e extrair a peçonha de *Apis mellifera*.

Quantificar as proteínas presentes na apitoxina.

Analisar a composição proteica da apitoxina.

Avaliar os efeitos da apitoxina e da melitina sobre a atividade da Na, K-ATPase *in vitro* e *in silico*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Confeção do coletor de apitoxina

Foi confeccionado um coletor de apitoxina utilizando materiais simples e de fácil acesso. O processo de confecção e teste está descrito no anexo I dessa dissertação, enquanto o depósito da patente corresponde ao anexo II.

4.2 Coleta da Apitoxina

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen com número de cadastro A6D6C06, sendo a coleta da apitoxina realizada na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (20°30'27.3"S 54°37'06.1"W), local onde há enxames de *A. mellifera* utilizados para pesquisa e aulas de apicultura. Também foi realizada uma coleta na fazenda escola da UFMS, próxima a Terenos (20°26'30.651"S 54°50'48.339"W). Em cada coleta, foram necessários utilizar os equipamentos de proteção individual tais como luvas e botas de borracha, macacão de apicultor ventilado e fumigador. No local da coleta, o coletor de apitoxina foi ligado e posicionado na entrada da colmeia, sem a utilização de fumaça, sendo esta utilizada apenas para a dispersar as abelhas após as coletas. O coletor de apitoxina permaneceu ligado durante 20 minutos em um enxame e 20 minutos em outro, sem retirar as abelhas do coletor. Após a coleta, esperou-se 2 horas até que a apitoxina secasse no vidro do coletor, realizando posteriormente a raspagem da apitoxina com uma lâmina inoxidável e depositando-a em um microtubo de 1,5 mL. Foram registradas as seguintes variáveis para a coleta: clima, concentração de proteínas (mg/mL), comportamento das abelhas, lua e peso seco (apitoxina). Quanto ao comportamento das abelhas foram classificadas em pouco defensivas (1/4 da área do coletor com abelhas), defensivas (1/2 da área do coletor com abelhas) e muito defensivas (ocuparam toda a área do coletor). Este método de coleta de apitoxina foi selecionado dentre as opções presentes na literatura devido à eficiência em relação aos outros métodos, como a extração manual (GRAAF et al., 2021; JUNIOR et al., 2010).

4.3 Dosagem de proteínas

O método de Bradford (1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteínas nas amostras de apitoxina e Na, K-ATPase. A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

4.3.1 Preparo da amostra

As diferentes amostras de apitoxina foram concentradas em 5 µg/mL. Utilizou-se os seguintes reagentes para preparo da amostra: solução de SDS 10%, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol e glicerol (Adaptado de LAEMMLI, 1970). Em um microtubo de 0,5 mL foi adicionado a amostra em um volume correspondente à concentração pretendida. A partir deste valor foram adicionados um volume igual ao da amostra de solução de SDS 10%, um valor que corresponde a 20% do volume da amostra em azul de bromofenol, um valor que corresponde a 10% do volume da amostra em β-mercaptoetanol e 4 µL de glicerol. Este conteúdo foi homogeneizado em vórtex e armazenado até a aplicação no gel.

4.3.2 SDS-PAGE

Os reagentes utilizados para a confecção do gel foram os seguintes: solução de acrilamida/bis-acrilamida, tampão Tris-HCl 3,0M (pH 8,9), tampão Tris-HCl 1,5M (pH 6,8), solução de persulfato de amônio 10 mg/mL, solução de SDS 1%, tetrametiletilenodiamina P.A.. Para o gel de entrada, utilizou-se todos os reagentes acima com exceção do Tris-HCl 3,0M (pH 8,9), enquanto para o gel de corrida a exceção é o Tris-HCl 1,5M (pH 6,8) (LAEMMLI, 1970). Foram realizados géis de poliacrilamida SDS-PAGE em concentrações de 10%, 15%, 20% e gradiente (4-20%).

A corrida eletroforética foi realizada em um sistema completo de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra Cell da BIO-RAD, além do tampão de corrida (Tris-hidroximetilaminometano 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1%, pH 8,3) e das amostras preparadas anteriormente. Os géis 10% e 15% tiveram a duração da corrida de cerca de 2 horas e 30 minutos, enquanto o gel de 20% e gradiente alcançou cerca de 3 horas e 15 minutos de corrida eletroforética. Todas as corridas eletroforéticas foram realizadas sob uma tensão de 100 volts.

Após o término da corrida eletroforética, o gel foi colocado em uma solução corante (Coomassie Blue R-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%), permanecendo durante 2 horas sob agitação constante. Posteriormente, o gel foi colocado em solução descorante (etanol 30% e ácido acético 10%). O gel foi então armazenado em água destilada contendo azida sódica e posteriormente seco com solução de secagem (Metanol 40% e glicerol 1%) em um sanduíche de papel celofane especial. Este sanduíche foi colocado sobre uma placa de vidro até a secagem do gel. Por fim, os géis obtidos também foram fotografados com auxílio de câmera de celular e digitalizados pelo aplicativo *CamScanner* ou por meio da impressora *HP Smart Tank 581*.

4.3.3 Tricina-SDS-PAGE eletroforese para proteínas de baixa massa molecular

Para o preparo do gel foram utilizadas as seguintes soluções: Acrilamida/Bis acrilamida (49,5%), Tris 2,0M (24%, pH 8,45), SDS 0,3%, glicerol 100% (0,11%), persulfato de amônio 20% (0,065%) e tetrametiletilenodiamina 100% (0,0325%). O tampão do eletrodo (ânodo) é o Tris 0,2M pH 8,9, enquanto o tampão do eletrodo (cátodo) corresponde à uma solução de Tris 0,1M, Tricina 0,1M e SDS 0,1% pH 8,25 (SCHÄGGER e VON JAGOW, 1987).

A corrida eletroforética foi realizada em um sistema completo de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra Cell da BIO-RAD, além de utilizar dois tampões de corrida diferentes, o tampão do eletrodo ânodo é colocado abaixo do tampão do eletrodo cátodo. As amostras foram pipetadas nos poços, a cuba foi fechada e a corrida eletroforética foi iniciada a 100 Volts e durou cerca de 3 horas e 15 minutos. Por fim, as etapas de revelação, secagem e aquisição das imagens foram realizadas conforme item 4.3.2.

4.3.4 Determinação das massas moleculares relativas

Para identificar a massa molecular das bandas obtidas nos géis foi utilizado o marcador de massas moleculares *Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards – BIORAD* (1610396) que contém proteínas recombinantes marcadas com *Strep* (10-250 kDa), incluindo três bandas de referência (25, 50 e 75 kDa). As massas moleculares relativas foram calculadas por meio de um gráfico da distância de corrida (cm) pelo \log_{10} da massa molecular, obtendo-se uma reta e dessa foi retirada uma equação de primeiro grau ($y=ax+b$), que permite calcular a massa molecular relativa das bandas proteicas das amostras.

4.4 Efeito da peçonha bruta sobre a atividade da Na, K-ATPase

4.4.1 Obtenção e preparo da Na, K-ATPase

A Na, K-ATPase obtida pela doação do professor Carlos Frederico Leite Fontes (UFRJ). A Na, K-ATPase foi purificada a partir da medula renal externa de rim de porco pelo método de JORGENSEN (1974), modificado por JENSEN et al. (1984), o qual inclui um passo de ativação dos microssomas em presença de baixas concentrações do detergente aniônico SDS (0,04-0,06%). O tampão de homogeneização e armazenamento contém imidazol 12,6M, EDTA 0,625M e sacarose 250M, pH 7,4. Para testar a pureza da preparação, a atividade ATPásica desta preparação foi ensaiada na presença de ouabaína (1mM). Para fins de conservação de sua

atividade, a enzima foi mantida em congelador a -20°C , e durante os experimentos, evitou-se manter a amostra descongelada por muito tempo, sendo mantida em gelo durante o uso (4°C).

4.4.2 Atividade da Na, K-ATPase com e sem peçonha bruta

A atividade foi medida num meio reacional contendo EDTA (0,125 mM), NaCl (150 mM), KCl (6,25 mM), MgCl_2 (7,5 mM), Tris-HCl pH 7,4 (37,5 mM) e água destilada para completar o volume final (CARVALHO et al., 2012). Neste experimento, foi utilizada 35 μg de Na, K-ATPase e como substrato ATP (10 mM). A atividade foi medida em diferentes condições, apenas a enzima (controle), enzima + substrato (ATP), apenas o ATP para identificar a hidrólise espontânea, apenas peçonha bruta com ATP para identificar uma possível hidrólise pela peçonha e por fim os testes da enzima com a peçonha bruta nas concentrações de 10, 13, 15, 18, 20, 30, 40, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As diferentes concentrações de peçonha bruta foram pré-incubadas por 10 minutos com a Na, K-ATPase. Posteriormente, a reação foi iniciada com a incubação do ATP durante 60 minutos e a reação foi interrompida com TCA 30%. Para a quantificação colorimétrica do fosfato inorgânico liberado, foram utilizados molibdato de amônio (10 mM), acetona 100% e ácido cítrico (1M). As absorbâncias foram lidas em um leitor de microplacas Spectramax M5 em 355 nm. Para o cálculo da atividade específica da enzima foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\textit{Atividade específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\textit{Média das Absorbâncias} * FCC}{t * v * \textit{cont. proteico} \left(\frac{mg}{ml} \right)}$$

Onde, *FCC* é o fator de correção do fosfato, *t* é o tempo em minutos, *v* é o volume de enzima (mL) e *cont. proteico* é a concentração da enzima. Para o cálculo do FCC foi utilizado fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) como padrão. A atividade da enzima Na, K-ATPase, foi expressa como a quantidade de nmols liberados de fosfato inorgânico, por minuto, por mg de enzima (U/mg).

Por fim, 37,5 μL de KCl foi pipetado após a pré-incubação da enzima com a peçonha bruta. CUPPOLETTI e ABBOTT (1990) demonstrou uma relação entre a inibição da Na, K-ATPase pela melitina antes da interação com os íons K^+ e após, discutindo-se uma possível inibição competitiva com o sítio de ligação dos íons K^+ .

4.4.3 Cálculo do K_I e do IC_{50} da peçonha bruta

O K_I (constante de inibição) é uma medida que determina a eficácia de um inibidor em bloquear a atividade de uma enzima, o valor de K_I representa a concentração na qual o inibidor ocupa 50% dos sítios de inibição. A constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (K_I) foi determinada graficamente conforme descrito por (DIXON, 1953).

O IC_{50} corresponde a concentração de peçonha que irá inibir 50% da atividade enzimática. Os dados obtidos foram plotados no programa Graphpad prism 8 e por meio deste foi obtido o valor de IC_{50} .

4.5 Estudo *in silico* – Interação Na, K-ATPase e melitina.

4.5.1 Determinação das estruturas tridimensionais

Para a aquisição das estruturas tridimensionais foi utilizado o banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). Foram então selecionados PDB's da melitina (2MW6), e da Na, K-ATPase em conformação E1 (7E1Z), E1P (3WGV), E2 (7E20), E2P (7WZ0) e E2P-Oua (ligada com a ouabaína) (3A3Y) (GUO et al., 2022; KANAI et al., 2013; KANAI et al., 2022; OGAWA et al., 2009; PEREKALIN et al., 2015). Os PDB's escolhidos foram então corrigidos pelo servidor *Protein Repair e Analysis Server* (PRAS) para evitar problemas nas análises seguintes, uma vez que este servidor retira íons, água e cadeias de aminoácidos adicionais, além de adicionar átomos de hidrogênio que estejam faltando (NNYIGIDE et al., 2022).

4.5.2 Preparação do *docking molecular*

O *docking molecular* foi realizado utilizando o servidor *High Ambiguity Driven protein-protein Docking* (HADDOCK). Esta plataforma é utilizada para modelagem de complexos biomoleculares, suportando conjuntos de multicomponentes de proteínas, peptídeos, pequenas moléculas e ácidos nucleicos, sendo muito utilizado para identificar a relação proteína-ligante. Vale ressaltar que para realizar um *docking molecular* a estrutura necessita estar no estado mínimo de energia, evitando possíveis geometrias incorretas e desfavoráveis, além de aliviar as tensões da molécula. O HADDOCK possui uma etapa implementada em sua programação denominada *steepest descend* que realiza o processo de minimização energética global das estruturas implementadas.

O *docking molecular* envolve uma etapa de previsão da conformação do ligante e sua posição e orientação, isto é, a orientação da molécula, e uma etapa de avaliação da afinidade de ligação (MENG et al., 2011). Logo, a partir do *docking molecular* é possível ter diversas

previsões de uma estrutura do complexo proteína-ligante por meio de cálculos computacionais, de forma que os resultados dessas conformações são classificados a partir de uma pontuação de fidelidade, de modo que a melhor pontuação entre as amostragens representa a estrutura mais fiel a realidade. O algoritmo do HADDOCK fornece uma pontuação de Z Score, que quanto mais negativa, mais fiel a realidade é a interação entre proteína-ligante (MENG et al., 2011). O *docking molecular* pode ser realizado em dois meios diferentes, em meio aquoso ou em meio de membrana fosfolipídica. Neste estudo foram realizados *docking molecular* em ambos os meios.

Para iniciar o experimento *in silico* por meio do HADDOCK, foram selecionados resíduos ativos e passivos com base nos dados experimentais e literários que sugerem regiões de interação, para a melitina foram selecionados todos os resíduos, enquanto para a Na, K-ATPase foram selecionados os seguintes resíduos de aminoácidos como possíveis sítios de interação: R¹⁹⁸, D²¹⁴, Q²²⁵, N²³³, E³²⁷, D³³⁴, D³⁷⁶, T³⁷¹, T³⁷⁸, F⁴⁷⁵, K⁴⁸⁰, K⁵⁰¹, P⁵²⁹, R⁵⁴⁴, R⁵⁵¹, V⁵⁵², T⁶¹⁰, G⁶¹¹, A⁶⁹¹, D⁷¹⁰, D⁷¹⁴, E⁷⁷⁹, N⁷⁸³, Y¹⁰¹⁹ (GATTO et al., 1997; KARLISH et al., 2008; KROLL et al., 2020; MORTH et al., 2009; OHTA et al., 1986; PILOTELLE-BUNNER et al., 2009). Estes resíduos foram selecionados pois são sítios de interações entre a Na, K-ATPase e os íons, Na⁺ e K⁺, ou sítio de ligação ao ATP, ou possui alguma função no processo de mudança conformacional de E1P para E2. Reconhecer os possíveis locais de ligação entre as moléculas aumenta significativamente a eficiência do acoplamento, por tal fato foram escolhidos os resíduos descritos acima (MENG et al., 2011).

4.5.3 Análise das orientações pelo software PyMOL

Para identificar a melhor orientação gerada pelo HADDOCK foi utilizado o software PyMOL que demonstra as diferentes posições e orientações assumidas entre a proteína e o ligante. De tal modo que este software permitiu reconhecer a melhor orientação e gerar uma imagem da interação proteína e ligante, além de calcular o RMSD.

4.5.4 Análise das interações por meio do LigPlot⁺

Para análise das interações foi utilizado o software LigPlot⁺, que determina interações resíduo-resíduo, desde interações hidrofóbicas, a ligações de hidrogênio, ligações dissulfeto e interações salinas.

4.6 Atividade fosfolipásica da peçonha bruta em meio sólido

Para identificar a atividade fosfolipásica, foi utilizado um meio sólido de ágar (CHEN et al., 1997). Para preparo deste, foi utilizado CaCl_2 0,01M, gema de ovo diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 na proporção 1:3. Além disso, adicionou-se ágar bacteriológico 1% e de azida de sódio 0,005%. Este meio foi preparado em uma placa de Petri. Foram realizados experimentos com 50, 100 e 150 μg de peçonha bruta, utilizando-se 4 amostras de peçonha bruta coletadas em momentos diferentes. Essas concentrações foram aplicadas em orifícios de 5mm de diâmetro feitos no gel, seguidos por uma incubação a 37°C durante 24 horas. A formação de halos translúcidos ao redor dos orifícios no gel indica atividade fosfolipásica.

4.7 Atividade fosfolipásica da peçonha bruta em meio líquido

Para determinar a atividade fosfolipásica em meio líquido foi utilizado o método adaptado de De-Haas e colaboradores (1968), que é fundamentado em uma titulação potenciométrica. Para o meio reacional foi utilizado uma emulsão de gema de ovo (uma gema de ovo diluída em água destilada, com volume final de 50 mL), desoxicolato de sódio 0,03 M e CaCl_2 0,06 M. Foram então realizadas triplicadas, sendo pipetado 100 μL de peçonha de *A. mellifera* em uma concentração de 1mg/mL. Para determinar os ácidos graxos liberados pela atividade fosfolipásica, foi utilizado como titulante uma solução padrão de NaOH 1 M em pH 8,0 a temperatura ambiente. Assim, a atividade fosfolipásica foi expressa em microequivalentes de base (NaOH) consumida por minuto, enquanto a atividade específica foi expressa pelo número de microequivalentes de base consumida por minuto por mg de proteína. Além disso, foi utilizado solução salina e EDTA para determinar a hidrólise espontânea e a atividade catalítica na ausência de Ca^{+2} , respectivamente.

4.8 Análise estatística dos dados

Para a análise dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 8, utilizando testes de regressão linear simples e ANOVA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta de apitoxina

Foram realizadas 14 coletas com rendimento de 191,5 mg de peçonha bruta (Tabela 2). Nas últimas adaptações realizadas no coletor e suas respectivas coletas, obteve-se uma média de 20,65 mg de peçonha bruta por coleta. No caso de coletor intensivo, em que é posicionado 10 quadros (24 cm x 33 cm) contendo o aparato com vidro e componentes para a eletroestimulação dentro da colônia, resultam em 272 mg de peçonha por mês, para a subespécie europeia (SERRINHA et al., 2019). Por outro lado, Benton e colaboradores (1963) descrevem que dependendo da dimensão do coletor de apitoxina, da intensidade do enxame e da estação do ano em que foi realizado a coleta, em 40 minutos, é possível coletar em média 1 g de apitoxina por colônia.

Tabela 2. Coletas realizadas no apiário da RPPN da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. A coleta da A14 foi realizada no apiário da fazenda escola, próximo a Terenos.

Identificação	Data da coleta	Concentração de proteínas (mg/mL)	Peso seco da apitoxina (mg)
A1	17/08/2023	0,7075	7,8
A2	20/09/2023	0	-
A3	04/10/2023	1,6622	-
A4	01/11/2023	0	-
A5	22/11/2023	2,7549	-
A6	08/12/2023	0,9809	5,6
A7	02/02/2024	2,7727	17,6
A8	16/02/2024	1,9018	19,6
A9	01/03/2024	2,2285	22,4
A10	15/03/2024	9,31	17,5
A11	28/03/2024	7,0664	26,3
A12	19/04/2024	4,1218	21,7
A13	03/06/2024	9,1916	36,3
A14	11/07/2024	1,9884	16,7

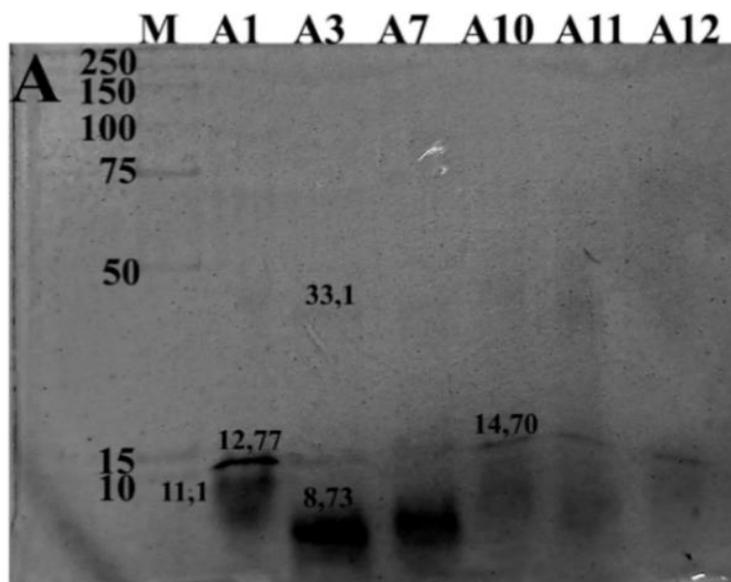
5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foram selecionadas as amostras A1, A3, A7, A10, A11 e A12 para observar uma possível diferença de composição entre as amostras de acordo com o período de coleta, isto é, entre as mais antigas, e as mais recentes. Sendo assim, para uma identificação inicial dos componentes presentes na apitoxina foram realizados géis de poliacrilamida SDS-PAGE e gel

para proteínas de baixa massa molecular (Tricina-SDS-PAGE), tendo em vista que em comparação ao SDS-PAGE, o gel de Tricina-SDS-PAGE apresenta uma maior resolução para as proteínas de baixa massa molecular. Para evidenciar o maior número de bandas e conseguir separar os componentes pela sua massa molecular foram realizados géis de poliacrilamida em quatro diferentes concentrações, 10% (Figura 7), 15% (Figura 8), 20% (Figura 9) e em gradiente (4-20%) (Figura 10), além disso, também foi realizado um gel para proteínas de baixa massa molecular (Figura 11).

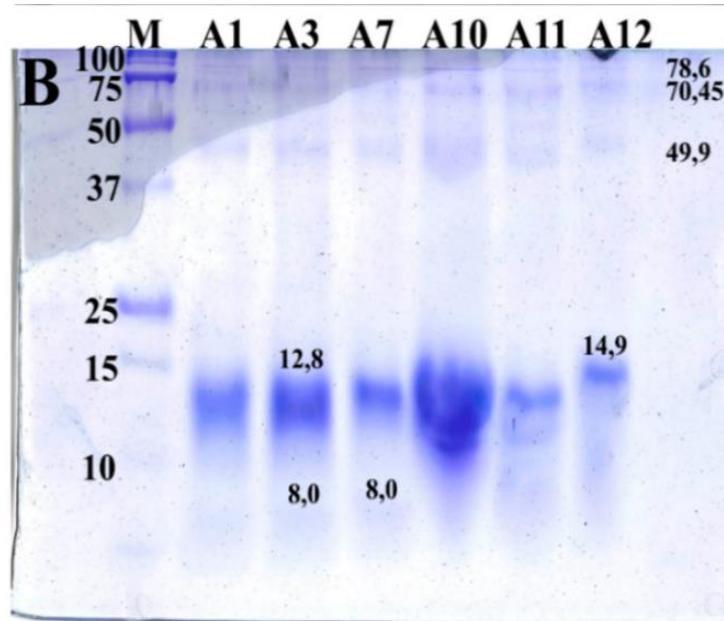
Primeiramente, foi realizado um gel de poliacrilamida 10% para de observar um panorama geral das bandas (Figura 7). No gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% foram evidenciadas bandas mais intensas na parte inferior do gel correspondendo a massas moleculares inferiores a 15 kDa para todas as amostras, destacando-se as bandas 14,70, 12,77, 11,1 e 8,73 kDa (Figura 7). Além disso, também é possível observar em A3 uma banda com aproximadamente 33,1 kDa.

Figura 7. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 10% corado em Comassie Brilliant Blue G-250. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras A1, A3, A7, A10, A11 e A12.



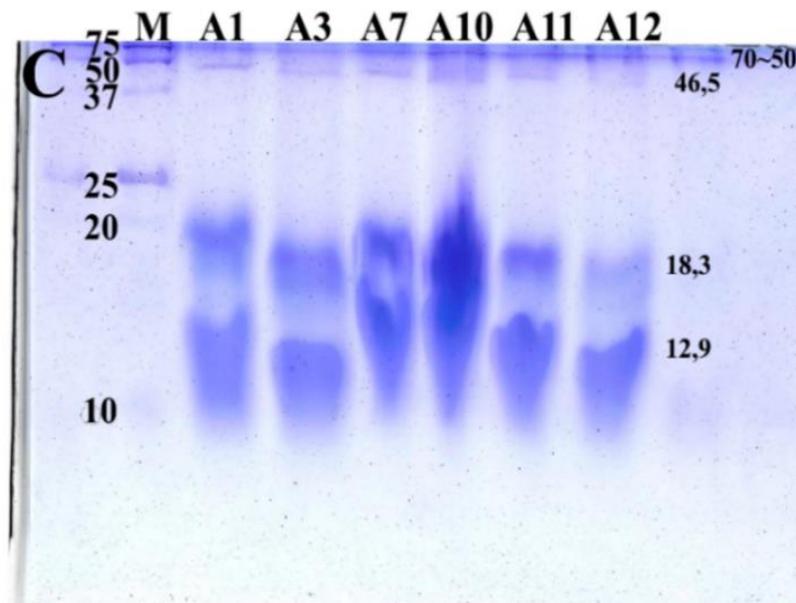
No gel de poliacrilamida 15% também foram evidenciadas bandas inferiores a 15 kDa (Figura 8). Neste gel também é possível evidenciar três bandas diferentes de maior massa molecular, 49,9, 70,45 e 78,6 kDa. Apesar de haver uma melhor distribuição das bandas em comparação ao gel de 10%, este gel ainda não foi o mais resolutivo uma vez que as bandas acima de 100 kDa não foram visualizadas.

Figura 8. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 15% corado em Comassie Brilliant Blue G-250. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras A1, A3, A7, A10, A11 e A12.



A Figura 9 corresponde ao gel de poliacrilamida 20%. Este apresentou algumas bandas com massas moleculares discrepantes quando comparados com os géis de 10%, 15% e para proteínas de baixa massa molecular (Figuras 7, 9 e 11).

Figura 9. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 20% corado em Comassie Brilliant Blue G-250.. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras A1, A3, A7, A10, A11 e A12.



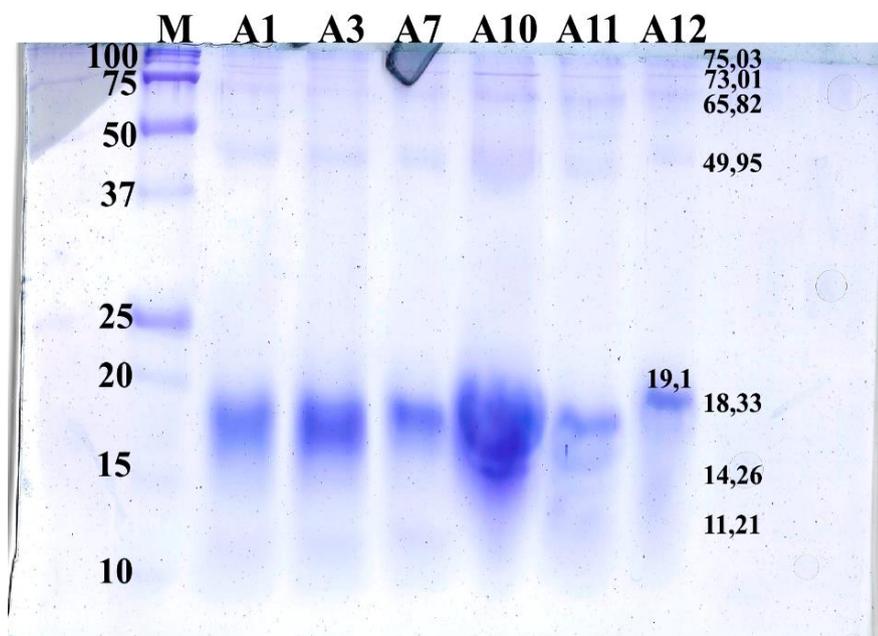
Devido à concentração do gel, seus poros são muito menores, o que impede que proteínas de alta massa molecular adentrem, como no caso de 100, 150 e 250 kDa presentes no marcador que não foram visualizadas neste gel. Diante disso, é possível afirmar que as proteínas de alta massa molecular não conseguiram adentrar no gel, e as proteínas de baixa massa molecular correram uma menor distância quando comparado aos outros géis. Logo, é possível evidenciar algumas bandas presas no topo do gel, entre 70 e 50 kDa. Além disso, neste gel também é possível evidenciar duas bandas de menor massa molecular e grande intensidade, em cerca de 18,3 kDa, e uma banda logo abaixo, com cerca de 12,9 kDa.

Os géis de 10, 15 e 20% foram realizados para tentar separar os componentes presentes na apitoxina de *A. mellifera* pela massa molecular, porém, os resultados não foram tão resolutivos em nenhum dos géis acima. A separação das bandas se mostrou complexa, pois nos géis em que os componentes de alta massa molecular não se separaram adequadamente, os de baixa massa molecular foram separados, e vice-versa.

Para resolver a problemática descrita acima, foi realizado um gel de gradiente, no qual existe um gradiente de concentração de acrilamida, que varia de 4% até 20%, podendo assim melhorar a separação tanto dos componentes de alta massa molecular quanto dos de baixa massa molecular (Figura 10). Quando comparado ao gel de 20% houve uma pequena melhora na visualização das bandas entre 50 e 75 kDa e, conseqüentemente, da massa molecular relativa, visto que não houve tanta sobreposição de bandas. Neste gel é possível observar diversas bandas que nos géis de 10% e 20% não estavam tão evidentes, mostrando um pouco mais da composição proteica da peçonha de *A. mellifera*. Ao observar o topo do gel é possível identificar 3 bandas com 75,03, 73,01 e 65,82 kDa.

Optou-se por realizar também um gel Tricina-SDS-PAGE utilizado para proteínas de baixa massa molecular (16%), na tentativa de obter uma resolução das bandas na região inferior do gel (Figura 11). Neste gel, os componentes presentes na peçonha de *A. mellifera* ficaram muito mais evidentes quando comparados aos outros, principalmente na região de baixa massa molecular. No topo do gel é possível identificar uma banda de 86,7 kDa. Logo abaixo da banda de 86,7 kDa, há uma de 63,3 kDa. Por fim, há bandas difusas entre 15,1 e 14,77 kDa, entre 13,48 e 11,3 kDa e entre 8,81 e 5,1 kDa (Figura 11).

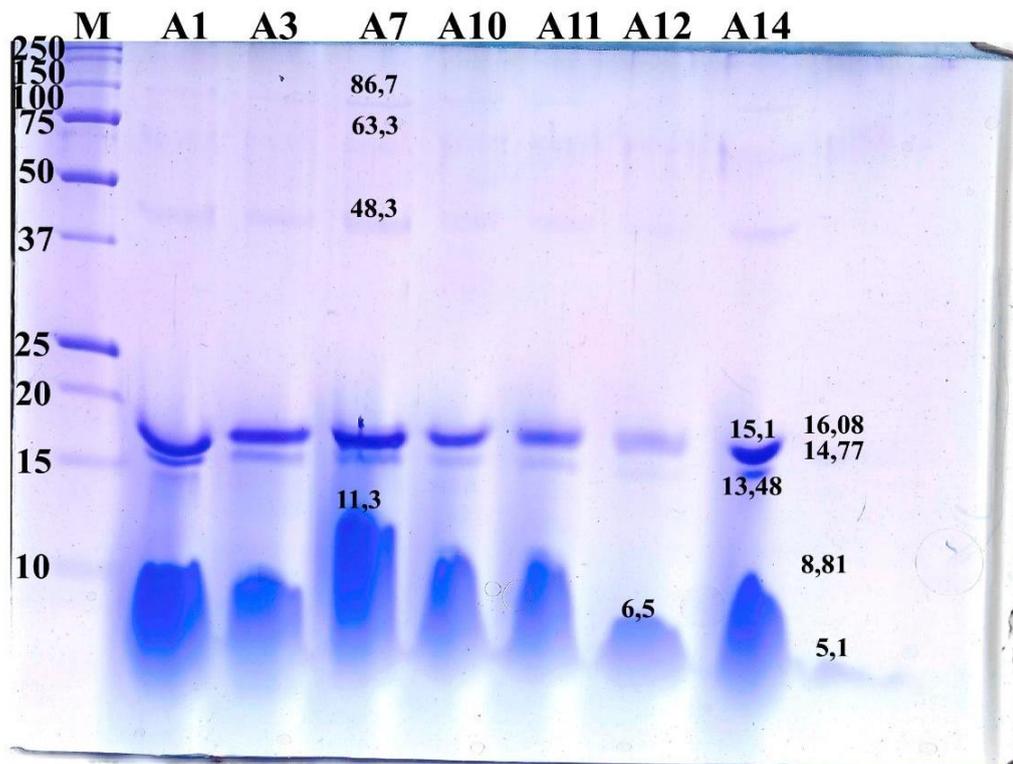
Figura 10. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida SDS em gradiente (4-20%) corado em Comassie Brilliant Blue G-250. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras correspondentes a Tabela 2.



Ao comparar as amostras coletadas no apiário da RPPN da UFMS (A1, A3, A7, A10, A11 e A12) com a amostra coletada na Fazenda Escola, em Terenos (A14), é possível observar correspondência entre as massas moleculares relativas. Em todas as amostras foi possível observar bandas intensas na região entre 16,08 e 13,48 kDa, com exceção da amostra 12. Além disso, também foi possível identificar uma banda difusa na região inferior do gel, entre 11,3 e 5,1 kDa. Logo, não há uma diferença evidente entre as amostras de apitoxina da RPPN da UFMS e da Fazenda Escola, demonstrando um perfil proteico semelhante entre as amostras.

Dentre os principais componentes da apitoxina estão a melitina (2,846 kDa), a fosfolipase A2 (11-19 kDa), e a hialuronidase (38-60 kDa) (ABD EL-WAHED et al., 2019; RADY et al., 2017; ZIDAN et al., 2018; ZOLFAGHARIAN et al., 2015). Há uma complexidade em descrever os respectivos componentes moleculares presentes na região inferior dos géis, visto que a maior concentração de proteínas presentes na apitoxina são de baixa massa molecular. Porém, vale ressaltar que os principais componentes da apitoxina são a melitina e a fosfolipase A2, e, devido sua maior concentração, indicariam bandas intensas na região inferior do gel (MORENO e GIRALT, 2015).

Figura 11. Análise das proteínas presentes na apitoxina por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molecular (16%) corado em Comassie Brilliant Blue G-250. Foi utilizado 10 µg de marcador de massa molecular (M) e 5 µg das amostras correspondentes a Tabela 2.



De acordo com a literatura, esperava-se uma banda intensa por volta de 3 a 12 kDa que corresponderia a melitina, haja visto que este é o componente mais abundante da peçonha de *A. mellifera*, correspondendo a 40-60% do peso seco da peçonha (MORENO e GIRALT, 2015). No gel de SDS-PAGE 10%, a banda de 11,1 kDa provavelmente é a melitina na forma tetramérica, ainda, há uma banda intensa que de acordo com a massa molecular relativa corresponde a 8,73 kDa (Figura 7). Essa última provavelmente também é a melitina, haja vista a intensidade da banda, porém a melitina não é encontrada na forma trimétrica e a sua presença na forma dimérica corresponde a menos de 0,5% de sua composição total (SCHUBERT et al., 1985). Sabe-se que a melitina na forma tetramérica apresentaria cerca de 11,38 kDa, o que não corresponde a 8,73 kDa. A melitina, sendo uma molécula anfipática e com 6 dos seus 26 resíduos de aminoácidos sendo carregados positivamente, poderia ter alguma alteração na corrida eletroforética. Já no gel SDS-PAGE 15%, na região entre 14,9 e 12,8 kDa há melitina na forma de tetrâmeros, visto que não é possível observar uma intensidade nas bandas mais inferiores indicando os monômeros (Figura 8), enquanto no gel SDS-PAGE 20%, a banda de

12,9 kDa que corresponde a essa região (Figura 9). Por fim, no gel de SDS em gradiente (4-20%), a melitina em sua forma tetramérica é visualizada na banda de 11,21 kDa (Figura 10), enquanto no gel de Tricina-SDS-PAGE, corresponde a região entre 13,48 e 11,3 kDa, e em forma monomérica, à região entre 8,81 e 5,1 kDa (MORENO e GIRALT, 2015) (Figura 11). Logo, é possível observar uma banda intensa na região inferior de todos os géis (12,8~5,51 kDa) que provavelmente é a melitina.

As fosfolipases A2 possuem quatro classificações primárias, as citosólicas, as secretadas, as dependentes de Ca^{+2} para sua atividade catalítica e as independentes de Ca^{+2} (BOYANOVSKY e WEBB, 2009; NASSAR, 2022). As fosfolipases A2 também são classificadas em 16 famílias (I até XVI), sendo as pertencentes as famílias I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV denominadas as fosfolipases A2 secretadas (sPLA2), as pertencentes a família IV são as fosfolipases A2 ditas como citosólicas (cPLA2), as da família IV são as fosfolipases A2 independentes de Ca^{+2} (iPLA2), a família VII e VIII são as fosfolipases do fator de ativação plaquetário acetil-hidrolase (PAF-AH PLA2), a família XV corresponde as fosfolipases A2 lisossômicas (LPLA2) e as da família XVI são as fosfolipases A2 específicas do tecido adiposo (AdPLA2) (KHAN e ILIES, 2023). As fosfolipases A2 secretadas são enzimas de baixo peso molecular, entre 13 a 19 kDa, porém, algumas pertencentes a família III podem alcançar 55 kDa (BOYANOVSKY e WEBB, 2009; KHAN e ILIES, 2023; VALENTIN et al., 2000). É possível observar, no gel de SDS-PAGE 10%, uma banda de 12,77 kDa que provavelmente corresponde a uma fosfolipase A2, assim como a banda de 14,70 kDa que devido a algum problema na migração eletroforética se dispôs um pouco acima (Figura 7). No gel SDS-PAGE 15%, há duas prováveis fosfolipases A2 (14,9 e 12,8 kDa) (Figura 8). Ao observar o gel SDS-PAGE 20%, é possível observar uma banda de baixa massa molecular, de 18,3 kDa, que pode corresponder a uma fosfolipase A2 (Figura 9), enquanto no gel SDS-PAGE em gradiente (Figura 10), é possível observar algumas bandas na região inferior do gel que possuem de 19,1 a 14,26 kDa, o que provavelmente também pode corresponder a fosfolipase A2 (HOSSEN et al., 2016). Por fim, na região inferior do gel de Tricina-SDS-PAGE se observa uma banda de 15 kDa que provavelmente corresponde a fosfolipase A2 (entre 15,1 e 14,77 kDa) (Figura 11). Logo, em todos os géis foram observadas bandas frequentes entre 19,1 e 12,77 kDa que podem corresponder a fosfolipase A2. Vale ressaltar que na literatura é possível identificar uma diferença no peso molecular da fosfolipase A2, onde alguns artigos trazem valores de 11 à 14 kDa (ZIDAN et al., 2018) e outros trazem valores entre 16 à 19 kDa (ABD EL-WAHED et al., 2019; ZOLFAGHARIAN et al., 2015).

A fosfatase ácida é um dos componentes da peçonha da abelha responsável pelas reações alérgicas, e apresenta uma massa molecular de 45 kDa (BARBONI et al., 1987; HOSSSEN et al., 2016). Essa enzima hidrolisa fosfomonoésteres em pH ácido, sendo um alérgeno capaz de liberar histamina e induzir sensibilidade em humanos (BARBONI et al., 1987; KIM e JIN, 2014). Nos géis SDS-PAGE de 15% e 20% foi possível observar, respectivamente, as bandas 65,5 kDa e 70-50 kDa que provavelmente correspondem a fosfatase ácida (Figuras 8 e 9). No gel de SDS-PAGE em gradiente foi observado bandas de alta massa molecular, sendo a de 65,82 kDa a mais próxima de ser uma fosfatase ácida devido à ausência, na literatura, de outra enzima com uma massa molecular próxima a esse valor (Figura 10). Por fim, no gel de Tricina-SDS-PAGE, observa-se uma banda de 63,3 kDa que também pode corresponder a uma fosfatase ácida (Figura 11).

Junto com a fosfolipase A2 e a fosfatase ácida, a hialuronidase também está envolvida nas reações alérgicas causadas pela peçonha de abelha (BARBONI et al., 1987). Tendo uma massa molecular entre 30 e 60 kDa, a hialuronidase é uma enzima responsável pela hidrólise do ácido hialurônico e do sulfato de condroitina presentes no tecido conjuntivo que preenche o espaço entre as células, também dito, espaço intersticial (LIMA e BROCHETTO-BRAGA, 2003). Por tal motivo, ela também é denominada como “fator de espalhamento”, visto que permite a dispersão mais eficaz dos componentes presentes na peçonha de *A. mellifera* (LIMA e BROCHETTO-BRAGA, 2003). Nos resultados obtidos é possível observar nos géis de SDS-PAGE 10%, 15% e 20%, respectivamente, bandas de 33,1 kDa, 49,9 kDa e de 46,5 kDa que provavelmente representam hialuronidasas (Figuras 7, 8 e 9) (HOSSSEN et al., 2016; NISHIMOTO et al., 2001; MORENO e GIRALT, 2015). Além disso, há uma banda de 49,95 kDa no gel de SDS-PAGE em gradiente, e uma de 48,3 kDa no gel de Tricina-SDS-PAGE que também podem corresponder a hialuronidase (Figuras 10 e 11) (PUCCA et al., 2019). Por fim, em todos os géis foi visto uma banda menos intensa na parte superior do gel (33,1~49,95 kDa) que provavelmente corresponde a hialuronidase e suas isoformas.

A α -glicosidase é uma enzima amplamente distribuída em diversos organismos que apresenta a função de catalisar a reação de um glicosil em uma α -glicose a partir da ligação glicosídica. Na peçonha de *A. mellifera* é possível identificar três isoformas de α -glicosidase, I, II e III, que possuem massa molecular diferentes, sendo, respectivamente, 98 kDa, 76 kDa e 68 kDa (KUBOTA et al., 2004). Na literatura há a descrição da presença de uma α -glicosidase na peçonha de *A. mellifera*, que corresponde a 170 kDa, porém, não é evidenciado o tipo desta α -glicosidase e nem se a mesma se encontra em complexos com outras moléculas como carboidratos, logo, há uma certa divergência entre os estudos (KUBOTA et al., 2004;

MORENO e GIRALT, 2015; RADY et al., 2017; PUCCA et al., 2019). Pode-se observar no gel de SDS-PAGE 15% uma banda com 68 kDa que provavelmente corresponde a uma α -glicosidase III (Figura 8), enquanto no gel de SDS-PAGE 20% essa mesma banda pode estar entre 70 e 50 kDa, não podendo ser determinada devido ao empacotamento dessa região neste gel (Figura 9). Além disso, no gel de SDS-PAGE em gradiente também é possível observar uma banda com 73,01 kDa que corresponderia a uma α -glicosidase III (Figura 10). Por fim, no gel de Tricina-SDS-PAGE, observa-se uma banda com 87 kDa, que também pode vir a ser uma α -glicosidase I que é descrita com 98 kDa ou até mesmo uma α -glicosidase II que é descrita com 76 kDa (HOSSEN et al., 2016; KUBOTA et al., 2004; NISHIMOTO et al., 2001; MORENO e GIRALT, 2015; PUCCA et al., 2019).

As principais proteínas da geleia real, ou, MRJP (*Major Royal Jelly Proteins*) são componentes proteicos presentes também na peçonha de *A. mellifera* e são classificadas em 9 famílias possuindo as mais diversificadas funções (FRATINI et al., 2016; PARK et al., 2019; PUCCA et al., 2019). Dentre as nove famílias, estão componentes proteicos de 49 a 87 kDa (PARK et al., 2019). A MRJP2 possui função majoritariamente antimicrobiana para as abelhas, porém, estudos já indicaram atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e de melhora no processo de cicatrização de feridas (MURESAN et al., 2022). Neste trabalho, foi possível observar no gel de SDS-PAGE em gradiente uma banda com 75,03 kDa que pode corresponder a uma das principais proteínas presentes na geleia real (MRJP2), com 87 kDa (MORENO e GIRALT, 2015; RADY et al., 2017; PUCCA et al., 2019). Por fim, no gel de Tricina-SDS-PAGE, também observamos uma banda de alta massa molecular, com 86,7 kDa que pode vir a ser uma das principais proteínas presentes na geleia real (MRJP2), com 87 kDa.

Por fim, foi possível identificar uma diferença nas massas moleculares relativas dos vários componentes proteicos. Isso pode ser explicada pelo método utilizado para o cálculo da massa molecular relativa (M_R). HAMES (1998) descreveu os princípios da eletroforese em gel de proteínas, e concluiu que estes cálculos possuem certas limitações, como por exemplo proteínas com uma proporção efetiva de resíduos de aminoácidos carregados positivamente migram mais lentamente em SDS-PAGE, alterando a relação massa/carga e, resultando em uma massa molecular relativa mais alta que o padrão. Outros problemas nesta técnica foram evidenciados para glicoproteínas, e para a presença de resíduos hidrofílicos, que afetam a interação da molécula com o SDS e também alteram a relação massa/carga (NEVILLE JR, 1971; RATH e DEBER, 2013; RIGHETTI et al., 2001).

Tendo em vista tais resultados, é possível afirmar que a eletroforese não foi a metodologia mais adequada para a separação dos componentes presentes na apitoxina de *A.*

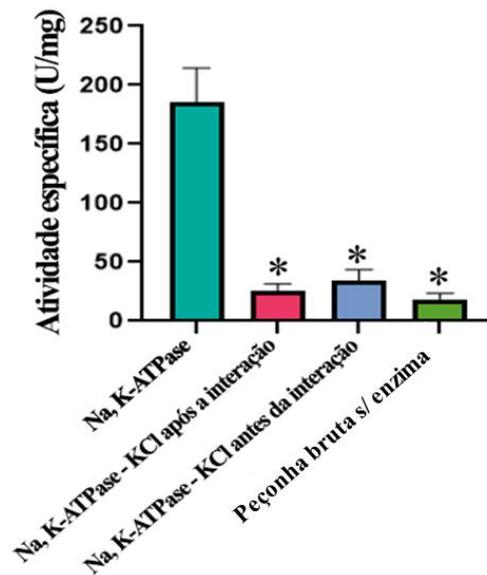
mellifera. Assim, espera-se conseguir uma melhor identificação e resolução dos componentes da peçonha de *A. mellifera* do Mato Grosso do Sul pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e pela razão massa/carga utilizando o método de espectrometria de massas em estudos posteriores.

5.3 Efeito da peçonha bruta sobre a atividade da Na, K-ATPase

Inicialmente, foi realizado um ensaio para verificar se há diferença na inibição da enzima Na, K-ATPase pela peçonha bruta de abelha quando o KCl é adicionado antes da interação peçonha-Na, K-ATPase e após a interação peçonha-Na, K-ATPase. Esse experimento foi baseado no teste realizado por CUPPOLETTI e ABBOTT (1990), que discutiram uma possível inibição competitiva com o sítio de ligação aos íons K^+ . Não houve diferença significativa ($p=0.0975$) entre a interação peçonha bruta e a enzima Na, K-ATPase antes ou após a adição de KCl. Entretanto, devido a uma maior inibição da enzima Na, K-ATPase com KCl sendo colocado no sistema após a interação Na, K-ATPase e peçonha bruta, decidiu-se manter esse procedimento para os próximos experimentos (Figura 12).

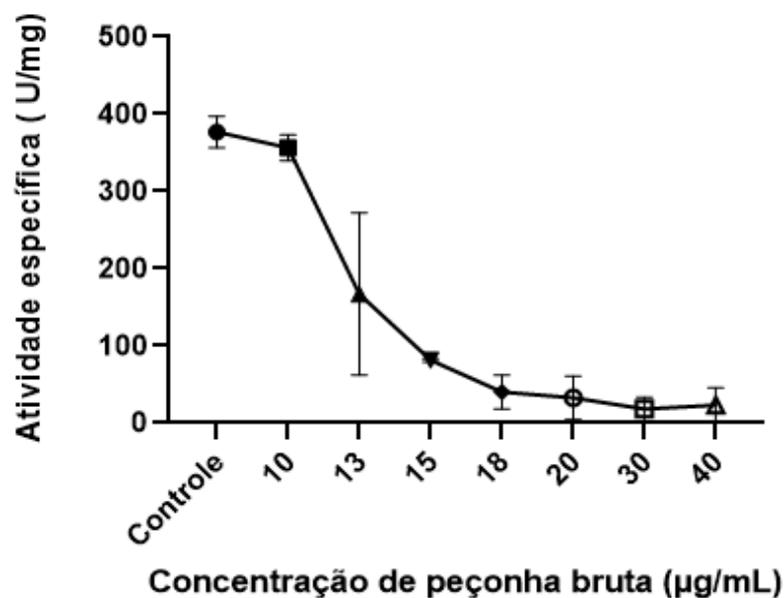
A peçonha bruta inibiu a atividade da Na, K-ATPase, sendo testadas as concentrações de peçonha bruta 10, 13, 15, 18, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13). A inibição ocorreu a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ de peçonha bruta, sendo com 20 $\mu\text{g/mL}$ uma inibição quase completa que perpetuou até 100 $\mu\text{g/mL}$. Assim, baixas concentrações de peçonha bruta foram suficientes para inibir a atividade da Na, K-ATPase. Dentre os componentes da peçonha, sabe-se que a melitina, o principal componente da peçonha de *A. mellifera*, é um inibidor da Na, K-ATPase (CUPPOLETTI e ABBOTT, 1990). CHEN e LIN-SHIAU (1985) demonstraram uma inibição competitiva, onde a melitina compete com os íons K^+ pelo sítio de ligação ao K^+ na Na, K-ATPase, de modo que uma alta concentração de íons K^+ reverteu a atividade inibitória da melitina.

Figura 12. Efeito da adição de KCl antes ou após a interação da peçonha bruta com a Na, K-ATPase. O ensaio foi realizado em triplicatas com um $p < 0.0001$ (*) em relação a atividade sem peçonha bruta.



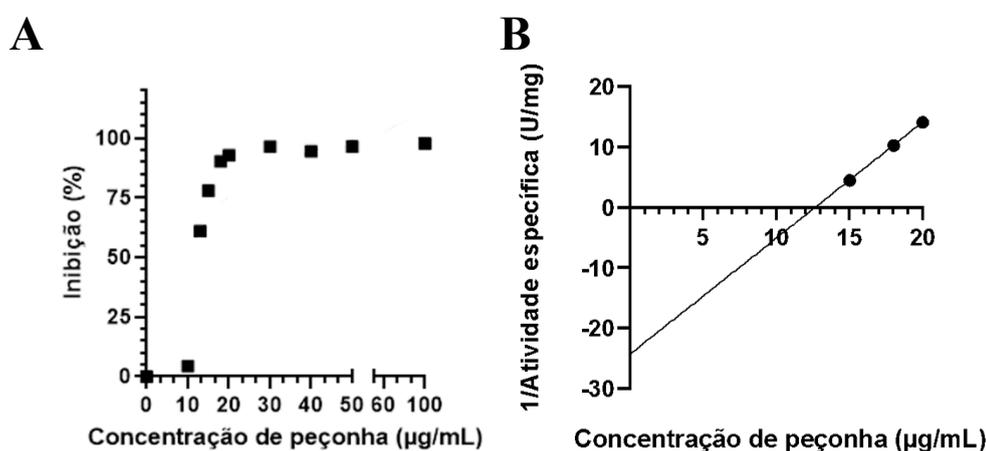
Como demonstrado na Figura 12, foi possível identificar uma menor inibição da Na, K-ATPase pela peçonha bruta quando os íons K^+ interagiram primeiro com a Na, K-ATPase. Entretanto, mesmo após essa interação ainda houve uma inibição significativa, mostrando a inibição da atividade da Na, K-ATPase. Por outro lado, outro estudo demonstrou que a melitina aumenta a atividade da enzima Na, K-ATPase em células Swiss 3T3 quiescentes por meio do estímulo de entrada dos íons Na^+ na célula (ROZENGURT et al., 1981).

Figura 13. Efeito da peçonha bruta sobre a atividade da Na, K-ATPase. ● Controle (s/ peçonha); ■ 10 $\mu\text{g/mL}$; ▲ 13 $\mu\text{g/mL}$; ▼ 15 $\mu\text{g/mL}$; ◆ 18 $\mu\text{g/mL}$; ○ 20 $\mu\text{g/mL}$; □ 30 $\mu\text{g/mL}$; △ 40 $\mu\text{g/mL}$.



Também foram determinados os valores de IC_{50} e K_I . Os valores de IC_{50} e da constante de inibição (K_I) foram determinados a partir dos dados de atividade específica (U/mg), para o gradiente de inibição apresentado pela peçonha bruta. Obteve-se um IC_{50} de 12,39 $\mu\text{g/mL}$ e um K_I de 12,63 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 14A e 14B). Estes dados demonstram que a peçonha bruta é capaz de inibir a atividade da Na, K-ATPase, bem como apresenta alta afinidade pela enzima, o que é corroborado pela Figura 13, onde a partir de 13 $\mu\text{g/mL}$ a atividade da Na, K-ATPase caiu pela metade.

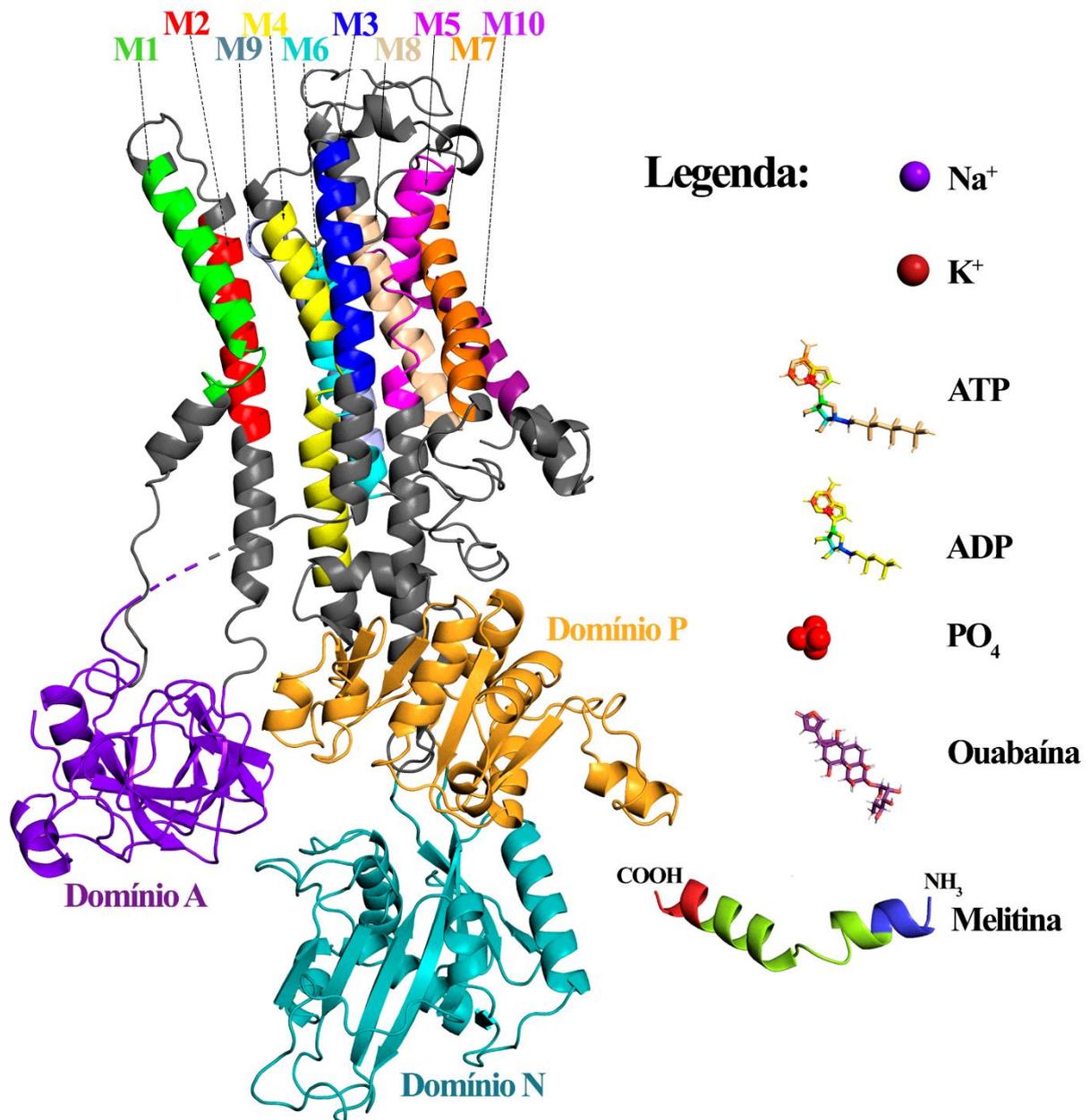
Figura 14. Determinação do IC_{50} e do K_I . A) Determinação do IC_{50} da peçonha bruta sobre a atividade da enzima Na, K-ATPase, sendo o IC_{50} igual a 12,39 $\mu\text{g/mL}$. B) Determinação do valor de K_I da peçonha bruta, sendo este igual a 12,63 $\mu\text{g/mL}$.



5.4 Estudo *in silico* da interação entre a melitina e a Na, K-ATPase

Os estudos de *docking molecular* da interação entre melitina (2MW6) com a Na, K-ATPase foram realizados em meio aquoso e em membrana, porém, não houve diferença nos resultados entre os meios. Além disso, foram realizados experimentos *in silico* com a Na, K-ATPase em cinco conformações diferentes, E1, E1P, E2, E2P e E2P-Oua, com os respectivos códigos de acesso PDB 7E1Z, 3WGV, 7E20, 7WZ0 e 3A3Y (GUO et al., 2022; KANAI et al., 2013; KANAI et al., 2022; OGAWA et al., 2009; PEREKALIN et al., 2015). Tendo em vista que o servidor HADDOCK necessita da escolha de possíveis sítios de ligação, foram determinados sítios onde há interação com os íons Na^+ , K^+ e Mg^{+2} , além de sítios que são importantes no processo de fosforilação e de ligação ao ATP. Os sítios de ligação escolhidos foram: R¹⁹⁸, D²¹⁴, Q²²⁵, N²³³, E³²⁷, D³³⁴, D³⁷⁶, T³⁷¹, T³⁷⁸, F⁴⁷⁵, K⁴⁸⁰, K⁵⁰¹, P⁵²⁹, R⁵⁴⁴, R⁵⁵¹, V⁵⁵², T⁶¹⁰, G⁶¹¹, A⁶⁹¹, D⁷¹⁰, D⁷¹⁴, E⁷⁷⁹, N⁷⁸³, Y¹⁰¹⁹. Os respectivos domínios e ligantes da Na, K-ATPase estão representados na figura 15.

Figura 15. Estrutura da Na, K-ATPase em conformação E1 com diferentes cores representando os segmentos transmembranares, e os domínios A, N e P, além de seus respectivos ligantes e em cinza estão representadas as alças. A melitina pode ser observada em verde, com região C-Terminal em vermelho e N-Terminal em azul. A direita segue uma legenda para os ligantes representados nas próximas figuras.



Os resíduos E³²⁷ e E⁷⁷⁹ fornecem ligantes de oxigênio, e, segundo a literatura, pode ser possíveis sítios de ligação de Na⁺ (MORTH et al., 2007). O resíduo D³⁷⁶ é fosforilado durante o processo de fosforilação da Na, K-ATPase (OHTA et al., 1986). Os resíduos T³⁷⁸, D⁷¹⁰ e D⁷¹⁴

podem contribuir com a coordenação do Mg^{+2} (KANAI et al., 2022; PILOTELLE-BUNNER et al., 2009). Os resíduos K^{480} e K^{501} desempenham uma função de estabilizar e auxiliar no processo de fosforilação (GATTO et al., 1997). Os resíduos R^{198} , D^{214} , Q^{225} , N^{233} , F^{475} , P^{529} , R^{544} auxiliam no processo de desfosforilação da Na, K-ATPase, e também auxiliam na coordenação dos íons Mg^{+2} (MORTH et al., 2009). O resíduo D^{334} está relacionado com a interação da Na, K-ATPase com esteroides cardíacos como a ouabaína (RADKOV et al., 2007). Os resíduos T371, T610 e G611 interagem com o motivo TGES por meio de ligações de hidrogênio, sendo um eixo de interação entre o domínio A e P (JORGENSEN et al., 2003). O resíduo R^{551} faz uma ligação salina com o resíduo E^{223} da Na, K-ATPase, o que auxilia na ligação do ATP (HODEIFY et al., 2024). O resíduo V552 está em uma região exposta da Na, K-ATPase que pode ter uma função na atividade enzimática (HOMAREDA et al., 1993). O resíduo N^{783} está envolvido na ligação com o íon Na^+ e está próximo de resíduos de aminoácidos que fazem ligação com o íon K^+ (GUO et al., 2022; LAURSEN et al., 2015). Por fim, o resíduo Y1019 está envolvido na estabilização dos íons K^+ durante seu transporte (SPILLER e FRIEDRICH, 2014).

5.4.1 Interação da Na, K-ATPase em conformação E1 com a melitina

No estudo com a Na, K-ATPase na conformação E1, houve uma interação entre a melitina e a Na, K-ATPase demonstrada pelo servidor HADDOCK e pelo software Ligplot+ (Figura 16 e 17). O servidor HADDOCK determinou 4 orientações em que a melitina se ligava efetivamente a Na, K-ATPase (Figura 16), e, por meio do software PyMOL foi possível determinar a melhor orientação e sua respectiva sobreposição com a Na, K-ATPase antes da interação, resultando em um valor de RMSD igual a 0.426.

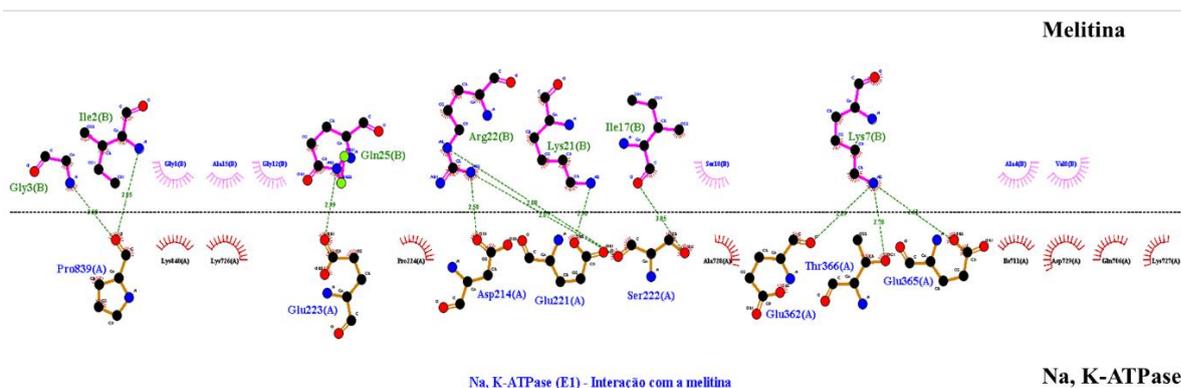
Foram observadas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre 13 resíduos de aminoácidos da melitina, e 16 resíduos de aminoácidos da Na, K-ATPase. As ligações de hidrogênio serão descritas como resíduo de aminoácido da melitina (resíduo de aminoácido da Na, K-ATPase). Dentre as ligações de hidrogênio, têm-se, os resíduos Ile^2 e Gly^3 (Pro^{839}), Lys^7 (Glu^{362} , Thr^{366} e Glu^{365}), Ile^{17} (Ser^{222}), Lys^{21} (Glu^{221}), Arg^{22} (Asp^{214} e Ser^{222}) e Gln^{25} (Glu^{223}) (Figura 17). As ligações de hidrogênio podem ser observadas em *cartoon* nas Figuras 16B e 16C.

Na interação entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E1 é possível identificar quatro ligações de hidrogênio com os resíduos Glu^{221} e Ser^{222} , que pertencem ao motivo TGES (Figura 16C). O motivo TGES, que está presente no domínio atuador, é

interage com os íons Mg^{+2} . A melitina, uma molécula de 26 resíduos de aminoácidos que interage com os resíduos próximos do Thr³⁷¹, como Glu³⁶², Glu³⁶⁵ e Thr³⁶⁶, pode afetar essa região da Na, K-ATPase, alterando a interação do íon Mg^{+2} com a Na, K-ATPase e consequentemente alterando a atividade enzimática (JORGENSEN et al., 2003).

O resíduo Pro⁸³⁹ da Na, K-ATPase interage por meio de ligações de hidrogênio com os resíduos Gly³ e Ile² da melitina. Essa região onde está localizado Pro⁸³⁹ corresponde a alça entre os domínios transmembranares 6 e 7 (SHACK et al., 2012) e uma mutação no resíduo Arg⁸³⁴ da Na, K-ATPase demonstrou a redução da afinidade pelos íons Na^+ . Assim, pode-se sugerir que a interação da melitina nesta região por meio de ligações de hidrogênio também pode ter o mesmo efeito (SHACK et al., 2012). Além disso, os resíduos de aminoácidos Arg⁸³⁰ e Asn⁸³¹ da Na, K-ATPase estabilizam os domínios transmembranares 6 e 7 da Na, K-ATPase. A interação da melitina com o resíduo Pro⁸³⁹, também pode alterar a estabilidade dos domínios transmembranares 6 e 7 (JORGENSEN et al., 2003).

Figura 17. Representação esquemática em 2D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E1. As linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio entre os resíduos, os semicírculos vermelhos representam as interações hidrofóbicas, e os semicírculos rosa correspondem os resíduos hidrofóbicos.

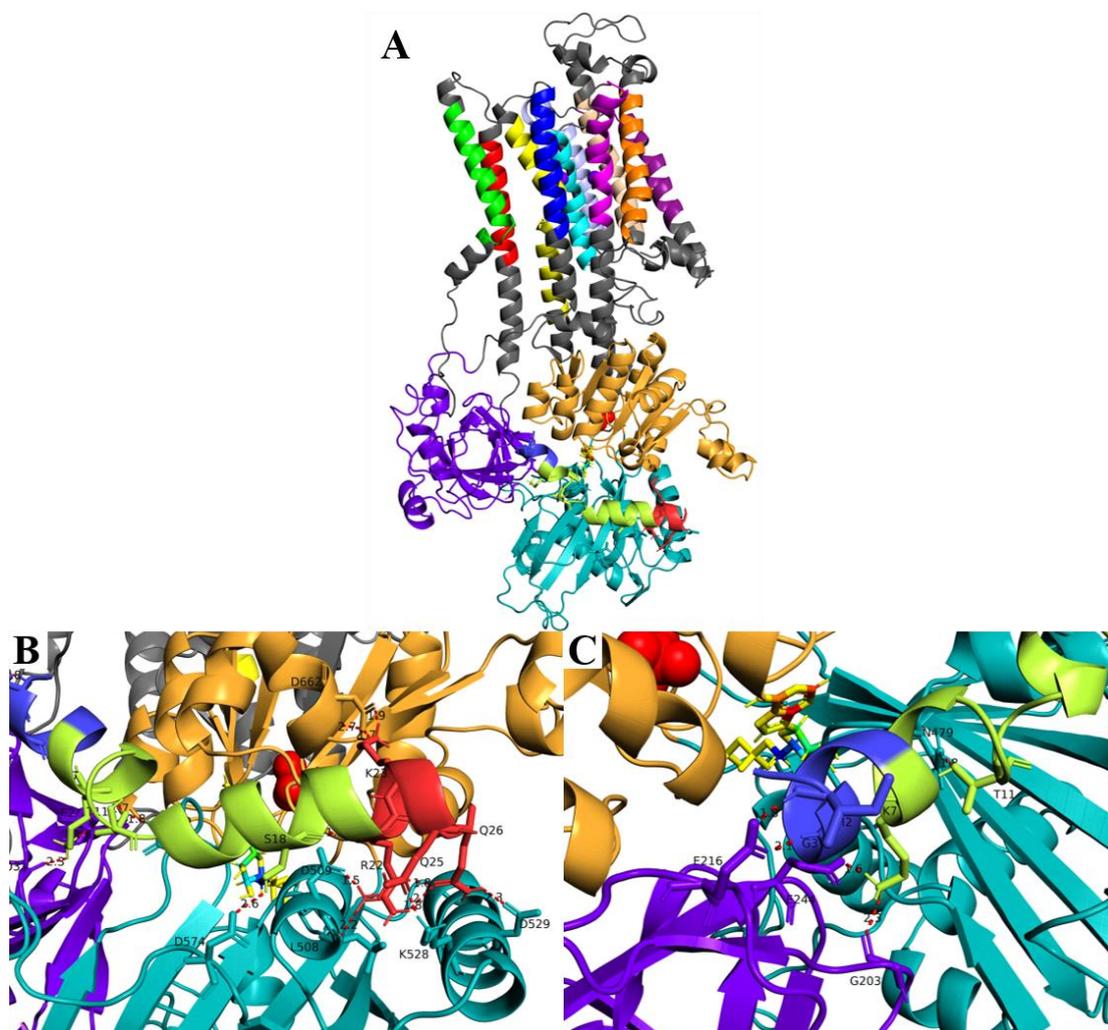


5.4.2 Interação da Na, K-ATPase em conformação E1P com a melitina

No estudo com a Na, K-ATPase na conformação E1P, houveram diversas interações entre a melitina e a Na, K-ATPase demonstradas pelo servidor HADDOCK e pelo software Ligplot+ (Figura 18 e 19). O software PyMOL mostrou a melhor orientação de interação, e também, foi possível sobrepor a estrutura da Na, K-ATPase em conformação E1P antes da interação com a melitina e após a interação com a melitina. Dessa sobreposição foi calculado o RMSD que resultou em um valor de 0.627.

Foram observadas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre 16 resíduos de aminoácidos da melitina e 16 resíduos de aminoácidos da Na, K-ATPase. As ligações de hidrogênio serão descritas como resíduo de aminoácido da melitina (resíduo de aminoácido da Na, K-ATPase). Dentre as ligações de hidrogênio, têm-se, os resíduos de aminoácidos Ile² (Glu²¹⁶), Gly³ (Glu²¹⁶), Lys⁷ (Gly²⁰³ e Glu²⁴⁴), Thr¹¹ (Asn⁴⁷⁹), Ser¹⁸ (Asp⁵⁷⁴), Arg²² (Leu⁵⁰⁸ e Asp⁵⁰⁹) Lys²³ (Asp⁶⁶²), Gln²⁵ (Lys⁵²⁸), Gln²⁶ (Asp⁵²⁹) (Figura 19). As ligações de hidrogênio podem ser observadas em *cartoon* na Figura 18B e 18C.

Figura 18. Representação em 3D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E1P. **A)** Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E1P em interação com a melitina. **B)** Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. **C)** Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.

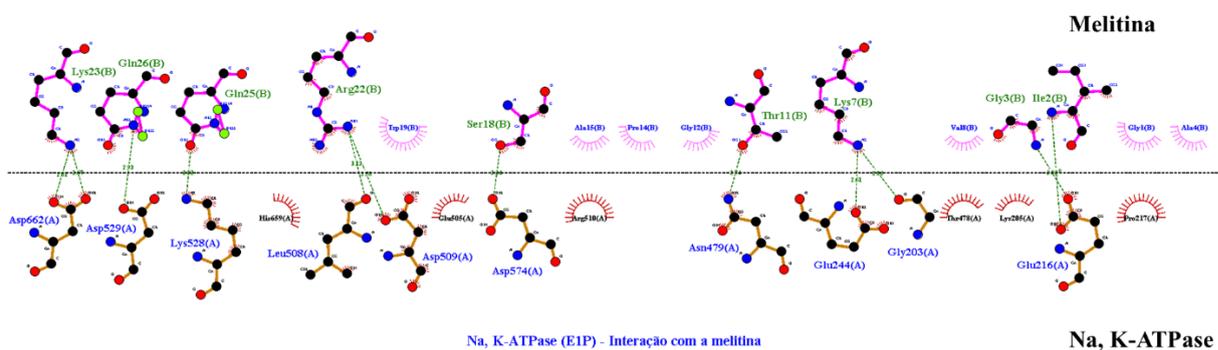


Os resíduos Ile², Gly³ e Lys⁷ da melitina interagiram com os resíduos Gly²⁰³, Glu²¹⁶ e Glu²⁴⁴ que estão próximos do motivo TGES, de tal forma que a melitina interagindo com essa

região poderia alterar o processo de desfosforilação da Na, K-ATPase (CONTRERAS et al., 2024).

Foi também possível identificar uma maior interação da região C terminal (Ser¹⁸, Arg²², Lys²³, Gln²⁵, Gln²⁶) e do resíduo Thr¹¹ da melitina com os resíduos pertencentes ao domínio de ligação ao nucleotídeo (N) e de ligação ao fosfato (P) (Asn⁴⁷⁹, Leu⁵⁰⁸, Asp⁵⁰⁹, Lys⁵²⁸, Asp⁵²⁹, Asp⁵⁷⁴ e Asp⁶⁶²), mostrando uma preferência de ligação aos resíduos de aspartato (Asp), os quais são cruciais na coordenação dos íons Na⁺ e K⁺ em M4, M5 e M6 e para a neutralização da carga dos íons (KAPLAN, 2002). Este ponto é importante tendo em vista que a melitina se ligando a tantos resíduos de Asp em uma única conformação pode interromper o processo de neutralização das cargas dos cátions, alterando a atividade da Na, K-ATPase.

Figura 19. Representação esquemática em 2D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E1P. As linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio entre os resíduos, os semicírculos vermelhos representam as interações hidrofóbicas, e os semicírculos rosa correspondem os resíduos hidrofóbicos.



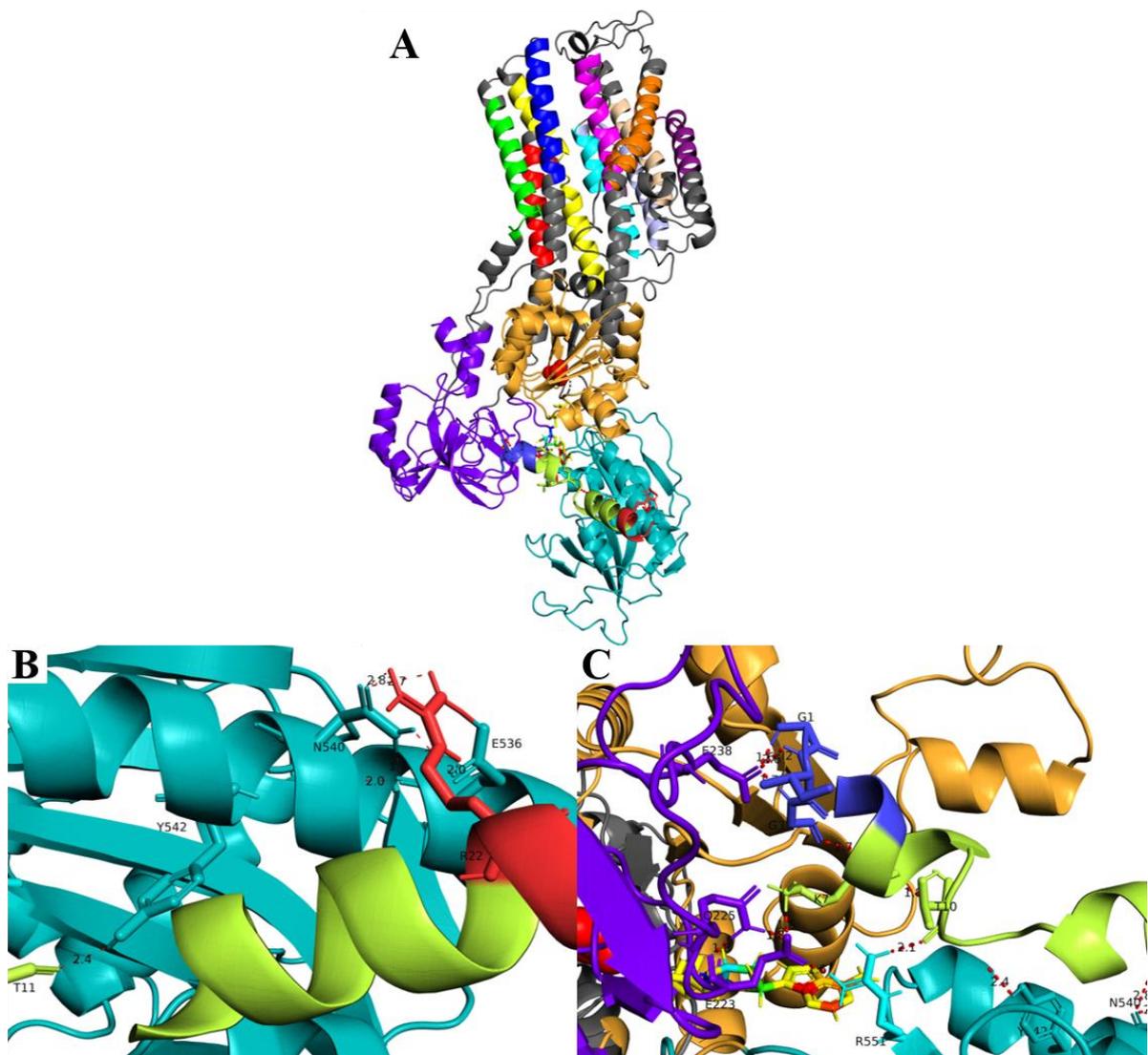
5.4.3 Interação da Na, K-ATPase em conformação E2P com a melitina

No estudo com a Na, K-ATPase na conformação E2P, houveram diversas interações entre a melitina e a Na, K-ATPase demonstradas pelo servidor HADDOCK e pelo software Ligplot+ (Figura 20 e 21). O software PyMOL mostrou a melhor orientação de interação, e também, foi possível sobrepor a estrutura da Na, K-ATPase em conformação E2P antes da interação com a melitina e após a interação com a melitina. Dessa sobreposição foi calculado o RMSD que resultou em um valor de 0.523.

Foram observadas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre 15 resíduos de aminoácidos da melitina e 15 resíduos de aminoácidos da Na, K-ATPase. As ligações de hidrogênio serão descritas como resíduo de aminoácido da melitina (resíduo de aminoácido da

Na, K-ATPase). Dentre as ligações de hidrogênio, têm-se, os resíduos de aminoácidos Gly¹ (Glu²³⁸), Ile² (Glu²³⁸), Gly³ (Glu²³⁸), Lys⁷ (Glu²²³ e Gln²²⁵), Thr¹⁰ (Arg⁵⁵¹), Thr¹¹ (Tyr⁵⁴²), Arg²² (Glu⁵³⁶ e Asn⁵⁴⁰) (Figura 21). As ligações de hidrogênio podem ser observadas em *cartoon* na Figura 20B e 20C.

Figura 20. Representação em 3D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2P. **A)** Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E2P em interação com a melitina. **B)** Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. **C)** Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.

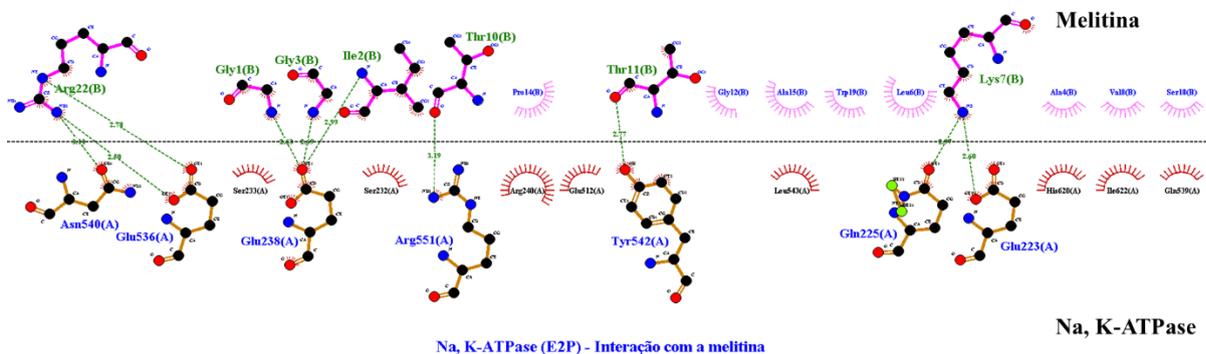


Foram observadas ligações de hidrogênio entre os resíduos Glu²³⁸, Gln²²⁵ e Glu²²³ da Na, K-ATPase com a Lys⁷ da melitina. Tais resíduos são próximos ao motivo TGES, sugerindo

que a melitina pode afetar a função e a estabilidade do motivo TGES, que é um dos principais responsáveis pela desfosforilação da Na, K-ATPase (CONTRERAS et al., 2024).

O resíduo Arg⁵⁴⁴ da Na, K-ATPase é responsável pela mudança na energia livre de Gibbs da ligação do ATP à Na,K-ATPase, sendo também responsável por uma interação iônica com o β-fosfato (JORGENSEN et al., 2003; MIDDLETON et al., 2011). Sabendo que a melitina interagiu com os resíduos de aminoácidos Glu⁵³⁶, Asn⁵⁴⁰, Tyr⁵⁴² e Arg⁵⁵¹, pode-se sugerir alterações nessa região, diminuindo a atividade da Na, K-ATPase. Logo, uma interação da melitina com estes resíduos pode afetar a região próxima ao resíduo Arg⁵⁴⁴ e consequentemente diminuir a afinidade com o ATP, o que impediria a ligação do grupo fosfato ao grupo carboxilato do Asp³⁶⁹ (JORGENSEN et al., 2003).

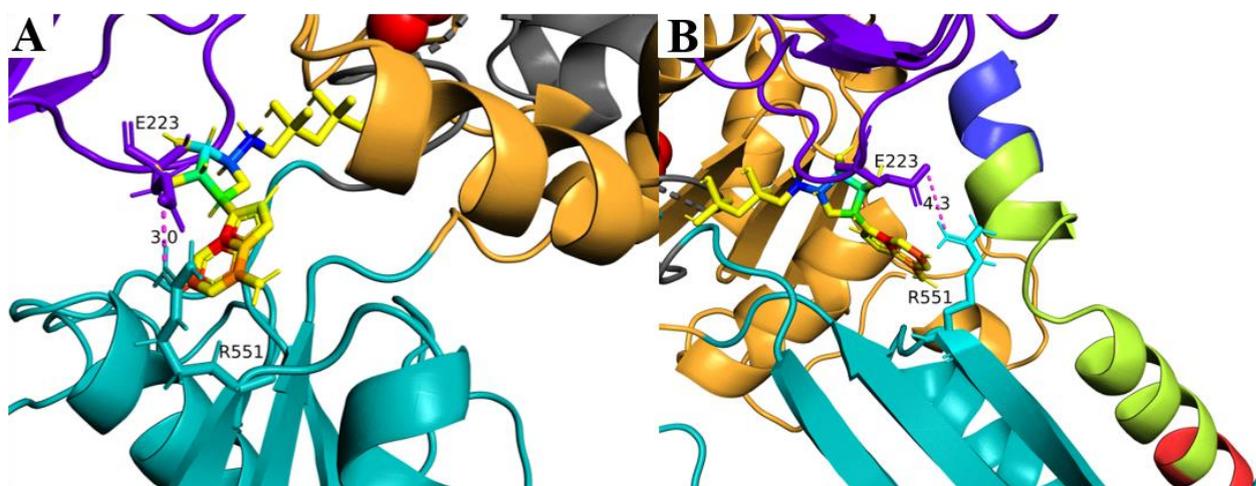
Figura 21. Representação esquemática em 2D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2P. As linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio entre os resíduos, os semicírculos vermelhos representam as interações hidrofóbicas, e os semicírculos rosa correspondem aos resíduos hidrofóbicos.



O resíduo Arg⁵⁵¹ da Na, K-ATPase também interage por meio de uma ligação de hidrogênio com o resíduo Thr¹¹ da melitina. Esse resíduo é responsável pela ligação com o β-fosfato do ATP, sendo resíduo chave para a conversão da Na, K-ATPase em conformação E2P para conformação E2. Assim, quando a melitina interage com tal resíduo de aminoácido, impede a transição de E2P para E2, provocando a inibição da atividade da Na, K-ATPase (SHINODA et al., 2009; TOYOSHIMA et al., 2011). Além disso, sabe-se que os resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ interagem por uma ponte salina, uma das poucas interações entre os domínios atuador (A) e de nucleotídeo (N) (SHINODA et al., 2009). Logo, as ligações da melitina a estes dois resíduos podem afetar a atividade da enzima (Figura 21). Ao simular a interação entre os resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ da Na,K-ATPase em conformação E2P, verificou-se uma ligação salina

com um comprimento de 3,0 Angstrom (\AA). Por outro lado, na Na, K-ATPase em conformação E2P após a interação com a melitina essa ligação salina se distanciou em 1,3 \AA , visto que o comprimento da ligação se tornou 4,3 \AA (Figura 22). Assim, a presença da melitina torna a ligação salina mais fraca, podendo sugerir alterações estruturais que podem alterar a atividade da Na, K-ATPase.

Figura 22. Representação em 3D dos diferentes comprimentos das ligações salinas entre os resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ na Na, K-ATPase em conformação E2P. **A)** Comprimento da ligação salina antes da interação com a melitina. **B)** Comprimento da ligação salina após a interação com a melitina.



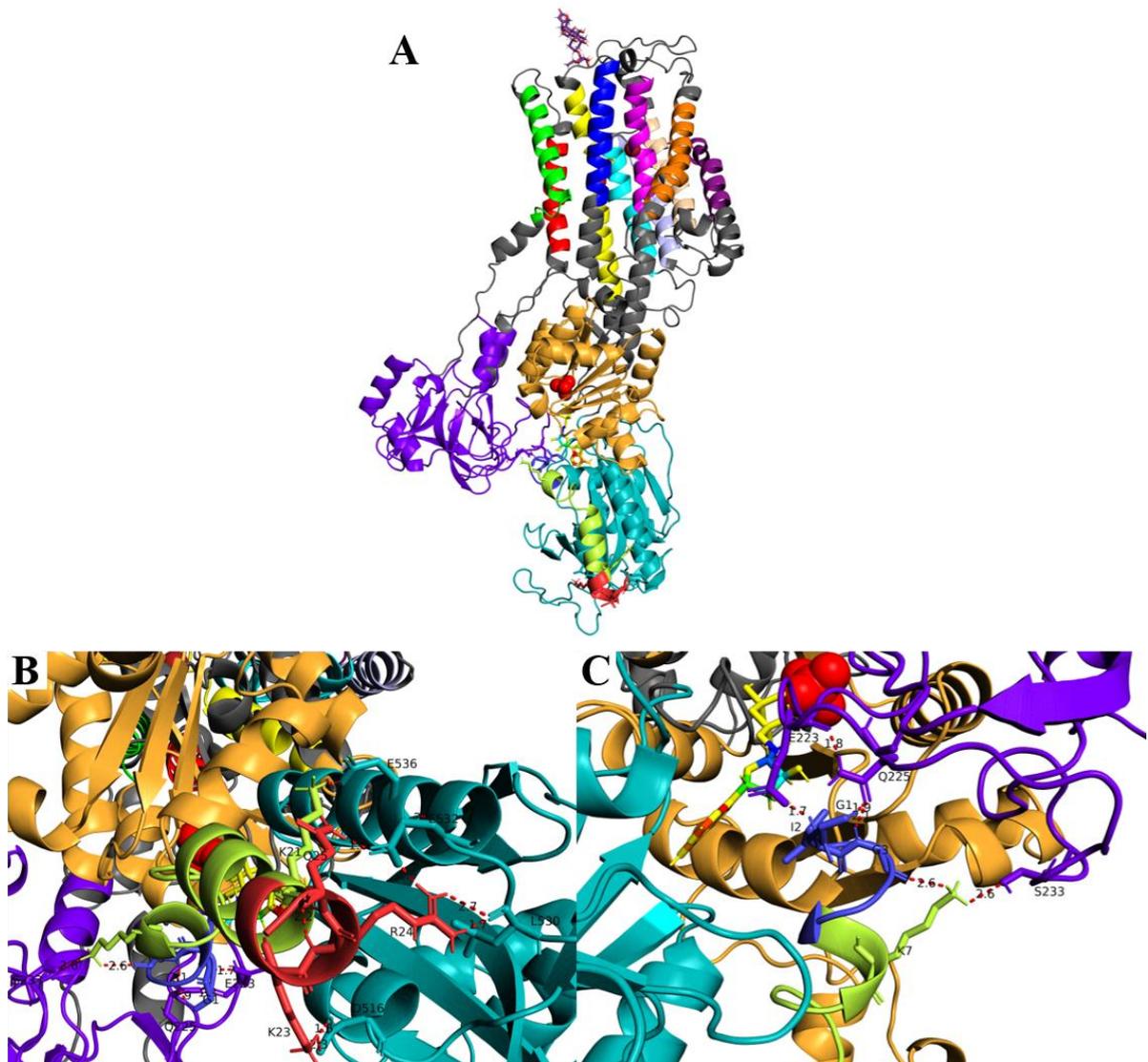
5.4.4 Interação da Na, K-ATPase em conformação E2P-Oua com a melitina

No estudo com a Na, K-ATPase na conformação E2P-Oua, houveram diversas interações entre a melitina e a Na, K-ATPase demonstrada pelo servidor HADDOCK e pelo software Ligplot+ (Figura 23 e 24). Por meio do software PyMOL foi possível determinar a melhor orientação de interação e também foi possível definir a sobreposição entre a Na, K-ATPase E2P antes e após a interação da melitina. Foi realizado uma sobreposição para comparar as mudanças conformacionais entre a Na, K-ATPase em conformação E2P após ligação com ouabaína, e posteriormente após a interação com a melitina, obtendo um valor de RMSD igual a 0.334.

Foram observadas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre 17 resíduos de aminoácidos da melitina e 17 resíduos de aminoácidos da Na, K-ATPase. As ligações de hidrogênio serão descritas como resíduo de aminoácido da melitina (resíduo de aminoácido da Na, K-ATPase). Dentre as ligações de hidrogênio, têm-se os resíduos de aminoácidos Gly¹

(Gln²²⁵), Ile² (Glu²²³), Gly³ (Gln²²⁵), Lys⁷ (Ser²³³), Lys²¹ (Glu⁵³⁶), Arg²⁴ (Leu⁵³⁰ e Glu⁵³²) e Gln²⁵ (Glu⁵³²) (Figura 24). As ligações de hidrogênio podem ser observadas em *cartoon* na Figura 23A e 23B.

Figura 23. Representação em 3D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2P-Oua. **A)** Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E2P-Oua em interação com a melitina. **B)** Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. **C)** Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.

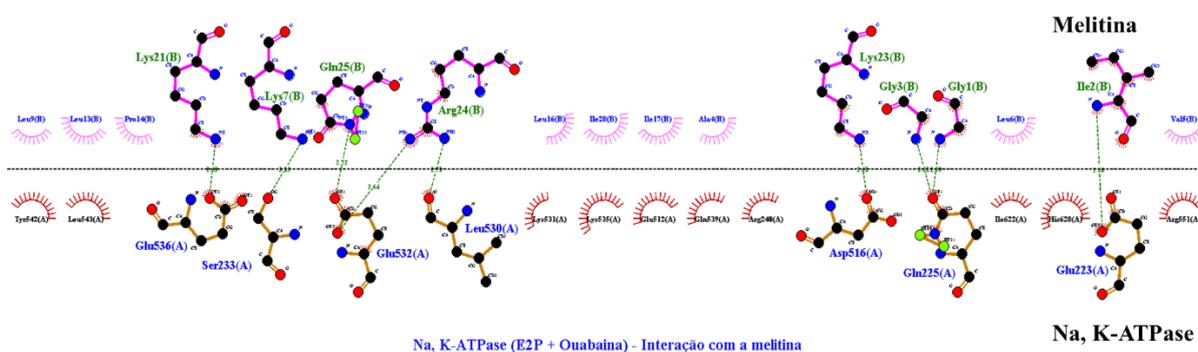


Foi observado a interação da melitina com os resíduos de aminoácidos Ser²³³, Gln²²⁵ e Glu²²³ da Na, K-ATPase, resíduos próximos ao motivo TGES, o qual é responsável pela

desfosforilação da Na, K-ATPase. Assim, a enzima provavelmente perderá a capacidade de realizar a conversão da conformação E2P para E2 (CONTRERAS et al., 2024).

Como discutido anteriormente, sabe-se que o resíduo Arg⁵⁴⁴ está relacionado a mudança na energia livre de Gibbs da ligação do ATP na Na,K-ATPase (JORGENSEN et al., 2003). Neste caso, a melitina interage com os resíduos Asp⁵¹⁶, Leu⁵³⁰, Glu⁵³² e Glu⁵³⁶, podendo alterar a conformação da Na, K-ATPase e consequentemente atrapalhar a interação do resíduo Asp⁵⁴⁴ com o ATP (JORGENSEN et al., 2003).

Figura 24. Representação esquemática em 2D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase E2P após a interação com a ouabaina demonstrada pelo software LigPlot+, em verde estão representadas as ligações de hidrogênio, os semicírculos vermelhos são as interações hidrofóbicas e os semicírculos rosa são os resíduos hidrofóbicos.



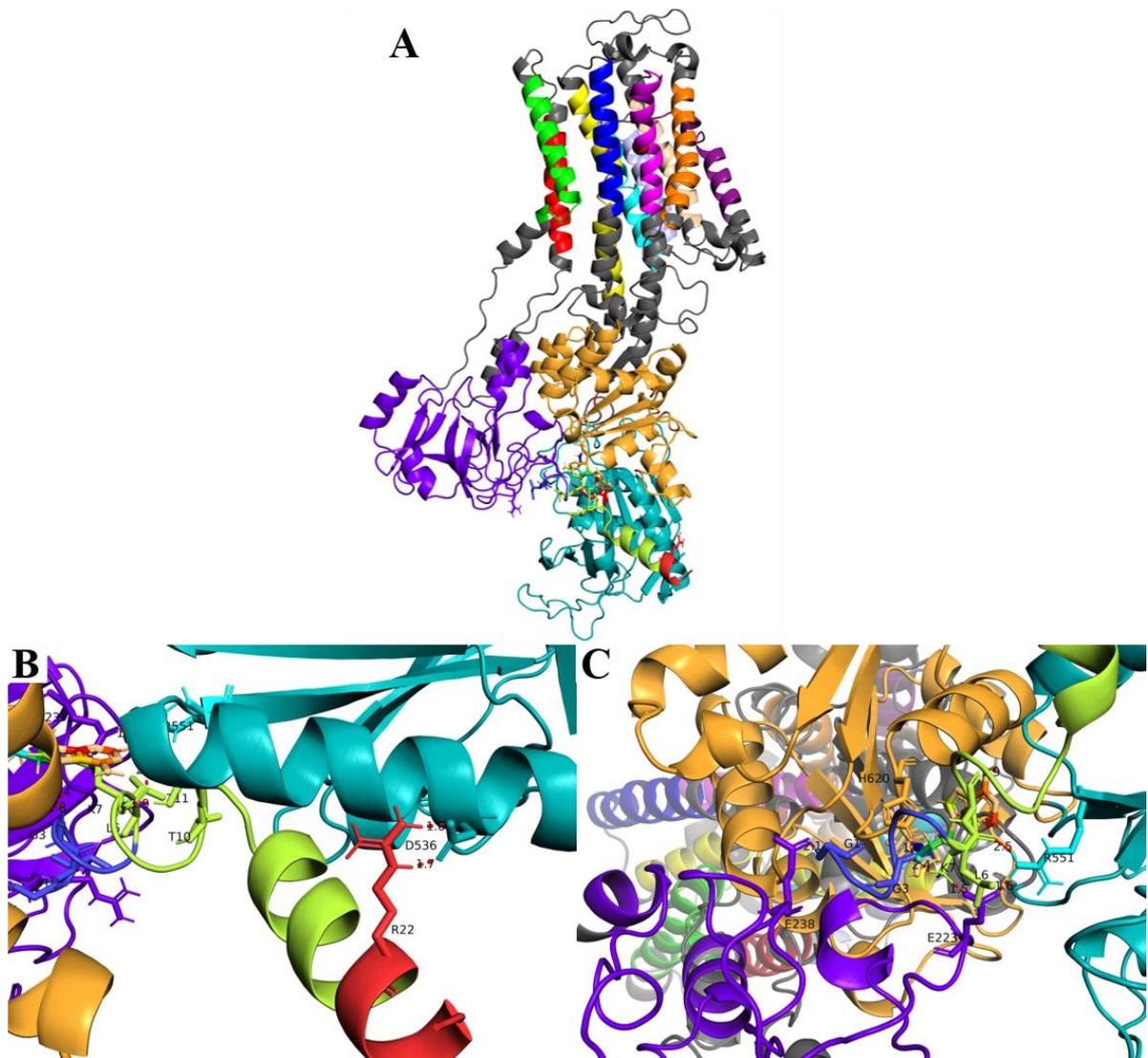
5.4.5 Interação da Na, K-ATPase em conformação E2 com a melitina

No estudo com a Na, K-ATPase na conformação E2, houveram diversas interações entre a melitina e a Na, K-ATPase demonstradas pelo servidor HADDOCK e pelo software Ligplot+ (Figura 25 e 26). O software PyMOL mostrou a melhor orientação de interação, e também, foi possível sobrepor a estrutura da Na, K-ATPase em conformação E2 antes da interação com a melitina e após a interação com a melitina. Dessa sobreposição foi calculado o RMSD que resultou em um valor de 0.350.

Foram observadas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre 15 resíduos de aminoácidos da melitina e 15 resíduos de aminoácidos da Na, K-ATPase. As ligações de hidrogênio serão descritas como resíduo de aminoácido da melitina (resíduo de aminoácido da Na, K-ATPase). Dentre as ligações de hidrogênio, têm-se, os resíduos de aminoácidos Gly¹ (Arg²⁴⁰), Ile² (Glu²³⁸), Gly³ (His⁶²⁰), Leu⁶ (Arg⁵⁵¹), Lys⁷ (Glu²²³), Thr¹⁰ (Arg⁵⁵¹), Thr¹¹ (Tyr⁵⁴²),

Arg²² (Gln⁵³⁹ e Asp⁵³⁶) (Figura 26). As ligações de hidrogênio podem ser observadas em *cartoon* na Figura 25B e 25C.

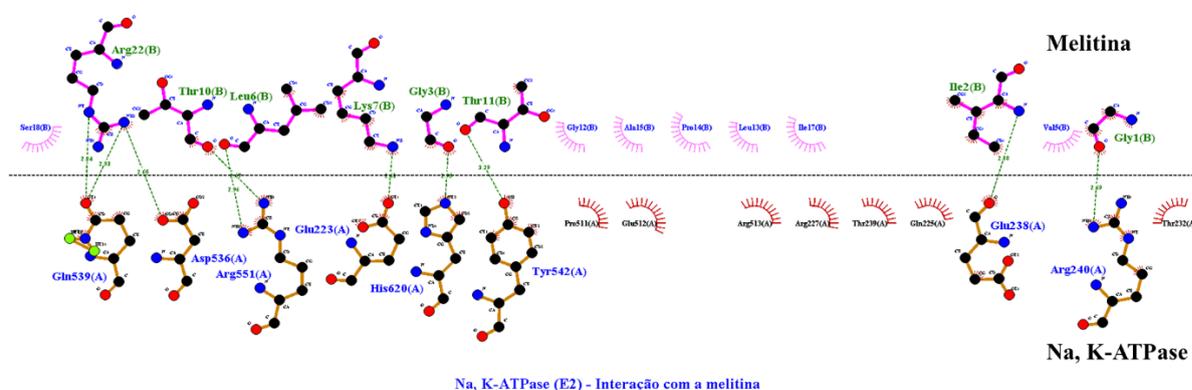
Figura 25. Representação em 3D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2. **A)** Melhor orientação da Na, K-ATPase em conformação E2 em interação com a melitina. **B)** Aproximação da região C-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase. **C)** Aproximação da região N-terminal da melitina e interações com a Na, K-ATPase.



Na conformação E2 foi possível observar que a maioria das interações ocorreram com a região N-terminal da melitina (Gly¹, Ile², Gly³, Leu⁶, Lys⁷, Thr¹⁰ e Thr¹¹). Os resíduos Gly¹, Ile² e Lys⁷ se ligaram a uma região próxima ao motivo TGES, principalmente a Lys⁷ que interagiu com um resíduo de aminoácido Glu²²³ que pertence ao motivo TGES, mostrando novamente que a melitina pode afetar o processo de desfosforilação da Na, K-ATPase

(CONTRERAS et al., 2024). Além disso, nessa conformação, assim como em E2P, a melitina interagiu tanto com o resíduo Glu²²³ quanto Arg⁵⁵¹ da Na, K-ATPase, que, como já discutido, esses resíduos são uma das poucas interações entre os domínios A e N da Na, K-ATPase, sendo também importantes para o processo de conversão de E2P para E2 (SHINODA et al., 2009; TOYOSHIMA et al., 2011).

Figura 26. Representação esquemática em 2D do *docking molecular* entre a melitina e a Na, K-ATPase em conformação E2. As linhas tracejadas em verde representam as ligações de hidrogênio entre os resíduos, os semicírculos vermelhos representam as interações hidrofóbicas, e os semicírculos rosa correspondem aos resíduos hidrofóbicos.



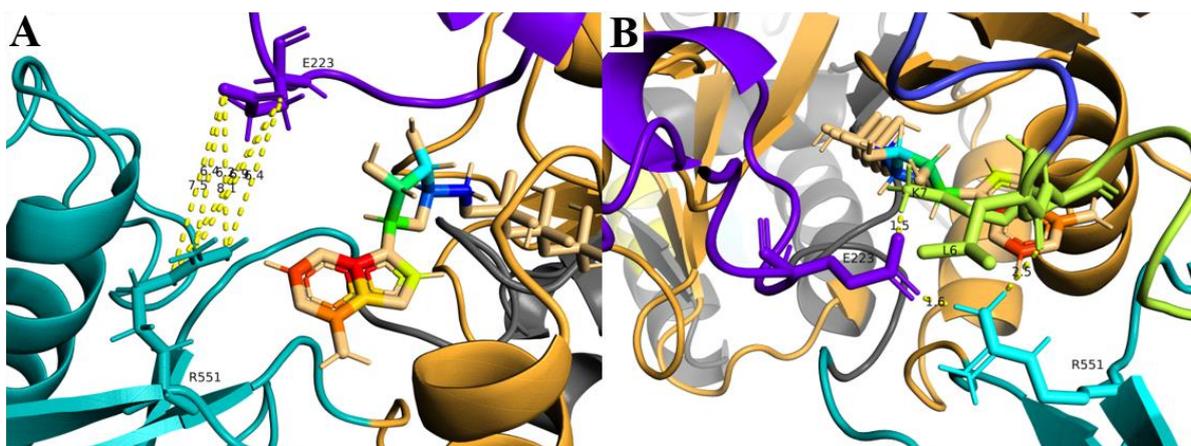
Ao comparar as diferenças da distância entre os resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ da Na, K-ATPase quando em conformação E2 antes e após a interação da melitina, foi possível observar que antes da interação a distância entre os resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ é cerca de 6-8 Å, não havendo interação entre esses dois resíduos. Porém, após a interação com a melitina, a Na, K-ATPase em conformação E2 apresenta uma aproximação dos resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹, que realizam uma ligação de hidrogênio de 1.6 Å. Isso se deve ao fato que melitina interage com ambos os resíduos, os aproximando (Figura 27).

Essa ligação de hidrogênio entre os dois resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ que não estava presente antes da interação da melitina ocasiona uma alteração estrutural da Na, K-ATPase que pode afetar no processo de conversão para E1, e a atividade da Na, K-ATPase, tendo em vista que são resíduos importantes para a conformação dos domínios atuador (A) e de nucleotídeo (N) (SHINODA et al., 2009).

Além disso, também em E2 foi possível identificar uma interação da região N-terminal da melitina com os resíduos Gln⁵³⁹, Tyr⁵⁴² e Asp⁵³⁶ que pertencem ao domínio N e a presença da melitina nessa região também poderia alterar a interação entre os domínios N e P. Além

disso, vale ressaltar que o resíduo His⁶²⁰ está envolvido em uma interação por ligação de hidrogênio com a melitina, o qual pertence ao domínio P, mostrando que a melitina interage com ambos domínios.

Figura 27. Representação em 3D da distância entre os resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ na Na, K-ATPase em conformação E2. **A)** Distância dos resíduos de aminoácidos antes da interação com a melitina. **B)** Distância dos resíduos de aminoácido após a interação com a melitina, sendo evidenciado uma ligação de hidrogênio.



5.4.6 Modelo geral da interação entre melitina e Na, K-ATPase

Assim, a inibição evidenciada *in vitro* da Na, K-ATPase pela melitina pode ser explicada pela sua interação com a melitina nos ensaios *in silico*, os quais sugerem que a Na, K-ATPase pode permanecer na conformação E2P e não realizar a transição para a conformação E2, uma vez que há interação com o motivo TGES da Na, K-ATPase e há um aumento do comprimento da ligação salina entre os resíduos de aminoácidos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ que estão relacionados ao processo de desfosforilação da Na, K-ATPase. Entretanto, ao observar a interação da melitina com a conformação E2 é possível observar uma alteração estrutural que a melitina ocasiona na Na, K-ATPase ao aproximar os resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ de tal modo que também pode desfavorecer a atividade da enzima mesmo após a desfosforilação, haja vista que esses dois resíduos pertencem aos domínios A e N, respectivamente. Além disso, devido à melitina se ligar aos resíduos Glu³⁶², Glu³⁶⁵ e Thr³⁶⁶ que estão próximos ao resíduo Thr³⁷¹ que realiza ligações com o íon Mg⁺², pode-se sugerir uma diminuição em sua atividade, visto que o Mg⁺² é o cofator da Na, K-ATPase (HANS-JURGEN et al., 2017; JORGENSEN et al., 2003).

Dentre os resíduos de aminoácidos da Na, K-ATPase que interagiram por meio de ligações de hidrogênio com a melitina, houve um resíduo de aminoácido que apresentou essa

ligação em quatro conformações diferentes da Na, K-ATPase analisadas, com exceção da E1P. O Glu²²³ fez ligações de hidrogênio com algum resíduo da melitina em quatro conformações, sendo esse resíduo de aminoácido da Na, K-ATPase importante para uma interação entre o domínio A e N por meio de uma ligação salina (SHINODA et al., 2009). Por outro lado, o resíduo de aminoácido Gln²²⁵ realizou a mesma interação, porém, apenas com a Na, K-ATPase em conformação E2P. Devido a estes resíduos de aminoácidos da Na, K-ATPase estarem próximos ao motivo TGES, e a melitina estar interagindo com essa região, sugere-se que o mecanismo de desfosforilação esteja inibido, e conseqüentemente, a enzima estar presa na conformação E2P, inibindo a atividade enzimática da Na, K-ATPase (CONTRERAS et al., 2024; JORGENSEN et al., 2003).

A Lys⁷ e os outros aminoácidos amino-terminais da cadeia da melitina, Ile² e Gly³ realizaram interações com a Na, K-ATPase em todas as cinco conformações, indicando que é a região que melhor interage por meio de ligações de hidrogênio com a Na, K-ATPase. Além disso, evidencia-se uma melhor interação da região amino-terminal da melitina (Gly¹, Ile², Gly³ e Lys⁷) com regiões próximas ao motivo TGES da Na, K-ATPase em conformação E1P, E2P, E2P+Oua e E2. Por outro lado, houve uma maior interação da região carboxi-terminal da melitina (Lys²¹, Arg²² e Gln²⁵) com esse mesmo motivo em conformação E1. Logo, sugere-se que a região carboxi-terminal da melitina apresenta uma maior afinidade ao motivo TGES da Na, K-ATPase em conformação E1, enquanto em conformação E1P, E2P, E2P-Oua e E2 a região de maior afinidade da melitina é a amino-terminal.

Sabe-se que a ouabaína pode se ligar a Na, K-ATPase entre os segmentos transmembranares M1, M2, M4 e M6 (SANDTLER et al., 2011), de modo que inibe a Na, K-ATPase em conformação E2P, impedindo a conversão para E1, além de alterar a conformação da Na, K-ATPase e fechar o portão extracelular inibindo sua função (OGAWA et al., 2009). A interação entre a melitina e a Na, K-ATPase E2P+Oua também ocorreu na região entre os domínios A, P e N, não havendo interação com os segmentos transmembranares. Por isso, pode-se supor que a melitina não afetaria a ligação da ouabaína, e nem a ouabaína modificaria a região de interação da melitina com a enzima. Porém, observou-se um aumento do número de interações entre os resíduos de melitina e de Na, K-ATPase, sendo observadas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre 17 resíduos de aminoácidos da melitina e 17 resíduos de aminoácidos da Na, K-ATPase, o maior número de interações entre todas as conformações. Logo, pode-se sugerir que a interação da ouabaína com a Na, K-ATPase modificaria sua conformação em E2P, expondo outros resíduos de aminoácidos nos domínios A, N e P, de modo a permitir uma maior interação da melitina com essa região.

Somado a isso, sabe-se que os sítios de interação iônica estão presentes nos segmentos transmembranares da Na, K-ATPase, e como dito anteriormente, a melitina teve uma preferência de ligação na região citoplasmática, mais especificamente, nos domínios citoplasmáticos A, N e P. Apesar de estarem voltados para dentro da célula, o que provavelmente dificultaria a interação da melitina nessa região, pode-se ressaltar que a melitina é um peptídeo altamente hemolítico que rompe a membrana citoplasmática da célula e consegue alcançar esses domínios citoplasmáticos (RATCLIFFE et al., 2011; SWIATLY-BLASZKIEWICZ et al., 2020). Kamanina e colaboradores (2015) identificaram que uma proteína semelhante a melitina, de 67 kDa, interage com a Na, K-ATPase na sequência DPPRAA que está localizada na subunidade α , a partir do resíduo 591. No presente estudo, assim como no de Kamanina, houve interação da melitina nos domínios citoplasmáticos, porém, mais próximos do motivo TGES e do resíduo Arg⁵⁵¹. De modo que não foi visto interação da melitina de *A. mellifera* com a sequência DPPRAA, tendo em vista que a melitina de *A. mellifera* tem cerca de 12 kDa enquanto que a melitina-like utilizada por Kamanina et al. (2015) apresenta 67 kDa, sendo 5 vezes maior.

Observa-se na figura 28 a sequência de aminoácidos da subunidade α da Na, K-ATPase e em quais resíduos de aminoácidos a melitina interagiu em todas as cinco diferentes conformações, além de contabilizar quantas vezes houve interação com o resíduo nas diferentes conformações. É possível observar uma maior interação da melitina com motivo TGES e com o domínio de ligação ao nucleotídeo (N). Além disso, a interação da melitina ficou restrita aos domínios citoplasmáticos, não sendo observada interação com os resíduos de aminoácidos pertencentes aos segmentos transmembranares.

Os valores de RMSD calculados para cada uma das conformações de Na, K-ATPase (E1, E1P, E2P, E2P+Oua e E2) após a interação com a melitina tiveram os valores respectivos de 0.426, 0.627, 0.523, 0.334 e 0.350. Quanto maior um valor de RMSD, mais a conformação da molécula se alterou após a interação, então, sugere-se que a Na, K-ATPase obteve maior mudança conformacional em E1P, seguida por E2P e E1. Entretanto, foi evidenciado uma aproximação dos resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹ em E2, o que pode acarretar numa maior alteração da atividade enzimática. Assim, é importante compreender, por meio de técnicas *in silico*, a interação da melitina com a Na, K-ATPase, permitindo explicar o processo de inibição da Na, K-ATPase pela melitina *in vitro*.

Para finalizar essa sessão, é possível observar o ciclo de alterações conformacionais da Na, K-ATPase ao interagir com a melitina, demonstrando as diferentes orientações da melitina em cada diferente conformação (E1, E1P, E2, E2P) (Figura 29). Essa figura mostra que a

melitina apresenta uma preferência pela região catalítica da Na, K-ATPase, mais especificamente pelos domínios atuador (A), de ligação ao nucleotídeo (N) e de ligação ao fosfato (P), não se ligando em nenhuma das 4 diferentes conformações as alças entre os segmentos transmembranares ou a estes.

Figura 28. Sequência de aminoácidos da subunidade α da Na, K-ATPase, os resíduos destacados em amarelos tiveram interação com a melitina, sendo o número abaixo a quantidade de interações contabilizando todas as cinco diferentes conformações. Os motivos altamente conservados, TGES e DKTGRT(I/L), estão marcados na figura, assim como o motivo MIDPPRAA descrito por Kamanina et al., 2015. As cores correspondem ao padrão demonstrado na figura 15.

```

40  SMDDHKLSLD ELHRKYGTDL SRGLTSARAA EILARDGPNALTPPPTPEW

90  IKFCRQLFGGFSMILLWIGAILCFLAYSIIQAATEEEPQNDNLYLGVVLSAV

140 VIITGCFSYQEAQSSKIMESFKNMVPQQLVIRNGEKMSINAEVVVGD

190 LVEVKGGDRI PADGRIISAN GCKVDNSSLTGESEFQTRSPDFTSENPLET
      1 1 1 1 1 1 1 2 1 2
      Motivo TGES

240 RNIAEFSTNC VEGTARGIVV YTGDRVMGR IA-----GQTPIAAEIE
      1 1

290 HFIHIITGVA VFLGVSFFIL SLILEYTWLE AVIFUGIIV ANVPEGLLAT

340 VTVCLTLTA K RMARKNCLVK NLEAVETLGS TSTICSDKTG TLTQNRMTVA
      1 11
      Motivo DKTGT(I/L)

390 HMWFDNQIHE ADTTENQSGV SFDKTSATWL ALSRIAGLCN RAVFQANQEN

440 LPILKRAVAG DASESALLKC IELCCGSVKE MRERYAKIVE(N) IPFNSTNKYQ
      1

490 LSIHKNPNTS EPQHLLVMK(L)G(D)APERILDRCSSILLHGKEQ(K)P(D)IDEELKD(E)AFQ
      1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1

540 NAYLELGGGLG ERVLGFCHLF LPDEQFPEGF QFDT(D)DVNFP IDNLCFVGLI
      1 2 2 1
      Motivo MIDPPRAA

590 SMIDPPRAAV PDAVGKCRSA GIKVIMVTGD HPITAKAIAK GVGIISEGNE
      1

640 TVEDIAARLN IPVSQVNPRD AKA(D)CVVHGSD LKDMTSEQLD DILKYHTEIV
      1

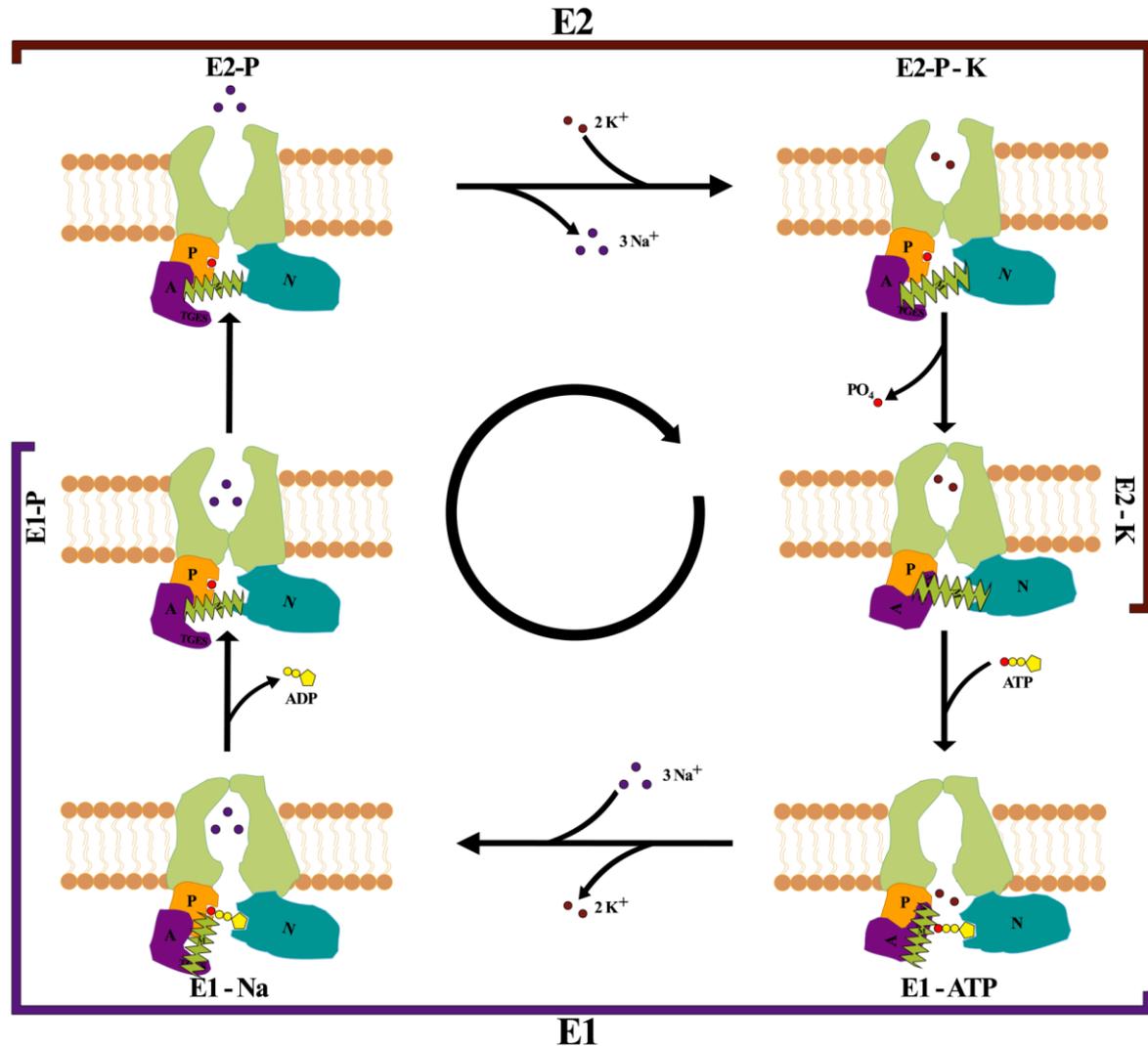
690 FARTSPQQL IIVEGCQRQG AIVAVTGDGV NDSPALKKAD IGVAMGIAGS

740 DVSKQAADMI LLDNDFASIV TGVEEGLIF DNLKKSIAYP LSNIPETP

790 FLIFIANIPLPLGTVTILC IDLGDMVPA ISLAYEQAES DIMKRQPRNP
      1

840 KTDKLVNERL ISMAYGQIGM IQALGGFFTY FVILAENGL PIHLLGLRVD
  
```

Figura 29. Ciclo catalítico e mudanças conformacionais de Na, K-ATPase interagindo com a melitina de *Apis mellifera*. A Na, K-ATPase contém os domínios de fosforilação (P), atuador (A) e de ligação ao nucleotídeo (N), enquanto a melitina está marcada com M.



5.5 Análise da atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *A. mellifera* em meio sólido

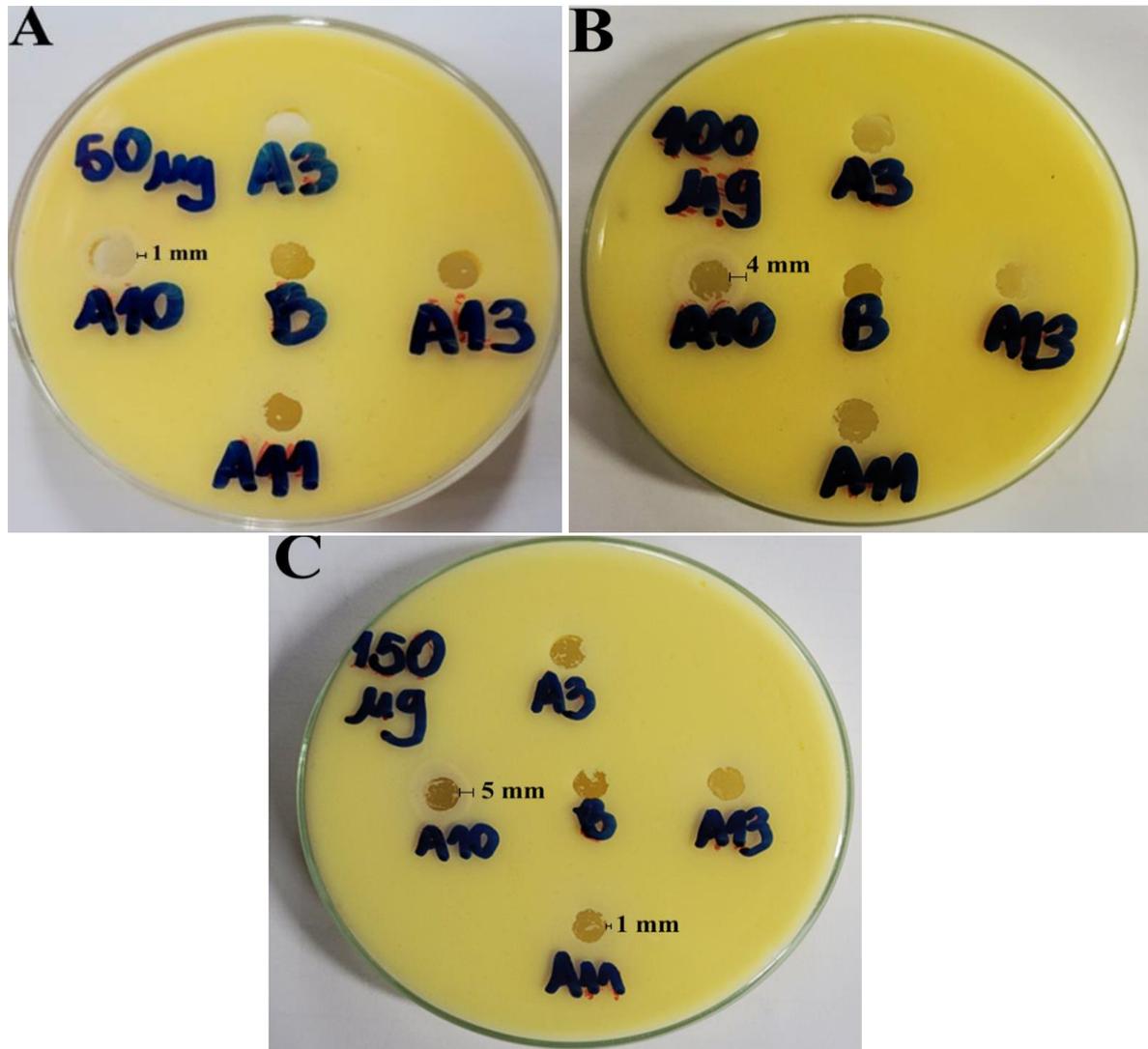
A atividade fosfolipásica da peçonha bruta pode ser observada pela presença de um halo translúcido próximo aos orifícios de 5mm de diâmetro (Figura 30). Na literatura é descrito a presença de fosfolipases A2 e B na peçonha de *A. mellifera*, por tal motivo, esperava-se uma atividade fosfolipásica que foi observada na amostra 10, em todas as concentrações, uma das mais recentes, sugerindo uma melhor preservação da atividade enzimática (Tabela 3). Por outro lado, a amostra 11 também mostrou atividade fosfolipásica mas menos intensa que a amostra 10, visto que só foi possível observar o halo formado na maior concentração. Em 50 μg de peçonha bruta, apenas a amostra 10 obteve atividade com a presença de um halo de

aproximadamente 1mm de diâmetro. Por outro lado, em 100 µg de peçonha bruta, houve a formação de um halo de 4 mm de diâmetro na presença da amostra 10. Por fim, em 150 µg foi possível observar halos de 5 mm na presença da amostra 10 e 1 mm na presença da amostra 11, também indicando a atividade fosfolipásica (Figura 30). Assim, esses resultados sugerem uma relação dose-resposta, visto que quanto maior a concentração de peçonha bruta, maior o tamanho do halo formado para a amostra A10. Observou-se também que não houve halos identificados para as amostras A3 e A13, isso pode ser explicado pelo manejo da amostra que pode ter perdido a atividade fosfolipásica por desnaturação da enzima.

Tabela 3. Atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *Apis mellifera* (µg/mL) em cada amostra e o tamanho do halo formado em mm.

[Peçonha bruta] µg/mL	Amostra	Halo formado (mm)
50	A3	0
	A10	1
	A11	0
	A13	0
100	A3	0
	A10	4
	A11	0
	A13	0
150	A3	0
	A10	5
	A11	1
	A13	0

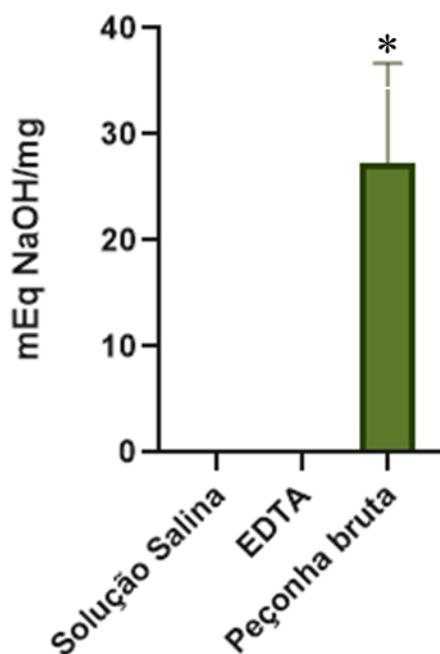
Figura 30. Atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *Apis mellifera* em meio sólido em diferentes concentrações. A) 50 µg de peçonha bruta. B) 100 µg de peçonha bruta. C) 150 µg de peçonha bruta.



5.6 Análise da atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *A. mellifera* em meio líquido

Após realizar uma titulação potenciométrica, em triplicata, utilizando NaOH 1N, foi observado uma atividade fosfolipásica média para a peçonha de *Apis mellifera* de 24,93 mEq de NaOH por mg de peçonha bruta. Além disso, observou-se que utilizando solução salina não houve alterações do pH, e nem na presença de EDTA, indicando que o Ca^{+2} é necessário para a atividade dessa fosfolipase com um $p < 0.0012$ (Figura 31).

Figura 31. Quantificação da atividade fosfolipásica utilizando meio líquido com 100 μ L de peçonha de *A. mellifera* a 1 mg/mL. Em triplicatas com um $p < 0.0012$ (*).



Assim, pode-se sugerir que há a presença de fosfolipases na peçonha de *Apis mellifera*, haja vista que foi possível identificar atividade fosfolipásica em meio sólido e em meio líquido, além da presença de bandas entre 12,77 e 19,1 kDa que provavelmente correspondem a uma fosfolipase, o que corrobora essa afirmativa, visto que foi identificada em todos os 5 géis de eletroforese realizados nesse trabalho. Sabe-se que dentro das fosfolipases A2 (PLA2) há as Ca^{+2} dependentes, que necessitam desse íon para sua atividade enzimática, o que foi observado para peçonha bruta de *Apis mellifera* (PASCHOAL, 2015). Logo, segundo a distribuição dos grupos Ca^{+2} dependentes da PLA2, a apitoxina poderia conter as PLA2 que são secretadas (sPLA2) do grupo I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV, porém, na literatura é descrito que as fosfolipases A2 da apitoxina corresponde majoritariamente ao grupo III (LEE e BAE, 2016).

6. CONCLUSÃO

Os resultados do perfil proteico por eletroforese da peçonha de *A. mellifera* africanizada do Mato Grosso do Sul sugerem alguns componentes, tais como a fosfolipase A2, hialuronidase, fosfatase ácida, MRJP, α -glicosidase e melitina em sua forma tetramérica. Além disso, foi possível identificar a presença de atividade fosfolipásica na apitoxina de *A. mellifera* do Mato Grosso do Sul para as amostras A10 e A11 em ensaios utilizando meio sólido e meio líquido, sendo identificado uma fosfolipase Ca^{+2} dependente.

Foi demonstrado também que a peçonha bruta inibiu a atividade da Na, K-ATPase com um IC_{50} de 12,39 $\mu\text{g/mL}$ e um K_i de 12,63 $\mu\text{g/mL}$. Análises *in silico* identificaram interações entre a melitina e a Na, K-ATPase, principalmente em uma região altamente conservada e importante para a desfosforilação da enzima, o motivo TGES. Essa interação, assim como outras em regiões de ligação ao Mg^{+2} , e aos resíduos Glu²²³ e Arg⁵⁵¹, podem explicar a inibição da atividade da Na, K-ATPase *in vitro*. Além disso, evidenciou-se uma preferência da melitina pelos domínios citoplasmáticos da Na, K-ATPase, visto que não foram identificadas interações nos segmentos transmembranares. Logo, a melitina pode inibir a Na, K-ATPase pela interação com os domínios citoplasmáticos A, N e P, os quais foram identificadas interações.

Esses dados são relevantes para compreender os mecanismos *in silico* e elucidar o processo de inibição da Na, K-ATPase pela melitina, contribuindo para estudos sobre os efeitos da apitoxina nos sistemas nervoso e renal. Além disso, o estudo da composição da peçonha de *A. mellifera* africanizada do Mato Grosso do Sul enriquecerá o banco de dados de componentes bioquímicos presentes na apitoxina da abelha africanizada no Brasil, auxiliando no desenvolvimento de soroterapias e inovações medicinais utilizando a apitoxina.

Para o futuro, tem-se como perspectiva a interação *in vitro* entre a melitina purificada e a enzima Na, K-ATPase, para comparar se há a inibição na mesma proporção, e, caso não, identificar possíveis inibidores da Na, K-ATPase presentes na apitoxina além da melitina. Além disso, espera-se uma análise dos componentes da apitoxina por meio da metodologia de espectrometria de massas, de modo a identificar com maior precisão os componentes proteicos presentes na apitoxina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMIDOR, S. E., CARDOSO-JÚNIOR, C. A., HARIANTO, J., NOWELL, C. J., COLE, L., OLDROYD, B. P., e RONAI, I. (2022). Reproductive plasticity and oogenesis in the queen honey bee (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, 136, 104347.

ABD EL-WAHED, A. A., KHALIFA, S. A., SHEIKH, B. Y., FARAG, M. A., SAEED, A., LARIK, F. A., ... e EL-SEEDI, H. R. (2019). Bee venom composition: From chemistry to biological activity. **Studies in natural products chemistry**, 60, 459-484.

AEBERSOLD, R., e MANN, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, 422(6928), 198-207.

ALMEIDA, E. A., PIE, M. R., BRADY, S. G., e DANFORTH, B. N. (2012). Biogeography and diversification of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae): emerging patterns from the southern end of the world. **Journal of biogeography**, 39(3), 526-544.

ALMEIDA, R. A. M. D. B., OLIVO, T. E. T., MENDES, R. P., BARRAVIERA, S. R. C. S., SOUZA, L. D. R., MARTINS, J. G., ... e BARRAVIERA, B. (2011). Africanized honeybee stings: how to treat them. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44, 755-761.

AMARAL, E. A. (2006). **Inibição da Na⁺/K⁺ATPase pelo derivado esteróide ouabaína: implicações sobre o ciclo de vesículas sinápticas em junção neuromuscular**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular. 60 p.

ANTHONISEN, A. N., CLAUSEN, J. D., e ANDERSEN, J. P. (2006). Mutational analysis of the conserved TGES loop of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, 281(42), 31572-31582.

ANTOINE, C. M., e FORREST, J. R. (2021). Nesting habitat of ground-nesting bees: a review. **Ecological Entomology**, 46(2), 143-159.

ARAÚJO, J. M. D. de, ARAÚJO, K. A. M. de, e LEITE, R. de S. (2023). Epidemiological study of bee stings in the state of Paraíba, Northeastern Brazil, from 2015 to 2019. **ABCS Health Sciences**, 48, e023224-e023224.

ARNAIZ, G. R. L., e ORDIERES, M. G. L. (2014). Brain Na⁺, K⁺-ATPase activity in aging and disease. **International journal of biomedical science: IJBS**, 10(2), 85.

ASCHER J. S. e PICKERING J. (2020). **Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila)**. Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20q>. Acesso em 16 set. 2023.

BAGROV, A. Y., SHAPIRO, J. I., FEDOROVA, O. V. (2009). Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological reviews**, 61(1), 9-38.

BAKER, K. J., EAST, J. M., LEE, A. G. (1995). Mechanism of Inhibition of the Ca²⁺ - ATPase by Melittin. **Biochemistry**, 34(11), 3596-3604.

BARBONI, E., KEMENY, D. M., CAMPOS, S., e VERNON, C. A. (1987). The purification of acid phosphatase from honey bee venom (*Apis mellifica*). **Toxicon**, 25(10), 1097-1103.

BARBOSA, A. N., FERREIRA JR, R. S., DE CARVALHO, F. C. T., SSCHUELTER-TREVISOL, F., MENDES, M. B., MENDONÇA, B. C., ... e BARRAVIERAI, B. (2021). Single-arm, multicenter phase I/II clinical trial for the treatment of envenomings by massive africanized honey bee stings using the unique apilic antivenom. **Frontiers in Immunology**, 12, 653151.

BATRA, S. W. (1984). Solitary bees. **Scientific American**, 250(2), 120-127.

BÉGUIN, P., CRAMBERT, G., MONNET-TSCHUDI, F., ULDRY, M., HORISBERGER, J. D., GARTY, H., e GEERING, K. (2002). FXYD7 is a brain-specific regulator of Na, K-ATPase α 1- β isozymes. **The EMBO Journal**, 21, 3264-3273.

BENTON, A. W., MORSE, R. A., e STEWART, J. D. (1963). Venom collection from honey bees. **Science**, 142(3589), 228-230.

BLAIMER, B. B., SANTOS, B. F., CRUAUD, A., GATES, M. W., KULA, R. R., MIKÓ, I., ... e BUFFINGTON, M. L. (2023). Key innovations and the diversification of Hymenoptera. **Nature Communications**, 14(1), 1212.

BLANCO, G., DETOMASO, A. W., KOSTER, J., XIE, Z. J., MERCER, R. W. (1994). The α -subunit of the Na, K-ATPase has catalytic activity independent of the β -subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, 269(38), 23420-23425.

BORTOLOTTI, L., e COSTA, C. (2014). **Chemical communication in the honey bee society. Neurobiology of chemical communication**. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor e Francis; 2014. Capítulo 5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200983/>. Acesso em: 3 jun. 2023.

BOSCH, J., OSORIO-CANADAS, S., SGOLA STRA, F., e VICENS, N. (2021). Use of a Managed Solitary Bee to Pollinate Almonds: Population Sustainability and Increased Fruit Set. **Insects**, 12(1), 56.

BOYANOVSKY, B. B., e WEBB, N. R. (2009). Biology of secretory phospholipase A 2. **Cardiovascular drugs and therapy**, 23, 61-72.

BUGNON, M., ROHRIG, U. F., GOULLIEUX, M., PEREZ, M. A., DAIANA, A., MICHIELIN, O., e ZOETE, V. (2024). SwissDock 2024: major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. **Nucleic Acids Research**, gkae300.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Gabinete do Ministro. Portaria nº 702, de 21 de março de 2018. Brasília, 2018.

BRIDGES, A. R. e OWEN, M. D. (1984). The morphology of the honey bee (*Apis mellifera* L.) Venom gland and reservoir. **Journal of Morphology**, 181(1), 69-86.

CALDAS, S. A., GRAÇA, F. A. S., de BARROS, J. S. M., ROLIM, M. F., PEIXOTO, T. D. C., e PEIXOTO, P. V. (2013). Lesions caused by Africanized honeybee stings in three cattle in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 19, 1-5.

CAMARGO, R. C. R., PEREIRA, F. M., LOPES, M. T. R. (2002). **Sistema de Produção: Produção de Mel**. 21ª ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte. 136 p.

CANTÚ, M. D., CARRILHO, E., WULFF, N. A., e PALMA, M. S. (2008). Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, 31, 669-675.

CARVALHO, F. B., MELLO, C. F., MARISCO, P. C., TONELLO, R., GIRARDI, B. A., FERREIRA, J., ... e RUBIN, M. A. (2012). Spermidine decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. **European journal of pharmacology**, 684(1-3), 79-86.

CHEN, C. C. e LIN-SHIAU, S. Y. (1985). Mode of inhibitory action of melittin on Na⁺- K⁺-ATPase activity of the rat synaptic membrane. **Biochemical Pharmacology**, 34(13), 2335-2341.

CHEN, J. e LARIVIERE, W. R. (2010). The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Prog Neurobiol**, 92(2), 151-183.

CHEN, S. C., MULLER, M., ZHOU, J. Z., WRIGHT, L. C., e SORRELL, T. C. (1997). Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor?. **Journal of Infectious Diseases**, 175(2), 414-420.

CHO, S. Y., SHIM, S. R., RHEE, H. Y., PARK, H. J., JUNG, W. S., MOON, S. K., ... e PARK, S. U. (2012). Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. **Parkinsonism e related disorders**, 18(8), 948-952.

CHOI, J. H., JANG, A. Y., LIN, S., LIM, S., KIM, D., PARK, K., ... e SEO, H. S. (2015). Melittin, a honeybee venom-derived antimicrobial peptide, may target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecular medicine reports**, 12(5), 6483-6490.

CINI, A., SUMNER, S., e CERVO, R. (2019). Inquiline social parasites as tools to unlock the secrets of insect sociality. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 374(1769), 20180193.

CLAUSEN, J. D., VILSEN, B., MCINTOSH, D. B., EINHOLM, A. P., e ANDERSEN, J. P. (2004). Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase assists in catalysis of E 2/E 2P partial reactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(9), 2776-2781.

CLAUSEN, M. V., HILBERS, F., e POULSEN, H. (2017). The structure and function of the Na, K-ATPase isoforms in health and disease. **Frontiers in physiology**, 8, 371.

CLAUSEN, T. (2003). Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. **Physiological reviews**, 83(4), 1269-324.

CONTRERAS, R. G., TORRES-CARRILLO, A., FLORES-MALDONADO, C., SHOSHANI, L., e PONCE, A. (2024). Na⁺/K⁺-ATPase: More than an Electrogenic Pump. **International Journal of Molecular Sciences**, 25(11), 6122.

CORDEIRO, B. M., LEITE FONTES, C. F., e MEYER-FERNANDES, J. R. (2024). Molecular Basis of Na, K-ATPase Regulation of Diseases: Hormone and FXD2 Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, 25(24), 13398.

CORTES, V. F., RIBEIRO, I. M., BARRABIN, H., ALVES-FERREIRA, M., e FONTES, C. F. L. (2011). Regulatory phosphorylation of FXD2 by PKC and cross interactions between FXD2, plasmalemmal Ca-ATPase and Na, K-ATPase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 505(1), 75-82.

COSTA-MAIA, F. M., LOURENÇO, D. A. L., e TOLEDO, V. A. A. (2010). Aspectos econômicos e sustentáveis da polinização por abelhas. **Sistemas de produção agropecuária (ciências agrárias, animais e florestais)**, 1, 45-67.

CRAMBERT, G., e GEERING, K. (2003). FXD Proteins: New tissue-specific regulators of the ubiquitous Na, K-ATPase. **Science Signaling**, 166, re1-re1.

CRANE, E. 2000. **The world history of beekeeping and honey hunting**. 1a ed. New York: Routledge. 720 p.

CRUZ, V. R. R., CABRAL, G. H., SILVA, S. J. R. (2022). Caracterização e predição de acidentes com abelhas africanizadas em Roraima, Brasil. **Gaia Scientia**, 16(2), 95-109.

CUPPOLETTI, J. e ABBOTT, A. J. (1990). Evidence for a melittin-induced conformational change. **Archives of biochemistry and biophysics**, 283(2), 249- 257.

DANFORTH, B. N. (2002). Evolution of sociality in a primitively eusocial lineage of bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99(1), 286-290.

DANFORTH, B. N., MINCKLEY, R. L., e NEFF, J. L. (2019). **The solitary bees: biology, evolution, conservation**. Princeton University Press.

DANTAS, C. G., NUNES, T. L. G. M., NUNES, T. L. G. M., GOMES, M. Z., GRAMACHO, K. P. (2013). Apitoxina: coleta, composição química, propriedades biológicas e atividades terapêuticas. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, 4(2), 127-150

DATASUS. (2024). **Acidentes por animais peçonhentos notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação – Brasil**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 21 de julho de 2024.

DE-HAAS, G. H., POSTEMA, N. M., NIEUWENHUIZEN, W. V., e VAN-DEENEN, L. L. M. (1968). Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, 159(1), 103-117.

DELPRAT, B., SCHAER, D., ROY, S., WANG, J., PUEL, J. L., e GEERING, K. (2007). FXYD6 is a novel regulator of Na, K-ATPase expressed in the inner ear. **Journal of biological chemistry**, 282(10), 7450-7456.

DIETEMANN, V., PFLUGFELDER, J., HÄRTEL, S., NEUMANN, P., e CREWE, R. M. (2006). Social parasitism by honeybee workers (*Apis mellifera capensis* Esch.): evidence for pheromonal resistance to host queen's signals. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 60, 785-793.

DIXON, M. (1953). The determination of enzyme inhibitor constants. **Biochemical journal**, 55(1), 170.

EINHOLM, A. P., TOUSTRUP-JENSEN, M., ANDERSEN, J. P., e VILSEN, B. (2005). Mutation of Gly-94 in transmembrane segment M1 of Na⁺, K⁺-ATPase interferes with Na⁺ and K⁺ binding in E2P conformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102(32), 11254-11259.

ENGEL, M. S., RASMUSSEN, C., AYALA, R., e de OLIVEIRA, F. F. (2023). Stingless bee classification and biology (Hymenoptera, Apidae): a review, with an updated key to genera and subgenera. **ZooKeys**, 1172, 239.

EPAGRI. (2017) **Meliponicultura**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). Boletim Didático, 141. Florianópolis. 56p.

FERAILLE, E., e DIZIN, E. (2016). Coordinated control of ENaC and Na⁺, K⁺-ATPase in renal collecting duct. **Journal of the American Society of Nephrology**, 27(9), 2554-2563.

FERREIRA JR, R. S., ALMEIDA, R. A. M. D. B., BARRAVIERA, S. R. C. S., e BARRAVIERA, B. (2012). Historical perspective and human consequences of Africanized bee stings in the Americas. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, 15(2), 97-108.

FLORES, C. A. M., NOVOA, E. G., HAMIDUZZAMAN, M., SOTO, J. I. A., e CARLOS, M. A. L. (2017). Africanization of honey bees (*Apis mellifera*) in three climatic regions of northern Mexico. **Veterinaria México**, 2(4), 6-9.

FORLI, S., HUEY, R., PIQUE, M. E., SANNER, M. F., GOODSSELL, D. S., e OLSON, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nature Protocols**, 11(5), 905–919.

FRANÇA, F. O. S., BENVENUTI, L. A., FAN, H. W., SANTOS, D. D., HAIN, S. H., PICCHIMARTINS, F. R., ... e WARREL, D. A. (1994). Severe and fatal mass attacks by 'killer' bees (Africanized honey bees—*Apis mellifera scutellata*) in Brazil: clinicopathological studies with measurement of serum venom concentrations. **QJM: An International Journal of Medicine**, 87(5), 269-282.

FRATINI, F., CILIA, G., MANCINI, S., e FELICOLI, A. (2016). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. **Microbiological research**, 192, 130-141.

FUNARI, S. R. C., ZEIDLER, P. R., ROCHA, H. C., e SFORCIN, J. M. (2001). Venom production by Africanized honeybees (*Apis mellifera*) and Africanized-European hybrids. **Journal of venomous Animals and Toxins**, 7, 190-198.

GAJSKI, G., e GARAJ-VRHOVAC, V. (2013). Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. **Environmental toxicology and pharmacology**, 36(2), 697-705.

GARÇON, D. P. (2007). **Caracterização cinética da (Na⁺, K⁺)-ATPase da fração microsomal do tecido branquial do siri *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Crustacea, Portunidae)** (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

GATTO, C., LUTSENKO, S., e KAPLAN, J. H. (1997). Chemical modification with Dihydro-4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonate reveals the distance between K480 and K501 in the ATP-Binding domain of the Na, K-ATPase. **Archives of biochemistry and biophysics**, 340(1), 90-100.

GEERING, K. (2008). Functional roles of Na, K-ATPase subunits. **Current opinion in nephrology and hypertension**, 17(5), 526-532.

GIANNINI, T. C., SARAIVA, A. M., e ALVES-DOS-SANTOS, I. (2010). Ecological niche modeling and geographical distribution of pollinator and plants: A case study of *Peponapis fervens* (Smith, 1879) (Eucerini: Apidae) and *Cucurbita* species (Cucurbitaceae). **Ecological Informatics**, 5(1), 59-66.

GIOVAMBATTISTA, N., LOPEZ, C. F., ROSSKY, P. J., e DEBENEDETTI, P. G. (2008). Hydrophobicity of protein surfaces: Separating geometry from chemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105(7), 2274-2279.

GONZALEZ, V. H., GRISWOLD, T., PRAZ, C. J., e DANFORTH, B. N. (2012). Phylogeny of the bee family Megachilidae (Hymenoptera: Apoidea) based on adult morphology. **Systematic Entomology**, 37(2), 261-286.

GRAAF, D. C., BROCHETTO-BRAGA, M. R., de ABREU, R. M. M., BLANK, S., BRIDTS, C. H., De CLERCK, L. S., ... e VAERENBERGH, M. V. (2021). Standard methods for *Apis mellifera* venom research. **Journal of Apicultural Research**, 60(4), 1-31.

GUHA, S., FERRIE, R. P., GHIMIRE, J., VENTURA, C. R., WU, E., SUN, L., ... e WIMLEY, W. C. (2021). Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. **Biochemical pharmacology**, 193, 114769.

GUO, Y., ZHANG, Y., YAN, R., HUANG, B., YE, F., WU, L., ... e ZHOU, Q. (2022). Cryo-EM structures of recombinant human sodium-potassium pump determined in three different states. **Nature Communications**, 13(1), 3957.

GUZMAN-NOVOA, E., MORFIN, N., DE LA MORA, A., MACÍAS-MACÍAS, J. O., TAPIA-GONZÁLEZ, J. M., CONTRERAS-ESCARREÑO, F., ... e QUEZADA-EUÁN, J. J. G. (2020).

The process and outcome of the Africanization of honey bees in Mexico: Lessons and future directions. **Frontiers in Ecology and Evolution**, 404.

HAAS, J., HAYWARD, A., BUER, B., MAIWALD, F., NEBELSIEK, B., GLAUBITZ, J., ... e NAUEN, R. (2022). Phylogenomic and functional characterization of an evolutionary conserved cytochrome P450-based insecticide detoxification mechanism in bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 119(26), e2205850119.

HAIT, W. N., e LEE, G. L. (1985). Characteristics of the cytotoxic effects of the phenothiazine class of calmodulin antagonists. **Biochemical pharmacology**, 34(22), 3973-3978.

HALVACI, E., KOZAK, T., MERT, G. Ü. L., HATICE, K. A. R. S., e FATIH, Ş. E. N. (2023). Bee anatomy: a comprehensive overview of bee morphology and physiology. **Journal of Scientific Reports-B**, 8, 1-19.

HAMES, B. D. (Ed.). (1998). **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach (Vol. 197)**. OUP Oxford.

HANS-JURGEN, A., TANJA, H., e GRISCHA, S. (2017). Modulation of the Na, K-ATPase by Magnesium Ions. **Biochemistry**, 56(7), 1005-1016.

HODEIFY, R., KREYDIYYEH, S., e ZAID, L. M. J. (2024). Identified and potential internalization signals involved in trafficking and regulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 479(7), 1583-1598.

HOMAREDA, H., NAGANO, Y., e MATSUI, H. (1993). Immunochemical identification of exposed regions of the Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit. **FEBS letters**, 327(1), 99-102.

HONORATO, R.V., KOUKOS, P.I., JIMÉNEZ-GARCÍAL, B., TSAREGORODTSEV, A., VERLATO, M., GIACHETTI, A., ROSATO, A., BONVIN, A.M.J.J.(2021). "Structural biology in the clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem." **Frontiers Mol. Biosci.**, 8, fmolb.2021.729513.

HONORATO, R.V., TRELLET, M.E., JIMÉNEZ-GARCÍAL, B., SCHAARSCHMIDT, J.J., GIULINI, M., REYS, V., KOUKOS, P.I., RODRIGUES, J.P.G.L.M., KARACA, E., VAN ZUNDERT, G.C.P., ROEL-TOURIS, J., VAN NOORT, C.W., JANDOVÁ, Z., MELQUIOND, A.S.J., BONVIN, A.M.J.J. (2024). **The HADDOCK2.4 web server: A leap forward in integrative modelling of biomolecular complexes**. Nature Prot., In Press.

HORISBERGER, J. D. (2004). Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology**, 19(6), 377-387.

HOSSEN, M. S., SHAPLA, U. M., GAN, S. H., e KHALIL, M. I. (2016). Impact of bee venom enzymes on diseases and immune responses. **Molecules**, 22(1), 25.

JAMPILEK, J., e KRALOVA, K. (2021). Advances in drug delivery nanosystems using graphene-based materials and carbon nanotubes. **Materials**, 14(5), 1059.

JENSEN, J., NORBY, J. G., e OTTOLENGHI, P. (1984). Binding of sodium and potassium to the sodium pump of pig kidney evaluated from nucleotide-binding behaviour. **The Journal of Physiology**, 346(1), 219-241.

JORGENSEN, P. L. (1974). Purification and characterization of (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase IV. Estimation of the purity and of the molecular weight and polypeptide content per enzyme unit in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 356(1), 53-67.

JORGENSEN, P. L., HAKANSSON, K. O., e KARLISH, S. J. (2003). Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual review of physiology**, 65(1), 817-849.

JUNIOR, R. S. F., SCIANI, J. M., MARQUES-PORTO, R., JUNIOR, A. L., ORSI, R. D. O., BARRAVIEIRA, B., e PIMENTA, D. C. (2010). Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. **Toxicon**, 56(3), 355-362.

KANAI, R., OGAWA, H., VILSEN, B., CORNELIUS, F., e TOYOSHIMA, C. (2013). Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺, K⁺-ATPase preceding the E1P state. **Nature**, 502(7470), 201-206.

KANAI, R., CORNELIUS, F., OGAWA, H., MOTOYAMA, K., VILSEN, B., e TOYOSHIMA, C. (2021). Binding of cardiotonic steroids to Na⁺, K⁺-ATPase in the E2P state. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 118(1), e2020438118.

KANAI, R., CORNELIUS, F., VILSEN, B., e TOYOSHIMA, C. (2022). Cryoelectron microscopy of Na⁺, K⁺-ATPase in the two E2P states with and without cardiotonic steroids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 119(15), e2123226119.

KAPLAN, J. H. (2002). Biochemistry of Na, K-ATPase. **Annual review of biochemistry**, 71(1), 511-535.

KARLISH, S. J., TAL, D., KATZ, A., KAPRI-PARDES, E., BELOGUS, E., e HAVIV, H. (2008). The sodium-potassium pump: structure, function, regulation and pharmacology. **Life Science Open Day, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel**, 1-3.

KELBER, A., e SOMANATHAN, H. (2019). Spatial vision and visually guided behavior in Apidae. **Insects**, 10(12), 418.

KAMANINA, Y. V., KLIMANOVA, E. A., DERGOUSOVA, E. A., PETRUSHANKO, I. Y., e LOPINA, O. D. (2016). Identification of a region of the polypeptide chain of Na, K-ATPase α -subunit interacting with 67-kDa melittin-like protein. **Biochemistry (Moscow)**, 81, 249-254.

KENT, R. B. (1988). The introduction and diffusion of the African honeybee in South America. **Yearbook of the association of pacific coast geographers**, 50(1), 21- 43.

KHAN, S. A., e ILIES, M. A. (2023). The phospholipase A2 superfamily: structure, isozymes, catalysis, physiologic and pathologic roles. **International journal of molecular sciences**, 24(2), 1353.

- KIM, B. Y., e JIN, B. R. (2014). Molecular characterization of a venom acid phosphatase Acph-1-like protein from the Asiatic honeybee *Apis cerana*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 17(4), 695-700.
- KIM, K. H., KIM, M., LEE, J., JEON, H. N., KIM, S. H., e BAE, H. (2019). Comparison of the protective effects of bee venom extracts with varying pla2 compositions in a mouse model of parkinson's disease. **Toxins**, 11(6), 358.
- KLEIN, A. M. (2020). **Insect pollination of crops in Brazil: a guide for farmers, gardeners, politicians and conservationists**. Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Ebook.
- KROLL, T., PRESCHER, M., SMITS, S. H., e SCHMITT, L. (2020). Structure and function of hepatobiliary ATP binding cassette transporters. **Chemical reviews**, 121(9), 5240-5288.
- KUBOTA, M., TSUJI, M., NISHIMOTO, M., WONGCHAWALIT, J., OKUYAMA, M., MORI, H., ... e CHIBA, S. (2004). Localization of α -glucosidases I, II, and III in organs of European honeybees, *Apis mellifera* L., and the origin of α -glucosidase in honey. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 68(11), 2346-2352.
- KUROPATNICKI, A. K., SZKISZKA, E., e KROL, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013(1), 964149.
- KWAPONG, P., AIDOO, K., COMBEY, R., e KARIKARI, A. (2010). Stingless bees. Importance, management and utilization. **A training manual for stingless beekeeping**, 1-72.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227(5259), 680-685.
- LAPECO, A., e GONÇALVES, R. B. (2022). Bayesian and parsimony phylogeny of Augochlora bees (Hymenoptera: Apoidea) based on morphology: insights for their biogeography and natural history. **Arthropod Systematics e Phylogeny**, 80, 99-115.
- LAURSEN, M., GREGERSEN, J. L., YATIME, L., NISSEN, P., e FEDOSOVA, N. U. (2015). Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺, K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112(6), 1755-1760.
- LEE, G., e BAE, H. (2016). Bee venom phospholipase A2: Yesterday's enemy becomes today's friend. **Toxins**, 8(2), 48.
- LEI, J., NOWBAR, S., MARIASH, C. N., e INGBAR, D. H. (2003). Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 285(3), L762-L772.
- LI, M., NISHIMURA, T., TAKEUCHI, Y., HONGU, T., WANG, Y., SHIOHAWA, D., ... e GOTOH, N. (2023). FXYD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell subpopulation with features of drug-tolerant persisters. **The Journal of Clinical Investigation**, 133(22).

- LIMA, P. R. de, e BROCHETTO-BRAGA, M. R. (2003). Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 9, 149-162.
- LINGREL, J. B. (2010). The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na, K-ATPase. **Annual Review of Physiology**, 75(1), 395-412.
- LINGREL, J. B. e KUNTZWEILER, T. (1994). Na⁺, K⁺ -ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, 269(31), 19659-19662.
- LITMAN, J. R. (2019). Under the radar: detection avoidance in brood parasitic bees. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 374(1769), 20180196.
- LUDMAN, S. W., e BOYLE, R. J. (2015). Stinging insect allergy: current perspectives on venom immunotherapy. **Journal of Asthma and Allergy**, 75-86.
- MARTIN, S. J., DILS, V., e BILLEN, J. (2005). Morphology of the Dufour gland within the honey bee sting gland complex. **Apidologie**, 36(4), 543-546.
- MCAFEE, A., METZ, B. N., MILONE, J. P., FOSTER, L. J., e TARPY, D. R. (2022). Drone honey bees are disproportionately sensitive to abiotic stressors despite expressing high levels of stress response proteins. **Communications biology**, 5(1), 141.
- MCDONOUGH, A. A., e FARLEY, R. A. (1993). Regulation of Na, K-ATPase activity. **Current opinion in nephrology and hypertension**, 2(5), 725-734.
- MELO, G. A., e GONÇALVES, R. B. (2005). Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). **Revista Brasileira de Zoologia**, 22, 153-159.
- MEMARIANI, H., e MEMARIANI, M. (2020). Anti-fungal properties and mechanisms of melittin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 104(15), 6513-6526.
- MEMARIANI, H., MEMARIANI, M., MORAVVEJ, H., e SHAHIDI-DADRAS, M. (2020). Melittin: a venom-derived peptide with promising anti-viral properties. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, 39(1), 5-17.
- MENG, X. Y., ZHANG, H. X., MEZEI, M., e CUI, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, 7(2), 146-157.
- MENSE, M., DUNBAR, L. A., BLOSTEIN, R., e CAPLAN, M. J. (2000). Residues of the fourth transmembrane segments of the Na, K-ATPase and the gastric H, K-ATPase contribute to cation selectivity. **Journal of Biological Chemistry**, 275(3), 1749-1756.
- MICHENER, C. D. (2007). **The bees of the world**. 2. Ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press. 972 p.

MICHEZ, D., PATINY, S., e DANFORTH, B. N. (2009). Phylogeny of the bee family Melittidae (Hymenoptera: Anthophila) based on combined molecular and morphological data. **Systematic entomology**, 34(3), 574-597.

MIDDLETON, D. A., HUGHES, E., e ESMANN, M. (2011). The conformation of atp within the na, k-ATPase nucleotide site: a statistically constrained analysis of REDOR solid-state NMR data. **Angewandte Chemie**, 31(123), 7179-7182.

MODANESI, MS. 2012. **Produção de apitoxina por abelhas *Apis mellifera* L. e seu efeito na expressão de genes relacionados ao estresse**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. 43 p

MOISSET, B., e BUCHMANN, S. (2010). **Bee basics: an introduction to our native bees**. USDA, Forest Service.

MOPOSITA, D. M., RODRÍGUEZ, L. M. C., e CRUZ, A. A. (2020). Africanization of Melliferous Bees (*Apis mellifera*. L.) Bibliographic Review. **Agrisost**, 26(2), 1-12.

MORENO, M., e GIRALT, E. (2015). Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan. **Toxins**, 7(4), 1126-1150.

MORONI, F. T., da SILVA, J. J., BORGES-MORONI, R., de MORAIS, J. F., OLIVEIRA, J. C. C. B., e da SILVA FILHO, D. F. (2021). Relação entre acidentes com abelhas (*Apis mellifera* scutellata) e cobertura arbórea nos bairros da cidade de Uberlândia (MG). **Revista Saúde e Meio Ambiente**, 13(01), 50-65.

MORTENSEN, A. N., SMITH, B., ELLIS, J. D. (2019). The social organization of honey bees. ENY-166. Gainesville: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. **EDIS**, 2015(9), 3-3.

MORTH, J. P., PEDERSEN, B. P., TOUSTRUP-JENSEN, M. S., SORENSEN, T. L. M., PETERSEN, J., ANDERSEN, J. P., ... e NISSEN, P. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. **Nature**, 450(7172), 1043-1049.

MORTH, J. P., POULSEN, H., TOUSTRUP-JENSEN, M. S., SCHACK, V. R., EGEBJERG, J., ANDERSEN, J. P., ... e NISSEN, P. (2009). The structure of the Na⁺, K⁺-ATPase and mapping of isoform differences and disease-related mutations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1514), 217-227.

MULHERN, P. (2022). **Exploring bee species: 14 types of bees and bee varieties**. The Best Bees Company. Disponível em: <<https://bestbees.com/2022/03/25/bee-species-types-of-bees/>>. Acesso em: 5 jul. 2023.

MUNIZ, V. I. M. D. S. (2021). **Parâmetros reprodutivos e alimentares da abelha solitária *Epanthidium tigrinum* (Schr.)(Hymenoptera, Megachilidae) para criatório racional**. Dissertação de Mestrado. Fortaleza. 103 p.

MURAO, R., TADAUCHI, O., e MIYANAGA, R. (2017). The bee family Halictidae (Hymenoptera, Apoidea) from Central Asia collected by the Kyushu and Shimane Universities Expeditions. **Biodiversity Data Journal**, (5), e15050.

MURESAN, C. I., DEZMIREAN, D. S., MARC, B. D., SUHAROSCHI, R., POP, O. L., e BUTTSTEDT, A. (2022). Biological properties and activities of major royal jelly proteins and their derived peptides. **Journal of Functional Foods**, 98, 105286.

MURRAY, T. E., KUHLMANN, M., e POTTS, S. G. (2009). Conservation ecology of bees: populations, species and communities. **Apidologie**, 40(3), 211-236.

NASSAR, M. I. (2022). Bee venom: Antitumor activity and its therapeutic applications. In **Bee Products and Their Applications in the Food and Pharmaceutical Industries** (pp. 369-390). Academic Press. 2022. 369-390.

NEUMANN, P., RADLOFF, S. E., MORITZ, R. F., HEPBURN, H. R., e REECE, S. L. (2001). Social parasitism by honeybee workers (*Apis mellifera capensis* Escholtz): host finding and resistance of hybrid host colonies. **Behavioral Ecology**, 12(4), 419-428.

NEVILLE JR, D. M. (1971). Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. **Journal of Biological Chemistry**, 246(20), 6328-6334.

NGUYEN, C. D., e LEE, G. (2021). Neuroprotective activity of melittin—the main component of bee venom—Against oxidative stress induced by A β 25–35 in in vitro and in vivo models. **Antioxidants**, 10(11), 1654.

NISHIMOTO, M., KUBOTA, M., TSUJI, M., MORI, H., KIMURA, A., MATSUI, H., e CHIBA, S. (2001). Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera* L., α -glucosidase III. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 65(7), 1610-1616.

NNYIGIDE, O. S., NNYIGIDE, T. O., LEE, S. G., HYUN, K. (2022). Protein Repair and Analysis Server: A Web Server to Repair PDB Structures, Add missing heavy atoms and hydrogen atoms and assing secondary structures by amide interactions. **J. Chem. Inf. Model.** 62, 4232-4246.

OBRADOVIC, M., SUDAR-MILOVANOVIC, E., GLUVIC, Z., BANJAC, K., RIZZO, M., e ISENOVIC, E. R. (2023). The Na⁺/K⁺-ATPase: A potential therapeutic target in cardiometabolic diseases. **Frontiers in Endocrinology**, 14, 1150171.

OGAWA, H., SHINODA, T., CORNELIUS, F., TOYOSHIMA, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. **Proc Natl Acad Sic U S A**, 106(33), 13742-13747.

OHTA, T., NAGANO, K., e YOSHIDA, M. (1986). The active site structure of Na⁺/K⁺-transporting ATPase: location of the 5'-(p-fluorosulfonyl) benzoyladenosine binding site and soluble peptides released by trypsin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 83(7), 2071-2075.

OU, Y., PAN, C. X., ZUO, J., HOORN, F. A. V. D. (2017). Ouabain affects cell migration via Na, K-ATPase-p130cas and via nucleus-centrosome association. **Plos one**, 12(8), n.p.

OWEN, M. D. (1979). Relationship between age and hyaluronidase activity in the venom of queen and worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Toxicon**, 17(1), 94-98.

PARK, M. J., KIM, B. Y., PARK, H. G., DENG, Y., YOON, H. J., CHOI, Y. S., ... e JIN, B. R. (2019). Major royal jelly protein 2 acts as an antimicrobial agent and antioxidant in royal jelly. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 22(3), 684-689.

PASCHOAL, T. D. S. (2015). **Caracterização bioquímica e funcional de uma Fosfolipase A2 isolada da peçonha de *Bothrops alternatus***. Dissertação de mestrado em biologia celular e estrutural.

PENG, M., HUANG, L., XIE, Z., HUANG, W. H., ASKARI, A. (1996). Partial inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain induces the Ca²⁺-dependent expressions of early-response genes in cardiac myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, 271(17), 10372-10378.

PEREKALIN, D. S., NOVIKOV, V. V., PAVLOV, A. A., IVANOV, I. A., ANISIMOVA, N. Y., KOPYLOV, A. N., ... e KUDINOV, A. R. (2015). Selective ruthenium labeling of the tryptophan residue in the bee venom peptide melittin. **Chemistry—A European Journal**, 21(13), 4923-4925.

PICOLI, T., PETER, C. M., VARGAS, G. D., HUBNER, S. O., LIMA, M. D., e FISCHER, G. (2018). Antiviral and virucidal potential of melittin and apamin against bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhea virus. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38, 595-604.

PICOLI, T., PETER, C. M., ZANI, J. L., WALLER, S. B., LOPES, M. G., BOESCHE, K. N., ... e FISCHER, G. (2017). Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. **Microbial pathogenesis**, 112, 57-62.

PIHAKASKI-MAUNSBACH, K., VORUM, H., HONORÉ, B., TOKONABE, S., FROKIAER, J., GARTY, H., ... e MAUNSBACH, A. B. (2006). Locations, abundances, and possible functions of FXFD ion transport regulators in rat renal medulla. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 291(5), F1033-F1044.

PILOTELLE-BUNNER, A., CORNELIUS, F., SEBBAN, P., KUCHEL, P. W., e CLARKE, R. J. (2009). Mechanism of Mg²⁺ binding in the Na⁺, K⁺-ATPase. **Biophysical journal**, 96(9), 3753-3761.

PIERCE, B. G., HOURAI, Y., e WENG, Z. (2011). Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library. **PloS one**, 6(9), e24657.

PIRKMAJER, S., e CHIBALIN, A. V. (2019). Hormonal regulation of Na⁺-K⁺-ATPase from the evolutionary perspective. **Current topics in membranes**, 83, 315-351.

PRAPHAWILAI, P., KAEWKOD, T., SURINAPROM, S., PANYA, A., DISAYATHANOOWAT, T., e TRAGOOLPUA, Y. (2024). Anti-Herpes Simplex Virus and

Anti-Inflammatory Activities of the Melittin Peptides Derived from *Apis mellifera* and *Apis florea* Venom. **Insects**, 15(2), 109.

PUCCA, M. B., CERNI, F. A., OLIVEIRA, I. S., JENKINS, T. P., ARGEMÍ, L., SORENSEN, C. V., ... e LAUTSEN, A. H. (2019). Bee updated: current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy. **Frontiers in immunology**, 10, 478911.

QUINTO, A. C. (2018). **Hormônio ouabaína tem efeito protetor em células cerebrais. Ciências da Saúde**. Disponível em: <https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-da-saude/hormonio-ouabaina-tem-efeito-protetor-em-celulas-cerebrais/>. Acesso em: 30 jan. 2023

RADY, I., SIDDIQUI, I. A., RADY, M., e MUKHTAR, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. **Cancer letters**, 402, 16-31.

RADKOV, R., KHAROUBI-HESS, S., SCHAER, D., MODYANOV, N. N., GEERING, K., e HORISBERGER, J. D. (2007). Role of homologous ASP334 and GLU319 in human non-gastric H, K-and Na, K-ATPases in cardiac glycoside binding. **Biochemical and biophysical research communications**, 356(1), 142-146.

RAMIREZ-ESQUIVEL, F., e RAVI, S. (2023). Functional anatomy of the worker honeybee stinger (*Apis mellifera*). **Iscience**, 26(7).

RAMOS, J. M. e CARVALHO, N. C. (2007). Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista científica eletrônica de engenharia florestal**, 6(10), n.p.

RATCLIFFE, N. A., MELLO, C. B., GARCIA, E. S., BUTT, T. M., AZAMBUJA, P. (2011). Insect natural products and processes: new treatments for human disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 41(10), 747-769

RATH, A., e DEBER, C. M. (2013). Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical biochemistry**, 434(1), 67-72.

RATNIEKS, F. L. (1995). Evidence for a queen-produced egg-marking pheromone and its use in worker policing in the honey bee. **Journal of Apicultural Research**, 34(1), 31-37.

REYNOLDS, C., PENCHARZ, P., KALYAN, B., SHILUBANE, N., WEBB, P., BYRNE, M. (2021). **Solitary bees. Jozi Bee Hotel Project**. Disponível em: <<https://www.jozibeehotelproject.com/solitary-bees>>. Acesso em: 19 mar. 2024.

RIGHETTI, P. G., STOYANOV, A. V., ZHUKOV, M. Y. (2001). Chapter 13 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), **Journal of Chromatography Library**, Elsevier, 63, 217-274.

ROAT, T. C., NOCELLI, R. C. F., e da CRUZ LANDIM, C. (2006). The venom gland of queens of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae): morphology and secretory cycle. **Micron**, 37(8), 717-723.

ROJCZYK, E., KLAMA-BARYLA, A., ŁABUS, W., WITEMSKA-KUCHARZEWSKA, K., e KUCHARZEWSKI, M. (2020). Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. **Journal of Ethnopharmacology**, 262, 113159.

ROZEN, J. G., e DING, L. (2012). Cleptoparasitic behavior and immatures of the bee melecta duodecimmaculata (Apoidea: Apidae: Melectini) Appendix: Tribal descriptions of the anthophorini and melectini based on their mature larvae. **American Museum Novitates**, 2012(3746), 1-24.

ROZENGURT, E., GELEHRTER, T. D., LEGG, A., e PETTICAN, P. (1981). Melittin stimulates Na entry, Na-K pump activity and DNA synthesis in quiescent cultures of mouse cells. **Cell**, 23(3), 781-788.

RUEPPELL, O., BACHELIER, C., FONDRK, K., PAGE, R. E. J. (2007). Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Experimental gerontology**, 42(10), 1020–1032.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. e SOUZA, P. M. (2019). Apitoxina: Utilização do Veneno da abelha *Apis mellifera*. **Pubvet**, 13(8), 1–7.

SALEH, N. W., e RAMÍREZ, S. R. (2019). Sociality emerges from solitary behaviours and reproductive plasticity in the orchid bee *Euglossa dilemma*. **Proceedings of the Royal Society B**, 286(1906), 20190588.

SANDTNER, W., EGWOLF, B., KHALILI-ARAGHI, F., SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, J. E., ROUX, B., BEZANILLA, F., e HOLMGREN, M. (2011). Ouabain binding site in a functioning Na⁺/K⁺ ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, 286(44), 38177-38183.

SERRINHA, V.; CORREIA, S. D.; MARQUES, G. (2019). Productivity and economic analysis of a new intensive collector in the Portuguese market with implication of open innovation perspective. **Journal of Open Innovation: Technology, Market, and Complexity**, 5(3), 71.

SCHACK, V. R., HOLM, R., e VILSEN, B. (2012). Inhibition of phosphorylation of Na⁺, K⁺-ATPase by mutations causing familial hemiplegic migraine. **Journal of Biological Chemistry**, 287(3), 2191-2202.

SCHÄGGER, H., e VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, 166(2), 368-379.

SCHMIDT, J. O. (1995). Toxinology of venoms from the honeybee genus *Apis*. **Toxicon**, 33(7), 917-927.

SCHUBERT, D., PAPPERT, G., e BOSS, K. (1985). Does dimeric melittin occur in aqueous solutions?. **Biophysical journal**, 48(2), 327-329.

SCHUMACHER, M. J., TVETEN, M. S., e EGEN, N. B. (1994). Rate and quantity of delivery of venom from honeybee stings. **Journal of allergy and clinical immunology**, 93(5), 831-835.

SCHWARZ, M. P., RICHARDS, M. H., e DANFORTH, B. N. (2007). Changing Paradigms in Insect Social Evolution: Insights from Halictine and Allodapine Bees. **Annual Review of Entomology**, 52(1), 127–150.

SCIANI, J. M., MARQUES-PORTO, R., JUNIOR, A. L., de OLIVEIRA-ORSI, R., JUNIOR, R. S. F., BARRAVIEIRA, B., e PIMENTA, D. C. (2010). Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptides**, 31(8), 1473-1479.

SHIM, J. S., e LIU, J. O. (2014). Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. **International journal of biological sciences**, 10(7), 654.

SHINODA, T., OGAWA, H., CORNELIUS, F., e TOYOSHIMA, C. (2009). Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4 Å resolution. **Nature**, 459(7245), 446-450.

SILVA, C. I. D., FONSECA, V. L. I., GROppo, M., BAURMANN, S. G., SARAIVA, A. M., QUEIROZ, E. P., ... e GARÓFALO, C. A. (2014). **Catálogo polínico das plantas usadas por abelhas no campus da USP de Ribeirão Preto**. Repositório USP. 153 p.

SKOU, J. C. e ESMANN, M. (1992). The Na, K-ATPase. **Journal of Bioenergetics and biomembranes**, 24(3), 249-261.

SLESS, T. J., BRANSTETTER, M. G., GILLUNG, J. P., KRICHILSKY, E. A., Tobin, K. B., Straka, J., ... e Danforth, B. N. (2022). Phylogenetic relationships and the evolution of host preferences in the largest clade of brood parasitic bees (Apidae: Nomadinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 166, 107326.

SMITH, D. R. (2020). **Biogeography of honey bees**. **Encyclopedia of Social Insects**. Springer International Publishing.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. (2011). **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley e Sons. 2011.

SON, D. J., LEE, J. W., LEE, Y. H., SONG, H. S., LEE, C. K., HONG, J. T. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology e Therapeutics**, 115(2), 246-270.

SOUZA, E. C. A., MENEZES, C., e FLACH, A. (2021). Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A review of quality control, chemical profile, and biological potential. **Apidologie**, 52, 113-132.

SPILLER, S., e FRIEDRICH, T. (2014). Functional analysis of human Na⁺/K⁺-ATPase familial or sporadic hemiplegic migraine mutations expressed in *Xenopus* oocytes. **World Journal of Biological Chemistry**, 5(2), 240.

STEPHEN, W. P., BOHART, G. E., e TORCHIO, P. F. (1969). **The biology and external morphology of bees with a synopsis of the genera of north-western America**. Oregon. 146 p.

SUNG, S. H. e LEE, G. (2021). Bee venom acupuncture effects on pain and its mechanisms: an updated review. **Toxins**, 13(9), 608-646

SWIATLY-BLASKIEWICZ, A., MRÓWCZYŃKA, L., MATUSZEWSKA, E., LUBAWY, J., URBANSKI, A., KOKOT, Z. J., ROSINSKI, G., MATYSIAK, J. (2020). The Effect of bee venom peptides melittin, tertiapin, and apamin on the human erythrocytes ghosts: a preliminary study. **Metabolites**, 10(5), 191-203.

TERÇAS, A. C. P., VIVI, V. K., MACHADO, C., LEMOS, E. R. S. (2017). Aspectos epidemiológicos dos acidentes por ferroadas de abelha africana. **Journal Health**, 2(1), 58-72.

TERWILLIGER, T. C. e EISENBERG, D. (1981). The structure of melittin II. Interpretation of the structure. **The Journal of Biological Chemistry**, 257(11), 6016-6022.

THAMM, M., REIß, F., SOHL, L., GABEL, M., NOLL, M., e SCHEINER, R. (2023). Solitary Bees Host More Bacteria and Fungi on Their Cuticle than Social Bees. **Microorganisms**, 11(11), 2780.

TOLEDO, L. F. M. D., MOORE, D. C. B. C., CAIXETA, D. M. D. L., SALÚ, M. D. S., FARIAS, C. V. B., e AZEVEDO, Z. M. A. D. (2018). Multiple bee stings, multiple organs involved: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 51(04), 560-562.

TOYOSHIMA, C., KANAI, R., e CORNELIUS, F. (2011). First crystal structures of Na⁺, K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. **Structure**, 19(12), 1732-1738.

UDDIN, M. B., LEE, B. H., NIKAPITIVA, C., KIM, J. H., KIM, T. H., LEE, H. C., ... e KIM, C. J. (2016). Inhibitory effects of bee venom and its components against viruses in vitro and in vivo. **Journal of Microbiology**, 54, 853-866.

VALENTIN, E., GHOMASHCHI, F., GELB, M. H., LAZDUNSKI, M., e LAMBEAU, G. (2000). Novel human secreted phospholipase A2 with homology to the group III bee venom enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, 275(11), 7492-7496.

VARFOLOMEEVA, L. A., KLIMANOVA, E. A., SIDORENKO, S. V., FEDOROV, D. A., e LOPINA, O. D. (2023). Identification of Melittin-Like Proteins with a Molecular Weight of 67 kDa that Interact with Na⁺/K⁺-ATPase. **Molecular Biology**, 57(6), 1070-1076.

WOOD, T. J., PATINY, S., e BOSSERT, S. (2022). An unexpected new genus of panurgine bees (Hymenoptera, Andrenidae) from Europe discovered after phylogenomic analysis. **Journal of Hymenoptera Research**, 89, 183-210.

XU, Y., MARCK, P., HUANG, M., XIE, J. X., WANG, T., SHAPIRO, J. I., ... e XIE, Z. (2021). Biased Effect of Cardiotonic Steroids on Na/K-ATPase-Mediated Signal Transduction. **Molecular Pharmacology**, 99(3), 217-225.

YONEDA, J. S. (2014). **Estudos biofísicos da interação entre a Na, K-ATPase e a subunidade gama, ATP, Na⁺, K⁺, DPPC, DPPE e colesterol**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado em Ciências. 143 p.

ZHANG, H. Q., SUN, C., XU, N., e LIU, W. (2024). The current landscape of the antimicrobial peptide melittin and its therapeutic potential. **Frontiers in Immunology**, 15, 1326033.

ZIDAN, H. A. E. G., MOSTAFA, Z. K., IBRAHIM, M. A., HAGGAG, S. I., DARWISH, D. A., e ELFIKY, A. A. (2018). Venom Composition of Egyptian and Carniolan Honeybee, *Apis mellifera* L. Affected by Collection Methods. Egyptian Academic **Journal of Biological Sciences. A, Entomology**, 11(4), 59-71.

ZOLFAGHARIAN, H., MOHAJERI, M., e BABAIE, M. (2015). Honey bee venom (*Apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time. **Journal of pharmacopuncture**, 18(4), 7.

ANEXO I

Confecção e eficiência do coletor de apitoxina

Para a confecção do coletor de apitoxina, foram utilizados os seguintes materiais: 1 vidro com dimensões de 43x30x \geq 0,3 cm, 1 base de madeira de 40x30x \geq 2 cm, 2 tábuas de madeira de 40x4x1 cm, 1 tábua de madeira de 30x4x1 cm, 2 tábuas de madeira de 20x4x1 cm, 2 tábuas de madeira de 6x5x1 cm, 20 fios de cobre de 36 cm, 2 fios de cobre de 60 cm, 40 parafusos com diâmetro de 2,2 mm e comprimento de 6,5 mm, 8 parafusos com 4 mm de diâmetro e 50 mm de comprimento, 1 bateria de 12 volts e 2 amperes, máquina de solda, material de solda Cobix, alicate e furadeira.

O primeiro passo foi construir uma base para o coletor. O esboço para a construção deste está representado na Figura 30. Primeiramente, foi separado uma tábua de madeira com tamanho correspondente ao vidro (Figura 32A). Os itens “c”, “d” e “e” da Figura 30B correspondem a base utilizada como suporte tanto para o vidro do coletor quanto para os fios de cobre que irão atravessar horizontalmente acima deste. Vale ressaltar que a altura dos suportes irá depender da altura da base e do vidro, de modo que os fios de cobre fiquem sobre o vidro. Foram então utilizados os parafusos 4x50mm para fixar as bases umas nas outras garantindo a sustentação do coletor.

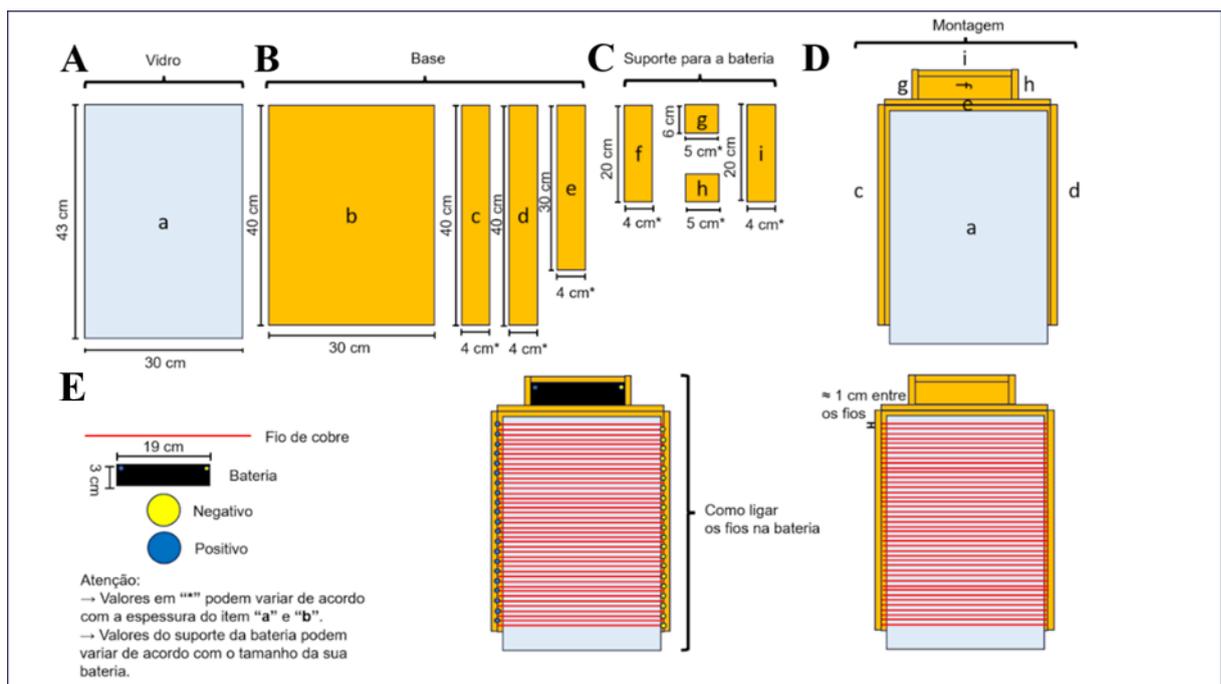
Após a montagem da base (Figura 32A) com uma furadeira e uma broca correspondente ao diâmetro dos fios de cobre, fez-se furos paralelos entre os suportes “c” e “d”. Após isso, inseriu-se o fio de cobre entre os furos e, parafusou-se com parafuso 2,2x6,5mm, esse processo foi repetido até que todos os fios de cobre tenham sido parafusados. Os fios de cobre foram mantidos esticados durante o processo, fazendo-se uso de um alicate. Após a montagem do sistema com os fios de cobre, procedeu-se à montagem do suporte para a bateria, parafusando-o na base (Figura 32C).

A seguir, foi soldado um único fio de cobre que liga o polo negativo aos fios de cobre que terão polo negativo; ou seja, um único fio deve ter apenas um polo da bateria correndo, e

os fios adjacentes, o outro polo. Dessa forma, os fios ficarão em uma ordem de positivo, negativo, positivo, ou o inverso, tendo sempre um fio positivo ao lado de um negativo.

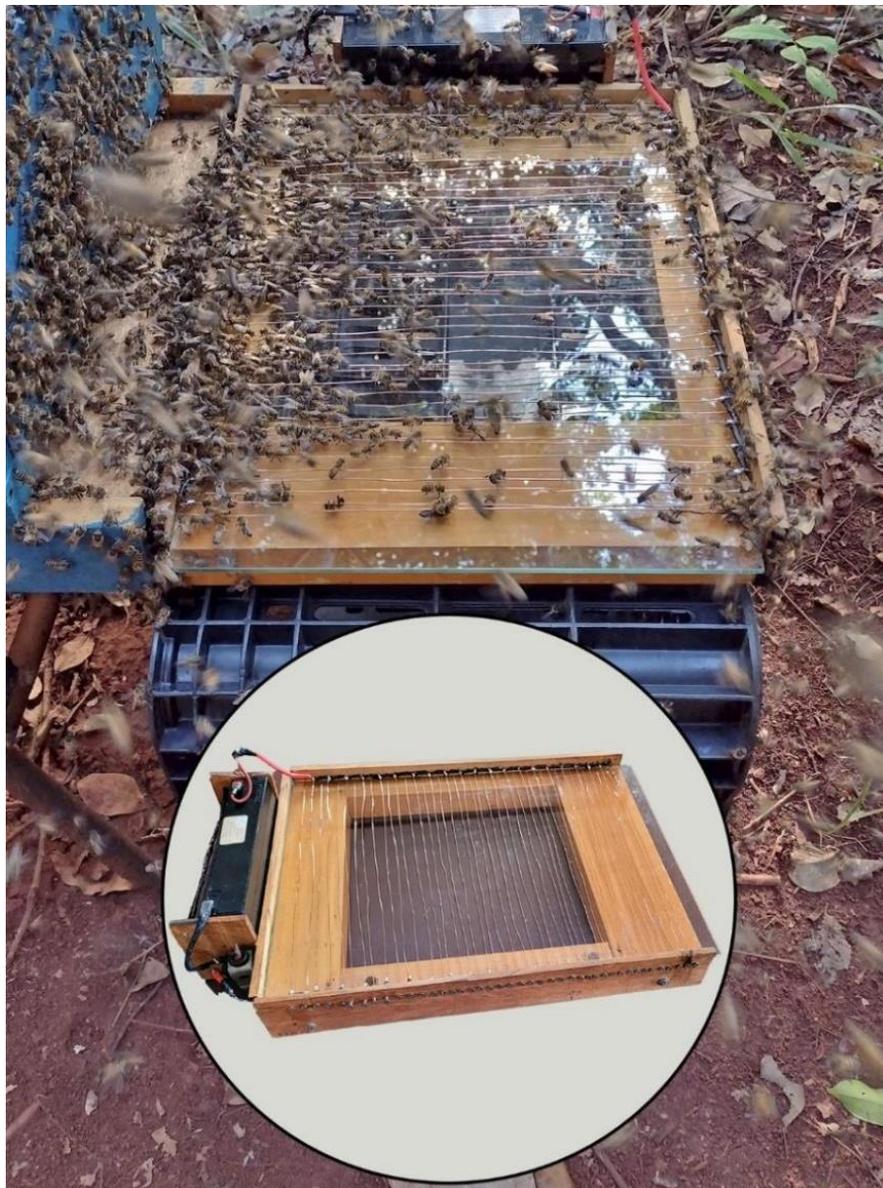
Vale ressaltar que após as últimas adaptações realizadas no coletor e suas respectivas coletas, obteve-se uma média de 20.65 mg de peçonha bruta por coleta (Figura 33).

Figura 32. Esboço para construção do coletor de apitoxina. **A)** O item “a” corresponde ao vidro do coletor, sendo este inserido dentro da base “B”. **B)** Os itens “b”, “c”, “d” e “e” correspondem à base do coletor, sendo estes de plástico ou madeira. **C)** Os itens “f”, “g”, “i” e “h” correspondem à base para a bateria que deve ser anexada na base do coletor. **D)** Corresponde à montagem do coletor. **E)** Coletor de apitoxina montado.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 33. Demonstração do método utilizado para coletar apitoxina assim como o equipamento confeccionado.



ANEXO II**Depósito da patente do coletor de apitoxina**

12/12/2024

870240106075



29409162326099776

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 025998 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica CPF/CNPJ: 15461510000133

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79070-900

País: Brasil Telefone: (67) 3345 7188

Fax:

Email: nit.aginova@ufms.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 12/12/2024 às 14:41, Petição 870240106075

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de DISPOSIÇÃO CONSTRUTIVA APLICADA EM COLETOR DE

Utilidade (54): APITOXINA

Resumo: A presente inovação apresenta um coletor de Apitoxina, construído preferencialmente em vidro e madeira, compreendendo fios de cobre precisamente posicionados e montados ao longo da estrutura, em que os fios de cobre são alimentados por meio de uma bateria e unidos a esta por meio de parafusos.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 12/12/2024 às
14:41, Petição 870240106075

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: MALSON NEILSON DE LUCENA CPF: 07002652605

Nacionalidade: Brasileira Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Cesar Ramos dos Santos, 351, casa 185, Rita Vieira.

Cidade: Campo Grande Estado: MS

CEP: 79052-564 País: BRASIL

Telefone: (67) 981 053484 Fax:

Email: malson.lucena@ufms.br

Inventor 2 de 3

Nome: WALTER MATHEUS SCHNEIDER BLEMA CPF: 00119927195

Nacionalidade: Brasileira Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Marechal Floriano, Vila Bandeirantes, 440 Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79006-840 País: BRASIL

Telefone: (67) 998 321006 Fax:

Email: walterblema@gmail.com

Inventor 3 de 3

Nome: ALYNNE COELHO RIBEIRO CPF: 07169739100

Nacionalidade: Brasileira Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua General Angelo Frulegui da Cunha, 1956 Cidade: Campo Grande

Estado: MS

CEP: 79093-210 País: BRASIL

Telefone: (67) 984 343331 Fax:

Email: alynne.ribeiro@ufms.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
------------	------

Comprovante de pagamento de GRU 200 GRU _comprovante de pagamento.pdf Desenho
Coletor de Apitoxina - Desenhos.pdf
Reivindicação MU - Coletor de Apitoxina - Reivindicações.pdf Relatório Descritivo
MU - Coletor de Apitoxina - Relatório.pdf
Resumo MU - Coletor de Apitoxina - Resumo.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 12/12/2024 às
14:41, Petição 870240106075

Acesso ao Patrimônio Genético

Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 12/12/2024 às 14:41, Petição 870240106075

INSTRUÇÕES:

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

[Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.](#) [Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.](#)

Recibo do Pagador				
BANCO DO BRASIL	001-9	00190.00009 02940.916238 26099.776176 1 9864000007000		
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço				
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL CPF/CNPJ: 15461510000133				
AV COSTA E SILVA S N CIDADE UNIVERSITARIA, CAMPO GRANDE -MS CEP:79070900				
Sacador/Avalista				
Nosso-Número	Nr. Documento	Data de Vencimento	Valor do Documento	(=) Valor Pago
29409162326099776	29409162326099776	09/10/2024	70,00	
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço				
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37				
RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910 2234-				
Agência/Código do Beneficiário			Autenticação Mecânica	
9 / 333028-1				

Recibo do Pagador				
BANCO DO BRASIL	001-9	00190.00009 02940.916238 26099.776176 1 9864000007000		
Local de Pagamento				
PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO				
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ				
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37 10/09/2024				
Data do Documento	Nr. Documento	Espécie DOC	Aceite	Data do Processamento
29409162326099776	29409162326099776	DS	N	10/09/2024
Uso do Banco	Carteira	Espécie	Quantidade	xValor
29409162326099776		RS		
Informações de Responsabilidade do Beneficiário				
A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo.				
Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n o campo Número de Referência na emissão do pagamento.				
Serviço: 200-Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT				
Data de Vencimento				
09/10/2024				
Agência/Código do Beneficiário				
2234-9 / 333028-1				
Nosso-Número				
29409162326099776				
(=) Valor do Documento				
70,00				
(-) Desconto/Abatimento				
(+) Juros/Multa				
(-) Valor Cobrado				
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço				
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL CPF/CNPJ: 15461510000133 AV COSTA E SILVA S N CIDADE UNIVERSITARIA, CAMPO GRANDE-MS CEP:79070900				
Sacador/Avalista				
Código de Baixa				
Autenticação Mecânica - Ficha de Compensação				



SIAFI2024-DOCUMENTO-CONSULTA-CONDOC (CONSULTA DOCUMENTO)
 12/09/24 09:35 USUARIO : EDINA NUNES
 DATA EMISSAO : 12Set24 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2024GR800104
 UG/GESTAO EMITENTE : 154054 / 15269 - FUNDACAO UNIVERS.FED. DE MATO GROSSO D UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU RECOLHEDOR : 154054 GESTAO : 15269
 CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: SET24 VENCIMENTO: 09Out24 DOC. ORIGEM: 154054 / 15269 / 2024NP002098 PROCESSO : 23104.026064/2024 RECURSO : 3
 (=)VALOR DOCUMENTO : 70,00 (-)DESCONTO/ABATIMENTO:
 (-)OUTRAS DEDUCOES : (+)MORA/MULTA :

(+)JUROS/ENCARGOS :

(+)OUTROS ACRESCIMOS :

(=)VALOR TOTAL : 70,00

NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409162326099776

CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9

00360640000 4

OBSERVACAO

PAGAMENTO: DOCUMENTO 2326099776, TAXA DE PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, MODELO D E UTILIDADE, CERTIFICADO DE ADIÇÃO DE INVENÇÃO E ENTRADA NA FASE NACIONAL DO P LANCADO POR : 56897596191 - EDINA NUNES UG : 154054 12Set2024 09:35

PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA

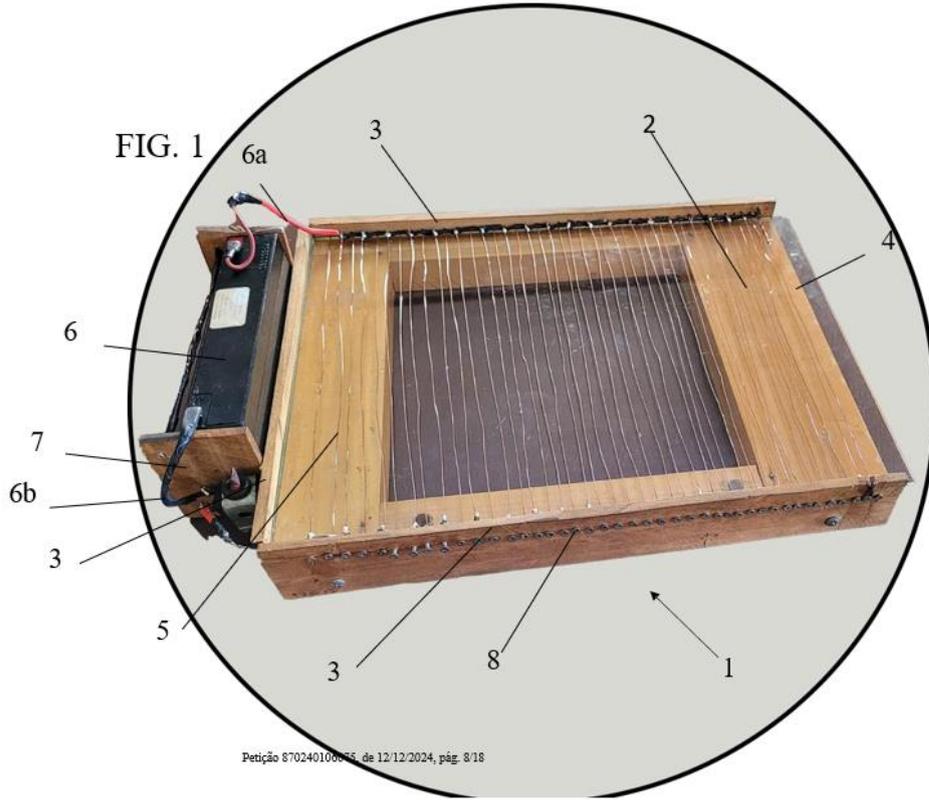


FIG. 2



REIVINDICAÇÕES

1. “DISPOSIÇÃO CONSTRUTIVA APLICADA EM COLETOR DE APITOXINA”, apresentando um coletor (1) de Apitoxina do tipo elétrico, *caracterizado pelo fato de* que o coletor (1) compreende uma estrutura (2) em formato de caixa, construída preferencialmente em material isolante elétrico, mais preferencialmente em madeira, em que a estrutura (2) dispõe de bordas (3) que se estendem para cima em relação a estrutura (2) e são posicionadas nas laterais e na porção inferior da referida estrutura (2); sendo que o coletor (1) compreende também uma placa de vidro (4), disposta sobre a estrutura (2) em formato de caixa, em que a dita placa de vidro (4) possui o mesmo formato da estrutura (2), sendo montada sobre esta, de maneira que encosta nas bordas (3) e se estende para fora da estrutura (2), em que na região de suas bordas (3), apresenta uma série de furações paralelas, as quais recebem um fio condutor (5), preferencialmente construído em cobre, em que ditos fios condutores (5), são dispostos nessas furações, de maneira que fiquem esticados e sensivelmente distantes da placa de vidro (4), sendo que o coletor (1) compreende também, uma bateria (6), alocada em um suporte de bateria (7), em que o dito suporte de bateria (7) se encontra localizado junto a porção inferior da estrutura (2), em que a bateria (6) dispõe de dois cabos elétricos soldados em cada um de seus polos, sendo um cabo elétrico positivo (6a) e um cabo elétrico negativo (6b), sendo que estes cabos elétricos são unidos aos fios condutores (5) de maneira alternada, garantindo uma alternância quanto à polaridade dos referidos fios condutores (5) adjacentes, em que a fixação dos cabos elétricos advindos dos polos da bateria (7) em cada um dos fios condutores (5) é realizada por meio de parafusos (8).

“DISPOSIÇÃO CONSTRUTIVA APLICADA EM COLETOR DE APITOXINA”

CAMPO DE APLICAÇÃO

- [01] A presente inovação está contida no campo técnico das colmeias, mais especificamente no campo dos dispositivos auxiliares, tais quais os dispositivos para coleta de mel e/ou outras substâncias advindas das abelhas.
- [02] Mais precisamente, a presente inovação apresenta uma disposição construtiva aplicada em coletores de Apitoxina, em que o dito coletor apresenta um maior espaço de interação com as abelhas, bem como a utilização de parafusos para a conexão dos fios condutores junto a estrutura do coletor, de maneira que os parafusos, quando energizados, atraem as abelhas para a sua região mais próxima, resultando em um aumento da coleta de Apitoxina.

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

- [03] A Apitoxina é uma substância utilizada pelas próprias abelhas como forma de proteção e defesa da colmeia, por meio de uma comunicação entre as abelhas a partir de feromônios, os quais indicam a localização dos possíveis inimigos.
- [04] A Apitoxina possui cerca de cinquenta componentes já identificados e, além da sua atuação como veneno, também possui efeitos benéficos, tendo sido usada para o tratamento de vários problemas de saúde, tais como eczemas, úlceras tóxicas, infecções, reumatologias, problemas cardiovasculares, pulmonares e ortopédicos, além de atuar na prevenção e inibição de alguns tipos de cânceres e esclerose múltipla.
- [05] Para que a Apitoxina possa ser utilizada sem a necessidade de se submeter a ferroada de uma abelha, alguns métodos de extração foram desenvolvidos, sendo que a utilização de coletores elétricos colocados na entrada da colmeia, possibilita o recolhimento da apitoxina bruta.

- [06] Entretanto, alguns problemas técnicos são encontrados nos processos de coleta de Apitoxina por meio de coletores elétricos, uma vez que o seu princípio de funcionamento submete as abelhas a um elevado estresse, tendo em vista que elas são submetidas a pequenos choques elétricos, os quais contraem a musculatura acessória da glândula de veneno, resultando na liberação de uma quantidade da substância sobre uma placa de vidro, em que a porção volátil evapora e a porção seca pode ser coletada. Esse estresse ao qual as abelhas são submetidas influencia negativamente na quantidade de Apitoxina coletada, bem como as construtividades dos coletores elétricos, também limitam a quantidade de substância coletada.
- [07] Nesse contexto, algumas soluções já foram desenvolvidas e estão presentes no estado da arte, como pode ser observado no documento de patente BR 10 2019 010808-8 – CENTRAL DE COLETA DE APITOXINA, sob titularidade de INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO NORTE, cujo resumo apresenta um central de coleta de Apitoxina composta por um veículo portátil confeccionado em fibra de vidro (FIG. 1), dois pneus de borracha fixados ao chassi. Em seu interior são acomodadas 4 caixas coletoras de Apitoxina desmontadas (5), também são acomodadas 20 placas coletoras, além de 40 lâminas de vidro extras (6). As caixas coletoras descritas acima comportam 5 placas coletoras de Apitoxina e são confeccionadas de madeira, plástico ou fibra de vidro (5) são dotadas com um sistema de engate rápido (FIG. 4) para sua montagem no momento da coleta. As placas coletoras são de dupla face (FIG. 3) permitindo coletar Apitoxina em ambos os lados da lâmina de vidro, são confeccionadas em poliestireno de alto impacto ou acrílico e reforçadas por cantoneiras de alumínio. A placa coletora possui uma malha de aço inox (18) em ambos os lados, entre as malhas é colocada uma lâmina de vidro (20) sobre a qual será depositada a apitoxina. Na extremidade da placa tem um terminal elétrico (21) para estabelecer o contato com os encaixes elétricos das caixas

coletoras. O Gerador de pulsos (FIG. 5) conta com uma bateria recarregável (27), que alimenta o sistema eletrônico. O gerador de pulsos possui um alarme sonoro de detecção de falhas nas placas coletoras. Fixado internamente a caixa coletora há também um carregador de bateria. O painel de controle do gerador de pulsos conta com uma chave (14) que seleciona as funções pulso ou carga, conta ainda com um display indicador de nível de carga da bateria.

[08] Outro documento que versa sobre soluções para o mesmo problema técnico é o documento de patente KR101240291 – DEVICE FOR COLLECTING APITOXIN, sob titularidade de WISSEN CO LTD, cujo resumo descreve um coletor de veneno de abelha para evitar o curto-circuito entre os eletrodos e para manter a distância entre os eletrodos. CONSTITUIÇÃO: Um coletor de veneno de abelha é composto por um corpo principal (210) formado por um suporte na frente e atrás, um membro de eletrodo no qual um eletrodo é montado no suporte e um eletrodo positivo e um eletrodo negativo são dispostos com um intervalo, e que é conectado a uma haste de conexão positiva e uma haste de conexão negativa, e um módulo de controle

(280) que é montado em um lado do corpo principal e fornece energia ao eletrodo ou bloqueia a energia. O módulo de controle inclui uma bateria recarregável e uma placa coletora de luz (281) para fornecer eletricidade à bateria usando a luz solar.

[09] Também é um exemplo de documento que versa sobre soluções para o mesmo problema técnico, o documento KR101003672 – DEVICE FOR COLLECTING APITOXIN, cujo resumo refere-se a um dispositivo para coleta de Apitoxina que torna o movimento e a instalação convenientes, evitando que um fio seja exposto ao exterior de um dispositivo para coleta de Apitoxina. CONSTITUIÇÃO: Um dispositivo para coletar Apitoxina é composto por: um corpo principal (110) no qual um suporte é formado em ambos os lados, onde uma parte do espaço é formada; um membro do eletrodo no qual ambas as extremidades são fixadas em um suporte que atravessa a parte do espaço; uma placa coletora localizada na parte inferior da haste do eletrodo e na qual

ambas as extremidades são fixadas na parte inferior do suporte; uma bateria recarregável capaz de fornecer energia; uma placa de circuito impresso na qual os componentes eletrônicos são montados; e um módulo de controle (180).

[0010] Mesmo com as soluções presentes no estado da técnica, nota-se que o mesmo se beneficiaria do advento de uma disposição aplicada em coletor de Apitoxina que diminua o estresse causado nas abelhas, no momento da coleta, aumentando a quantidade de substância coletada, em que a dita disposição também favoreça uma redução dos custos de produção e uma imediata adaptação para utilização junto às colmeias.

BREVE DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

[0011] A presente inovação tem como objetivo apresentar uma disposição construtiva aplicada em coletor de Apitoxina do tipo elétrico, a qual favorece uma redução nos custos de produção, diminui o estresse causado nas abelhas no momento da coleta de Apitoxina e aumenta a produtividade durante a coleta.

[0012] Para tanto, um objetivo da presente inovação é apresentar uma disposição construtiva aplicada em coletor de Apitoxina compreendendo uma estrutura preferencialmente construída em madeira.

[0013] Outro objetivo da presente inovação é apresentar uma disposição construtiva aplicada em coletor de Apitoxina compreendendo uma placa de vidro montada sobre a estrutura, sendo que a estrutura apresenta bordas que circundam a placa de vidro, ao menos em três partes.

[0014] Também é um objetivo da presente inovação, apresentar uma disposição construtiva aplicada em coletor de Apitoxina compreendendo fios condutores alocados nas bordas da estrutura, de maneira esticada e alimentados eletricamente por uma bateria.

[0015] Por fim, outro objetivo da presente inovação é apresentar uma disposição construtiva aplicada em coletor de Apitoxina em que os fios condutores elétricos são alimentados de maneira alternada quanto a sua polaridade, sendo unidos aos polos da bateria por meio de parafusos que garantem que permaneçam esticados e que exerçam maior interesse nas abelhas, dada a condução de eletricidade por estes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0016] A matéria objeto desta inovação ficará totalmente clara em seus aspectos técnicos a partir da descrição pormenorizada que será feita com base nas figuras abaixo relacionadas, nas quais:

[0017] A FIG. 1 apresenta uma vista em perspectiva da disposição aplicada em um coletor de Apitoxina, compreendendo uma estrutura em material isolante elétrico, placa de vidro, bateria e fios condutores e bateria para alimentação elétrica; e

[0018] A FIG. 2 apresenta uma fotografia quanto a utilização do coletor de Apitoxina em campo, demonstrando que as abelhas demonstram maior interesse nas regiões próximas aos parafusos que realizam a conexão elétrica entre os fios condutores e os polos da bateria;

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INOVAÇÃO

[0019] Em conformidade com os objetivos apresentados por meio da breve descrição, o presente pedido de patente de modelo de utilidade: “DISPOSIÇÃO CONSTRUTIVA APLICADA EM COLETOR

DE APITOXINA”, apresenta um coletor de Apitoxina (1), construído preferencialmente em vidro e madeira, compreendendo fios de cobre precisamente posicionados e montados ao longo da estrutura, em que os fios de cobre são alimentados por meio de uma bateria.

[0020] O coletor de Apitoxina (1) apresenta uma estrutura (2) em formato de caixa, construída preferencialmente em material

isolante elétrico, mais preferencialmente em madeira. A referida estrutura (2) em formato de caixa dispõe de bordas (3), também construídas em material isolante, preferencialmente em madeira, em que as ditas bordas (3) se estendem para cima em relação a estrutura (2) e são posicionadas nas laterais e na porção inferior da referida estrutura (2).

[0021] O coletor de Apitoxina (1) compreende também uma placa de vidro (4), disposta sobre a estrutura (2) em formato de caixa, em que a dita placa de vidro (4) possui o mesmo formato da estrutura (2), sendo montada sobre esta, de maneira que encosta nas bordas (3) e se estende para fora da estrutura (2), facilitando a sua retirada, quando necessário.

[0022] O coletor de Apitoxina (1), na região de suas bordas (3), apresenta uma série de furações paralelas, as quais recebem um fio condutor (5), preferencialmente construído em cobre, em que ditos fios condutores (5), são dispostos nessas furações, de maneira que fiquem esticados e sensivelmente distantes da placa de vidro (4).

[0023] O coletor de Apitoxina (1) compreende também, uma bateria de 12V e 2A (6), alocada em um suporte de bateria (7), em que o dito suporte de bateria (7) se encontra localizado junto a porção inferior da estrutura (2), sendo este também construído em material isolante, preferencialmente madeira.

[0024] A bateria (6) dispõe de dois cabos elétricos soldados em cada um de seus polos, sendo um cabo elétrico positivo (6a) e um cabo elétrico negativo (6b), sendo que estes cabos elétricos são unidos aos fios condutores (5) de maneira alternada, garantindo uma alternância quanto à polaridade dos referidos fios condutores (5) adjacentes.

[0025] A fixação dos cabos elétricos advindos dos polos da bateria (6) em cada um dos fios condutores (5) é realizada por meio de parafusos (8). Esses parafusos (8) garantem que os fios condutores (5) fiquem sempre esticados e também funcionam como um fator de interesse para as

abelhas, uma vez que a corrente conduzida por meio desses parafusos (8) incomoda as abelhas que estão na porta da colmeia, como pode ser observado por meio da FIG. 2, resultando em uma tentativa de defesa por parte delas, garantindo que mais abelhas se interessem pelo coletor (1), diminuindo o estresse decorrente da coleta da Apitoxina.

[0026] Em experimentos realizados com o coletor (1), foram realizadas diversas coletas de Apitoxina, sendo que as coletas foram realizadas por cerca de 40 minutos e resultaram em uma média de 36,4 mg de Apitoxina, comprovando que a disposição construtiva aplicada no coletor (1) possibilita melhores resultados frente aos coletores do estado da técnica.

[0027] Deve ficar entendido que a presente descrição não limita a aplicação aos detalhes aqui descritos e que a invenção é capaz de outras modalidades e de ser praticada ou executada em uma variedade de modos, dentro do escopo das reivindicações. Embora tenham sido usados termos específicos, tais termos devem ser interpretados em sentido genérico e descritivo, e não com o propósito de limitação.

RESUMO

DISPOSIÇÃO CONSTRUTIVA APLICADA EM COLETOR DE APITOXINA

A presente inovação apresenta um coletor de Apitoxina, construído preferencialmente em vidro e madeira, compreendendo fios de cobre precisamente posicionados e montados ao longo da estrutura, em que os fios de cobre são alimentados por meio de uma bateria e unidos a esta por meio de parafusos

SisGen

ANEXO III



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A6D6C06

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A6D6C06**
 Usuário: **UFMS**
 CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Apis mellifera

Título da Atividade: **ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA DE APIS MELLIFERA DO MATO GROSSO DO SUL E OS EFEITOS CINÉTICOS DA MELITINA NA ATIVIDADE DA ENZIMA NA,K-ATPASE**

Equipe

MALSON NEILSON DE LUCENA	UFMS
Walter Matheus	UFMS
Alyne Coelho Ribeiro	UFMS
JÉSSICA DE MORAES CARRETONE	UFMS
Frederico Nakasone Ferreira	UFMS
Rodrigo Zaluski	UFMS

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Anais da 53rd Annual Meeting of the Braz**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Análise da atividade enzimática da fosfoli**

Requerimento de propriedade intelectual

Órgão no qual foi requerido: **INPI**

Código do requerimento: **BR10202402599**

Número da patente: **12/12/20024**

Data do Cadastro: **05/02/2025 11:00:25**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **14:48** de **07/03/2025**.

