**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

DANIEL MACEDO DE MELO JORGE

Busca de inibidores naturais contra o veneno de *Apis mellifera*

**Ribeirão Preto - SP
2008**

DANIEL MACEDO DE MELO JORGE

Busca de inibidores naturais contra o veneno de *Apis mellifera*

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Genética.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Giuliatti

Ribeirão Preto - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Jorge, Daniel Macedo de Melo

Busca de inibidores naturais contra o veneno de *Apis mellifera*, São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

p. 142 : il. ; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética.

Orientador: Giuliatti, Silvana.

1. *Apis*. 2. banco de dados. 3. Fosfolipase. 4. Melitina. 5. Docking. 6. Antiveneno.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Macedo de Melo Jorge

Busca de inibidores naturais contra o veneno de *Apis mellifera*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, Luquesio Petrola de Melo Jorge e
Katia Macedo de Melo Jorge,
pela educação, apoio, dedicação e contribuição,
sempre presentes de forma decisiva
em simplesmente todos os momentos.*

Aos meus irmãos, Karina e Felipe, pelo apoio e carinho.

*Ao meu grande amor Luiza por toda a ajuda, apoio,
carinho, que sem seu auxílio seria impossível
realizar o trabalho, sempre presente em todos os momentos,
me apoiando ou simplesmente estando perto,
isso fez toda a diferença nos momentos mais difíceis,
te admiro e sempre serei grato a você e
te quero sempre ao meu lado. Muito obrigado por tudo*

Amo vocês!!!

Agradecimentos

Primeiramente a DEUS, por tudo!

Em especial a Profa. Dra. Silvana Giuliatti, pela orientação, grande paciência, companheirismo, apoio e por ter me proporcionado as condições para desenvolver esse trabalho;

Aos membros da banca examinadora da minha dissertação pela atenção, discussão e sugestões que enriqueceram este trabalho;

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares pela orientação, pelo apoio e por permitir a realização dos experimentos em seu laboratório;

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva pelo apoio e por permitir a realização das análises em seu laboratório;

Ao CNPq pela concessão bolsa de mestrado, e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro, sem os quais seria impossível a realização desta pesquisa;

Ao Clayton Zambeli Oliveira pela amizade e companheirismo, pelo auxílio, ajuda e apoio durante todos os experimentos no Laboratório de Toxinas Animais e Inibidores Naturais e Sintéticos, sua ajuda foi imprescindível para realização dos experimentos;

Ao Renato David Puga pela amizade, companheirismo, viagens, apoio, suporte, paciência em todas as minhas dúvidas computacionais sua ajuda foi muito importante no desenvolvimento do sistema;

Ao Vinicius Barreto da Silva pela amizade, auxílio, ajuda e apoio durante todos os experimentos no Laboratório de Química Medicinal de Produtos Sintéticos e Naturais, sua ajuda foi essencial para realização das análises na bioinformática estrutural;

Ao Curso de pós-graduação em Genética da FMRP – USP, na pessoa de seus Professores e Funcionários pelos ensinamentos e pela convivência;

Às secretárias da pós-graduação Susie Adriana Penha Nalon e Maria Aparecida Oliveira Silva Elias, pela eficiência, pelo permanente apoio, amizade e orientação durante todo o período do mestrado;

Ao Professor Dr. Ademilson Espencer Egea Soares pela amizade, ajuda, apoio e orientação nas diversas comissões em que participei. Sempre motivando os alunos e apoiando em todas as atividades;

À Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi pela amizade, ajuda e apoio em todas as atividades realizadas no departamento;

À Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo pela amizade e apoio;

Ao Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz pela amizade, apoio e orientação durante o estagio PAE;

Ao grande amigo Andre Breve pelo apoio, conversas, amizade, companheirismo, sempre presente, um amigo para todos os momentos;

Ao Luciano Bernardes um grande amigo sempre sério, mas sabe ser engraçado e divertido nos momentos adequados;

Aos amigos de laboratório que fazem parte do grupo de Bioinformática: Gabi, Gustavo, Pablo, Saulo, Vitor, Mariana, Alynne e as outras pessoas que já passaram pelo nosso laboratório;

À grande amiga Ana Claudia Teixeira por toda amizade, conversas, discussões, brincadeiras, mas sempre apoiando e ajudando presente em todos os momentos, uma amiga muito importante e companheira de mestrado;

À amiga Aline Poersch pela amizade, conversas, apoio e todas as risadas e momentos de descontração;

Aos amigos Cristiano Profeta e Raquel Alves por toda a amizade, conversas e companheirismo;

Aos grandes colegas do Bloco G: Ana Paula, Paulo Roberto, Igor Magela, Stephano Spanó, Patrícia Carminati, Danilo Jordão, Douglas Oliveira, Maria Sol, Giovana da Silva, Danillo Lucas, Paula Lumy, Leonardo Pereira, Junior e Sueli;

A todos os colegas do Laboratório de Toxinas Animais e Inibidores Naturais e Sintéticos;

A todos os colegas do Laboratório de Química Medicinal de Produtos Sintéticos e Naturais;

Aos meus grandes amigos de Fortaleza, que apesar da distância continuam ser grandes amigos: Joel, Luciana, Igor, Davi, Carlos Eduardo e tantos outros que sempre fizeram parte da minha vida;

Aos grandes colegas Virologistas: Alberto, Liz, Juliana, Vanessa, Glauciane, Viviane, Alessandra; Dani, Emiliana, Keny, Kleber, Maira, Mariana, Rafael, Teresa, Paula e Camila

O meu muito obrigado!

" Cada segundo é tempo para mudar tudo para sempre."

Charles Chaplin

RESUMO

JORGE, D. M.M. **Busca de inibidores naturais contra o veneno de *Apis mellifera***. 2008. 142 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Os insetos são os mais numerosos animais encontrados no mundo, com mais de 675 mil espécies conhecidas. Pertencentes à ordem Hymenoptera, da superfamília Apoidea, as abelhas são encontradas distribuídas em aproximadamente 20 mil espécies. No Brasil estima-se que existam 1.700 espécies. Uma das principais espécies é a *Apis mellifera*, com ocorrência cosmopolita. A *Apis mellifera*, popularmente conhecida como abelha africanizada, é agressiva, enxameia várias vezes ao ano e utiliza uma grande variedade de locais para nidificar. Esse comportamento aumenta o contato direto entre o inseto e a população, aumentando o número de acidentes. Os acidentes com abelhas representam um problema de saúde pública em diversos países do mundo pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam. O presente estudo propõe a busca por inibidores naturais contra o veneno de abelhas. Um sistema e uma base de dados foram desenvolvidos para a integração entre dados de plantas medicinais antivenenos e os venenos de abelhas. As atividades anti-hemorrágica, anti-proteolítica, anti-miotóxica, anti-fosfolipase e anti-edema de plantas medicinais antiveneno foram analisadas por meio de ensaios farmacológicos. As possíveis interações entre as toxinas Melitina e Fosfolipase A2 com inibidores foram avaliadas, através do *docking* virtual. O banco de dados, denominado *Bee Venom*, foi implementado e os dados de bancos de dados públicos foram inseridos no sistema. O sistema foi liberado para acesso público no endereço eletrônico <http://gbi.fmrp.usp.br/beevenom/>. Durante a análise da proteína Melitina foram encontradas as regiões da proteína em que os possíveis inibidores devem interagir e identificadas as propriedades químicas que os inibidores devem possuir para interagir corretamente com a Melitina. Nas análises *in silico* foi possível identificar 10 possíveis inibidores que interagiriam corretamente com o sítio ativo da Fosfolipase A2. Algumas espécies do Banco de Germoplasma da FMRP/USP foram obtidas e utilizadas nos experimentos de atividade fosfolipásica indireta e de Edema, sendo possível observar inibição do veneno total e da proteína Fosfolipase A2. Os compostos sintéticos e inibidores avaliados não causaram inibição em todos os experimentos avaliados. Já as plantas obtidas no laboratório de Toxinas Animais e Inibidores Naturais e Sintéticos causaram inibição do veneno total e da proteína Fosfolipase A2.

Palavras chaves: *Apis*, banco de dados, fosfolipase, melitina, *docking*, antiveneno.

ABSTRACT

JORGE, D. M.M. **A search for natural inhibithiros against *Apis mellifera* venom.** 2008. 142 p. Dissertation (Master) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Insects are the most numerous animals worldwide, with more than 675 thousand known species. Belonging to Hymenoptera order, Apoidea, superfamily, bees are found distributed in approximately 20 thousand species. In Brazil there are about 1,700 species. One of the major species is *Apis mellifera*, with cosmopolitan occurrence. *Apis mellifera*, popularly known as Africanized bee, is aggressive, swarm several times per year and uses a great variety of locals to nidificate. This behavior raises the contact between the insect and the population, increasing the accidents numbers. Bee accidents represent a public health problem in many countries because of their frequency and mortality. The present study proposes to search for natural inhibitors of bee venom. A system and a data base have been developed to integrate anti-venom medicinal plants data and bee venoms. Plants activities against venom have been evaluated by farmacological assays, such as anti-hemorrhagic, anti-proteolitic, anti-myotoxicity, anti-Phospholipase and anti-edema. The possible interactions between Melittin and Phospholipase A2 toxins with inhibitors have been evaluated by virtual docking. The data base, denominated *Bee Venom*, was implemented and the data from public data bases have been inserted in the system. The system was released to public access in the following address <http://gbi.fmrp.usp.br/bee venom/>. In Melittin analysis the protein regions which the inhibitors may act have been found and also the chemical properties that the inhibitors must have to interact with Melitina have been identified. During *in silico* analysis it was possible to identify 10 possible inhibitors that interacted well with Phospholipase A2 active site. Some plants species from FMRP/USP Germoplasm Bank have been obtained and used in the indirect Phospholipase activity and edema, being possible to observe inhibitions of total venom and Phospholipase A2 protein. The synthetic compounds and inhibitors evaluated did not cause inhibition in any experiments. However, the plants obtained on Animals Toxins and Natural and synthetic Inhibitors laboratory have caused inhibition of total venom and Phospholipase A2 protein.

Key words: *Apis*, data bases, Melittin, Phospholipase docking, anti-venom.

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	01
1.1 – Abelhas	02
1.2 – Acidentes com abelhas no Brasil e no mundo	03
1.3 – Sintomatologia no acidente com abelhas	09
1.4 – Veneno	12
1.4.1 – Os fatores farmacológicos	14
1.5 – Plantas medicinais	15
1.5.1 – Plantas medicinais antiveneno	17
1.5.2 – Banco de germoplasma de plantas	20
1.6 – Bioinformática	21
1.6.1 – Banco de dados de toxinas	22
1.6.2 – Sistemas de Gerenciamento de Conteúdo (CMS)	23
1.6.3 – <i>Docking</i> e <i>Screening</i> Virtual	24
1.6.4 – Determinação dos potenciais de interação molecular fármaco-receptor	26
1.6.5 – Potenciais eletrostáticos moleculares	27
1.6.6 – Campos de interação molecular	28
II - OBJETIVOS	29
III - MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 – Aquisição das seqüências	33
3.2 – Aquisição das estruturas	34
3.3 – Desenvolvimento do Sistema	34
3.3.1 – Criação de conteúdos específicos	35
3.3.2 – Categorização do Banco de Dados	35
3.3.3 – Banco de Dados	36
3.3.4 – Política de Segurança	36
3.4 – Modelagem do Sistema	37
3.4.1 – Escopo	37
3.4.2 – Cadastrar usuários	38
3.4.3 – Criar tipo de conteúdo	38
3.4.4 – Cadastrar categorias, termos e campos	39
3.4.5 – Cadastrar tipos de conteúdos	39
3.4.5.1. – Enviar dados de plantas (antiveneno)	39
3.4.5.2. – Enviar dados de proteínas de venenos de abelhas	40
3.4.5.3. – Enviar estruturas de proteínas de veneno de abelhas	40
3.4.5.4. – Enviar dados de referências de venenos de abelhas	41
3.4.5.5. – Enviar dados de experimentos laboratoriais de venenos de abelhas	41
3.4.6 – Visualizar conteúdo	41
3.4.7 – Diagramas de UML	41
3.4.7.1. – Visão global dos atores e use-cases	42
3.4.7.2. – Diagrama de Colaboração	43
3.5 – Docking Virtual	53

3.5.1 – Simulações de <i>screening</i> virtual.....	54
3.5.2 – <i>Almond</i>	55
3.5.3 – <i>Q-Site Finder</i>	54
3.6 – Ensaio laboratoriais.....	55
3.6.1 – Obtenção do veneno.....	55
3.6.2 – Extratos Vegetais das Plantas do Banco de Germoplasma da USP/RP	56
3.6.2.1. – Coleta dos vegetais.....	56
3.6.2.2. – Preparação dos extratos.....	56
3.6.3 – Atividade Fibrinogenolítica.....	57
3.6.4 – Atividade Miotóxica.....	57
3.6.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	57
3.6.6 – Estudos de Inibição das Atividades Biológicas e Enzimáticas.....	58
3.6.7 – Atividade fosfolipásica.....	59
3.6.8 – Edema em camundongos.....	61
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 – Aquisição das seqüências.....	63
4.2 – Aquisição das estruturas proteicas.....	65
4.3 – Desenvolvimento do Sistema.....	66
4.4 – Bioinformática estrutural.....	88
4.4.1 – Melitina.....	88
4.4.2 – <i>Screening</i> Virtual.....	92
4.5 – Ensaio laboratoriais.....	96
4.5.1 – Extratos Vegetais das Plantas do Banco de Germoplasma da USP/RP	96
4.5.1.1. – Coleta dos vegetais.....	96
4.5.1.2. – Preparação dos extratos.....	96
4.5.2 – Atividade Fibrinogenolítica.....	96
4.5.3 – Atividade Miotóxica.....	97
4.5.4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	98
4.5.5 – Interação extratos ou inibidores-venenos.....	98
4.5.6 – Avaliação da atividade fosfolipásica indireta.....	99
4.5.7 – Edema em camundongos.....	114
V - CONCLUSÕES.....	129
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
VII - ANEXOS.....	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A expansão das abelhas africanizadas no Brasil e datas de chegada destas abelhas em outros países da América do Sul. Fonte: (Barraviera, 1999).....	06
Figura 2. Esquema representando o procedimento experimental realizado durante o desenvolvimento do projeto.....	33
Figura 3. Modelo simplificado da interação dos três tipos de usuários com os recursos disponíveis de acordo com a permissão atribuída a cada usuário.....	38
Figura 4. Visão Global dos Atores e Use-cases. Os atores Administrador e Colaborador fazem papel de usuário do sistema interagindo com os eventos que cada um tem permissão de realizar, e o ator Visitante não entra como usuário cadastrado do sistema, porém, pode visualizar os dados públicos.....	42
Figura 5. Diagrama de colaboração do Use-case Criar tipo de conteúdo – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Administrador realiza para criar um novo tipo de conteúdo, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....	44
Figura 6. Diagrama de colaboração do Use-case Cadastrar Categorias – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Administrador realiza para criar uma nova categoria, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....	45
Figura 7. Diagrama de colaboração do Use-case Adicionar Termos – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Administrador realiza para adicionar um novo termo em uma categoria, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....	46
Figura 8. Diagrama de colaboração do Enviar dados de plantas com atividade Antiveneno – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de plantas, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....	47
Figura 9. Diagrama de colaboração do Use-case Enviar Dados de Sequências de abelhas – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de animais, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....	48
Figura 10. Diagrama de colaboração de Enviar Dados de Estruturas de Proteínas de veneno de abelha – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de plantas, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....	49
Figura 11. Diagrama de colaboração do Use-case Enviar Dados Laboratoriais – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de animais, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....	50
Figura 12. Diagrama de colaboração Enviar Dados de Referências de Abelhas – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de plantas, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....	

evento.....
.51

Figura 13. Diagrama de colaboração do Use-case Alterar Dados – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Administrador realiza para alterar dados de plantas e venenos de abelhas, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.
.....52

Figura 14. Diagrama de colaboração do Use-case Visualizar Conteúdo – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Visitante realiza para visualizar o conteúdo público do sistema, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.....53

Figura 15. Esquema representando dos ensaios laboratoriais realizados em todo o procedimento experimental, apresentando o fluxo básico.....55

Figura 16. Esquema representando a preparação dos extratos brutos aquoso, metanólico e clorofórmico.....
56

Figura 17. Tela inicial do sistema Bee Venom. a) site para os tipos de visualização do conteúdo. b) visualização do número de dados de seqüências, plantas, referências e de dados laboratoriais cadastrados, c) módulo de busca simples por palavra chave, d) acesso rápido aos diversos tipos de categorias e) site para registro no sistema e login para os usuários colaboradores cadastrados; f) Artigos do Pubmed inseridos no sistema.....67

Figura 18. Tela do site map do projeto Bee Venom. a) Categorias existentes no sistema b) Termo criados nas categorias contendo o número de informações depositadas sobre o termo. c) Termos criados nas categorias contendo informação a respeito das espécies de animais.....68

Figura 19. Tela inicial de formulário de busca dentro do banco de dados do Bee Venom, onde pode ser feita uma busca simples ou uma busca avançada.....68

Figura 20. Visualização do Statistics do sistema, onde é possível visualizar todos os conteúdos. a) Conteúdo do sistema Bee Venom. b) a porcentagem do termo relacionada aos outros da mesma categoria e o número total de ocorrências dele.....69

Figura 21. Visualização do Animal datalist do sistema, permite realizar buscas em todos os conteúdos relacionados às espécies animais. a) Filtro usado para a busca. b) Resultado da busca.....
..70

Figura 22. Tela de visualização do Proteins. Lista das proteínas cadastradas no sistema, sendo divididas em peptídeos (a) e enzimas (b).....71

Figura 23. Tela de visualização da proteína Melitina. É possível observar uma pequena descrição da proteína Melitina (a) e algumas informações a respeito da origem da Melitina (b).....71

Figura 24. Continuação da tela de visualização da proteína Melitina. Destacados os links para as proteínas e estruturas depositadas em seqüências e estruturas dentro do sistema Bee Venom.....72

Figura 25. Tela de visualização das seqüências de proteína depositadas no sistema. As seqüências de proteína foram obtidas no banco de dados públicos do Genbank. a) Filtro para busca de seqüências através da espécie e proteína. b) Tela com resultado de uma busca da proteína Apamina existente no sistema.....72

Figura 26. Tela de visualização da seqüência da proteína Apamina. Todas as informações da proteína obtidas no banco de dados públicos do GenBank. a) Título escolhido durante o depósito da seqüência. b) Tags que foram criadas durante o depósito da seqüência ao sistema que permitem buscas rápidas. c) Informações à respeito da proteína Apamina.....73

Figura 27. Tela de visualização das estruturas de proteínas de veneno. Todas as informações das proteínas foram obtidas no banco de dados público do PDB. a) Filtro para busca de seqüências através da espécie e proteína. b) As estruturas de proteínas depositadas no sistema.74

Figura 28. Tela de visualização da estrutura da proteína Fosfolipase A2. Todas informações, das proteínas foram obtidas no banco de dados público do PDB. a) Título escolhido durante o depósito da estrutura da proteína. b) Tags que foram criadas durante o depósito da estrutura da proteína no sistema que permitem buscas rápidas. c) Informações a respeito da estrutura da proteína Fosfolipase A2.....74

Figura 29. Tela de visualização da estrutura da proteína Fosfolipase A2. Todas as informações das proteínas foram obtidas no banco de dados público do PDB. a) Imagens no formato jpg da proteína Fosfolipase A2 b) Site para visualizar a proteína Fosfolipase A2 com Webmol. c) Imagem no formato jpg do ligante da Fosfolipase A2.....75

Figura 30. Tela de visualização da estrutura da proteína Fosfolipase A2 em imagem 3D através do programa Webmol.....75

Figura 31. Tela de visualização dos dados de plantas com atividade antiveneno. Todas as informações da proteína foram obtidas nos bancos de dados públicos. a) Filtro para busca de plantas através da espécie e família. b) As plantas depositadas no sistema Bee Venom.....76

Figura 32. Tela de visualização dos dados de plantas com atividade antiveneno. Todas as informações das proteínas foram obtidas nos bancos de dados públicos. a) Título escolhido durante o depósito da planta. b) Tags que foram criadas durante o depósito da planta no sistema que permitem buscas rápidas. c) Informações a respeito da planta *Echinodorus ellipticus*.77

Figura 33. Tela de visualização dos dados laboratoriais do sistema Bee Venom.....77

Figura 34. Tela de visualização das Tools do sistema Bee Venom. Em destaque a ferramenta disponível até o momento, que é o clustalw.....78

Figura 35. Tela de visualização dos dados de referências sobre veneno de abelhas. Todas informações da proteína obtidas nos bancos de dados públicos. a) Filtro para busca de referências através do tipo de referência e autores. b) Tela inicial das referências de abelhas.....79

Figura 36. Tela de visualização do Links.....79

Figura 37. Formulário para cadastro de usuários. Informações pessoais e profissionais são obrigatórias para o cadastro, um nome de usuário e e-mail para onde a senha de acesso será enviada.....80

Figura 38. Campos de escrita do cadastro de seqüência de proteína que permitem a categorização da seqüência. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. a) Título da seqüência a ser cadastrada e escolha da categoria de tipo de conteúdo, b) A primeira parte do cadastro da seqüência que está relacionado com as informações sobre as abelhas e vespas. c) Segunda parte do cadastro informações da

seqüência. d) Terceira parte do cadastro que possui o campo de escrita para inserção da seqüência fasta.....82

Figura 39. Campos de escrita do cadastro de plantas com atividade antiveneno que permite a categorização da seqüência. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. a) Título da planta a ser cadastrada e escolha da categoria de tipo de conteúdo, b) A primeira parte do cadastro está relacionado com as informações sobre o planta. c) Segunda parte do cadastro são informações sobre o composto. d) Terceira parte do cadastro que possui campos para submeter imagens do composto e da planta.....83

Figura 40. Campos de escrita do cadastro de estruturas protéicas de veneno de abelhas que permitem a categorização da estrutura. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. Está dividido em quatro partes. a) Título da estrutura a ser cadastrada e inserção dos autores e categorização do tipo de conteúdo, b) A primeira parte do cadastro está relacionada com as informações sobre a proteína, c) A segunda parte do cadastro está relacionada com as informações sobre o animal, d) Terceira parte do cadastro são informações sobre a estrutura, e) Quarta parte do cadastro são informações sobre o ligante.....84

Figura 41. Campos de escrita do cadastro da estrutura da proteína do veneno, sendo possível a submissão de imagens da proteína e do ligante e submissão de arquivos no formato PDB e MOL da proteína e do ligante.....85

Figura 42. Campos de escrita do cadastro de dados laboratoriais de experimentos que permitem a categorização da estrutura. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. Está dividido em três partes. a) Título do experimento a ser cadastrado e inserção dos autores e, categorização do tipo de conteúdo e inserção da instituição onde foram realizados os experimentos, b) Informações a respeito dos experimentos e informações adicionais, c) Campos para envio de arquivos adicionais que sejam relacionados aos experimentos.....86

Figura 43. Campos de escrita do cadastro de referências de veneno de abelhas que permitem a categorização da estrutura. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. Está dividido em três partes. a) Título da estrutura a ser cadastrada e inserção dos autores, categorização do tipo de conteúdo, ano em que foi publicado as referências, linguagem da referência e editora da publicação b) O resumo da referência, c) Informações adicionais com inserção da instituição onde foram realizados os experimentos, inserção da área de estudo e inserção do site para a referência.....87

Figura 44. Resultado obtido do Almond da proteína Melitina, sendo o campo de prova nitrogênio de amida. A região com círculo representa o local do sitio ativo da proteína. As regiões em azul (*) são os locais onde, potencialmente, ocorreriam ligações com amidas. A ocorrência dessa região é na extremidade da proteína.....89

Figura 45. Resultado obtido do Almond da Melitina, sendo o campo de prova hidrofóbico. A região com círculo representa o local do sitio ativo da proteína. As regiões em branco (*) são os sítios onde existem campos de força para interações do tipo pontes de hidrogênio, que estão próximos ao sitio ativo da proteína.....90

Figura 46. Resultado obtido do Almond da Melitina, sendo o campo de prova oxigênio da carbonila. A região com círculo representa o local do sitio ativo da proteína. As regiões em vermelho (*) são os sítios de ligação de hidrogênio que ocorrem na extremidade da proteína.....91

Figura 47. Resultado obtido do site Q-Site Finder da Melitina. A região em marrom representa os locais da proteína que têm sítios de interação com ligantes ou proteínas. Os círculos em vermelho representam os sítios ativos da Melitina. O retângulo preto marca o sitio identificado no sitio ativo..92

Figura 48. Todos os inibidores de Fosfolipase A2 selecionados através do GOLD na base de dados do Ilibdiverse. Os 10 ligantes foram sobrepostos, onde pode-se observar que possuem estruturas similares. Duas formas de visualizar os ligantes sobrepostos em A e em B. As estruturas das proteínas são visualizadas através do programa PYMOL.....93

Figura 49. Todos os inibidores de Fosfolipase A2 selecionados através do software GOLD na base de dados do Ilibdiverse. O número ao lado dos 10 ligantes representa o número do ligante dentro da base de dados do Ilibdiverse.....93

Figura 50. A proteína Fosfolipase A2 interagindo com todos os ligantes selecionados através do software GOLD, sendo visualizadas na forma de linhas (A) e da estrutura secundária (B) no software PYMOL (DeLano, 2002).....95

Figura 51. Resultado do site Q - Site Finder da proteína Fosfolipase A2 sem inibidores e com os sítios de interações possíveis.....95

Figura 52. Avaliação da Fosfolipase A2 e os ligantes através do site Q site-finder, onde foram identificados as regiões da proteína que interagem com outras moléculas. Nessa figura, pode-se observar que todos os inibidores ficaram sobrepostos à região onde ocorre o sítio ativo. Na parte A da figura tem uma visão geral e na parte B um zoom no sítio ativo.....96

Figura 53. Fibrinogênio: 1-Fibri (80µg); 2- Fibri + Apis mellifera (0,5µg); 3- Fibri + Apis mellifera (1µg); 4- Fibri + Apis mellifera (5µg); 5- Fibri + Apis mellifera (10µg); 6- Fibri + Apis mellifera (20µg); 7- Fibri + Apis mellifera (30µg); 8- Fibri + Apis mellifera (50µg).....97

Figura 54. SDS-PAGE: 1- PPM; 2- Apis mellifera (5µg); 3- Apis mellifera (15µg); 4- Apis mellifera (30µg); 5- PLA2 Apis mellifera (0,1µg); 6- PLA2 Apis mellifera (0,5µg); 7-PLA2 Apis mellifera (3µg).....98

Figura 55. Gel SDS-PAGE: Apis mellifera + Casearia Folhas 28 e 29 (teste de degradação de proteínas). SDS-PAGE: 1- Apis mellifera VB (30µg); 2- Apis mellifera + Casearia Folhas 28 e 29 1:1; 3- Apis mellifera + Casearia Folhas 28 e 29 1:5; 4- Apis mellifera + Casearia Folhas 28 e 29 (1:10); 5- Apis mellifera + Casearia Folhas 28 e 29 (1:20).....98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de acidentes com abelhas, mamangavas e vespas no período de 1954 a 1969 Fonte: (Cardoso et al., 2003).....	4
Tabela 2. Incidência*, óbitos e letalidade dos acidentes por Himenópteros (abelhas, vespas e marimbondos) no período de 1993 a 1998 - Estado de São Paulo.....	8
Tabela 3. Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Zona de Ocorrência. Brasil, 2005.....	9
Tabela 4. Número de solicitações recebidas no Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo para retirada de colônias e enxames viajantes nos anos de 1994 a 1997.....	9
Tabela 5. Classificação das reações alérgicas sistêmicas à picada de Himenóptera.....	12
Tabela 6. Lista de todas as espécies que estão sendo preservadas no Banco de Germoplasma da USP/RP. Com seus respectivos nomes científicos, nome vulgar e família.....	21
Tabela 7. Permissão dos três níveis de usuários do sistema.....	37
Tabela 8. Lista das espécies utilizadas, inicialmente, para produção de extratos, com o nome da família a que pertence, nome científico e nome popular das plantas estudadas.....	57
Tabela 9. Experimentos avaliados na atividade fosfolipásica indireta.....	59
Tabela 10. Plantas utilizadas contra veneno total e Fosfolipase A2.....	59
Tabela 11. Plantas avaliadas no teste de edema veneno total e Fosfolipase A2.....	61
Tabela 12. Número total de seqüências separadas por tipo de seqüência e por palavra de busca...63	63
Tabela 13. Número de seqüências separadas por tipo de seqüência e espécie.....	64
Tabela 14. Lista das estruturas encontradas no PDB, separadas por proteína, com nome do depósito, método de obtenção, a espécie, a resolução e a data do depósito.....	65
Tabela 15. Categorias do sistema Bee Venom.....	88
Tabela 16. Resultado obtido do software GOLD na coluna scores e resultados obtidos dos parâmetros da Regra dos Cinco. Em vermelho são apresentados os valores que ultrapassaram o valor limite.....	94
Tabela 17. Plantas utilizadas contra veneno total.....	102
Tabela 18. Plantas avaliadas contra Fosfolipase A2.....	103
Tabela 19. Plantas avaliadas no teste de edema veneno total.....	115

Tabela	20.	Fosfolipase	A2	teste	de
edema.....			116		

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Número de acidentes por abelhas notificados no Brasil entre os anos de 2001 a 2006 pelo SINAM. Fonte: DataSUS.....6
- Gráfico 2.** Número de acidentes por abelhas notificados no Brasil em relação à evolução dos casos entre os anos de 2001 a 2006 pelo SINAM. Fonte: SINAN.....7
- Gráfico 3.** Número de acidentes com animais peçonhentos no Estado de São Paulo no período de 1988 a 2006. Fonte: CVE.....7
- Gráfico 4.** Avaliação da atividade miotóxica do veneno de PLA2. Não foi encontrada atividade miotóxica.....97
- Gráfico 5.** Teste da atividade Fosfolipásica indireta. A: Avaliação para escolha da melhor dose de Veneno Total a ser utilizada durante os ensaios de avaliação da atividade fosfolipásica. B: Avaliação do efeito do pH sobre a atividade do veneno da Apis, demonstrando que o pH não interfere, significativamente, sobre a ação da Fosfolipase A2 C: Avaliação do efeito do EDTA sobre a atividade do veneno da Apis, demonstrando que o EDTA não interfere, significativamente, sobre a ação da Fosfolipase A2.....104
- Gráfico 6.** Teste da atividade Fosfolipásica indireta e avaliação do efeito das plantas sobre a atividade do veneno da Apis. A: Avaliação do efeito dos íons sobre a atividade do veneno da Apis, demonstrando que os íons não interferem, significativamente, sobre a ação da Fosfolipase A2. B: Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade do veneno da Apis, demonstrando que a temperatura não interfere, significativamente, sobre a ação da Fosfolipase A2. C: Avaliação do efeito das plantas coletadas na USP sobre a atividade do veneno da Apis. A Canafistula, Pau-Pereira e Pau-Ferro foram identificados como potenciais inibidores do veneno da Apis.105
- Gráfico 7.** Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre a atividade do veneno da Apis. A: Avaliação do efeito de Mandevilla sobre a atividade do veneno da Apis. Quando se utilizou raízes extraídas em extrato de álcool houve inibição completa do veneno da Apis. B: Avaliação do efeito da Casearia sobre a atividade do veneno da Apis. Com o aumento das concentrações foi possível observar alguma inibição; entretanto, o aumento da concentração pode ser tóxico. C: Avaliação do efeito de diversos extratos de plantas sobre a atividade do veneno da Apis. Somente o precipitado (1:30), ETOH Guaraçonuga, extrato aquoso e acetato apresentaram inibição.....106
- Gráfico 8.** Avaliação do efeito de substâncias sintéticas sobre a atividade do veneno da Apis. A: Avaliação do efeito de extratos de CSF sobre a atividade do veneno da Apis. O CSF 28 e 29, CSF 23 e CSF 25 apresentaram inibição do veneno de Apis. B: Avaliação do efeito de extratos de CSF sobre a atividade do veneno da Apis. O CSF 28 e 29, CSF 23, CSF 25 e CSF 22 apresentaram inibição do veneno de Apis. C: Avaliação do efeito de extratos de CSF sobre a atividade do veneno da Apis. O CSF 28 e 29, CSF 23 e CSF 25 apresentaram inibição do veneno de Apis.....107
- Gráfico 9.** Avaliação do efeito dos extratos de plantas e substâncias sintéticas sobre a atividade do veneno da Apis. A: Avaliação do efeito de extratos de plantas sobre a atividade do veneno da Apis. O Barbatimão, Miconia albicans, Miconia fallax, Eclipta e Tibouchina stenocarpa apresentaram inibição do veneno de Apis. B: Avaliação do efeito de extratos de Sedum dendroideum sobre a atividade do veneno da Apis. Apresentou inibição do veneno de Apis. C: Avaliação do efeito de extratos de AH sobre a atividade do veneno da Apis. Os extratos de AH apresentaram inibição do veneno de Apis.....108

Gráfico 10. Avaliação do efeito de substâncias sintéticas sobre a atividade do veneno da Apis. A: Avaliação do efeito de extratos de CP sobre a atividade do veneno da Apis. O CP 47 apresentou inibição do veneno de Apis. B: Avaliação do efeito de extratos de P sobre a atividade do veneno da Apis. O P2 e P3 apresentaram inibição do veneno de Apis.....109

Gráfico 11. Avaliação do efeito dos extratos de plantas e substâncias sintéticas sobre a atividade da Fosfolipase A2 da Apis. A: Avaliação para escolha da melhor dose de Fosfolipase A2 a ser utilizada durante os ensaios de avaliação da atividade fosfolipásica. B: Avaliação do efeito de extratos do banco de germoplasma sobre a atividade de PLA2 de Apis. A canafistula, cabriúva, amendoim bravo, jatobá, pau-ferro e pau-pereira apresentaram inibição de PLA2 de Apis. C: Avaliação do efeito de extratos de Barbatimão sobre a atividade de PLA2 de Apis. Apresentaram inibição de PLA2 de Apis.....110

Gráfico 12. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre a atividade da Fosfolipase A2 da Apis. A: Avaliação do efeito de extratos de SD2 sobre a atividade de PLA2 de Apis. Apresentaram inibição de PLA2 de Apis. B: Avaliação do efeito de extratos de SD6 sobre a atividade de PLA2 de Apis. Apresentaram inibição de PLA2 de Apis. C: Avaliação do efeito de extratos de Frações isoladas sobre a atividade de PLA2 de Apis. Onde Eclidwl e Ecliwl apresentaram inibição de PLA2 de Apis.....111

Gráfico 13. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre a atividade da Fosfolipase A2 da Apis. A: Avaliação do efeito de extratos de Miconia albicans sobre a atividade de PLA2 de Apis. A Miconia albicans apresentou uma pequena inibição de PLA2 de Apis. B: Avaliação do efeito de extratos de Miconia fallax sobre a atividade de PLA2 de Apis. A Miconia fallax apresentou uma pequena inibição de PLA2 de Apis. C: Avaliação do efeito de extratos de Mandi F RETOH sobre a atividade de PLA2 de Apis. O Mandi F RETOH apresentou inibição de PLA2 de Apis.....112

Gráfico 14. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre a atividade da Fosfolipase A2 da Apis. A: Avaliação do efeito de extratos de Tibouchina stenocarpa sobre a atividade de PLA2 de Apis. A Tibouchina stenocarpa apresentou inibição de PLA2 de Apis. B: Avaliação do efeito de extratos de Anacardium humile sobre a atividade de PLA2 de Apis. O AH (46 – 65) apresentaram inibição de PLA2 de Apis.....113

Gráfico 15. Teste de edema. A: Avaliação dos vários tempos do teste para escolha do tempo adequado para os experimentos com veneno de Apis mellifera. B: Avaliação dos vários tempos do teste para escolha do tempo adequado para os experimentos com veneno total e PLA2, onde foram escolhidos os tempos 15 e 30 minutos. C: Avaliação dos vários tempos do teste para escolha do tempo adequado para os experimentos com PLA2.....117

Gráfico 16. Teste de edema e avaliação do efeito das plantas e substâncias sintéticas sobre o edema. A: Avaliação para verificar se o PBS interferiria no teste para escolha do tempo adequado para os experimentos com veneno total e PLA2. B: Avaliação da atividade de Mandevilla sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. Onde em concentrações maiores apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis. C: Avaliação da atividade de Barbatimão sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. Nas concentrações maiores apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis.....118

Gráfico 17. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema. A: Avaliação da atividade de Casearia sylvestris sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. Em concentrações maiores apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis. B: Avaliação da atividade de Tibouchina stenocarpa sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. Em concentrações maiores apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis. C: Avaliação da atividade de Miconia albicans sobre

o veneno total de Apis para verificar atividade. No tempo inicial causou um maior edema, entretanto no tempo de 30 minutos a maior concentração diminui o edema..... 119

Gráfico 18. Avaliação do efeito dos extratos de plantas e substâncias sintéticas sobre o edema. A: Avaliação da atividade de Eclipta prostata sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis. B: Avaliação da atividade de CSF 28 e 29 sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. No tempo de 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis. C: Avaliação da atividade de Balsamo sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis..... 120

Gráfico 19. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema. A: Avaliação da atividade de AH (46-65) sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. No tempo de 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis. B: Avaliação da atividade de Bauhinia forficata sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. No tempo de 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis. C: Avaliação da atividade de Dwl sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. Na concentração 1:30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis..... 121

Gráfico 20. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema. A: Avaliação da atividade de WL sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis. B: Avaliação da atividade de Canafistula sobre o veneno total de Apis para verificar atividade. No tempo de 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de Apis..... 122

Gráfico 21. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de Mandevila sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. B: Avaliação da atividade de Barbatimão sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. C: Avaliação da atividade de Casearia sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis..... 123

Gráfico 22. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de Miconia fallax sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. No tempo 30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. B: Avaliação da atividade de Eclipta prostata sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. C: Avaliação da atividade de CSF 28 e 29 sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis..... 124

Gráfico 23. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de Balsamo sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. B: Avaliação da atividade de Ah (46-65) sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. No tempo 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. C: Avaliação da atividade de Mandevila sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. No tempo 30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis..... 125

Gráfico 24. Avaliação do efeito dos extratos de plantas e substâncias sintéticas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de Precipitado sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. No tempo 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. B: Avaliação da atividade de SD2 sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. No tempo 30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. C: Avaliação da atividade de DWL sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. No tempo 30, nas

concentrações 1:10 e 1:30, apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis.....126

Gráfico 25. Avaliação do efeito das plantas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de WI sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. No tempo 30, apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. B: Avaliação da atividade de Tibouchina stenocarpa sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis. C: Avaliação da atividade de Miconia albicans sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. No tempo 30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis.....127

Gráfico 26. Avaliação da atividade de Canafistula sobre o PLA2 de Apis para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de Apis.....128

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Abelhas

Os insetos são os mais numerosos animais encontrados no mundo, com mais de 675 mil espécies conhecidas. Pertencentes à ordem Hymenoptera, da superfamília Apoidea, as abelhas são encontradas distribuídas em aproximadamente 20 mil espécies. No Brasil estima-se que existam 1700 espécies. Uma das principais espécies é a *Apis mellifera*, com ocorrência cosmopolita (Silveira; Melo e Almeida, 2002).

O gênero *Apis* apresenta quatro espécies: *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), *Apis florea* (Fabricius, 1787), *Apis dorsata* (Fabricius, 1793) e *Apis cerana* (Fabricius, 1793). Dentre as quatro, a *Apis mellifera* sempre despertou interesse, devido a sua grande importância econômica (Camargo e Stort, 1973; Kato, 1997; D'Ávila e Marchini, 2005) e, sobretudo, pelas novas possibilidades de usos de seus produtos na área médica (Maia, 2002; Costa Neto e Pacheco, 2005).

Como espécie, a *Apis mellifera* apresenta uma grande complexidade, incluindo 24 subespécies diferentes, que podem ser identificadas por análises morfométricas, por sua biogeografia e comportamento, sendo que 14 delas foram confirmadas por meio de estudos de DNA mitocondrial (Ruttner, 1988; Arias e Sheppard, 1996). Esta espécie apresenta ampla distribuição, podendo ser encontrada desde locais de clima temperado frio a zonas tropicais. No entanto, apesar disto e de sua adaptação nas Américas, *Apis mellifera* é uma espécie exótica no Brasil, sendo a *Apis mellifera mellifera* (Linnaeus, 1758) a primeira subespécie a ser introduzida pelos imigrantes alemães. A europeia foi introduzida em 1839 e, posteriormente, em 1956, a espécie africana se difundiu por todo o Brasil (Figura 1). A partir de 1956, deu-se origem a formação da atual raça da *Apis mellifera* brasileira, ocorrendo um processo de africanização. Estudos comprovam que no genoma da *Apis mellifera* existe uma herança genética africana e europeia (Barraviera, 1999).

A *Apis mellifera*, popularmente conhecida como abelha africanizada ou abelha de mel, são mais agressivas, enxameiam várias vezes ao ano e utilizam uma grande variedade de locais para nidificar. Esse comportamento aumenta o número de acidentes. Uma das preocupações com acidentes com abelhas está associada à frequência de enxameações, que ocorrem de três a quatro vezes ao ano (Diniz, 1990), além da existência de uma grande variedade de abrigos em áreas urbanas. Tais abrigos aumentam o contato entre inseto e população. Estes acidentes estão relacionados ao fato das pessoas entrarem em contato com locais próximos onde estão situados os abrigos, atirarem objetos e produtos químicos, tentarem remover ou destruir os abrigos de maneira inadequada (Mello; Silva e Natal, 2003).

Figura 1. A expansão das abelhas africanizadas no Brasil e datas de chegada destas abelhas em outros países da América do Sul. Fonte: (Barraviera, 1999)

Segundo Soares et al. (1994), a abelha africanizada apresenta dois modelos de dispersão. O primeiro enxame reprodutivo ocorre quando existe grande oferta de alimento e população numerosa. Ocorre formação de uma nova rainha e parte das abelhas da colônia voa com a rainha mais velha ao encontro de novo local de nidificação. O segundo modelo, enxame de abandono, ocorre quando existe escassez de alimento, condições climáticas desfavoráveis e ameaça de predação e todas as abelhas deixam a colméia e migram para outro local. O primeiro ocorre entre agosto, setembro e outubro. O segundo é mais significativo entre os meses de março, abril e maio (Soares et al., 1994).

1.2. Acidentes com abelhas no Brasil e no mundo

Os registros sobre a incidência dos acidentes por himenópteros além de serem subnotificados são incompletos. O que se sabe, no entanto, é que os casos fatais provocados por ataques maciços de abelhas têm aumentado desde a década de 60, fato esse atribuído à introdução das abelhas africanas no Brasil em 1956. Rosenfeld (1972) observou, porém, que a partir de 1963, casos fatais provocados por múltiplas picadas de abelhas passaram a ser atendidos no Hospital Vital Brasil, e que o número de atendimentos de picados por abelhas sofreu um aumento significativo nos anos seguintes, mesmo quando comparado aos picados por mamangavas e vespas (Tabela 1)(Rosenfeld, 1972; Cardoso et al., 2003).

Tabela 1. Número de acidentes com abelhas, mamangavas e vespas no período de 1954 a 1969
 Fonte: (Cardoso et al., 2003)

Quadriênios	APIDAE				VESPIDAE		TOTAL
	Abelhas		Mamangavas		Vespas		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
1954-57	12	17,4	16	23,2	41	59,4	69
1985-61	62	27,9	11	4,9	149	67,1	222
1962-65	185++	44,8	18	4,3	210	50,8	413++
1966-69	457+	60,7	23	3,0	273	36,3	753+

O aumento de casos de acidentes com abelhas está relacionado à rápida expansão das abelhas africanizadas no continente americano e ao seu maior grau de agressividade, quando comparadas às espécies européias, anteriormente presentes no Brasil. Estima-se que a letalidade causada por abelhas africanizadas, na América Latina, desde 1957, esteja entre 700 a 1.000 óbitos (Cardoso et al., 2003).

Por outro lado, casos fatais devidos a reações alérgicas anafiláticas desencadeadas por picadas de himenópteros são conhecidos desde a Antigüidade. Inscrições no túmulo do faraó Menes, do Egito, descrevem a sua morte em decorrência da ferroadada de uma vespa em 2.621 a.C. (Cardoso et al., 2003).

Estatísticas americanas documentam aproximadamente 40 óbitos por ano devido à anafilaxia por picada de insetos (Cardoso et al., 2003), podendo ser esse número ainda maior, pois foram encontrados níveis sangüíneos elevados de IgE específica para veneno de himenóptero numa parcela de pacientes que tiveram morte súbita de causa desconhecida. Na Europa, estima-se que esse número seja em torno de 100 óbitos (Cardoso et al., 2003). Estudos epidemiológicos têm apontado uma incidência de 0,15 a 3,3% de reações alérgicas sistêmicas e de 15 a 25% de sensibilização aos diferentes venenos de himenópteros na população geral em diversas partes do mundo (Cardoso et al., 2003).

Desde 1993, as abelhas foram incluídas como “animal agressor” na ficha de investigação de acidentes por animal peçonhento no Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) “Prof. Alexandre Vranjac”, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (Mello et al., 2003). No período compreendido entre 1993 a 1997, o CVE registrou 30.291 notificações de acidentes com animais peçonhentos no Estado de São Paulo. Delas, em média para todo o período, 6,3% ocorreram por causa de himenópteros, dos quais 89,7% eram abelhas africanizadas. Mello et al. (2003), utilizando os relatórios de campo preenchidos após cada atendimento realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo para retirada de colméias e enxames de abelhas africanizadas, fizeram um levantamento dos principais locais de instalação destas abelhas correlacionando com as condições

climáticas. Durante o período de 1994 a 1997 foi constatada a ocorrência de 3.061 solicitações para retirada de colônias (abelhas instaladas no local com presença de favos de mel) e enxames viajantes (aglomerado de abelhas que pousa nos mais diversos locais até encontrar abrigo adequado) (Mello et al., 2003). Os locais mais freqüentes de instalação de colônias em 1997 foram o forro de casas (29,0%) e o interior de paredes (22,5%) refletindo certo grau de sinantropia, mostrando uma adaptação desses insetos às condições impostas pela cidade (poucas áreas verdes e muitas edificações). Os locais de pouso de enxames viajantes foram a árvore (28,2%) e parede externa (22,6%). Houve correlação positiva entre número de solicitações para retirada de colônias e temperatura média nos 4 anos estudados. Segundo Brandeburgo (1986), temperatura e insolação correlacionam-se positivamente tanto com o comportamento agressivo, como com o número de abelhas campeiras (refletindo maior atividade da colônia). As colônias e enxames viajantes também foram encontrados em interiores de caixas, tambores, caixas de luz e relógios de água, mobiliários, postes, caixas d'água, caixas de inspeção de esgoto e porões (Brandeburgo, 1986).

Atualmente no Brasil, o número de acidentes tem aumentado, em parte devido ao aumento de áreas de plantações de cana-de-açúcar. As plantações atraem as abelhas e durante o período de colheita da cana-de-açúcar, ocorrem às queimadas com isso, as colônias enxameiam para regiões urbanas podendo causar acidentes. Na região urbana de Ribeirão Preto ocorre uma maior incidência de enxames nos meses de março, abril, agosto, setembro e outubro.

Outra forma de ocorrência de acidentes existe através de uma prática bastante comum e antiga: a apitoxinoterapia, ou a utilização da peçonha de abelhas (apitoxina) com fins terapêuticos. Vem sendo praticada desde o Antigo Egito e considerada eficaz no tratamento de artroses, artrites, celulites, varizes, bursite, asma e tendinite (Costa Neto et al., 2005). Há cerca de 2.500 anos, Hipócrates já empregava ferroadas de abelha em seus procedimentos terapêuticos. No século II de nossa era, outro médico grego, Galeno, escreveu sobre o tratamento com veneno; Carlos Magno, no século VIII, foi tratado com ferroadas de abelha para combater suas inflamações nas juntas (Maia, 2002). O tratamento muitas vezes consiste na aplicação direta da apitoxina através das ferroadas.

Atualmente, no Brasil, existem diversos bancos de dados relacionados à saúde que monitoram os diversos tipos de ocorrências no Brasil. Entretanto, os dados não possuem valores idênticos, e sim próximos. Esse fato pode ser devido à falta de centralização dos dados em um único sistema. As informações de acidentes com abelhas apresentadas a seguir, foram obtidas de três bases diferentes: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) e o

Sistema de Vigilância Epidemiológica (SVE). As três bases apresentam diferenças em seus resultados pelo fato de serem alimentadas por fontes diferentes e não compartilharem seus dados. Além destas três bases, foram também obtidos dados de acidentes em artigos científicos e livros (Bochner e Struchiner, 2002).

Segundo dados do Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), que estão associados aos dados do Departamento de Informática do SUS (DataSUS), no período de 2001 a 2006, ocorreram 20.861 acidentes com abelhas (Gráfico 1). Deste total, 19.488 apresentaram cura sem seqüelas e 134 apresentaram cura com seqüelas. Entretanto, 61 causaram óbitos no Brasil. Os estados com maior número de óbitos foi Minas Gerais (15 óbitos), seguido por Santa Catarina (9 óbitos) e São Paulo (9 óbitos). No caso de acidentes com cura e com seqüelas, São Paulo (25 casos) foi o estado com maior número de acidentes, seguido por Santa Catarina (25 casos) e Minas Gerais (22 casos).

Gráfico 1. Número de acidentes por abelhas notificados no Brasil entre os anos de 2001 a 2006 pelo SINAM. Fonte: DataSUS

No período de 2001 a 2006, dos 20.861 acidentes com abelhas, 259 foram acidentes graves, 2.251 acidentes moderados e 17.150 leves. Em relação ao número total de notificações de acidentes (20.861 acidentes) o estado em que ocorreu um maior número de acidentes foi São Paulo (7.309 casos), seguido por Santa Catarina (3.164 casos) e Minas Gerais (2.606 casos). Nesse mesmo período, o ano em que ocorreu maior número de notificações e o maior número de casos graves foi 2006, sendo que em 2002 ocorreu o maior número de óbitos e o segundo maior número de casos graves, devido a acidentes de abelhas.

Em relação à classificação final dos casos versus evolução dos casos (Gráfico 2), dos 259 casos graves, 172 apresentaram cura sem seqüelas, 6 curas com seqüelas e 59 óbitos, dentre os casos leves 2 levaram a óbito e 98 curas com seqüelas. Possivelmente, estes valores de óbitos deva-se a casos de pessoas alérgicas ao veneno das abelhas.

Gráfico 2. Número de acidentes por abelhas notificados no Brasil em relação à evolução dos casos entre os anos de 2001 a 2006 pelo SINAM. Fonte: SINAN

A partir da década de 90, o número de acidentes com animais peçonhentos no estado de São Paulo teve um aumento de uma forma geral, demonstrando a grande importância em se estudar venenos de animais na busca de inibidores naturais e sintéticos (Gráfico 3).

Gráfico 3. Número de acidentes com animais peçonhentos no Estado de São Paulo no período de 1988 a 2006. Fonte: CVE

Segundo os dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica (SVE), no estado de São Paulo, no período de 1993 a 1998, houve um aumento do número de casos de acidentes com Himenópteros (abelhas, vespas e marimbondos) (Tabela 2).

Tabela 2. Incidência*, óbitos e letalidade dos acidentes por Himenópteros (abelhas, vespas e marimbondos) no período de 1993 a 1998 - Estado de São Paulo.

ANO	NÚMERO DE CASOS	COEF. DE INCIDÊNCIA	ÓBITO	LETALIDADE
1993	243	0,75	0	0,00
1994	349	1,06	4	1,15
1995	388	1,16	1	0,26
1996	426	1,25	0	0,00
1997	503	1,45	0	0,00
1998	553	1,57	2	0,36
TOTAL	2.462		7	0,28

* Por 100.000 habitantes (Fonte: Divisão de Zoonoses / CVE)

Segundo os dados obtidos através do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas), no período de 1999 a 2005, as regiões do Brasil em que mais aconteceram acidentes com animais peçonhentos e óbitos foram Sudeste e Sul. A base de dados do SINITOX não apresenta de forma individualizada acidentes somente com abelhas, ela considera todos os animais peçonhentos com exceção de aranhas, serpentes e escorpiões. Na base de dados do SINITOX foi possível observar, em relação ao local de ocorrência dos acidentes, que a grande maioria dos acidentes acontecem em área urbana e não rural, demonstrando que as abelhas estão cada vez mais inseridas dentro das cidades aumentando a possibilidade de acidentes (Tabela 3). Esse fato também foi observado por Mello et al (1993). Neste trabalho foi realizado um levantamento de número de solicitações de Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo para retirada de colônias e enxames viajantes nos anos de 1994 a 1997. Foi observado um aumento de solicitações como mostra a tabela 4. As abelhas foram divididas em dois grupos: exames viajantes (identificados como enxames que não tinham colônia formada, isto é, formação de colméia) e colônias (colméias formadas).

Tabela 3. Casos Registrados de Intoxicação Humana por Agente Tóxico e Zona de Ocorrência. Brasil, 2005

Agentes	Zona			T o t a l	
	Rural nº	Urbana nº	Ignorada nº	nº	%
Medicamentos	857	20.299	770	21.926	25,96
Agrotóxicos/Uso Agrícola	2.052	3.252	273	5.577	6,6
Agrotóxicos/Uso Doméstico	167	2.360	63	2.590	3,07
Produtos Veterinários	163	690	24	877	1,04
Raticidas	202	2.929	82	3.213	3,8
Domissanitários	251	6.062	193	6.506	7,7
Cosméticos	17	768	23	808	0,96
Produtos Químicos Industriais	302	4.198	131	4.631	5,48
Metais	39	595	86	720	0,85
Drogas de Abuso	424	1.842	676	2.942	3,48
Plantas	181	1.530	54	1.765	2,09
Alimentos	157	628	48	833	0,99
Animais Peç./Serpentes	3.597	1.154	193	4.944	5,85
Animais Peç./Aranhas	1.089	3.383	189	4.661	5,52
Animais Peç./Escorpiões	898	7.085	225	8.208	9,72
Outros Animais Peç./Venenosos	921	4.457	456	5.834	6,91
Animais não Peçonhentos	1.682	3.272	192	5.146	6,09
Desconhecido	242	1.265	498	2.005	2,37
Outro	113	1.122	35	1.270	1,5
T o t a l	13.354	66.891	4.211	84.456	100
%	15,81	79,2	4,99		100

Fonte: MS / FIOCRUZ / SINITOX

Tabela 4. Número de solicitações recebidas no Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo para retirada de colônias e enxames viajantes nos anos de 1994 a 1997.

Solicitações	1994	1995	1996	1997	Total
Remoção de colônias	338	373	525	754	1.990
Remoção de enxames viajantes	229	193	283	319	1.024
Total	569	571	817	1.104	3.061

1.3. Sintomatologia no acidente com abelhas

Os acidentes causados por picadas de abelhas e vespas apresentam manifestações clínicas distintas, dependendo da sensibilidade do indivíduo ao veneno e do número de picadas. Um acidente com abelhas pode tornar-se mais grave por dois motivos: pelo fato das colônias serem grandes (muitas abelhas) e pelos ferormônios liberados pela abelha após a ferroadada. Estes ferormônios estimulam a agressividade de outras abelhas, indicando onde atacar. Entretanto, o acidente mais freqüente é aquele no qual um indivíduo, não sensibilizado ao veneno, é acometido por poucas picadas.

Nestes casos, o quadro clínico se limita à reação inflamatória local com pápulas eritematosas, dor e calor local. Na maioria das vezes, esta situação é resolvida sem a participação médica (Barraviera, 1999). Devido a esse tipo de tratamento, o número total de acidentes com abelhas, possivelmente, pode estar abaixo do número real de acidentes.

Outra forma de apresentação clínica destes acidentes é aquela na qual o indivíduo, previamente sensibilizado a um ou mais componentes do veneno, manifesta reação de hipersensibilidade imediata. É uma ocorrência grave, podendo ser desencadeada por apenas uma picada e exige a intervenção imediata do médico. O quadro clínico em geral se manifesta por edema de glote e brancopasma acompanhado de choque anafilático (Barraviera, 1999).

A terceira forma de apresentação deste tipo de acidente é a causada por múltiplas picadas. O acidente ocorre quando a pessoa é atacada, geralmente, por um enxame de abelhas do gênero *Apis*, em geral durante o trabalho no campo ou entrando em contato com algum exame na cidade. Neste caso, grande quantidade de veneno é inoculada, devido às múltiplas picadas, em geral centenas ou milhares (Barraviera, 1999). Em decorrência, manifestam-se vários sinais e sintomas devido à ação das diversas frações do veneno. Este tipo de acidente é raro e o quadro clínico apresentado pelo doente é decorrente da ação das diferentes frações do veneno (Habermann, 1972; Hegner; Schummer e Schnepel, 1973). Os doentes acometidos por muitas ferroadas evoluem rapidamente para um quadro clínico grave de insuficiência respiratória e renal aguda (Barraviera, 1999).

Classicamente, as manifestações clínicas decorrentes de picadas por himenópteros são classificadas em reações tóxicas, atribuídas à ação farmacológica dos componentes do veneno, e em reações alérgicas, nas quais mecanismos alérgicos de hipersensibilidade estão envolvidos.

As reações tóxicas podem ser divididas em locais e sistêmicas. As reações tóxicas locais, também chamadas de reações habituais, se caracterizam pela presença de dor, eritema e edema, não muito intensos, que surgem no local da picada e persistem por algumas horas. Geralmente não requerem tratamento, a não ser a aplicação de compressas frias e o uso de analgésicos, além da retirada do ferrão, quando presente. As reações locais extensas devem ser tratadas com o uso de anti-inflamatórios não-hormonais e anti-histamínicos.

As reações tóxicas sistêmicas são decorrentes de múltiplas picadas, em geral, acima de 100 no caso dos acidentes provocados por abelhas. Entretanto, acidentes em crianças com poucas dezenas de picadas, podem apresentar toxicidade sistêmica. Nas reações tóxicas sistêmicas decorrentes de múltiplas picadas, o prognóstico costuma ser grave em

adultos que receberam mais que 500 picadas de abelhas e em crianças, idosos e em portadores de doenças cardiopulmonares que receberam relativamente poucas picadas. O quadro clínico inicia-se com uma intoxicação histamínica caracterizada por sensação de prurido, rubor e calor generalizados, podendo surgir pápulas e placas urticariformes disseminadas pelo corpo. Seguem-se hipotensão, taquicardia, cefaléia, náuseas e/ou vômitos, cólicas abdominais e broncoespasmo. Já que complicações importantes como a hemólise intravascular, rabdomiólise, necrose tubular aguda e colapso respiratório e cardiovascular podem ocorrer, a terapêutica apropriada deve ser instituída o mais precocemente possível. Em pacientes com quadro clínico grave, após um grande número de picadas, a transfusão sangüínea ou a plasmaferese, devem ser consideradas, uma vez que pode haver evolução para choque e insuficiência respiratória aguda. O uso empírico de altas doses de anti-histamínicos e corticosteróides tem-se mostrado benéfico para o combate da intoxicação histamínica e dos efeitos inflamatórios do envenenamento, não sendo estabelecido um tratamento adequado para esses pacientes (Barraviera, 1999).

As reações alérgicas às picadas de abelhas são comuns e, mesmo que raramente, podem levar à morte. Entretanto existe um aumento do risco de sensibilização ao veneno com o envelhecimento (Golden et al., 1989). A alergia aos venenos de Hymenoptera é um fenômeno imunológico. Ela ocorre quando, numa primeira picada, a exposição a determinados alérgenos presentes no veneno induz uma resposta imunológica no indivíduo denominada "sensibilização". Após a sensibilização, o indivíduo permanecerá assintomático até que ocorra uma nova picada. Quando essa ocorre, os alérgenos do veneno reagem com anticorpos específicos induzindo uma resposta inflamatória, responsável pelos sinais e sintomas encontrados na reação alérgica (Cardoso et al., 2003).

As reações alérgicas podem ser divididas em locais e sistêmicas. As reações alérgicas locais são caracterizadas pela formação de um processo inflamatório acentuado nas áreas contíguas ao local da picada, com a formação de edema, geralmente maior que 10cm de diâmetro, que progride por até 48 horas e persiste por alguns dias. Eventualmente, pode ocorrer a formação de uma bolha com conteúdo seroso no local da picada. Nem sempre se pode afirmar que essas reações são mediadas por mecanismos alérgicos ou devidas à ação farmacológica do veneno, com a liberação de mediadores inflamatórios por mecanismos não imunológicos. Entretanto, em muitos pacientes que apresentam esse tipo de reação local extensa, os testes alérgicos cutâneos com extrato de veneno são positivos, sugerindo mecanismo alérgico mediado por IgE (Cardoso et al., 2003).

As reações alérgicas sistêmicas, ou anafiláticas, são classificadas, segundo MUELLER (1966), em quatro graus, levando-se em consideração a intensidade da sintomatologia (Tabela 5).

Tabela 5. Classificação das reações alérgicas sistêmicas à picada de Himenóptera.

Grau	Sintomatologia
I	Urticária generalizada, prurido, mal estar, ansiedade.
II	Um dos sintomas anteriores e dois ou mais dos seguintes: angioedema (isoladamente também define grau II), broncoconstrição leve, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, vertigens.
III	Um dos sintomas anteriores e dois ou mais dos seguintes: dispnéia, sibilos, estridor (isoladamente qualquer um desses três define grau III), disfagia, disartria, rouquidão, fraqueza, confusão mental, sensação de morte iminente.
IV	Um dos sintomas anteriores e dois ou mais dos seguintes: queda da pressão arterial, colapso, perda da consciência, incontinência (urinária, fecal), cianose.

Fonte: (Mueller, 1966)

Esses sintomas surgem em torno de 15 minutos após a picada e há uma tendência de serem mais graves quanto mais precoce for o seu aparecimento. Raramente aparecem horas após o acidente. As reações de graus I e II que incluem angioedema, prurido e urticária, são consideradas sem risco de vida, enquanto que nas reações de graus III e IV, compreendendo edema de glote, crise de broncoespasmo e choque anafilático, ocorre risco de vida. O tratamento das reações alérgicas sistêmicas deve ser abordado de acordo com o grau de gravidade, utilizando-se adrenalina, corticosteróides, anti-histamínicos medidas de suporte cardiorrespiratórias, não diferindo o tratamento daquele recomendado para as reações anafiláticas de outras causas (Cardoso et al., 2003).

A imunoterapia (IT) com extratos de venenos purificados tem-se mostrado altamente eficaz para a maioria dos pacientes alérgicos a venenos de insetos Hymenoptera, na profilaxia e prevenção de reações a picadas subseqüentes. A IT consiste na administração de extratos purificados de venenos, por via subcutânea, em quantidades pequenas e crescentes. Outra forma de tratamento dos acidentes com abelhas é por meio da utilização de plantas com atividade antiveneno.

1.4. Veneno

As glândulas de veneno estão presentes em todos os Himenópteros, excetuando-se os grupos em que a glândula atrofiou (Cruz-Landim e Abdalla, 2002). Entretanto, a composição do veneno é variada entre os diversos tipos de Himenópteros. Na *A. mellifera*, a composição do veneno varia de acordo com a raça (subespécie), fase do desenvolvimento e com os hábitos alimentares (Palma e Brochetto-Braga, 1993). As principais alterações encontradas são variações nas concentrações das proteínas do veneno ao longo das estações do ano, demonstrando uma influência do meio (Abreu, 1996).

No desenvolvimento das abelhas, durante a fase de pupa inicia-se a secreção do veneno e o seu armazenamento, que continua até o 10º ao 15º dia de vida adulta da

operária. Após esse período, a secreção do veneno deixa de ser produzida (Cruz-Landim et al., 2002).

Abreu (1996) encontrou variações no conteúdo protéico do veneno de operárias coletadas em diferentes estações do ano e de um ano para outro, denotando influências do meio sobre a quantidade de proteína na secreção. O veneno produzido pela glândula de veneno de *Apis mellifera* é um líquido transparente, incolor e muito solúvel em água. Possui, aproximadamente, 50 componentes identificados, sendo muitos deles tóxicos para vários animais (Cruz-Landim et al., 2002).

O comportamento de ferroar das abelhas é, geralmente, desencadeado em competição por alimento, na maioria das vezes contra outros artrópodes. A ferroadada injeta o correspondente a, aproximadamente, 0,5 µL de veneno que causa dor e reações anafiláticas em grandes animais. Para os insetos essa dose é, muitas vezes, letal. No momento da ferroadada, o aparelho do ferrão, juntamente com o saco de veneno (reservatório) fica preso à vítima, assegurando que todo o veneno seja injetado. A própria vítima garante o sucesso da injeção do veneno quando tenta remover o ferrão, promovendo, assim, a compressão do reservatório (Cruz-Landim et al., 2002).

Os 0,5 µL de veneno injetados em uma ferroadada contêm aproximadamente 50 µg de matéria seca. As principais proteínas presentes são a Melitina (50% do peso de seco do veneno), Fosfolipase A2 (12% do peso seco), fator degranulador de mastócitos (3% do peso seco), hialuronidase (3% do peso seco) e apamina (2% do peso seco). Além disso, estão presentes numerosas aminas biogênicas, entre elas histamina (1 % do peso seco), dopamina (0,5% do peso seco) e noradrenalina (0,5% do peso seco). Também estão presentes muitos acetatos voláteis que, presumivelmente, estimulam o comportamento agressivo de outras abelhas (Cruz-Landim et al., 2002).

A composição e o modo de ação dos venenos das abelhas melíferas têm sido mais bem estudados a partir da década de 1950 (Cardoso et al., 2003). A toxicidade desses venenos é atribuída a três tipos fundamentais de componentes protéicos: enzimas (Fosfolipases A2 e Hialuronidase), grandes peptídeos (Melitina, Apamina e Peptídeo degranulador de mastócitos - PDM) e pequenas moléculas (Peptídeo e Aminas biogênicas), que possuem atividades alérgicas e farmacológicas. Os fatores alergênicos são enzimas como fosfolipases, hialuronidases, lipases e fosfotases, proteínas antigênicas que inoculadas durante a ferroadada, iniciam respostas imunes responsáveis pela hipersensibilidade de alguns indivíduos e pelo início da reação alérgica.

1.4.1. Os fatores farmacológicos

Os fatores alergênicos presentes no veneno são representados, principalmente, pelas fosfolipases, hialuronidase, lipases e fosfatases, que são as substâncias responsáveis pelo início da reação. A hialuronidase hidrolisa o ácido hialurônico, que faz parte da substância intersticial dos tecidos e cujas propriedades adesivas mantêm as células unidas. A hialuronidase fluidiza o ácido hialurônico, facilitando a difusão dos componentes do veneno através dos espaços intercelulares dos tecidos, sendo conhecido como "fator propagador". A Fosfolipase A2 encontrada no veneno de abelhas é a mais ativa das fosfolipases conhecidas. Seu mecanismo de ação está relacionado à destruição de fosfolípidos de membrana, convertendo-os da forma cilíndrica para a forma cônica, levando à ruptura do arranjo nas membranas, com conseqüente formação de "poros", lise celular e permitindo a entrada do veneno nas células. As lipases e as fosfatases atuam na destruição dos resíduos provenientes das células lisadas (Cardoso et al., 2003; Lima e Brochetto-Braga, 2003).

A Melitina é a toxina mais ativa do veneno de abelhas, possui uma conformação especial, sendo a com menor peso molecular encontrada no veneno de abelhas, contendo apenas 26 aminoácidos. A conformação da molécula de Melitina é tal que esta apresenta uma extremidade hidrofóbica e outra hidrofílica. Em certas condições, quatro moléculas de Melitina unem-se e formam tetrâmeros com as partes hidrofóbicas voltadas para o interior. Nessa forma a Melitina não possui ação lítica e é assim que é estocada no reservatório de veneno. Entretanto, quando diluída, dissocia-se em monômeros que são altamente ativos, incorporando-se as membranas celulares, causando desorganização dos fosfolípidos, podendo levar à lise celular. Tanto as fosfolipases A2 quanto a Melitina são tóxicas quando presentes separadamente, porém seus efeitos são potencializados quando estão associadas, fazendo com que a lise celular ocorra mesmo na presença de baixas concentrações desses componentes. A Melitina e Fosfolipase A2 agem de forma sinérgica sobre fosfolípidos de membranas, resultando no comprometimento da integridade da membrana celular e da membrana mitocondrial, comprometendo a fosforilação oxidativa e a cadeia respiratória, ocasionando dano tecidual. Essa atividade é exercida sobre diversos grupos celulares como hemácias, células musculares, hepatócitos, fibroblastos, mastócitos e leucócitos. A lise de membranas celulares pode levar à liberação de produtos de degradação do ácido araquidônico (Cardoso et al., 2003; Lima et al., 2003).

Outro componente farmacológico importante, contido no veneno, é a apamina. É a menor neurotoxina conhecida, que age nas membranas pós-sinápticas do sistema nervoso central e periférico, bloqueando a transmissão de determinados impulsos inibitórios. Como muitas neurotoxinas potentes presentes nos venenos de cobras, ela liga-se firmemente aos

receptores dos canais de potássio (K^+) que são cálcios (Ca^{2+}) dependentes, alterando as condições de polarização de membrana e a permeabilidade das membranas sinápticas (Cardoso et al., 2003; Lima et al., 2003).

Já o peptídeo degranulador de mastócitos (PDM) é o principal responsável pela liberação de mediadores de mastócitos e basófilos, como a histamina, serotonina, derivados do ácido araquidônico e fatores que atuam sobre plaquetas e eosinófilos. Desempenha, dessa forma, papel no quadro de intoxicação histamínica observada nas fases iniciais do acidente (Cardoso et al., 2003; Lima et al., 2003).

As aminas biogênicas são, em sua maioria, constituintes comuns dos venenos de insetos e ofídios. As informações sobre seus efeitos em insetos são escassas, sabendo-se apenas que algumas atuam como neurotransmissores. A histamina é a amina biogênica mais comum e o seu conteúdo no veneno de *Apis mellifera* está relacionado com a idade da abelha. Seu conteúdo aumenta de zero, logo após a emergência, para 2.000 ng entre 35 e 45 dias de vida. A pequena quantidade de histamina encontrada no veneno tem papel insignificante para explicar seus efeitos no envenenamento, quando comparada com a capacidade de liberação dessa amina bioativa pelo PDM e pela associação da Melitina com a Fosfolipase A2. A histamina ocasiona vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, podendo também, quando em níveis elevados, ativar a liberação de adrenalina, explicando o quadro clínico compatível com intoxicação adrenérgica observado no início do envenenamento. A concentração das catecolaminas também varia com a idade. Outras aminas biogênicas, também encontradas, são serotonina, dopamina e noradrenalina que têm sido identificadas no veneno de abelhas (Cardoso et al., 2003; Lima et al., 2003).

Existem muitos outros peptídeos encontrados no veneno, alguns dos quais já foram identificados tais como secapina, tertiapina e procamina. Muitos deles não são encontrados em todas as amostras de veneno e sua presença pode variar muito, tanto quantitativa como qualitativamente, de acordo com a linhagem e a subespécie de *Apis mellifera* (Palma et al., 1993). São também encontrados aminoácidos livres, carboidratos e constituintes lipídicos provenientes da hemolinfa. Segundo Banks & Shipolini (1986) devem ser considerados como componentes orgânicos, de baixo peso molecular e característicos do veneno, apenas aqueles que não são encontrados também na hemolinfa (Banks e Shipolini, 1986; Lima et al., 2003).

1.5. Plantas medicinais

Grande parte dos medicamentos que estão no mercado origina-se de produtos naturais, em especial, de plantas. Entre as vinte drogas mais vendidas nos EUA em 1988, apenas sete não derivavam diretamente de produtos naturais. Ainda assim, estes

participaram em algum momento da história farmacológica dessas drogas. Naturalmente, o Brasil, com a sua enorme biodiversidade, pode contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de plantas.

O mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta US\$ 320.000.000/ano dos quais, US\$ 20.000.000, são originados de substâncias ativas derivadas de plantas (Robbers; Speedle e Tyler, 1993). As plantas medicinais têm um papel fundamental na saúde mundial, por serem fontes de muitas combinações farmacológicas ativas como flavonóides e taninos. Muitos destes compostos se assemelham a combinações biológicas e esta similaridade é a base da ação fisiológica delas (Robbers et al., 1993).

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica, sejam originados de medicamentos derivados de plantas. Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais avaliadas em suas propriedades medicinais (Garcia et al., 1996).

Sem recursos e tempo para resolver seus problemas de saúde, o Brasil e outros países, com apoio da Organização Mundial de Saúde, começaram a resgatar a medicina popular e nesta as plantas medicinais ressurgiram com força e vigor. Nos últimos anos, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam identificar e obter novos compostos com propriedades terapêuticas (Souza Brito e Souza Brito, 1996).

O uso de plantas medicinais tem sido uma prática consagrada em épocas diversas da história humana, cujo acúmulo de informações, obtido através de experiências de vários povos, representa milênios de história, desde quando os únicos recursos medicamentosos disponíveis eram em grande parte provenientes dos vegetais.

Neste contexto, é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje utilizados, como por exemplo, a morfina (anestésico), a vincristina (antitumoral) e a rutina (vasodilatadora) isoladas de várias espécies de plantas (Cechinel Filho e Yunes, 1998).

As substâncias com atividade de interesse na maioria das vezes estão presentes em quantidades mínimas na planta, dependendo de vários fatores como a variabilidade sazonal e até mesmo o dia e à hora da coleta, estágio de crescimento, o clima e a composição do solo predominantes nas diferentes regiões e também as partes da planta onde são produzidos ou armazenados os compostos de interesse. Algumas substâncias de grande valia para a indústria farmacêutica são obtidas diretamente das plantas, em grande

quantidade, e utilizadas na elaboração de diversos fármacos. No entanto, é necessária a síntese química de medicamentos a partir de seus análogos naturais isolados de plantas em quantidades ínfimas e caracterizados estrutural e farmacologicamente.

1.5.1. Plantas medicinais antiveneno

Os acidentes com animais peçonhentos representam sério problema de saúde pública em diversos países do mundo pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam. Existe uma grande diversidade de animais peçonhentos como serpentes, abelhas, escorpiões e outros animais. Apesar de existir uma grande quantidade de animais peçonhentos, as serpentes são os animais mais estudados em relação a plantas antiveneno. No Brasil, ocorrem em torno de 25.000 acidentes com os mais diversos animais peçonhentos, onde 4.847 foram causados por abelhas e vespas. Dessa forma, as plantas medicinais representam uma importante fonte de obtenção de compostos bioativos capazes de auxiliar diretamente no tratamento do envenenamento ou indiretamente suplementando a sorologia existente atualmente.

O uso de extratos de planta como antídoto para venenos animais é uma antiga opção utilizada em muitas comunidades que não têm um acesso pronto a terapia de soro. Além disso, dependendo do tempo entre o acidente e o tratamento, a habilidade do anti-soro para neutralizar efeitos locais de envenenamento é somente parcial. Extratos vegetais se tornam um material de pesquisa importante, bem como um suplemento alternativo para anti-soro (Rizzini; Mors e Pereira, 1988; Ruppelt et al., 1991; Martz, 1992). Estes extratos podem, futuramente, substituir o tratamento tradicional utilizado em envenenamentos humanos, podendo ser de grande importância para acidentes com animais, uma vez que, o anti-soro não é disponibilizado neste caso.

Centenas de plantas têm sido relatadas com ação antiveneno a nível mundial, mostrando a presença de biomoléculas capazes de neutralizar variados efeitos locais e sistêmicos. Extrato aquoso das raízes de *Mimosa pudica* neutralizou a letalidade e a miotoxicidade induzidas pelo veneno bruto de *Naja Kaouthia* (Mahanta e Mukherjee, 2001), *Musa sp.* mostrou inibição total da atividade fosfolipásica dos venenos de *B. jararacussu* e *C. d. terrificus* e neutralização da atividade hemorrágica do veneno de *B. jararacussu* (Borges et al., 2001), extrato das folhas de *Schizolobium parahyba* mostrou-se inibitório sobre as atividades fosfolipásica, coagulante e hemorrágica do veneno bruto de *B. alternatus* (Mendes et al., 2002), extrato aquoso de *Kalanchoe brasiliensis* mostrou inibição do edema e necrose em cães quando injetados com veneno bruto de *B. alternatus* (Silva Jr. et al., 2002).

Melo et al. (1994; 1999) testaram os efeitos do extrato bruto de *Eclipta prostrata* (Asteraceae) e verificaram a presença de substâncias antiproteolíticas e anti-hemorrágicas e a capacidade da wedelolactona em inibir os efeitos induzidos por venenos crotálicos. Borges et al. (2000; 2001) testaram os efeitos antiofídicos da *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) que demonstrou inibição das atividades fosfolipásica, miotóxica, edematogênica, hemorrágica e proteolítica, induzidas por diferentes venenos de serpentes, miotoxinas e proteases isoladas (Melo et al., 1994; Melo e Ownby, 1999; Borges et al., 2000; Borges et al., 2001).

Mors et al. (2000) citam 104 plantas indicadas pela medicina popular como antiofídicas e ainda as várias classes de compostos relacionados com ação antiofídica, ressaltando a importância de espécies da família Apocynaceae (Mors et al., 2000).

Além das tentativas de se compreender o mecanismo de ação destas toxinas animais, a busca de formas alternativas para o tratamento do envenenamento tornou-se alvo freqüente e importante de diversos pesquisadores. As diferentes isoformas de toxinas de venenos podem ser reconhecidas e inibidas por anticorpos policlonais e/ou monoclonais, e também por algumas moléculas de diversas naturezas, incluindo agentes quelantes, heparina, fatores plasmáticos de origem animal (inclusive das próprias serpentes) e extratos de plantas (Melo et al., 1999; Borges et al., 2000; Borges et al., 2001; Biondo et al., 2003; Biondo et al., 2004). A neutralização da ação dos venenos e suas toxinas são imprescindíveis na busca de tratamentos antiveneno.

Em razão de suas excelentes propriedades medicinais, as plantas vêm sofrendo exploração predatória excessiva nos últimos anos e correm o risco de desaparecerem, antes mesmo que estudos ecológicos e agronômicos pormenorizados sejam efetuados (Vieira, 1992). Portanto, o aumento de pesquisas com plantas medicinais nativas do cerrado brasileiro, mata atlântica e outras regiões típicas, tem grande importância, por tratar-se de estímulo adicional ao estudo das espécies destas regiões, o que contribui com os esforços para a preservação da biodiversidade vegetal.

Outras atividades, também identificadas para as plantas medicinais, são contra diversos tipos de patologias, tais como diabetes (Aritajat; Wutteerapol e Saenphet, 2004; Chhetri; Parajuli e Subba, 2005), diarreia (Agunu et al., 2005), malária (Krettli et al., 2001; Asase et al., 2005; Koch et al., 2005) e câncer (Kimura, 2005). Têm sido usadas também como analgésicos (Almeida; Navarro e Barbosa-Filho, 2001), bactericidas (de Boer et al., 2005; Hersch-Martinez; Leanos-Miranda e Solorzano-Santos, 2005; Kloucek et al., 2005), antivirais (Andrighetti-Frohner et al., 2005), antifúngicos (de Boer et al., 2005), antimicrobianos (de Souza et al., 2004) e antivenenos (Hutt e Houghton, 1998; Lans et al.,

2001; Daduang et al., 2005; Jimenez-Ferrer et al., 2005). A possibilidade de usar plantas antivenenos é de grande importância para a saúde pública e indústria de fármacos.

Outra forma de obter plantas que inibam a atividade de veneno seria com estudos farmacológicos, pois diversas atividades são demonstradas com os extratos e frações de algumas dessas plantas usadas na medicina tradicional como: atividade antiinflamatória, antiviral e antivenenos (Mors et al., 2000; Soares et al., 2004; Soares et al., 2005). O metabolismo das plantas medicinais oferece algum produto ou subproduto que pode ser utilizado de alguma forma pelo homem. Tais produtos têm sido administrados com sucesso em diferentes formas para um grande número de problemas de saúde. Assim como seus benefícios, as contra-indicações também tem sido registradas. Algumas plantas com reputação de antiofídicas na medicina popular, mostraram-se inativas em experimentos clínicos e farmacológicos. Numerosas espécies vegetais da flora brasileira são conhecidas popularmente como antiofídicas, no entanto, poucas espécies foram testadas cientificamente e menos ainda tiveram seus princípios ativos isolados e caracterizados do ponto de vista estrutural e funcional (Mors et al., 2000; Soares et al., 2004; Soares et al., 2005). Sendo assim, a identificação de uma atividade, pode permitir que o composto ou o extrato da planta venha ser avaliado contra o veneno.

O uso popular das plantas medicinais tem crescido nos últimos anos e o mercado mundial de plantas medicinais movimenta cerca de US\$ 500 bilhões anuais (www1.folha.uol.com.br/folha/reuters/ult112u12329.shl). Entretanto, o consumo elevado e a falta no controle de plantio podem levar à extinção de várias espécies de plantas medicinais utilizadas hoje em dia pela população.

O conhecimento etnobotânico-farmacológico é a base para o desenvolvimento de fármacos. Sendo assim, os metabólicos secundários vegetais apresentam um grande valor social e econômico para o país, uma vez que, são usados em grande escala, como por exemplo, para a produção de inseticidas, corantes e medicamentos (www.biotecnologia.com.br/materias/).

Em 2002, o Brasil começou a desenvolver o primeiro banco de dados para mapear a enorme biodiversidade de plantas medicinais existentes no país (cerca de 20% das espécies do planeta), tentando combater o comércio ilegal (www1.folha.uol.com.br/folha/reuters/ult112u12329.shl). “A Organização Mundial da Saúde calcula que, ainda hoje, 80% da população mundial recorra à prática de curar-se por meio de plantas medicinais” (De Lucca, 2004). Atualmente, existem diversos esforços para promover a conservação da biodiversidade existente, permitindo que as plantas possam ser estudadas sem causar a extinção das mesmas. A formação de um banco de germoplasma

seria uma forma de aumentar a conservação e viabilizar diversos tipos de estudos sem afetar a natureza (Barbosa, 2001).

1.5.2. Banco de germoplasma de plantas

Os bancos de germoplasma são importantes ferramentas para conservação da biodiversidade, permitem manter um grande número de espécimes com uma grande diversidade genética (Barbosa, 2001). O banco de germoplasma da USP de Ribeirão Preto possui uma grande diversidade de plantas que estão ameaçadas de extinção. As plantas representadas são plantas pertencentes à mata nativa, que devem ser conservadas. Atualmente, existe um total de 44 espécies (Tabela 6) que são conservadas em viveiros. Dentre as 44 espécies, algumas têm importância econômica e medicinal, devido a esse fato a conservação do banco é essencial. Muitas informações têm sido geradas a partir de experimentos com plantas medicinais. Para análise desses experimentos, são utilizados computadores. Devido a esse fato, houve um grande avanço entre a informática e biologia, e com isto surgiu uma nova área que se denomina bioinformática.

Tabela 6. Lista de todas as espécies que estão sendo preservadas no Banco de Germoplasma da USP/RP. Com seus respectivos nomes científicos, nome vulgar e família.

Família	Nome científico	Nome vulgar	Família	Nome científico	Nome vulgar
Anacardiaceae	<i>Schinus tereventifollius</i>	Aroeira vermelha	Lecythidaceae	<i>Cariniana legalis</i>	Jequitibá rosa
Anacardiaceae	<i>Astronium graveolens</i>	Guaritá	Lythraceae	<i>Lafoensia pacori</i>	Dedaleiro
Apocynaceae	<i>Aspidosperma polyneuron</i>	Peroba-rosa	Melastomataceae	<i>Tibouchina granulosa</i>	Quaresmeira rosa
Araliaceae	<i>Didymopanax morototonii</i>	Morototó ou mandiocão	Meliaceae	<i>Cedrela fissilis</i>	Cedro
Arecaceae	<i>Acrocomia aculeata</i>	Macaúba	Meliaceae	<i>Guarea guidonia</i>	Marinheiro
Arecaceae	<i>Syagrus romanzofiana</i>	Jerivá	Mimosidae	<i>Acacia polyphylla</i>	Monjoleiro
Bignoniaceae	<i>Tabebuia roseo alba</i>	Ipê branco	Mimosidae	<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	Angico vermelho/branco
Bignoniaceae	<i>Tabebuia vellosi</i>	Ipê amarelo	Mimosidae	<i>Enterolobium contorsiliquum</i>	Tamboril
Bombaceae	<i>Chorisia speciosa</i>	Paineira	Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga
Boraginaceae	<i>Cordia trichotoma</i>	Louro-pardo	Papilionoideae	<i>Machaerum villosum</i>	Jacarandá do Mato
Caesalpinioideae	<i>Pterogyne nitens</i>	Amendoim bravo	Papilionoideae	<i>Centrolobium domentosum</i>	Araribá
Caesalpinioideae	<i>Schizolobium parahyba</i>	Guapuruvu	Papilionoideae	<i>Platycamus elegans</i>	Amendoim do campo
Caesalpinioideae	<i>Pelthophorum dubium</i>	Canafistula	Papilionoideae	<i>Platycamus regnelli</i>	Pau-pereira
Caesalpinioideae	<i>Caesalpinia ferrea</i>	Pau-ferro	Papilionoideae	<i>Holocalys balansae</i>	Alecrim de Campinas
Caesalpinioideae	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Óleo de copaíba	Papilionoideae	<i>Myroxylum peruiferum</i>	Cabreuva
Caesalpinioideae	<i>Hymenaea courbaril</i>	Jatobá	Phytolaccaceae	<i>Galesia integrifolia</i>	Pau d'álho
Cecropiaceae	<i>Cecropia pachystachya</i>	Embauba	Rubiaceae	<i>Genipa americana</i>	Genipapo
Euphorbiaceae	<i>Croton floribundus</i>	Capixingui	Rutaceae	<i>Zanthoxylum riedelianum</i>	Mamica de porca
Euphorbiaceae	<i>Croton urucurana</i>	Sangra d'água	Rutaceae	<i>Balfourodendron riedelianum</i>	Pau-marfim
Lauraceae	<i>Nectandra megapotâmica</i>	Canelinha	Rutaceae	<i>Esembeckia leiocarpa</i> Engl.	Guarantã
Lecythidaceae	<i>Cariniana estrellensis</i>	Jequitibá branco	Sterculiaceae	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Mutambo
			Verbenaceae	<i>Aegiphila sellowiana</i>	Tamanqueiro

1.6. Bioinformática

A bioinformática é uma área que tem crescido exponencialmente devido à grande quantidade de dados biológicos gerados e aos grandes avanços da computação, permitindo que ocorra uma interação cada vez maior entre as duas áreas. Suas aplicações são variadas, seja na análise de seqüências, anotação de genomas, modelagem de proteínas, diagnóstico de doenças, desenvolvimento de novos fármacos ou estudos das relações

filogenéticas. Cada nova área exige conhecimentos específicos além da própria biologia e computação, necessitando de pessoas com conhecimentos cada vez mais variados. Devido ao grande volume de dados biológicos torna-se necessário armazená-lo de forma organizada em banco de dados, facilitando assim novas pesquisas.

1.6.1. Banco de dados de toxinas

Animais peçonhentos produzem uma grande variedade de importantes componentes farmacológicos. Os componentes do veneno são utilizados no estudo de canais iônicos e receptores, para a descoberta de medicamentos e formulação de inseticidas. Informações sobre toxinas estão dispersas em bases de dados públicas, que fornecem a sequência estrutural e descrições, porém escassas informações funcionais de anotação. O crescimento exponencial de dados de toxinas recém identificadas criou a necessidade de melhores formas de gerenciamento e armazenamento dos dados. *Veneno-informática* é uma abordagem sistemática da bioinformática, em que são obtidos dados armazenados em repositórios, classificados, organizados e integrados em um novo banco de dados específico que utiliza ferramentas avançadas de bioinformática para análise da estrutura e função de toxinas (Tan; Khan e Brusica, 2003). Dessa forma, o foco da *veneno-informática* é a bioinformática dirigida para a aquisição, manipulação e análise de dados de venenos. Sendo possível encontrar na *internet* alguns bancos de dados específicos sobre venenos, dentre eles podem ser citados: *SCORPION*, *MOLLUSK*, *svPLA2 database*, *Venom* e *BioVenom*. Na área de toxinas de abelhas, atualmente, os bancos de dados se concentram em apresentar tipos de alérgenos. Portanto, torna-se necessário um banco de dados que permita a organização dos dados existentes e também a sua análise. Um banco de dados pode ser considerado uma coleção de dados inter-relacionados, estruturados, projetado para suprir as necessidades de um grupo específico de aplicações e usuários.

Os venenos são fontes de pesquisa na área biológica, e com a existência e acessibilidade aos bancos de dados na *Internet*, pesquisadores de todo o mundo podem acessar informações de forma instantânea, como características biológicas, localização geográfica ou outras características de acordo com os critérios de sua pesquisa (Perez et al., 2001), economizando tempo e recursos. Para controlar o acesso e armazenamento de informações é necessária a utilização de um Sistema de Gerenciamento de Banco de Dados (DBMS). Um DBMS é um software que gerencia os pedidos dos usuários para acesso às informações e, também, controla o armazenamento, a recuperação e a modificação dos dados de interesse dos usuários.

Há muitas maneiras de organizar os dados, enquanto a maioria dos dados biológicos está armazenada em bancos de dados de arquivos simples, esse tipo de banco de dados

torna-se ineficiente quando a capacidade de dados que está sendo armazenada é extremamente grande. Em um banco de dados de arquivos simples, todas as informações sobre o objeto de estudo são armazenados em um grande arquivo de texto estruturado. Em um banco de dados relacional, as informações são armazenadas em um conjunto de tabelas e os dados são organizados em linhas, onde cada linha representa um registro no banco de dados. Uma linha pode conter várias informações separadas (campos). Cada campo no banco de dados pode conter uma informação distinta. A função do DBMS é fazer as conexões entre as tabelas relacionadas, localizando rapidamente os elementos comuns que estabelecem esses relacionamentos (Gibas e Jambeck, 2001).

O MySQL é um sistema de gerenciamento de bancos de dados relacional, que permite armazenar dados em tabelas separadas em vez de colocar todos os dados em um só local. Isso proporciona velocidade e flexibilidade. O Programa de Banco de Dados MySQL é um sistema cliente/servidor que consiste de um servidor SQL multitarefa que suporta acessos diferentes, diversos programas clientes e bibliotecas, ferramentas administrativas e diversas interfaces de programação (API's), sendo necessário uma linha de código para estabelecer a conexão com o banco de dados, utilizando a linguagem PHP, que possui suporte incorporado para a interação com bancos de dados MySQL, PostgreSQL e Oracle. O PHP (um acrônimo recursivo para "PHP: Hypertext Preprocessor") é uma linguagem de script Open Source de uso geral, muito utilizada e especialmente guarnecida para o desenvolvimento de aplicações *Web* (Meloni, 2000).

1.6.2. Sistemas de Gerenciamento de Conteúdo (CMS)

O CMS é uma sigla em inglês para Content Management Systems ou em português Sistema de Gerenciamento de Conteúdo e, geralmente, apresenta-se na forma de códigos abertos (*open sources*), com livre distribuição nos servidores de seus desenvolvedores. Dessa forma, é um sistema escrito em alguma linguagem de programação que controla os dados sem que o usuário precise ficar editando todos os arquivos.

Geralmente, um CMS grava os dados em um banco de dados, mas isso não é uma premissa. O gerenciador de conteúdos é uma ferramenta que permite integrar e automatizar todos os processos relacionados à criação, catalogação, indexação, personalização, controle de acesso e disponibilização de conteúdos em portais *web*.

O sistema Drupal é um CMS altamente configurável, portanto o administrador de um *website* pode ativar e desativar diferentes recursos e fazer várias configurações que mudem a aparência e a funcionalidade do mesmo, além de realizar novas implementações específicas, de acordo com o projeto desenvolvido. Possui um sistema de privilégios que faz com que seja possível criar diferentes tipos de usuários, com diferentes níveis de acessos e

administração interna, como por exemplo, visitantes, membros, equipe, parceiros, editores, entre outros (Mercer, 2006).

O Drupal é projetado para ser facilmente estendido através de módulos - blocos de código que provêm funcionalidade extra ou aprimoramentos ao desempenho do *website*, permitindo novas implementações sem comprometer o sistema. Alguns módulos vêm com toda instalação do Drupal (módulos-padrão), enquanto outros podem ser obtidos individualmente, através do *site* do Drupal e instalados, separadamente, (módulos contribuídos). Para desenvolvedores, ele dá uma base sólida para estender e implementar soluções de gerenciamento de conteúdos personalizados.

Algumas características e módulos peculiares destacam-se na possibilidade de uma perfeita associação com ferramentas e/ou interface, em sistemas e portais de Bioinformática, como os recursos de taxonomia (categorização do banco de dados), diferentes tipos de conteúdos, flexibilidade de blocos, relacionamentos (conteúdo versus blocos), diferentes formatos de entrada de dados (Textos, HTML, PHP, etc.), URL's alternativas, agregador e sindicância de conteúdos (XML, RSS, RDF), indexação total para sistema de busca, manipulação de expressões para idiomas (.pot files), códigos extremamente limpos, temas em PHP *Template*, XHTML, CSS, estatísticas, rastreador, *watchdog*, controle de acesso definido por papéis e, principalmente, os *Snippets*, fragmentos de códigos que proporcionam customizações, associados com PHP, SQL e arquivos do *template* (Temas).

1.6.3. *Docking e Screening Virtual*

O processo de triagem orientado pelo alvo molecular, característico do paradigma industrial, vem sendo influenciado pela revolução da biologia molecular e pelos avanços da bioinformática. A habilidade de desenvolver modelos que predigam o reconhecimento molecular de uma micromolécula (ligante) por um determinado biorreceptor, associada à disponibilidade de amplo banco de dados virtual de pequenas moléculas e de proteínas no PDB (Protein Data Bank) (Berman et al., 2000), impulsionou o desenvolvimento de softwares para triagem *in silico*, aplicando-se a abordagem conhecida como *screening* virtual (Lima, 2007; Silva e Silva, 2007).

Embora esta estratégia vise acelerar o processo de identificação de ligantes, contribuindo para o processo da descoberta de fármacos, a utilidade do método permanece limitada, tanto pelo valor quantitativo, previsto, como pelas diferenças entre as estruturas moleculares concebidas pelo programa, muitas vezes sem análise crítica do operador, com aquelas factíveis de serem sintetizadas.

Segundo Kubinyi (2003), o êxito na aplicação desta abordagem depende muito mais da descrição adequada das propriedades moleculares que do método específico utilizado. Embora a análise de farmacóforos e o *docking* (atracamento molecular) sejam técnicas importantes no processo de desenho racional de ligantes e candidatos a protótipos de fármacos, elas são freqüentemente aplicadas de forma inadequada. Ademais, a complexidade do processo de interação ligante-receptor - considerando fatores entrópicos e entálpicos - a presença de moléculas de água, a flexibilidade do ligante e do sítio de interação são outros fatores complicadores, que podem comprometer a descrição quantitativa da interação, através da afinidade prevista pelos modelos de *docking* (Kubinyi, 2003).

Recentemente, a estratégia de *screening* virtual vem sendo empregada dentro da abordagem conhecida por *in silico antitarget screening*, visando contribuir para o aumento da taxa de acerto no processo de seleção de novos candidatos a fármacos (NCEs). Esta abordagem vem sendo utilizada como parâmetro para eliminação de ligantes pré-selecionados, a partir de uma atividade *in vitro* sobre um alvo terapêutico específico, importante para o controle e/ou tratamento de uma determinada doença, baseando-se num conjunto de informações geradas a partir da análise da atividade *in silico* sobre alvos reconhecidamente envolvidos com a resposta tóxica e efeitos adversos, permitindo antecipar um perfil de seletividade e ausência de toxicidade, que assegure o sucesso na etapa seguinte do processo da descoberta de fármacos (Kitchen et al., 2004).

Sendo assim, o desenho de drogas baseado em estrutura tornou-se uma tecnologia altamente desenvolvida e utilizada nas maiores empresas farmacêuticas. A modelagem molecular comparativa ou por homologia é uma chave característica de um esforço integrado no descobrimento de novas drogas, porque ela permite que estas informações genômicas sejam utilizadas no desenvolvimento de ligantes alvos ou na engenharia de especificidade de ligantes (Lima, 2007; Silva et al., 2007).

O *docking* de um ligante a um receptor, podendo ser uma proteína, é uma das mais importantes técnicas utilizadas em conjunto com a modelagem molecular em biologia estrutural. Se a estrutura do receptor é conhecida, então, a aplicação é, essencialmente, de um desenho de droga baseado em estrutura. Estes métodos têm alguns objetivos relacionados, tais como: procurar identificar a localização do sítio ativo do ligante e talvez a geometria do ligante no sítio ativo. Outra meta é a classificação de uma série de ligantes relacionados em termos de sua afinidade ou avaliar a energia livre de ligação absoluta tão precisamente quanto possível (Silva, 2007).

Atualmente, modelos comparativos estão sendo usados em conjunto com *screening* virtual para identificar novos inibidores. Vários pesquisadores têm demonstrado em seus trabalhos o sucesso no uso de modelos estruturais para auxiliar no desenho racional de drogas contra parasitas. Modelos comparativos foram usados em simulações de *docking*, identificando uma baixa constante de inibição para inibidores não peptídicos de proteases em malária e *Schistosoma* (Ring et al., 1993). Adicionalmente, modelos comparativos foram usados para justificar a afinidade de ligantes pelo sítio de ligação em *E. histolytica* (Silva, 2007).

Computadores rápidos e a disponibilidade de *clusters* de computadores de custo, relativamente baixo têm aumentado a velocidade na qual as drogas podem ser identificadas e avaliadas *in silico*. O primeiro ciclo para o desenho de novas drogas inclui a determinação da estrutura da proteína alvo por um dos três principais métodos usados para desenho de drogas: cristalografia de raios X, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou modelagem molecular comparativa de estruturas de proteínas. Uma vez que o alvo foi identificado, é necessário obter informações sobre a precisão estrutural. Todas as estruturas devem ser avaliadas por vários programas para determinar desvios do comprimento de ligação com relação à geometria ideal, as quais não devem ser maiores que 0,015 Å ou 3° para ângulos de ligação. Átomos planares não devem estar mais que 0,015 Å fora do plano e não deve haver centros quirais incorretos. Finalmente, no mínimo 90% dos ângulos ϕ e ψ da cadeia principal devem cair na região mais favorável do gráfico de Ramachandran garantindo maior precisão aos modelos (Lima, 2007; Silva, 2007).

As estruturas 3D de novas proteínas alvo, relevantes terapeuticamente, estão se tornando disponíveis numa razão dramaticamente crescente através da determinação de estruturas por cristalografia de raios X, RMN ou por modelagem molecular comparativa. Devido ao crescimento do conhecimento estrutural, os experimentos de *docking* estão se tornando essenciais no desenho racional de drogas. Este interesse é atribuído ao *screening* virtual a bancos de dados de ligantes por métodos computacionais levando à identificação de novos alvos terapêuticos.

1.6.4. Determinação dos potenciais de interação molecular fármaco-receptor

A formação de um complexo fármaco-receptor se inicia através do processo de reconhecimento molecular, em que o receptor precisa reconhecer as propriedades moleculares do fármaco que se aproxima para realizar uma interação forte e específica. A etapa de reconhecimento molecular ocorre através da formação de interações, que termina com a formação de complexos. O campo eletrostático que envolve cada molécula apresenta um papel crítico no reconhecimento molecular. Quando a distância entre as superfícies do

fármaco e do receptor diminui, outras propriedades moleculares, como polarizabilidade e hidrofobicidade, tornam-se determinantes (Höltje et al., 2003).

Os potenciais de interação molecular podem ser determinados na estrutura do receptor através de cálculos sistemáticos que envolvem energias de interação entre o receptor e grupos químicos de prova de interesse, em que dados representativos para o entendimento dos potenciais de interação naquele receptor, sem informações prévias de ligantes, são gerados. Essa abordagem se torna ainda mais interessante quando se deseja identificar protótipos promissores para novos e atrativos alvos terapêuticos.

1.6.5. Potenciais eletrostáticos moleculares

O conhecimento de potenciais eletrostáticos se torna de vital importância quando interações moleculares são estudadas. As forças eletrostáticas de longo alcance governam o contato inicial de moléculas que se aproximam. Existem diversos tipos de interações intermoleculares que podem manter um complexo fármaco-receptor, entre elas: interações iônicas, ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, dipolo-dipolo, íon-dipolo e interações hidrofóbicas (Höltje et al., 2003; Patrick, 2005).

Em princípio, as forças de interação molecular podem ser agrupadas em três componentes: eletrostática, indutiva e dispersiva. As interações de ordem eletrostática ocorrem entre moléculas polares que possuem carga ou um momento de dipolo permanente. As forças indutivas são formadas por moléculas polares que interagem com moléculas não-polares. As cargas ou dipolos das moléculas polares produzem um campo elétrico que é capaz de mudar a distribuição dos elétrons nas moléculas não-polares e, dessa forma, induzir um momento de dipolo nas mesmas. Quando as moléculas que interagem entre si apresentam características, predominantemente, hidrofóbicas, as forças dispersivas são majoritárias. Em moléculas hidrofóbicas a flutuação dos elétrons pode induzir a formação de um momento de dipolo na molécula vizinha. As forças dispersivas são consideradas fracas e se desfazem facilmente com o aumento da distância entre as moléculas. Entretanto, formam o principal componente de atração entre moléculas neutras apolares (Höltje et al., 2003).

As interações intermoleculares aparecem amplamente nas regiões moleculares que apresentam carga. Devido às cargas, sobretudo aos momentos de dipolo, um campo eletrostático tridimensional é gerado no ambiente que envolve as moléculas. Mesmo entre moléculas neutras, a distâncias consideradas moderadas, existe um potencial eletrostático significativo. Esse potencial pode ser representado como a energia de interação entre a distribuição eletrônica molecular e uma carga pontual positiva que está localizada em um *grid* tridimensional em qualquer região do espaço ao redor da molécula. Dessa forma, para a

determinação de potenciais eletrostáticos as propriedades eletrônicas das moléculas precisam de tratamento minucioso.

1.6.6. Campos de interação molecular

As forças de interação não-covalentes determinam a geometria e a simetria do arranjo molecular entre um fármaco e seu sítio ligante. Como regra geral, a ligação entre fármaco e receptor só ocorre, efetivamente, se a energia de interação gerada supera as forças repulsivas de Van der Waals. Os campos de interação molecular (MIF, do inglês, molecular interaction fields) podem ser utilizados na investigação das condições energéticas entre um receptor e seu ligante (Goodford, 1985; Höltje et al., 2003).

Os campos de interação molecular podem ser calculados para qualquer molécula com estrutura tridimensional conhecida. Os MIFs descrevem a variação espacial da energia de interação entre um alvo molecular e um grupo químico de prova. O alvo molecular pode ser uma macromolécula, um complexo molecular ou até um composto de baixo peso molecular (Höltje et al., 2003; Wade, 2006).

Existem vários *softwares* capazes de computar os MIFs ao redor de uma molécula. Para que se proceda a esta análise, é necessária a obtenção das coordenadas atômicas x, y e z do alvo molecular. O alvo molecular é, então, envolvido por uma grade ortogonal imaginário, onde os MIFs são calculados para os grupos químicos de prova em cada ponto da grade. Os grupos químicos de prova representam átomos ou pequenos grupos de átomos, como a prova oxigênio de carbonila, que é um átomo de oxigênio com dois pares de elétrons sp². Os grupos químicos de prova refletem as características químicas de um componente que pode interagir com o alvo molecular (Wade, 2006). Através da utilização de gráficos computacionais, os campos de interação molecular podem ser representados como contornos tridimensionais isoenergéticos. Os contornos com energias altamente positivas indicam regiões pelas quais o grupo de prova seria repelido, enquanto que as regiões amplamente negativas correspondem a regiões que favorecem energeticamente interações com o grupo químico de prova (Höltje et al., 2003).

No decorrer do cálculo, o grupo de prova é movido sistematicamente através dos pontos regulares do grid. A cada ponto alcançado a energia de interação entre o grupo de prova e o alvo molecular é calculada (GOODFORD, 1985). A energia de interação não-covalente é calculada a cada coordenada x, y e z através da soma de vários componentes.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto propõe a busca por inibidores naturais contra o veneno de abelhas. Um sistema e uma base de dados foram desenvolvidos para a integração entre plantas medicinais antivenenos e os venenos de abelhas, abordando os seguintes aspectos: (i) a criação de um banco de dados contendo informações científicas sobre plantas medicinais com propriedades antivenenos, venenos de abelhas e seus constituintes isolados tanto de plantas (inibidores naturais) quanto das abelhas (principais toxinas), (ii) estudar as possíveis interações entre algumas toxinas de animais e inibidores vegetais pré-selecionados, (iii) análise e apresentação dos dados laboratoriais obtidos em triagem de plantas medicinais antivenenos de abelhas, (iv) estudar e avaliar as possíveis interações entre as toxinas Melitina e Fosfolipase A2 com inibidores, através do *docking* Virtual.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construção de base de dados: Plantas medicinais antivenenos e venenos de abelhas.

- 1.1. Banco de plantas: contendo famílias, espécies, fonte do extrato, propriedades antiveneno, região onde são encontradas e compostos químicos isolados;
- 1.2. Banco de venenos de abelhas: contendo seqüências protéicas, distribuições geográficas e dados biológicos caracterizando as espécies com suas particularidades.

2. Desenvolvimento do Sistema: O sistema permitirá:

- 2.1. Um levantamento estatístico obtido como resultado dessa pesquisa.
- 2.2. Ao pesquisador, o cadastro de propriedades e estruturas químicas de princípios ativos isolados, assim como de proteínas de venenos. Todas as informações somente serão cadastradas perante comprovação científica.
- 2.3. Desenvolvimento de um sistema *web* denominado *Bee Venom*, que será o repositório de todas informações obtidas.

3. Ambiente WEB: Toda pesquisa realizada pelo usuário será feita através de um ambiente *web*, de forma que a comunidade científica terá acesso, de forma simples e rápida, aos dados depositados nos bancos.

4. Ensaaios laboratoriais: Obtenção e análise de resultados dos ensaios farmacológicos dos venenos e suas antitoxinas, realizados, experimentalmente, em laboratório. Triagem de plantas medicinais antiveneno de abelhas (atividades anti-hemorrágica, anti-proteolítica, anti-miotóxica, anti-fosfolipase e anti-edema). Com a colaboração do Banco de Germoplasma da Floresta da USP, novas plantas poderão ter sua ação antivenenos avaliada.

5. Docking Virtual: Busca virtual de inibidores das toxinas Fosfolipase A2 e Melitina e análise das possíveis interações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A maior parte desse projeto foi conduzida no Laboratório do Grupo de Bioinformática (GBI) do departamento de Genética da FMRP, onde foi realizado o desenvolvimento do sistema. A experimentação animal foi realizada em colaboração com o Laboratório de Toxinas Animais e Inibidores Naturais e Sintéticos coordenado pelo Prof. Dr Andreimar Soares Martins, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto. As análises da bioinformática estrutural foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Química Medicinal de Produtos Sintéticos e Naturais coordenado pelo Prof. Dr Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, localizado também na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto. A figura 2 representa todas as atividades realizadas durante o desenvolvimento do projeto.

Figura 2. Esquema representando o procedimento experimental realizado durante o desenvolvimento do projeto.

3.1. Aquisição das seqüências

As seqüências foram obtidas através do banco de dados públicos do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). As buscas foram realizadas através da ferramenta "Taxonomy". Trabalhou-se com o taxa *Hymenoptera*, especificamente as abelhas, e as palavras utilizadas

nas buscas foram “venom” e “toxin”. As seqüências obtidas foram divididas em aminoácidos e nucleotídeos. Posteriormente, as seqüências foram separadas por tipo de proteína e foram inseridas no banco de dados, para outras análises.

3.2. Aquisição das estruturas

As estruturas foram obtidas por meio do banco de dados públicos do PDB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Foram realizadas buscas com os termos “venom” e “toxin”. Entre os resultados da busca foram escolhidas somente estruturas que pertenciam ao grupo *Hymenoptera*.

3.3. Desenvolvimento do Sistema

O sistema foi implementado sobre o CMS Drupal (<http://www.drupal.org>) (Mercer, 2006), que gerencia todo o conteúdo do sistema, o qual está em um servidor HP Pentium Xeon 3.0 de 2Gb de memória, com o sistema operacional GNU/Linux Fedora 6. O CMS (*Content Manager System*) apresenta ferramentas que permitem integrar e automatizar os processos relacionados à criação, armazenamento, catalogação, indexação, personalização, modificação, recuperação, controle de acesso e disponibilização de conteúdos em portais *Web* (Michelinakis, 2004; Mercer, 2006).

O CMS escolhido para a implementação do sistema foi o Drupal versão 5 que corresponde a um CMS de código aberto liberado pela política GPL (*General Public License*). O drupal é mantido e desenvolvido por uma comunidade de milhares de usuários e desenvolvedores de todo o mundo. A principal vantagem do Drupal é ser um programa modular, que pode crescer de acordo com a necessidade do usuário. No início o Drupal não foi desenvolvido para uma aplicação específica, sendo um programa dinâmico e versátil (Mercer, 2006).

O Drupal gerencia todos os tipos de conteúdos e serviços atribuídos à interface *Web*, por exemplo, o acesso dos usuários (*Login*), métodos de busca, inserção de novos dados, atualizações, alterações, entre outros. A estrutura do CMS Drupal foi implementada na linguagem PHP (Meloni, 2000) (<http://www.php.net>), que corresponde a um módulo de pré-processamento de hipertexto para o servidor da *Web*, permitindo ler e interpretar código PHP incorporado em páginas da *Web*. Essa plataforma permite também acoplar outras linguagens de programação como Perl (*Practical Extraction and Report Language*), (<http://www.perl.com/>) (Wall; Christiansen e Orwant, 2001), que é uma linguagem mais popular para escrita de scripts CGI (Guelich e Gundavan, 2001). A linguagem Perl é uma linguagem de programação especialmente desenvolvida para processamento de texto, que

no sistema foi utilizada na análise de dados, como em scripts para inserção de dados decorrentes de arquivos texto de bancos de dados públicos.

A linguagem de programação usada para criação de páginas *Web* foi HTML (*Hypertext Markup Language*), juntamente com pacotes gráficos de desenvolvimento na criação de ferramentas dinâmicas interagindo com o sistema, como o *content type* que exhibe uma estrutura gráfica a porcentagem de dados depositados e relacionados com as categorias do sistema. Relacionando também com ferramentas específicas de Bioinformática tais como Webmol, Clustal, entre outras também foram acopladas ao sistema (Gibas et al., 2001).

O sistema apresenta um banco de dados baseado na estrutura de tabelas do CMS Drupal, porém esse banco é flexível e expande de acordo com os diversos tipos de conteúdo que possam surgir.

3.3.1. Criação de conteúdos específicos

Os conteúdos específicos foram criados utilizando o módulo CCK, que cria diferentes tipos de conteúdos de forma flexível, com administração no painel de controle, juntamente com o gerenciamento dos conteúdos inseridos no portal, permitindo a criação de qualquer classe de conteúdo como, publicações, dados laboratoriais, seqüências, estruturas, além dos tipos já existentes, como matérias, páginas e outros. O administrador pode definir os campos requeridos na inserção dos dados correspondentes ao conteúdo criado, editando-os de acordo com a necessidade específica do conteúdo, podendo ser um campo de texto simples, data e hora, imagem, área para composição de mensagem, lista de menus, caixa de seleção, *URL*, galeria de imagem, seleção de cores, endereço eletrônico, tabela e recursos de mídia como MP3, além do campo de anexos de arquivos.

Após criar um novo tipo de conteúdo, foram adicionados os tipos de campos necessários e algumas configurações sobre instruções de preenchimento, descrição, opções de visualização em listagem de conteúdos, requisição do campo e o valor do peso para a ordenação.

3.3.2. Categorização do Banco de Dados

A flexibilidade na organização das categorias hierárquicas e a adição de subcategorias para a maioria dos conteúdos, relacionando em sistemas de “nós”, puderam ser realizadas através do módulo “Taxonomy”. Neste módulo, as classes de categorias são chamadas de “Vocabulários”, que contêm seus respectivos termos, compondo a estrutura de categorias do *website*. Com o auxílio deste módulo, foi possível listar os termos para as

diversas frentes de conteúdos, como matérias de artigos, seqüências e estruturas, permitindo ainda relacioná-los com diferentes tipos de conteúdos existentes.

3.3.3. Banco de Dados

O sistema para gerenciamento de bancos de dados escolhido foi o *open source* MySQL 5 (<http://www.mysql.com>). O MySQL (*Structured Query Language* - Linguagem Estrutural de Consultas) é sistema de gerenciamento do tipo relacional, que permite armazenar dados em tabelas local e proporcionando velocidade e flexibilidade. A linguagem padrão é SQL, que é usada para acessar banco de dados, sendo definida pelo Padrão ANSI/ISO SQL. O MySQL usa a política GPL (GNU General Public License - Licença Pública Geral GNU) (<http://www.fsf.org/licenses>).

3.3.4. Política de Segurança

O sistema possui uma política de segurança. Onde os cada grupo possui permissões específicas de acordo com a tarefa a ser realizada. As tarefas são:

a) quanto à submissão de dados:

Os dados submetidos ao sistema serão avaliados e, se aprovados, serão armazenados no banco de dados.

b) quanto ao acesso ao banco de dados:

A política de segurança será estabelecida pelos seguintes critérios:

- As informações de domínios públicos permanecerão com o *status* de domínio público a todos os pesquisadores cadastrados no sistema;
- A informação pertinente, quer seja a um grupo de pesquisa ou a um pesquisador em particular, o *status* será selecionado pelo grupo ou pesquisador. Ou seja, caberá ao grupo ou pesquisador decidir a quem suas informações deverão ser liberadas;
- A alteração do *status* somente será feita mediante uma requisição por escrito vinda do coordenador do grupo ou pesquisador responsável.

Os *status* disponíveis são:

- Público (B): Os dados obtidos dos bancos públicos serão disponibilizados a todos os grupos e pesquisadores nacionais cadastrados.
- Grupos (G): O grupo ou pesquisador poderá selecionar qual(is) grupo(s) que terá(ão) acesso às suas informações submetidas.

3.4. Modelagem do Sistema

A linguagem UML (Unified Modeling Language) foi utilizada para a modelagem do sistema. Uma das principais características da linguagem UML é o fato de ser uma linguagem gráfica para visualização, especificação e documentação de artefatos dos sistemas complexos de software. Dessa forma, proporciona uma forma-padrão para a preparação de planos de arquitetura de projetos incluindo, também, aspectos conceituais (Booch; Jacobson e Rumbaugh, 2006).

Neste trabalho, a UML está relacionada aos procedimentos que devem ser executados pelos atores no sistema; sendo assim, o sistema utiliza uma infra-estrutura já estabelecida que é o CMS Drupal. A modelagem exemplifica o desenvolvimento de criação de conteúdos, categorias, permissões e todas as opções que existem no sistema.

3.4.1. Escopo

O sistema *Bee venom* é responsável por centralizar os dados de experimentos *in silico*, *in vivo* e *in vitro*, relacionados à inibição de proteínas do veneno e do extrato total do veneno. Dessa forma, a centralização desses dados em uma única base de dados é muito importante, pois permite integrar informações a respeito das proteínas do veneno, das plantas medicinais antiveneno, estruturas de proteínas do veneno, seqüências de proteínas do veneno, referências e dados laboratoriais relacionados ao veneno de *Apis mellifera*. A integração dos dados está disponibilizada na *Web* e os dados inseridos no sistema consistem de dados coletados de bancos de dados públicos, publicações científicas e através de pesquisadores e colaboradores.

No sistema, os usuários podem ser registrados como: administrador, colaboradores e visitantes. Os usuários possuem atribuições diferentes de acordo com cada tipo de acesso ao sistema (Tabela 7). A figura 3 apresenta um esquema simplificado do funcionamento do sistema e de sua interação com os usuários, permissões e principais módulos do CMS Drupal.

Tabela 7. Permissão dos três níveis de usuários do sistema.

USUÁRIO	PERMISSÃO DE ACESSO
Administrador	Acesso completo (Cria tipo de conteúdo, Cria categorias, Adiciona termos, Envia dados de plantas, abelhas, vespas e administração geral)
Colaboradores	Acesso restrito (Envia dados de plantas e abelhas, vespas e altera os dados submetidos).
Visitantes	Acesso restrito (Visualização do conteúdo público)

Figura 3. Modelo simplificado da interação dos três tipos de usuários com os recursos disponíveis de acordo com a permissão atribuída a cada usuário.

3.4.2. Cadastrar usuários

Os usuários possuem diferentes tipos de permissões de acesso. O sistema possui uma parte chamada *Create new account*, que permite o cadastro de um novo usuário. Os campos para criação de um novo usuário são: *Personal information* (*Full name*, *City*, *State* e *Country*), *Account information* (*Username* e *E-mail address*) e *Professional information* (*Profession*, *Institution*, *Group*, *City*, *State* e *Country*). Todos os campos são obrigatórios. Após a avaliação dos coordenadores, uma senha será criada e enviada para o e-mail do novo usuário cadastrado. Os usuários cadastrados poderão enviar dados ao sistema e buscar dados restritos a um determinado grupo de usuário.

3.4.3. Criar tipo de conteúdo

Os novos tipos de conteúdos são as informações que devem ser inseridas no sistema. A inserção de informações ocorre através de campos específicos de entrada de dados. O módulo CCK (*Content Construction Kit*) do Drupal permite criar novos tipos de

conteúdos, que interagem diretamente com o banco MySQL. É permitido apenas ao administrador criar tipos de conteúdo no sistema.

3.4.4. Cadastrar categorias, termos e campos

O sistema é composto por categorias e subcategorias, que são utilizadas para classificar e organizar os conteúdos. As categorias podem ser específicas para um único tipo de conteúdo ou comum para vários. A categorização correta do conteúdo é fundamental, pois permite que as buscas sejam feitas de forma mais eficiente, através de buscas por palavras chaves e utilizando o módulo *Views* do Drupal para fazer uma busca relacionando os termos das categorias.

Os dados podem ser cadastrados de duas formas: categorias ou campos. As categorias são partes do sistema que podem ser comuns a vários conteúdos permitindo que sejam associadas e usadas como ferramentas de buscas, já os campos são conteúdos específicos e não podem ser relacionados com outros conteúdos.

Somente o administrador pode criar categorias, termos e campos. Caso o pesquisador não encontre um termo específico no sistema para categorizar o dado é oferecido a ele um campo de escrita para que ele entre com seu termo. Os dados submetidos ao sistema são liberados após a análise do administrador, que avaliará a necessidade de criação do termo.

3.4.5. Cadastrar tipos de conteúdos

Os conteúdos podem ser cadastrados no sistema em conteúdos específicos. Os dados submetidos são analisados pelos coordenadores antes do acesso ao sistema ser liberado. Os cadastros podem ser do tipo: dados de plantas (por exemplo: nome de espécies de plantas antiveneno), dados de proteínas de veneno de abelhas (por exemplo: seqüências de DNA e proteínas de veneno), estrutura de proteínas de veneno de abelhas (por exemplo: estruturas terciárias de proteínas de abelhas), dados de referências de veneno de abelhas (por exemplo: artigos e livros relacionados com veneno de abelhas), dados experimentais de venenos de abelhas (por exemplo: experimentos de inibição de componentes do veneno).

3.4.5.1. Enviar dados de plantas (antiveneno)

O tipo de conteúdo *Data of Plant* é o local onde são cadastrados os dados de plantas medicinais. É necessário para enviar dados de plantas acessar como usuário cadastrado. Após isso, deve-se acessar *Create content* e entrar em *Plant*. Os seguintes campos e categorias devem ser selecionados: *Scientific Name*, categoria (*Content type*) e *Additional*

Information. As outras informações necessárias para o cadastro das plantas estão divididas em três áreas. A primeira área é a *Plant information* existem os campos *Common Name*, *Distribution* e *Characteristic*. Já as categorias existem *Family*, *Activity*, *Country*, *Part of plant used* and *Scientific Name*. A segunda área corresponde aos compostos tem os campos *Chemical formula* e *Compoud Name*. A terceira área é *Image*, com os campos para envio de imagens de *Compound* e *Plant*. O campo (*Anti-Venom plants*) pertence ao próprio sistema e serve para listar as categorias relacionadas a essa planta, portanto não deve ser alterado.

3.4.5.2. Enviar dados de proteínas de venenos de abelhas

Os dados de proteínas de venenos de abelhas e outros himenópteros são cadastrados através do tipo de conteúdo *Sequence*. Para enviar dados de venenos de abelhas deve-se entrar no sistema como usuário cadastrado e acessar *Create content* e entrar em *Sequence*. Os seguintes campos e categorias devem ser selecionados: campo de escrita (*Title*) e tipo de categoria (*Content type*). Os outros campos e categorias estão divididos em três áreas. A primeira área é *Animal Information*, por exemplo informações a respeito da abelha ou vespa, que possui as categorias *Animal*, *Genus Animal* e *Scientific Name*. A segunda área é *Sequence information*, que apresenta as categorias *Protein* e *Sequence type* e o campo *Acession* (número de acesso). Na terceira área existe o campo *Fasta*.

3.4.5.3. Enviar estruturas de proteínas de veneno de abelhas

As estruturas de veneno de abelhas são cadastradas através do tipo de conteúdo *Sequence*. Para enviar as estruturas de venenos de abelhas deve-se entrar no sistema como usuário cadastrado e acessar *Create content* e entrar em *Structure*. Os seguintes campos e categorias devem ser selecionados: campo de escrita (*Title*), categoria (*Content type*), categoria (*Genus animal*), categoria (*Type of Strucure*), categoria (*Authors*) e o campo (*Additional Information*). Os outros campos e categorias estão divididos em cinco áreas. A primeira área é *Animal Information*, que possui as categorias *Animal* e *Scientific Name*. A segunda área é *Structure information*, que apresenta as categorias *Protein*, *Classifcation* e *EC Number*. A terceira área é *Structure Information* existem as categorias *Structure (Obtaining Method)* e *PDB Number* e os campos *Parameters*, *PDB Link*, *Reference (Primiry Citation)* e *Reference Link*. A quarta área é *Ligand Information*, que possui as categorias *Type of Ligand*, *Ligand Name*, *Action* e *Formula* e o campo *Ligand Chemical Component*. A quinta área é *Files*, que apresenta locais para submeter imagens e arquivos PDB do ligante e proteínas.

3.4.5.4. Enviar dados de referências de venenos de abelhas

Os dados de referências de venenos de abelhas são cadastrados através do tipo de conteúdo *Bee Venom Reference*. Para enviar dados de venenos de abelhas deve-se entrar no sistema como usuário cadastrado e acessar *Create content* e entrar em *Bee Venom Reference*. Os seguintes campos e categorias devem ser selecionados: campo de escrita (*Title*), categoria (*Content type*) e o campo *Abstract*. Os outros campos e categorias estão divididos em duas áreas. A primeira área é *Details*, que possui as categorias *Type of reference*, *Year*, *Authors*, *Publisher* e *Language*. A segunda área é *Additional information*, que possui as categorias *Field of Study* e *Institution* e os campos URL e *Additional Information*, com um campo para enviar um arquivo no formato PDF.

3.4.5.5. Enviar dados de experimentos laboratoriais de venenos de abelhas

Os dados de experimentos laboratoriais de venenos de abelhas e outros himenópteros são cadastrados através do tipo de conteúdo *Laboratorial Data*. Para enviar dados de experimentos de inibição de componentes do veneno de abelhas deve-se entrar no sistema como usuário cadastrado e acessar *Create content* e entrar em *Laboratorial Data*. Os seguintes campos e categorias devem ser selecionados: campo de escrita (*Title*), categoria (*Content type*), campo de escrita (*Assay*) e campo de escrita (*Additional Information*). Os outros campos e categorias estão divididos em duas áreas. A primeira área é *Authors Information*, que possui as categorias *Authors* e *Institution*. A segunda área é *Files*, que apresenta campos para envio de arquivos textos e imagens.

3.4.6. Visualizar conteúdo

Os dados liberados podem ser disponíveis como público ou restrito a algum grupo. No caso de dados com acesso público, existem diversas formas de visualizações. A visualização por categorias permite um acesso rápido e eficiente quando o pesquisador conhece bem o que deseja analisar. Já o *taxonomy graph* permite visualizar a quantidade de dados armazenados no sistema de maneira dinâmica, utilizando-se os termos das categorias. Os conteúdos podem ser visualizados também por nomes.

3.4.7. Diagramas de UML

A forma de visualizar os blocos de construção é através de diagramas. O diagrama é uma apresentação gráfica de um conjunto de elementos, geralmente representado como um gráfico conectado de vértices (itens) e arcos (relacionamentos). Na UML existem vários tipos de diagramas que são utilizados na modelagem que especificam modelos a partir dos quais são construídos sistemas executáveis (Booch, Jacobson e Rumbaugh 2006).

3.4.7.1. Visão global dos atores e use-cases

A Visão global dos atores e *use-cases* (Figura 4) é um diagrama que representa graficamente os atores e suas interações com as *use-cases*. O ator é qualquer pessoa ou sistema externo que tenha interação com o sistema que está em desenvolvimento e a *use-case* é um conjunto de funcionalidades de um sistema, representado por fluxos de eventos iniciados por um ator que apresenta um resultado de valor a um ator (Cardoso et al. 2003).

Figura 4. Visão Global dos Atores e Use-cases. Os atores Administrador e Colaborador fazem papel de usuário do sistema interagindo com os eventos que cada um tem permissão de realizar, e o ator Visitante não entra como usuário cadastrado do sistema, porém, pode visualizar os dados públicos.

Os atores do sistema, Administrador e Colaborador, possuem uma seta que os ligam ao ator de sistema Usuário, isso significa que tanto o Administrador quanto o Colaborador podem fazer o papel do Usuário e executam o *Use-Case* **Visualizar Conteúdo**, **Enviar dados de estrutura de Proteínas**, **Enviar dados laboratoriais**, **Enviar dados de**

Referências, Enviar dados de Seqüências, Enviar Dados de Plantas e Alterar os Dados.

3.4.7.2. Diagrama de Colaboração

A colaboração é representada por meio de diagramas que demonstram o relacionamento das classes no que diz respeito ao sentido das mensagens e ao número de mensagem, dando ênfase à organização dos objetos que participam de uma interação (Cardoso, 2003). O diagrama de colaboração contém seu Fluxo Básico, ou seja, o fluxo padrão de funcionamento de um determinado *Use-Case* e os Fluxos Alternativos, que correspondem a quaisquer outros tipos de eventos fora do fluxo padrão, levando-se em consideração a ordem em que se encontram os atores e estereótipos.

Os diagramas gerados são dos eventos: criar um tipo de conteúdo (Figura 5), cadastrar categorias (Figura 6), adicionar termos (Figura 7), enviar dados de plantas com atividade antiveneno (Figura 8), enviar dados de seqüências de abelhas (Figura 9), enviar dados de estruturas de proteínas de abelhas (Figura 10), dados laboratoriais (Figura 11), dados de referências de abelhas (Figura 12), alterar dados (Figura 13) e visualizar conteúdos (Figura 14). Os diagramas demonstram o fluxo a ser seguido para realização das atividades com todas as etapas dos processos.

O diagrama de criar conteúdo mostra todos os passos envolvidos na criação de um novo conteúdo, permite observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 5).

Figura 5. Diagrama de colaboração do *Use-case Criar tipo de conteúdo* – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Administrador realiza para criar um novo tipo de conteúdo, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

O diagrama de cadastrar categorias mostra fluxo das etapas envolvidas no cadastro de uma categoria, permite observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 6).

Figura 6. Diagrama de colaboração do *Use-case Cadastrar Categorias – Fluxo Básico*. Representa os eventos que o ator Administrador realiza para criar uma nova categoria, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

O diagrama de adicionar termos mostra fluxo das etapas envolvidas na adição de novos termos na base de dados, permite observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 7).

Figura 7. Diagrama de colaboração do Use-case **Adicionar Termos** – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Administrador realiza para adicionar um novo termo em uma categoria, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

O diagrama de enviar dados de plantas com atividade antiveneno permite observar o fluxo das etapas envolvidas no envio de dados de plantas, sendo possível observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 8).

Figura 8. Diagrama de colaboração do **Enviar dados de plantas com atividade Antiveneno – Fluxo Básico**. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de plantas, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

O diagrama de enviar dados de seqüências de abelhas apresenta o fluxo das etapas envolvidas no envio de seqüências de abelhas, permitindo observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 9).

Figura 9. Diagrama de colaboração do *Use-case Enviar Dados de Sequências de abelhas – Fluxo Básico*. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de animais, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

O diagrama de enviar dados de estruturas de proteínas de veneno de abelhas mostra o fluxo das etapas envolvidas no envio de dados de estruturas de proteínas, sendo possível observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 10).

Figura 10. Diagrama de colaboração de **Enviar Dados de Estruturas de Proteínas de veneno de abelha – Fluxo Básico**. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de plantas, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

O diagrama de enviar dados laboratoriais mostra fluxo das etapas envolvidas no envio de dados laboratoriais, permitindo observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 11).

Figura 11. Diagrama de colaboração do *Use-case Enviar Dados Laboratoriais* – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de animais, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

O diagrama de enviar dados de referências de abelhas mostra todos os passos envolvidos no envio de referências de abelhas, permitindo observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 12).

Figura 12. Diagrama de colaboração **Enviar Dados de Referências de Abelhas – Fluxo Básico**. Representa os eventos que o ator usuário (Administrador ou Colaborador) realiza para enviar dados de plantas, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

O diagrama de alterar dados mostra etapas necessárias para alterar os dados que estejam depositados no sistema, permitindo observar o fluxo das informações e onde os possíveis problemas podem ocorrer (Figura 13).

Figura 13. Diagrama de colaboração do *Use-case Alterar Dados* – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Administrador realiza para alterar dados de plantas e venenos de abelhas, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

Figura 14. Diagrama de colaboração do Use-case **Visualizar Conteúdo** – Fluxo Básico. Representa os eventos que o ator Visitante realiza para visualizar o conteúdo público do sistema, descrevendo as entradas de dados a serem preenchidas e as mensagens para cada evento.

3.5. Docking Virtual

De maneira geral, os softwares de *docking* são formados por uma combinação de dois componentes: um algoritmo de busca e uma função de *score* (Taylor; Jewsbury e Essex, 2002; Verdonk et al., 2003). O algoritmo é utilizado na busca de possíveis modos de ligação e permite explorar os graus de liberdade translacional e rotacional do ligante, bem como, os graus de liberdade conformacional de ambos, ligante e proteína. A função de *score* é aplicada para tentar distinguir os modos de ligação mais próximos dos obtidos experimentalmente entre os demais modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca e, dessa forma, ordenar os diferentes modos de ligação apresentados. As funções de *score* podem ser estabelecidas de acordo com campos de força mecânica molecular, parâmetros empíricos de cálculos de energia livre ou até de acordo com parâmetros denominados *knowledge-based*, que são conhecimentos prévios da estrutura.

Nas análises de bioinformática estrutural foram utilizadas as proteínas Fosfolipase A2 e Melitina obtidas a partir do PDB, pois a Melitina e Fosfolipase A2 são as proteínas majoritárias e as principais responsáveis pelos efeitos do veneno das abelhas.

3.5.1. Simulações de *screening* virtual

As simulações de *screening* virtual foram realizadas com o software GOLD 3.3 (Verdonk et al., 2003) para a proteína Fosfolipase A2 (código: 1POC) em relação à base de dados (*Ilbdiverse*) (<http://www.inteligand.com/ilbdiverse/index.shtml>) de estruturas de moléculas de fármacos, substâncias ativas e/ou moléculas com propriedades *drug-like*. O banco de dados *Ilbdiverse* contém, aproximadamente, 1.200 estruturas moleculares virtuais de fármacos ou substâncias ativas, as quais foram utilizadas nas simulações de *screening* virtual. As coleções de moléculas têm suas próprias particularidades, apresentam diversas estruturas de moléculas pequenas contendo propriedades *drug-like* e abrangem diversas características farmacofóricas espaciais relevantes para realizar interações com os mais diversos alvos terapêuticos que possuam alta probabilidade de encontrar protótipos com grande potencial de biodisponibilidade por via oral e capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica (BHE).

A base metodológica do software GOLD é a execução de simulações de *docking* flexível utilizando um algoritmo genético. Os cálculos de *docking* foram realizados dentro de uma esfera de raio de 10 Å tendo como centro o átomo de carbono delta 1 da cadeia lateral do resíduo de PHE67. A orientação de melhor *score* para cada composto foi selecionada através de uma função matemática, implementada no software GOLD, denominada GoldScore. Com base nessa função, o software classifica as orientações das moléculas do banco de dados de acordo com um padrão de afinidade (*score*), do ponto de vista de estabilidade energética, em relação ao sítio ligante da proteína. Foram selecionadas 10 simulações referentes, respectivamente, a 10 diferentes orientações para um mesmo composto, que seriam as 10 melhores.

3.5.2. Almond

Os campos de interação molecular (Molecular Interaction Fields, MIFs) foram gerados com o módulo Almond (Pastor et al., 2000) do pacote computacional Sybyl v.7.3 (Tripos(Inc.), 2005) para a proteína Melitina (código PDB: 2MLT). Os cálculos foram realizados com base nas interações moleculares do domínio da Melitina com 3 grupos químicos de prova, sendo eles: hidrofóbico (DRY), oxigênio de carbonila e nitrogênio de amida. Depois de gerados os campos de interação molecular MIFs, da estrutura da Melitina são identificados os locais de interação para realizar as simulações de *screening virtual*.

3.5.3. Q-Site Finder

As proteínas Melitina e Fosfolipase A2 foram submetidas ao programa Q-Site Finder (<http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/qsitefinder/>) com o objetivo de verificar sítios de

reconhecimento nas proteínas. Esses sítios seriam possíveis locais onde as proteínas têm capacidade de interagir com outras proteínas e ligantes. Nessas regiões das proteínas, normalmente existem sítios importantes para a proteína, como por exemplo, o sítio ativo. Esse programa pode confirmar os sítios ativos encontrados na literatura (Laurie e Jackson, 2005).

3.6. Ensaio laboratoriais

Este estudo foi executado com o consentimento do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP (Processo nº 107/2007) (ANEXO A). A Figura 15 apresenta todos os experimentos realizados nos ensaios laboratoriais, sendo possível visualizar o fluxograma dos experimentos.

Figura 15. Esquema representando dos ensaios laboratoriais realizados em todo o procedimento experimental, apresentando o fluxo básico.

3.6.1. Obtenção do veneno

O extrato total foi obtido junto ao serpentário da USP/RP, onde o veneno foi extraído com choques elétricos e coletado em uma placa. A Fosfolipase A2 foi obtida junto à empresa Sigma.

3.6.2. Extratos Vegetais das Plantas do Banco de Germoplasma da USP/RP

3.6.2.1. Coleta dos vegetais

As espécies vegetais selecionadas foram localizadas e coletadas em seu 'habitat' natural ou cultivadas e identificadas. Durante as coletas, foram selecionadas folhas que se apresentavam íntegras e sem possíveis parasitas.

3.6.2.2. Preparação dos extratos

Ao chegar ao laboratório, o material foi pesado e dividido em duas partes de peso igual, onde uma parte do material foi usada fresca e a outra parte seca. O material usado fresco foi lavado em água corrente para retirada de contaminantes. Após a lavagem, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços para aumentar a superfície de contato. Posteriormente, foi acrescentado água na temperatura aproximada de 100 °C. A água ficou em contato com a folha por, aproximadamente, 3 a 5 horas (dependendo do tamanho da folha picada e tipo de folha). Após o tempo necessário, o material foi filtrado e congelado para posterior liofilização. No caso do material seco, as folhas foram lavadas e colocadas em uma estufa por cerca de 16 horas. Esse processo foi interrompido quando as folhas se apresentavam completamente secas. Após a secagem das folhas, o material foi moído para aumentar a superfície de contato. Posteriormente, a água, com temperatura aproximada de 100 °C foi acrescentada. Novamente, a água ficou em contato com a folha durante o período noturno. Após esse processo, o material foi filtrado e congelado para posterior liofilização. Após a liofilização do extrato, ele foi ressuspendido para sua utilização. As plantas selecionadas para obtenção do extrato são encontradas na tabela 8 (Figura 16).

Figura 16. Esquema representando a preparação dos extratos brutos aquoso, metanólico e clorofórmico.

Tabela 8. Lista das espécies utilizadas, inicialmente, para produção de extratos, com o nome da família a que pertence, nome científico e nome popular das plantas estudadas.

Banco de germoplasma USP/RP		
Sub-Família	Nome científico	Nome Popular
Caesalpinioideae	<i>Pterogyne nitens</i>	Amendoim bravo
Caesalpinioideae	<i>Schizolobium parahyba</i>	Guapuruvu
Caesalpinioideae	<i>Pelthophorum dubium</i>	Canafístula
Caesalpinioideae	<i>Caesalpineia férrea</i>	Pau ferro
Caesalpinioideae	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Óleo de copaíba
Caesalpinioideae	<i>Hymenaea courbaril</i>	Jatobá
Papilionoideae	<i>Machaerum villosum</i>	Jacarandá do Mato
Papilionoideae	<i>Centrolobium domentosum</i>	Araribá
Papilionoideae	<i>Platycamus elegans</i>	Amendoim do campo
Papilionoideae	<i>Platycamus regnelli</i>	Pau-pereira
Papilionoideae	<i>Holocalyx balansae</i>	Alecrim de Campinas
Papilionoideae	<i>Myroxylum peruiferum</i>	Cabreuva

3.6.3. Atividade Fibrinogenolítica

O método descrito por Rodrigues et al. (2000) foi utilizado com algumas modificações. Os extratos de folhas e caule foram, previamente, incubados com os venenos por 30min a 37°C. Amostras, contendo 50 µg de fibrinogênio bovino dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS) foram incubadas com as soluções de venenos/extratos, por 2h a 37°C. A reação foi finalizada adicionando-se tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,8, contendo glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 10 %, SDS 2 % e azul de bromofenol 0,05%. A seguir, as amostras foram analisadas em eletroforese com gel de poliacrilamida (Rodrigues et al., 2000).

3.6.4. Atividade Miotóxica

Grupos de 03 camundongos Swiss machos (18–22 g) foram injetados via intramuscular (i.m.) no gastrocnêmico direito com diferentes doses de venenos em 50 µL de PBS. Os controles receberam somente PBS e, três horas depois, os camundongos foram sangrados pela cauda, coletando-se o sangue em capilares heparinizados e, imediatamente, centrifugado. A atividade da enzima creatina-cinase foi determinada utilizando-se 4 µL de plasma pelo Kit CK-UV cinético da Sigma Chem. Co., procedendo conforme especificações do fabricante. A atividade creatina cinase foi expressa em U / L, constituindo uma unidade o resultado da fosforilação de um nano Mol de creatina por minuto a 25°C (Soares et al., 2000; Soares et al., 2000; Soares et al., 2001).

3.6.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

As amostras do extrato total do veneno e de Fosfolipase A2 de *Apis mellifera* foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes,

para verificação da integridade das proteínas dos venenos. Para aplicação no gel, foi adicionado o tampão de corrida às amostras e estas foram fervidas a 100°C durante 4 min, para desnaturação. A eletroforese foi realizada conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de resolução a 12% em acrilamida (bis-acrilamida: acrilamida 1,0: 19) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8.8 e SDS a 1%. O gel de concentração a 12% em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 e SDS a 0,1%. Após a corrida, o gel foi retirado e corado por 15 minutos em azul comassie G-250 a 0,1% dissolvido em água: metanol: ácido acético (40: 50: 10) e descorado em ácido acético 10%. Em seguida, foi embebido em solução de gelatina incolor 5% (m/v) e seco em papéis celofanes (Laemmli, 1970).

Posteriormente, as amostras foram submetidas a um estudo preliminar da inibição do veneno e da Fosfolipase A2 em relação ao extrato de *Casearia* folhas 28 e 29 (CSF 28 e 29), pois apresentou atividade inibitória reconhecida em outros experimentos. Esse experimento foi realizado através da incubação do veneno de *A. mellifera* e da toxina Fosfolipase A2 de *A. mellifera*, nas proporções de 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20, por 30min a 37°C, com o *Casearia* folhas 28 e 29 (CSF 28 e 29). A precipitação, proteólise das proteínas dos venenos ou ligação destas a alguma substância dos extratos, pôde ser visualizada por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de agentes desnaturantes. As amostras foram submetidas à preparação para aplicação no gel, por adição de tampão de corrida para proteínas e fervura a 100°C por 4 min, para desnaturação. A eletroforese foi realizada conforme descrito anteriormente.

3.6.6. Estudos de Inibição das Atividades Biológicas e Enzimáticas

Em todas as atividades anteriormente descritas, os estudos de neutralização foram realizados incubando-se, previamente, os extratos vegetais e/ou inibidores isolados com os diferentes venenos e/ou toxinas isoladas por 30 min a 37°C. As doses de veneno e/ou toxinas foram selecionadas após estudos dose tempo resposta para cada atividade em particular. Estes ensaios foram usados e validados em estudos de neutralização pelos antivenenos (Escalante et al., 2000). As proporções para incubação de toxinas e venenos com os inibidores foram determinadas em cada ensaio biológico específico. Nos controles negativos foram usados PBS de acordo com os volumes previamente determinados em cada atividade testada, enquanto que, nos controles positivos, foram utilizados venenos e/ou toxinas diluídos em PBS. Posteriormente, foram efetuados estudos de inibição sem prévia incubação na tentativa de se verificar a real possibilidade de aplicação prática destes inibidores para o tratamento do envenenamento ofídico.

3.6.7. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada por hemólise indireta por gel de agarose contendo hemácias de carneiro e usando emulsão de gema de ovo como substrato, conforme descrito por Gutiérrez (1988). Cerca de 0,3 mL de eritrócitos humanos foram lavados quatro vezes com tampão fosfato em salina (PBS) e foram adicionados juntamente com 0,3 mL de gema de ovo (diluída 1:4 em solução salina) e 0,25 de CaCl_2 0,01M a 25 mL de agarose 1% dissolvida em salina tamponada com fosfato pH 8,1. A mistura foi colocada em placas de petri (135 por 80mm) para solidificar o gel. Posteriormente, os orifícios de 0,3 mm de diâmetro foram preenchidos com 40 μL das soluções de veneno bruto e Fosfolipase A2. A placa foi incubada 37°C por 20h e o diâmetro dos halos de hemólise foi medido com régua. Como controles, foram aplicados 40 μL de salina, apenas venenos brutos ou Fosfolipase A2. Os experimentos foram feitos em triplicata, sendo utilizadas diferentes proporções de venenos e extratos. Posteriormente, os gráficos foram gerados com o valor médio obtido e o desvio padrão. Os ensaios de inibição foram realizados com incubação prévia dos venenos com os extratos e posterior aplicação ao gel de hemólise e incubação. As plantas avaliadas contra o veneno total e Fosfolipase A2 são apresentadas na tabela 10. Na tabela 9 é possível observar todas as análises realizadas contra o veneno total e Fosfolipase A2 (Gutierrez et al., 1988).

Tabela 9. Experimentos avaliados na atividade fosfolipásica indireta.

Parâmetros analisados	Variáveis
pHs	2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 7; 8; 10
Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético (EDTA)	10, 20, 30, 50
Íons	Co^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Na^{++} , Zn^{++} , Ca^{++}
Temperatura	-20, 4, 25, 37, 50, 60, 80, 100 °C
Plantas	Amostras do germoplasma e amostras existentes no laboratório
Substâncias sintéticas	P (originário das quinolinonas), CP e I

Tabela 10. Plantas utilizadas contra veneno total e Fosfolipase A2.

Plantas	Concentração avaliada	Compostos sintéticos	Concentração avaliada
Canafistula*	1:5; 1:10; 1:30	CP 01	1:5
Cabriúva*	1:5; 1:10; 1:30	CP 02	1:5
Amendoim Bravo*	1:5; 1:10; 1:30	CP 10	1:5
Jatobá*	1:5; 1:10; 1:30	CP 11	1:5
Pau ferro*	1:5; 1:10; 1:30	CP 17	1:5
<i>Mikania glomerata</i> ^o	1:5; 1:10; 1:30; 1:60	CP 20	1:5
Lippia 6	1:5; 1:10; 1:30	CP 21	1:5; 1:10
Mandevilla ^o	1:5; 1:10; 1:30	CP 25	1:5; 1:10
Zeyhenia ^o	1:5; 1:10; 1:30	CP 26	1:5; 1:10
<i>Cordia verbanacea</i> (Cor e = 29)	1:10	CP 27	1:5; 1:10

<i>Bauhinia fortificata</i> ^º	1:1; 1:3; 1:6; 1:5; 1:10; 1:30; 1:60	CP 29	1:5; 1:10
<i>Casearia silvestris</i> ^º	1:10; 1:30	CP 31	1:5; 1:10
<i>Amburana cearensis</i> ^º	1:5; 1:10; 1:30; 1:60	CP 32	1:5
<i>Casearina</i> ^º	1:5; 1:10; 1:30; 1:60	CP 33	1:5; 1:10
<i>Casearia</i> ^º	1:5; 1:10; 1:30; 1:60	CP 37	1:5
Extrato da <i>Casearia</i> (MeOH) ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 39	1:5
Extrato da <i>Casearia</i> (Precipitado) ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 40	1:5; 1:10
Extrato da <i>Casearia</i> (Acetato) ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 41	1:5; 1:10
EtOH Guaçatonga ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 42	1:5; 1:10
Extrato aquoso ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 43	1:5; 1:10
<i>Casearia</i> folhas 20 ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 46	1:5; 1:10
<i>Casearia</i> folhas 21 ^º	1:5; 1:10;	CP 47	1:1; 1:3; 1:5; 1:6; 1:10; 1:12; 1:24
<i>Casearia</i> folhas 22 ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 48	1:5; 1:10
<i>Casearia</i> folhas 23 ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 50	1:5; 1:10
<i>Casearia</i> folhas 25 ^º	1:5; 1:10; 1:30	I1	1:5; 1:10;
<i>Casearia</i> folhas 27 ^º	1:10	I2	1:5; 1:10;
<i>Casearia</i> folhas 28 e 29 ^º	1:5; 1:10; 1:30	I3	1:5; 1:10;
<i>Miconia fallax</i> ^º	1:5; 1:10; 1:30	I4	1:5; 1:10;
<i>Miconia albicans</i> ^º	1:0,1; 1:1; 1:5	I5	1:5; 1:10;
<i>Miconia pipericarpa</i> ^º	1:0,1; 1:1; 1:5	I6	1:5; 1:10;
<i>Tibouchina stenocarpa</i> ^º	1:1; 1:5; 1:10; 1:30	I7	1:5; 1:10;
Raiz eclipta	1:5	CP 52	1:5; 1:10
<i>Stryphnodendron barbatiman</i> ^º	1:0,1; 1:1; 1:5	CP 53	1:5; 1:10
Eclipta ^º	1:5; 1:10; 1:30	CP 54	1:5; 1:10
<i>Calos sapindus</i> Fração acida A1 ^º	1:10; 1:30	CP 55	1:5; 1:10
<i>Calos sapindus</i> MeOH/H ₂ O ^º	1:10; 1:30	P1	1:10
<i>Calos sapindus</i> CH ₂ CL ₂ /MeOH ^º	1:10; 1:30	P2	1:1; 1:3; 1:6; 1:10; 1:12; 1:24
Rp-18 <i>Sapindus</i> ^º	1:10; 1:30	P3	1:1; 1:3; 1:6; 1:10; 1:12; 1:24
Fração A2 <i>Sapindus</i> ^º	1:10; 1:30	P4	1:10
Fração B2 <i>Sapindus</i> ^º	1:10; 1:30	P5	1:10
<i>Sapindus calus</i> 1º F ^º	1:10; 1:20; 1:60	P6	1:10
<i>Sapindus saponaria</i> Calos 1º F ^º	1:10; 1:30	P7	1:10
<i>Sedum Dendroideum</i> ^º	1:5; 1:10; 1:20; 1:30	P8	1:10
<i>Phyllacantus</i> ^º	1:5; 1:10; 1:30		
<i>Eclipta alba</i> - dimetilwedelolactona (Eclidwl) ^º	1:10		
AH (46-65)	1:1; 1:3; 1:5; 1:6; 1:12; 1:24		
AH (1-9)	1:5		
Ah (10-23)	1:5		

Legenda: * amostras do germoplasma,

º extratos e frações de plantas existentes no laboratório

‡ inibidores sintéticos

3.6.8. Edema em camundongos

Grupos de 03 camundongos Swiss machos (18-22g) foram injetados via intradérmica (i.d) na região subplantar da pata direita posterior com 50 µL de soluções contendo diferentes quantidades de venenos brutos e Fosfolipase A2, dissolvidos em PBS. Os venenos foram previamente incubados com os extratos por 30min a 37°C, em diferentes proporções e injetados nos animais. A mensuração da espessura das patas foi realizada previamente, antes da inoculação das amostras (tempo 0 h). Os controles foram realizados com injeções de 50 µL de PBS por animal e apenas extratos na maior concentração para as incubações. Em seguida, a mensuração das patas foi efetuada em diferentes intervalos de tempo após as administrações, 30 min, 1 h e 3 h. Os valores obtidos foram subtraídos dos valores inicialmente aferidos no tempo 0 h. Posteriormente, os resultados foram inseridos em gráficos, onde somente o valor médio e o desvio padrão são apresentados. O aumento do volume na pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0.01 mm (Mytutoyo, Japão) e expresso em percentagem direta de edema induzido (Soares et al., 2000). As plantas avaliadas nos experimentos com veneno total e Fosfolipase A2 estão na tabela 11.

Tabela 11. Plantas avaliadas no teste de edema veneno total e Fosfolipase A2.

Plantas	Concentração avaliada
Mandevila °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Stryphnodendron barbatiman</i> (Barbatimão) °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Casearia sylvestris</i> °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Miconia fallax</i> °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Tibouchina stenoscarpa</i> °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Miconia albicans</i> °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Eclipta prostrata</i> °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Casearia</i> folhas 28 e 29 °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Casearia</i> folhas 23 °	1:5; 1:10; 1:30
Balsamo °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Anacardium humile</i> (AH 46 – 65) °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Bauhinia forficata</i> °	1:5; 1:10; 1:30
Extrato da <i>Casearia</i> (Precipitado) °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Sedum dendroideum</i> 2 (SD2) °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Sedum dendroideum</i> 6 (SD6) °	1:5; 1:10; 1:30
P2 ‡	1:5; 1:10; 1:30
<i>Cordia verbanacea</i> - ácido rosmarinico (CV – AM 28) °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Cordia verbanacea</i> (COR E 29) °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Eclipta</i> - dimetilwedelolactona (DWL) °	1:5; 1:10; 1:30
<i>Eclipta</i> - wedelolactona (WL) °	1:5; 1:10; 1:30
Canafistula *	1:5; 1:10; 1:30

Legenda: * amostras do germoplasma,
 ° extratos e frações de plantas existentes no laboratório,
 ‡ inibidores sintéticos

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aquisição das seqüências

Durante o processo de aquisição das seqüências de *Apis mellifera*, observou-se que existiam aproximadamente 20 seqüências de veneno de proteínas no GenBank. Com intuito de ampliar as análises, seqüências de outras espécies de Apoidea foram obtidas e, posteriormente, foram adicionados outros himenópteros (Tabela 13). Todas as seqüências foram obtidas através do banco de dados público do GenBank. Quando foram utilizados os termos “toxin” e “venom” foram encontradas no total: 44 seqüências de DNA e 86 de proteínas (Tabela 12). Foi possível observar que a maioria das seqüências foram depositadas com o termo “venom”, pois um dos problemas encontrados durante as buscas foi obter seqüências que fossem exclusivas de abelhas e outros himenópteros. Utilizando esse tipo de filtro foram obtidas as seqüências de DNA e proteínas das abelhas e vespas. Entretanto, apenas algumas proteínas do GenBank estão completamente categorizadas. O total de seqüências de DNA e proteínas foi 130, que corresponde ao número de proteínas relacionadas ao veneno do grupo taxonômico Apoidea (Tabela 13). As seqüências obtidas foram filtradas, tendo sido retiradas seqüências redundantes. Durante as análises foram incluídas somente seqüências de DNA e proteínas de abelhas.

Tabela 12. Número total de seqüências separadas por tipo de seqüência e por palavra de busca.

Tipo de seqüência	Palavra		Total
	Toxin	Venom	
DNA	2	42	44
Proteína	15	71	86

Tabela 13. Número de seqüências separadas por tipo de seqüência e espécie.

Apoidae	Tipo de seqüência	
	DNA	Proteína
Secapin		
<i>Apis mellifera</i>	3	6
<i>Apis cerana cerana</i>	1	1
Phospholipase A2		
<i>Apis cerana</i>	0	1
<i>Apis mellifera</i>	3	6
<i>Bombus terrestris</i>	0	1
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	0	1
<i>Apis dorsata</i>	0	1
Melittin		
<i>Apis mellifera</i>	1	6
<i>Apis cerana cerana</i>	2	3
<i>Apis cerana</i>	0	1
<i>Apis dorsata</i>	0	1
<i>Apis flórea</i>	0	1
Mast cell degranulating		
<i>Apis mellifera</i>	2	4
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	0	1
<i>Apis cerana cerana</i>	1	1
<i>Bombus SP</i>	0	1
Hyaluronidase		
<i>Apis mellifera</i>	3	6
<i>Apis cerana cerana</i>	1	1
Apamin		
<i>Apis mellifera</i>	2	4
<i>Apis cerana cerana</i>	1	1
Acid phosphatase		
<i>Apis mellifera</i>	4	4
Protease		
<i>Apis mellifera</i>	0	4
Tertiapin		
<i>Apis mellifera</i>	0	3
Seqüências de DNA sem classificação		
<i>Apis mellifera</i>	14	10
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	0	5

Todas as seqüências selecionadas foram categorizadas por espécie com intuito de se observar a diversidade de organismo e gêneros representados em cada tipo de proteína (Tabela 13). As seqüências obtidas foram categorizadas de acordo com o tipo de proteína, entretanto algumas proteínas provenientes do GenBank não possuíam uma classificação definida, sendo possível, com o desenvolvimento do sistema e categorização do banco de dados, auxiliar na anotação de proteínas sem classificação. Conforme o esperado, o organismo que apresenta o maior número de proteínas é a *Apis mellifera*, demonstrando a sua grande importância e o quanto tem sido estudada diferente de outras abelhas.

A aquisição das seqüências é muito importante para construção do banco, pois fornece as informações para criação do banco de dados. Foi observado, durante o processo de aquisição das seqüências, que não existia até o momento, nenhum banco de dados que contivesse somente informações a respeito de abelhas e outros himenópteros. Entretanto, há denominado um banco de dados com informações gerais e seqüências de venenos de animais chamado *BioVenom* (Puga, 2008). Outros bancos de veneno encontrados estavam relacionados a outros animais. O depósito de informações de abelhas em um único banco de dados público e disponível por meio da *internet* é de grande importância.

4.2. Aquisição das estruturas protéicas

As estruturas foram obtidas por meio do banco de dados públicos do PDB (www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Foram realizadas buscas com o termo “venom” e “toxin”. Foram escolhidas somente estruturas que pertenciam a *Apis mellifera* (Tabela 14). As estruturas de Melitina e Fosfolipase A2 obtidas foram utilizadas nas análises de modelagem e *docking*.

Tabela 14. Lista das estruturas encontradas no PDB, separadas por proteína, com nome do depósito, método de obtenção, a espécie, a resolução e a data do depósito.

Toxina	Número (PDB)	Métodos experimentais	Organismo	Resolução (angstrom)	Ano do depósito
Melitina	2MLT	Cristalografia de Raios-X	Construção sintética	2.00	15/10/1990
	1BH1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	<i>Apis mellifera</i>	X	06/01/1999
Fosfolipase A2	1POC	Cristalografia de Raios-X	<i>Apis mellifera</i>	2.00	07/09/1992
Tertiapina	1TER	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	<i>Apis mellifera</i>	X	08/04/1994
Hialuronidase	1FCQ	Cristalografia de Raios-X	<i>Apis mellifera</i>	1.60	01/10/2001
	1FCU	Cristalografia de Raios-X	<i>Apis mellifera</i>	2.10	01/10/2001
	1FCV	Cristalografia de Raios-X	<i>Apis mellifera</i>	2.65	01/10/2001
	2J88	Cristalografia de Raios-X	<i>Apis mellifera</i>	2.60	23/10/2006

Nos estudos de estruturas protéicas terciárias foi observada uma pequena quantidade de proteínas de *Apis mellifera*, apesar de ser uma abelha muito estudada. Durante a aquisição das seqüências de DNA e proteínas, nove tipos de proteínas diferentes foram encontrados; entretanto, somente quatro tipos de proteínas foram encontrados no PDB, demonstrando a possibilidade de novos estudos estruturais com as proteínas ainda não avaliadas. Em relação às proteínas disponíveis no PDB, as proteínas majoritárias do veneno da abelha já estão disponíveis, que são: Fosfolipase A2 e Melitina.

4.3. Desenvolvimento do Sistema

O desenvolvimento de um sistema em que se concentrem somente informações de abelhas é de grande importância, devido ao número cada vez maior de acidentes por abelhas. Desta forma, a criação e a existência deste banco de dados públicos vêm ocupar uma lacuna existente nos bancos de dados disponíveis. As informações contidas neste sistema auxiliariam os estudos com veneno de abelhas, uma vez que o objetivo do é obter e concentrar informações de experimentos *in vitro*, *in silico* e *in vivo* de inibição do veneno de abelhas.

O sistema *Bee Venom* (<http://gbi.fmrp.usp.br/bee venom/>) está finalizado. Entretanto o sistema permanecerá em constantes atualizações para suprimento de uma maior quantidade de dados, que ocorrerá por meio de colaborações. No sistema, as informações de plantas medicinais, proteínas e estruturas de venenos de abelhas, referências e dados laboratoriais coletados de bancos de dados públicos continuam sendo inseridas e categorizadas. As seqüências de proteínas de venenos de abelhas e vespas foram coletadas de bancos de dados público, como NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Sirotkin, 2006). As estruturas protéicas foram obtidas no banco de dados públicos do PDB, os dados de plantas medicinais obtidos do banco de dados público como Brazilian-Plants (Hashimoto, 2002), as referências obtidas por meio do levantamento bibliográfico do PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed>). Os dados laboratoriais foram obtidos por meio de experimentos laboratoriais realizados durante a realização desse projeto. Já as informações a respeito das proteínas de veneno de *Apis mellifera* foram obtidas através de artigos e do banco de dados públicos do UniProt (<http://beta.uniprot.org/>). Os dados de acidentes com abelhas foram obtidos através dos bancos de dados públicos de saúde do Brasil: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), DATASUS e outros. Os *Links* sugeridos no sistema são de *sites* visitados durante a realização do projeto. A ferramenta Clustal foi inserida no sistema para auxiliar as análises. Esses dados foram submetidos até o momento ao sistema que já está apto a receber dados de colaboradores cadastrados.

A tela principal do sistema (Figura 17) contém informações sobre o projeto (*Group*, *Project*, *Contact Information* e *site map*). Ainda na tela principal, o *link Categories* é um dos tipos de visualização do conteúdo público do sistema através das categorias. O *link Categories* utiliza o módulo *taxonomy_dhtml* do Drupal para separar e quantificar todo o conteúdo usando os termos das categorias (Figura 17). Na Figura 17a, pode-se visualizar o *menu* do sistema com todos os conteúdos existentes. Em 17b vê-se o número dados depositados no *site* até o momento. Na Figura 17c, observa-se a parte do sistema onde

pode-se fazer buscas há um outro *menu* que fica no topo da página e na Figura 17d, observa-se um *link* para acesso rápido aos diversos tipos de categorias. Já na Figura 17e, pode-se ver o link para registro no sistema e *login* para os usuários colaboradores cadastrados. Os artigos encontrados *Pubmed* podem também observados (Figura 17f).

O *site map* permite observar toda a estrutura do sistema, visualizando a quantidade de informação em cada categoria. É uma forma de visualizar os diversos tipos de categorias. Na Figura 18, pode-se visualizar a categoria *protein*, onde está apresentado o número de ocorrências de cada termo, e acessar, de forma rápida, os conteúdos presentes no sistema.

The screenshot shows the homepage of the Bee Venom database. The browser address bar displays <http://gbi.fmp.usp.br/bee venom/>. The page features a navigation menu on the left with links to Home, Group, Contact information, and Site map. A search bar is located at the top left. The main content area is divided into several sections:

- Menu (a):** A list of categories including Proteins, Sequence, Structure, Anti-Venom plants, Laboratorial Data, Bee's Accidents (Statistics), Tools, Bee venom references, Links, and Animal datalist.
- Statistics (b):** A table showing the distribution of data across different categories:

Category	Percentage	Count
Sequence	94.44%	(408)
Plant	2.78%	(12)
Structure	1.85%	(8)
Bee venom references	0.93%	(4)
- Navigation (c):** A section with a link to News aggregator.
- User login (e):** A form for logging in with fields for Username and Password, and a Log in button. Below the form are links for Create new account and Request new password.
- Structure, Sequence, Laboratorial Data, Tools, BV References, Bee's Accidents (Statistics) (d):** A grid of icons and links for quick access to different data types. Each icon has a 'View' link next to it.
- PubMed (f):** A section displaying a list of articles from PubMed, including titles like 'JNK pathway is involved in the inhibition of inflammatory target gene expression and NF-kappaB activation by melittin'.

At the bottom of the page, there are logos for FAPESP, CNPq, and FAEPA, along with the text 'Grupo de Bioinformática'.

Figura 17. Tela inicial do sistema *Bee Venom*. a) *site* para os tipos de visualização do conteúdo. b) visualização do número de dados de seqüências, plantas, referências e de dados laboratoriais cadastrados, c) módulo de busca simples por palavra chave, d) acesso rápido aos diversos tipos de categorias e) *site* para registro no sistema e *login* para os usuários colaboradores cadastrados; f) Artigos do Pubmed inseridos no sistema.

Protein

- Acid phosphatase (10)
- Apamin (7)
- Chitinase (2)
- Cysteine rich (7)
- Hyaluronidase (39)
- Hydrolase (6)
- Inhibitor (9)
- Mast cell degranulating (56)
- Melittin (33)
- Other (1)
- Permease (1)
- Phenoloxidase (3)
- Phospholipase A1 (8)
- Phospholipase A2 (29)
- Polistinae (5)
- Protease (182)
- Secapin (17)
- Tertiapin (3)

Animal

- Bee (154)
- Wasp (239)
- Other Animal (25)

Scientific name (animal)

- Agelaia pallipes (1)
- Anterhynchium flavomarginatum micado (1)
- Apis cerana (2)
- Apis dorsata (2)
- Apis florea (1)
- Apis mell (0)
- Apis mellifera scutellata (1)

Figura 18. Tela do *site map* do projeto *Bee Venom*. a) Categorias existentes no sistema b) Termo criados nas categorias contendo o número de informações depositadas sobre o termo. c) Termos criados nas categorias contendo informação a respeito das espécies de animais.

Os dados submetidos podem ser visualizados utilizando os recursos disponíveis no sistema como: busca simples por palavras-chaves, por nomes e relacionando termos das categorias ou busca avançada, que permite acessar conteúdos específicos do sistema (Figura 19). Todos esses dados armazenados já foram publicados e definidos como público.

Search

Enter your keywords:

▼ **Advanced search**

<p>Containing any of the words:</p> <input type="text"/>	<p>Only in the category(s):</p> <div> Protein Acid phosphatase Apamin Chitinase Cysteine rich Hyaluronidase Hydrolase Inhibitor Mast cell degranulating Melittin </div>	<p>Only of the type(s):</p> <ul style="list-style-type: none"> ☐ Bee venom references ☐ Laboratorial Data ☐ Page ☐ Plant ☐ Poll ☐ Sequence ☐ Story ☐ Structure
<p>Containing the phrase:</p> <input type="text"/>		
<p>Containing none of the words:</p> <input type="text"/>		

Figura 19. Tela inicial de formulário de busca dentro do banco de dados do *Bee Venom*, onde pode ser feita uma busca simples ou uma busca avançada.

A visualização por *statistics* é a forma mais simples e rápida de interagir com os dados. A parte de *statistics* pode-se visualizar os termos nos diversos conteúdos existentes no sistema e quantificar o número de ocorrências de cada um dos termos dos conteúdos selecionados, por cada categoria (Figura 20). Com base nas categorias é possível realizar uma busca relacionando os termos das diferentes categorias. Os resultados decorrentes das diversas formas de busca no sistema exibem informações com títulos e outras informações relacionadas à pesquisa, podendo relacionar a busca com conteúdos específicos. O *statistics* permite uma busca clara e dinâmica, devido à interação dos dados selecionados, obtidos através das categorias e termos.

Figura 20. Visualização do *Statistics* do sistema, onde é possível visualizar todos os conteúdos. a) Conteúdo do sistema *Bee Venom*. b) a porcentagem do termo relacionada aos outros da mesma categoria e o número total de ocorrências dele.

O *Animal data list* é um tipo de busca específica e eficiente que utiliza termos de várias categorias e relaciona com o tipo de conteúdo existente no banco de dados do sistema, disponibilizando, assim, o agrupamento dos termos desejados, criando uma busca filtrada e específica por meio de termos (Figura 21).

The screenshot displays the 'Animal datalist' interface. At the top, a search bar contains the query: `venom/list_sequence?op0=AND&filter0=Apis+mellifera&op1=AND&filter1%5B%5D=438`. Below the search bar, the 'Animal datalist' title is followed by buttons for 'View', 'Edit', 'Clone', and 'Export'. The interface is divided into two main sections, labeled 'a' and 'b'.

Section a: This section shows the search filters. On the left, under 'Scientific name (animal)', there is a dropdown menu set to 'Is All Of' and a text input field containing 'Apis mellifera'. On the right, under 'Content type', there is a dropdown menu set to 'Is One Of' with a list of options: '<All>', 'Bee venom references', 'Laboratorial Data', 'Plant', 'Sequence' (which is highlighted), and 'Structure'.

Section b: This section displays the search results. It lists several entries, each with a title and a 'Content type' of 'Sequence'. The entries include:

- prepromelittin [Apis mellifera]
- PREDICTED: similar to radish CG4346-PA [Apis mellifera]
- PREDICTED: similar to Furin-like protease 1, isoforms 1/1-X/2 precursor (Furin-1) (Kex2-like endoprotease 1) [Apis mellifera]
- PREDICTED: similar to Signal peptide protease CG11840-PA [Apis mellifera]
- PREDICTED: similar to snake CG7996-PA [Apis mellifera]
- Apis mellifera hyaluronidase (LOC406146), mRNA [Apis mellifera]
- mast cell-degranulating peptide preproprotein [Apis mellifera]
- HUGA_APIME Hyaluronoglucosaminidase precursor (Hyaluronidase) (Hya) (Allergen Api m 2) (Api m II) [Apis mellifera]
- A Chain A, Crystal Structure Of Bee-Venom Phospholipase A2 In A Complex With A Transition-State Analogue [Apis mellifera]

Figura 21. Visualização do *Animal datalist* do sistema, permite realizar buscas em todos os conteúdos relacionados às espécies animais. a) Filtro usado para a busca. b) Resultado da busca.

O *Proteins* permite visualizar os tipos de proteínas existentes no veneno de abelhas, sendo divididas de acordo com o tamanho da proteína: peptídeo e enzimas. Cada proteína possui uma descrição detalhada, que permite visualizar todas as informações obtidas através do banco de dados públicos do Uniprot (<http://beta.uniprot.org/>) e artigos científicos (Figura 22 e Figura 23). Nas páginas das proteínas existem *sites* para as seqüências e estruturas depositadas no banco de dados do *Bee Venom* (Figura 24). Alguns artigos citados nas referências foram adicionados no sistema *Bee Venom* no conteúdo de referências de abelhas. Entretanto, a página de *proteins* não está completa, pois novas proteínas têm sido identificadas com técnicas mais precisas (Peiren et al., 2005) e, à medida que novas proteínas forem identificadas, elas serão adicionadas ao sistema.

Home Group Contact information Site map

Search

Menu

- Proteins
 - Acid phosphatase
 - Allergen Api m 6
 - Apamin
 - Carbohydrate-rich
 - Hyaluronidase
 - Melittin
 - Phospholipase A2
 - Protease
 - Secapin
 - Tertiapin
- Sequence
- Structure
- Anti-Venom plants
- Laboratorial Data
- Bee's Accidents (Statistics)
- Tools
- Bee venom references
- Links
- Animal datalist

Statistics

Sequence

94.44% (408)

Plant

Home

Proteins

Apis mellifera venom is composed of high molecular weight molecules - enzymes with a molecular weight higher than 10.0 kDa and peptides (with low molecular weight).

Peptide:

- Melittin
- Apamin
- Tertiapin

Enzyme:

- Phospholipase A2
- Secapin
- Hyaluronidase
- Acid phosphatase
- Allergen Api m 6
- Protease
- Carbohydrate-rich

Figura 22. Tela de visualização do *Proteins*. Lista das proteínas cadastradas no sistema, sendo divididas em peptídeos (a) e enzimas (b).

Home Group Contact information Site map

Search

Menu

- Proteins
 - Acid phosphatase
 - Allergen Api m 6
 - Apamin
 - Carbohydrate-rich
 - Hyaluronidase
 - Melittin
 - Phospholipase A2
 - Protease
 - Secapin
 - Tertiapin
- Sequence
- Structure
- Anti-Venom plants
- Laboratorial Data
- Bee's Accidents (Statistics)
- Tools
- Bee venom references
- Links
- Animal datalist

Statistics

Sequence

94.44% (408)

Home > Proteins

Melittin

Melittin is the best characterized peptide. It has alkaline characteristics similar to other venom compounds and seems to be the major responsible for intense local pain. It correspond to 40- 50 % of venom dry weight, although this varies during aging. Chemically, it is considered one of the most interesting peptides studied to date. It has 26 amino acid residues with amphipath characteristics (polar and non-polar ends), which allows it to interact with lipid membranes, which in turn, can increase permeability of the erythrocytes and other cell membranes. Its tetrameric form is believed to have ionophore properties being responsible for constant skin nerve terminal depolarization that causes pain from the sting. Although most experimental works had demonstrated melittin lytic action on erythrocytes, this peptide can also trigger lysis in many cell types and intercellular membranes, such as lysosomes, with subsequent enzyme release, as demonstrated by Hegner. Melittin also present fungicide and antibiotic action against several microorganisms.

Names and origin

Protein names:

- Melittin [Precursor]

Also known as:

- Allergen Api m 3
- Api m III

Gene names:

Figura 23. Tela de visualização da proteína Melitina. É possível observar uma pequena descrição da proteína Melitina (a) e algumas informações a respeito da origem da Melitina (b)

Feature key Position(s) Length

Helix 45 - 53 9

Helix 55 - 68 14

Sequence: P01501 Length(aa): 77 Mass (Da): 7,585

10 20 30 40 50 60

MKFLVNVAV FMVVVISYIY AAEPEPEAPE PEAEADAEAD PEAGIGAVLK VLTITGLPALI

70

SWIKRGRQQG

Links

Sequence

Structure

Reference

1 "Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin."
Vlasak R., Unger-Ullmann C., Kreil G., Frischauf A.-M. Eur. J. Biochem. 135:123-126(1983) [PubMed: 6309516] [Abstract]
Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE [MRNA].

2 "Sequence analysis of melittin from tryptic and peptic degradation products."
Habermann E., Jentsch J. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348:37-50(1967) [PubMed: 5592400] [Abstract]
Cited for: PROTEIN SEQUENCE OF 44-69 (MELITTIN 1 AND 2), AMIDATION AT GLN-69.

Figura 24. Continuação da tela de visualização da proteína Melitina. Destacados os *links* para as proteínas e estruturas depositadas em seqüências e estruturas dentro do sistema *Bee Venom*.

O *sequence* permite visualizar todas as seqüências depositadas no banco de dados do *Bee Venom*. Este tipo de visualização lista o título e o tipo de seqüência, a espécie e nome de proteína (Figura 25), sendo possível filtrar pelo nome da espécie e pelo nome da proteína. Nas seqüências depositadas, é possível observar todas as informações relativas à seqüência como: tipo de animal, gênero do animal, nome científico, proteína, tipo de seqüência, número de acesso e a seqüência fasta (Figura 26). Durante o processo de submissão, alguns termos da proteína foram depositados como categoria. Sendo assim, na visualização das seqüências é possível ver as palavras chaves (*tag*), o que permite listar todo o conteúdo depositado nas seqüências relacionado com os termos, facilitando a busca dentro do sistema para listar informações relacionadas.

Sequence

View Edit Clone Export

a

Species Protein

Is All Of Is All Of

Submit

Apamin

b

Title	Species	Protein	Sequence Type
Apamin [Apis mellifera]	Apis mellifera	Apamin	Amino acid
Apamin preproprotein [Apis mellifera]	Apis mellifera	Apamin	Amino acid
APAM_APIIME Apamin precursor [Apis mellifera]	Apis mellifera	Apamin	Amino acid
APAM_APICC Apamin precursor [Apis cerana cerana]	Apis cerana cerana	Apamin	Amino acid
Apamin - worker bees, venom glands, mRNA Partial, 304 nt [Apis mellifera]	Apis mellifera	Apamin	Nucleotide
Apis mellifera apamin protein (Apamin), mRNA [Apis mellifera]	Apis mellifera	Apamin	Nucleotide
Apis cerana cerana preproapamin mRNA, complete cds [Apis cerana cerana]	Apis cerana cerana	Apamin	Nucleotide

Figura 25. Tela de visualização das seqüências de proteína depositadas no sistema. As seqüências de proteína foram obtidas no banco de dados públicos do Genbank. a) Filtro para busca de seqüências através da espécie e proteína. b) Tela com resultado de uma busca da proteína Apamina existente no sistema.

The screenshot shows the 'Venom' database interface. The main content area displays the entry for 'Apamin [Apis mellifera]'. The title is highlighted with a red box and labeled 'a'. Below the title, the tags 'Tagged: Apamin • Bee • Apis • Apis mellifera • Amino acid • Sequence' are highlighted with a red box and labeled 'b'. The protein information section, including 'Animal: Bee', 'Genus animal: Apis', 'Scientific name: Apis mellifera', 'Protein: Apamin', 'Sequence type: Amino acid', and 'Accession: AAB3440', is highlighted with a red box and labeled 'c'. The FASTA sequence is also visible below this section.

Figura 26. Tela de visualização da sequência da proteína Apamina. Todas as informações da proteína obtidas no banco de dados públicos do GenBank. a) Título escolhido durante o depósito da sequência. b) Tags que foram criadas durante o depósito da sequência ao sistema que permitem buscas rápidas. c) Informações à respeito da proteína Apamina.

O *structure* permite visualizar informações e as estruturas protéicas existentes depositadas no banco de dados do *Bee venom*. No *structure*, as proteínas são listadas com o título, tipo de estrutura, proteína e espécie, sendo possível filtrar por proteínas e espécies (Figura 27). As informações contidas nas estruturas correspondem às informações relativas à forma de obtenção da estrutura, autores, informações à respeito da publicação relacionada à estrutura, informações da abelha e verificar a existência de algum ligante relacionado a essa molécula (Figura 28 e Figura 29). Imagens relativas às estruturas depositadas no *Bee Venom* estão disponíveis para visualização, sendo possível visualizar a estrutura 3D do arquivo pdb através do programa Webmol (Walther, 1997) (Figura 30). Durante o processo de submissão alguns termos da estrutura foram depositados como categoria, desta maneira na visualização das estruturas é possível ver as palavras chaves (*tag*), que permitem listar todo o conteúdo depositado nas estruturas relacionado com os termos, dessa forma facilita a busca dentro do sistema para listar informações relacionadas.

A página de *structure* contém, atualmente, somente estruturas de proteínas, mas o objetivo é ter todas as informações de estruturas inclusive ligantes que causem a inibição das proteínas do veneno. Dessa forma, o sistema conteria informações sobre experimentos *in silico* com venenos de abelhas, por exemplo, *docking*. Atualmente, o sistema possui campos para depósitos somente dos ligantes e durante o desenvolvimento do trabalho alguns ligantes foram encontrados; entretanto, serão submetidos ao sistema somente após a publicação dos experimentos *in silico*. Os dados dos experimentos *in silico* podem vir a auxiliar nos experimentos *in vitro*.

Home Group Contact information Site map

Search

Home

Structure

Protein Species

Is All Of Is All Of Submit

Title	Type of Structure	Protein	Species
Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue	Protein	Phospholipase A2	Apis mellifera
Solution structure of Tertiapin determined using nuclear magnetic resonance and distance geometry	Protein	Tertiapin	Apis mellifera
Structural studies of d-pro Melittin, nmr, 20 structures	Protein	Melittin	Apis mellifera
Melittin	Protein	Melittin	Apis mellifera
Crystal structure (monoclinic) of bee venom Hyaluronidase	Protein	Hyaluronidase	Apis mellifera
Crystal structure (trigonal) of bee venom Hyaluronidase	Protein	Hyaluronidase	Apis mellifera
Crystal structure of bee venom Hyaluronidase in complex with hyaluronic acid tetramer	Protein	Hyaluronidase	Apis mellifera

Figura 27. Tela de visualização das estruturas de proteínas de veneno. Todas as informações das proteínas foram obtidas no banco de dado público do PDB. a) Filtro para busca de seqüências através da espécie e proteína. b) As estruturas de proteínas depositadas no sistema.

Home

Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue

By admin - Posted on May 9th, 2008

Tagged: Phospholipase A2 • Bee • Apis mellifera • 3.1.1.4 • Hydrolase • Otwinowski Z. • Protein • Scott D. L. • Sigler P.B. • Structure • TRANSITION-STATE ANALOGUE • X-ray crystallography

Structure (Authors)

Structure (Authors):

Otwinowski Z.
Sigler P.B.
Scott D. L.

Protein Information

Protein: Phospholipase A2
Classification : Hydrolase
EC Number: 3.1.1.4

Type of Structure:

Protein

Animal Information

Animal: Bee
Scientific Name: Apis mellifera

Figura 28. Tela de visualização da estrutura da proteína Fosfolipase A2. Todas informações, das proteínas foram obtidas no banco de dado público do PDB. a) Título escolhido durante o depósito da estrutura da proteína. b) Tags que foram criadas durante o depósito da estrutura da proteína no sistema que permitem buscas rápidas. c) Informações a respeito da estrutura da proteína Fosfolipase A2.

Figura 29. Tela de visualização da estrutura da proteína Fosfolipase A2. Todas as informações das proteínas foram obtidas no banco de dado público do PDB. a) Imagens no formato jpg da proteína Fosfolipase A2 b) Site para visualizar a proteína Fosfolipase A2 com Webmol. c) Imagem no formato jpg do ligante da Fosfolipase A2.

Figura 30. Tela de visualização da estrutura da proteína Fosfolipase A2 em imagem 3D através do programa Webmol.

O *anti-venom plants* possibilita visualizar todas as plantas depositadas no sistema que possuem atividade antiveneno identificadas. O *anti-venom plants* lista o título, a família da planta e espécies (Figura 31), sendo possível filtrar por espécie e família. As informações em *anti-venom plants* inclui campos sobre a família, espécie da planta, parte da planta utilizada contra o veneno, nome científico, características e imagens das plantas (Figura 32). Durante o processo de submissão, alguns termos das plantas foram depositados como categorias, sendo assim, na visualização das plantas é possível ver as palavras chaves (*tag*), que permitem listar todo o conteúdo depositado nas plantas relacionado com os termos, dessa forma facilita a busca dentro do sistema para listar informações relacionadas.

Durante os experimentos *in vitro*, foram identificadas plantas que possuem atividade antiveneno; entretanto, serão inseridas no sistema somente depois de terem sido submetidas à publicação.

The screenshot shows the 'Anti-Venom Plants' section of the Bee Venom website. The page has a navigation bar with links: Home, Group, Contact information, Site map. Below the navigation bar is a search bar and a menu. The menu includes links to Proteins, Sequence, Structure, Anti-Venom plants, Laboratorial Data, Bee's Accidents (Statistics), Tools, Bee venom references, Links, and Animal datalist. The Statistics section shows the following data:

Category	Percentage	Count
Sequence	94.44%	(408)
Plant	2.78%	(12)
Structure	1.85%	(8)
Bee venom references	0.93%	(4)

The Anti-Venom Plants section is highlighted with a red box (a). It contains a search bar with 'Is All Of' dropdowns for Species and Family, and a Submit button. Below the search bar is a table of plants, also highlighted with a red box (b). The table has three columns: Title, Family, and Species.

Title	Family	Species
Echinodorus ellipticus	Alismataceae	Echinodorus ellipticus
Arctium lappa	Compositae	Arctium lappa
Erythroxylum anguifugum	Erythroxylaceae	Erythroxylum anguifugum
Licaria puchury-major	Lauraceae	Licaria puchury-major
Sida acuta	Malvaceae	Sida acuta
Sida cordifolia	Malvaceae	Sida cordifolia
Maranta arundinacea	Marantaceae	Maranta arundinacea
Carapa guianensis	Meliaceae	Carapa guianensis
Ouratea hexasperma	Ochnaceae	Ouratea hexasperma
Oxalis corniculata	Geometroidea	Oxalis corniculata
Elaeis oleifera	Noctuoidea	Elaeis oleifera
Clematis montevidensis	Ranunculaceae	Clematis montevidensis

Figura 31. Tela de visualização dos dados de plantas com atividade antiveneno. Todas as informações da proteína foram obtidas nos bancos de dados públicos. a) Filtro para busca de plantas através da espécie e família. b) As plantas depositadas no sistema *Bee Venom*.

Home Group Contact information Site map

Search

Menu

- Proteins
- Sequence
- Structure
- Anti-Venom plants
- Laboratorial Data
- Bee's Accidents (Statistics)
- Tools
- Bee venom references
- Links
- Animal datalist

Statistics

Sequence

94.44% (408)

Plant

2.78% (12)

Structure

1.85% (8)

Bee venom references

0.93% (4)

About admin

Full name

Daniel Macedo de Melo Jorge

Institution

University of Sao Paulo

Navigation

Home

Echinodorus ellipticus **a**

By admin - Posted on May 12th, 2008

Tagged: Alismataceae • Brazil • Echinodorus ellipticus • Leaves • Plant **b**

Plant information

Family: Alismataceae

Distribution: South America

Activity:

Country: Brazil

Part of plant used: Leaves

Scientific name: Echinodorus ellipticus

Characteristic:

Plants annual or perennial, emerged, floating-leaved, or rarely submersed, glabrous to stellate-pubescent; rhizomes present or absent; stolons absent; corms absent; tubers absent. Leaves sessile or petiolate; petioles triangular, rarely terete; blade with translucent markings as dots or lines present or absent, linear to lanceolate to ovate, base attenuate to cordate, margins entire or undulating, apex obtuse to acute. Inflorescences racemes or panicles, rarely umbels, of 1--18 whorls, erect or decumbent, emerged; bracts coarse, apex obtuse to acute, surfaces smooth or papillose along veins, apex obtuse to acute. Flowers bisexual, subsessile to pedicellate; bracts subtending pedicels, subulate to lanceolate, shorter than to longer than pedicels, apex obtuse to acute; pedicels ascending to recurved; receptacle convex; sepals recurved to spreading, herbaceous to leathery, sculpturing absent; petals white, entire; stamens 9--25; filaments linear, glabrous; pistils 15--250 or more, spirally arranged on convex receptacle, forming head, distinct; ovules 1; style terminal or lateral. Fruits plump, often longitudinally ribbed, sometimes flattened, rarely abaxially keeled, abaxial wings absent, lateral wings absent, glands often present.

c

Figura 32. Tela de visualização dos dados de plantas com atividade antiveneno. Todas as informações das proteínas foram obtidas nos bancos de dados públicos. a) Título escolhido durante o depósito da planta. b) Tags que foram criadas durante o depósito da planta no sistema que permitem buscas rápidas. c) Informações a respeito da planta *Echinodorus ellipticus*.

O *laboratorial data* contém informações relativas a experimentos *in vitro* e *in vivo* que foram realizados para inibir proteínas de veneno de abelha. O *laboratorial data* lista os experimentos por título e proteínas avaliadas (Figura 33). Entretanto, não foram depositados resultados ainda, pois será necessária a publicação para, posteriormente, serem disponibilizados na *internet*.

Resultados.doc - Microsoft Word

http://gbi.fmrp.usp.br/bee venom/laboratorial_data

Bee Venom

Home Group Contact information Site map

Search

Home

Laboratorial data

Menu

- Proteins
- Sequence
- Structure
- Anti-Venom plants
- Laboratorial Data
- Bee's Accidents (Statistics)
- Tools
- Bee venom references
- Links
- Animal datalist

Statistics

Sequence

94.44% (408)

Plant

2.78% (12)

Structure

1.85% (8)

Bee venom references

0.93% (4)

Figura 33. Tela de visualização dos dados laboratoriais do sistema *Bee Venom*.

O *Bee's accidents (statistics)* tem por objetivo mostrar aos usuários, estatísticas de acidentes com abelhas no mundo e no Brasil. Os dados de acidentes do Brasil foram levantados e serão inseridos no sistema *Bee Venom*.

O *Tools* visa disponibilizar para o usuário ferramentas de bioinformática. Atualmente, a única ferramenta disponível é de alinhamento de seqüências, sendo possível submeter um grupo de seqüências e gerar o alinhamento das mesmas (Figura 34). Entretanto à medida que houver necessidade outras ferramentas serão inseridas.

Figura 34. Tela de visualização das Tools do sistema *Bee Venom*. Em destaque a ferramenta disponível até o momento, que é o clustalw.

O *Bee Venom Reference* visa centralizar e divulgar todas as informações sobre estudos com veneno de abelhas, sendo possível submeter: livros, notícias e referências. O *Bee Venom Reference* lista todas as referências depositadas no sistema. É possível ver o título, a área de estudo e o tipo de referência, podendo ser filtradas através do tipo de referência e autores (Figura 35). Durante o processo de submissão alguns termos das referências foram depositadas como categorias, sendo assim, na visualização das referências é possível observar as palavras chaves (*tag*), que permitem listar todo o conteúdo depositado nas referências relacionado com os termos. As palavras chaves facilitam a busca dentro do sistema para listar informações relacionadas.

Bee Venom

Home Group Contact information Site map

Search

Home

Bee venom Reference

Type of reference **Authors**

Is All Of Is All Of Submit

Title	Field of study	Type of reference
Animais Peçonhentos no Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes	Toxinology	Book
Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue	Biochemistry	Paper
Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons	Toxinology	Book
Allergy to bee venom in beekeepers in Germany.	Toxinology	Paper

Menu

- Proteins
- Sequence
- Structure
- Anti-Venom plants
- Laboratorial Data
- Bee's Accidents (Statistics)
- Tools
- Bee venom references
- Links
- Animal datalist

Statistics

Sequence

94.44% (408)

Plant

2.78% (12)

Structure

1.85% (8)

Bee venom references

0.93% (4)

Navigation

News aggregator

Figura 35. Tela de visualização dos dados de referências sobre veneno de abelhas. Todas informações da proteína obtidas nos bancos de dados públicos. a) Filtro para busca de referências através do tipo de referência e autores. b) Tela inicial das referências de abelhas.

O *links* permite visualizar os diversos bancos de dados públicos disponíveis na internet com conteúdo relacionado ao *Bee Venom* (Figura 36), juntamente com os utilizados para desenvolvimento do sistema.

Bee Venom

Home Group Contact information Site map

Search

Home

Links

Bee

Honey Bee Genome Project

Bioinformatics Database

NCBI

PDB

DDBJ

EMBL

SWISS-PROT

PDB

Uniprot

Bioinformatics on-line tools

Blast

Clustal

Phylip

Software

Modeller

Bee's Accidents (Statistics)

SINITOX

DATASUS

Menu

- Proteins
- Sequence
- Structure
- Anti-Venom plants
- Laboratorial Data
- Bee's Accidents (Statistics)
- Tools
- Bee venom references
- Links
- Animal datalist

Statistics

Sequence

94.44% (408)

Plant

2.78% (12)

Structure

1.85% (8)

Bee venom references

0.93% (4)

Navigation

News aggregator

Figura 36. Tela de visualização do *Links*.

Para acessar os dados públicos por qualquer tipo de visualização não é necessário utilização de registro de usuário, mas para inserir, alterar e remover dados do sistema é necessário o registro. Portanto, para cadastrar um novo usuário no sistema, deve-se preencher o formulário disponível no sistema (Figura 37) que se encontra no site *Register* (Figura 17 E). Neste formulário, é obrigatório o preenchimento de informações pessoais, profissionais, nome de usuário e endereço de *e-mail*, para onde a senha para acessar o sistema será enviada.

User account

☐ Create new account

Account information

Username: *

Your preferred username; punctuation is not allowed except for periods, hyphens, and underscores.

E-mail address: *

A valid e-mail address. All e-mails from the system will be sent to this address. The e-mail address is not made public and will only be used if you wish to receive a new password or wish to receive certain news or notifications by e-mail.

Personal information

Full name: *

Country:

City:

State:

Contact e-mail: *

Professional information

Profession:

Institution:

Country:

City:

State:

Figura 37. Formulário para cadastro de usuários. Informações pessoais e profissionais são obrigatórias para o cadastro, um nome de usuário e e-mail para onde a senha de acesso será enviada.

Após o cadastro no sistema, o novo usuário poderá acessar as propriedades de conteúdo e enviar seus próprios dados para o sistema.

Para enviar dados de plantas (Figura 39), seqüências de proteínas de venenos de abelhas e vespas ao sistema (Figura 38), estrutura de proteínas de veneno de abelhas (Figura 40 e 41), dados laboratoriais (Figura 42) e referências de sobre abelhas (Figura 43), primeiramente, deve-se categorizar os dados que serão inseridos. Portanto, foram atribuídas

categorias no sistema que melhor representem e recuperem os dados que estão sendo inseridos no sistema. No momento de enviar um conteúdo, é necessário que se faça uma categorização dos dados, pois o sistema de busca interage, diretamente, com as categorias e termos em que estiverem relacionados. Caso não exista um termo específico na categoria selecionada no momento de classificar os dados, é possível a utilização de categorias do tipo livre, sendo necessário que o curador revise os dados submetidos no sistema, possibilitando, assim, o uso deste termo em outros conteúdos. Os campos e categorias escolhidos em cada cadastro foram escolhidos de acordo com as informações existentes nos dados públicos de onde foram retirados os dados, sendo cada ficha de cadastro específica para cada tipo de conteúdo. As fichas de cadastro são independentes, entretanto, durante uma busca, é possível relacioná-las.

O cadastro de dados de seqüências de veneno de abelhas possui um campo para título e a categoria do tipo de conteúdo. Os outros campos estão divididos em três partes. A primeira parte corresponde à informações sobre as abelhas e vespas, como o nome científico, juntamente, com todas as categorias que possibilitam a categorização do conteúdo, que apresentam campo livre de escrita, sendo possível adicionar novos termos no sistema. A segunda parte corresponde à informações sobre a seqüência, onde os campos são categorias do tipo de seqüência, tipo de proteína e o número de acesso é um campo de escrita. A terceira parte é relativa à seqüência FASTA. (Figura 38).

Submit Sequence

The form is titled "Submit Sequence" and is divided into four main sections, each highlighted with a red border and a red letter label:

- a) Title and Content type:** Contains a text input field for "Title: *" and a dropdown menu for "Content type: *".
- b) Animal Information:** Contains a dropdown menu for "Animal: *" with options "Bee", "Wasp", and "Other Animal". Below it are text input fields for "Genus animal: *" and "Scientific name : *".
- c) Sequence information:** Contains a dropdown menu for "Protein: *", a dropdown menu for "Sequence type: *", and a text input field for "Accession:".
- d) FASTA:** Contains a large text area for "FASTA:" and a link "enable rich-text" with a sub-link "Input format".

Figura 38. Campos de escrita do cadastro de seqüência de proteína que permitem a categorização da seqüência. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. a) Título da seqüência a ser cadastrada e escolha da categoria de tipo de conteúdo, b) A primeira parte do cadastro da seqüência que está relacionado com as informações sobre as abelhas e vespas. c) Segunda parte do cadastro informações da seqüência. d) Terceira parte do cadastro que possui o campo de escrita para inserção da seqüência fasta.

Após preencher os campos do formulário de cadastro de seqüências de DNA e proteínas, os dados entrarão em uma fila de espera aguardando análise dos administradores e colaboradores do sistema para que sejam disponibilizadas para visualização como conteúdo público.

O cadastro de dados de plantas com atividade antiveneno também está dividido em três partes: informações sobre as plantas, informações de seus compostos e imagens. Além dessas três partes, existe um campo para título, tipo de conteúdo e informações adicionais. Foram criados campos de categoria livre para inserção de novos termos, sendo possível enviar imagens das plantas e dos compostos. Os campos mostrados com asterisco são campos de preenchimento obrigatório, conforme mostrado na Figura 39.

The image shows a web form titled "Submit Plant" with four distinct sections, each highlighted with a red border and a letter label (a, b, c, d) in the bottom right corner.

- Section a:** Contains two input fields: "Scientific name: *" and "Content type: *" with a dropdown menu.
- Section b:** Titled "Plant information", it includes fields for "Family: *" (with a dropdown), "Common Name:", "Distribution: *" (with a dropdown), "Scientific name: *" (with a dropdown), "Part of plant used: *" (with a listbox containing items like Aerial parts, All plant, Barks, etc.), "Activity:" (with a dropdown), "Country:" (with a dropdown), and a "Characteristic:" text area.
- Section c:** Titled "Compound", it has a "Compound name :" text field and a "Chemical formula:" text field.
- Section d:** Titled "Image", it features two identical upload blocks, each with a text input, an "Arquivo..." button, and an "Upload" button.

Figura 39. Campos de escrita do cadastro de plantas com atividade antiveneno que permite a categorização da seqüência. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. a) Título da planta a ser cadastrada e escolha da categoria de tipo de conteúdo, b) A primeira parte do cadastro está relacionado com as informações sobre o planta. c) Segunda parte do cadastro são informações sobre o composto. d) Terceira parte do cadastro que possui campos para submeter imagens do composto e da planta.

O cadastro de dados de estruturas protéicas (Figura 40 e 41), dados laboratoriais (Figura 42) e referências de abelhas (Figura 43) são similares aos cadastros anteriores; entretanto, os campos obrigatórios podem mudar e variar. Cada um dos cadastros possui grupos de categorias específicos que permitem filtros rápidos e dinâmicos. Após preencher os campos do formulário, os dados entrarão em uma fila de espera aguardando análise dos administradores e colaboradores do sistema, para que sejam disponibilizados para a visualização como conteúdo público.

Submit Structure

Title: *

Structure (Authors):

Submission a group of authors is necessary separate by ",". Never use "."

Structure (Authors): *

a

Protein Information:

Protein: *

Classification :

EC Number:

Content type: *

Type of Structure: *

b

Animal Information:

Scientific Name: *

Animal: *

c

Structure Information:

Structure (obtaining Method):

- Computational approaches
- Ab initio
- Comparative protein modelling
- Homology modelling
- Protein threading
- Experimental methods
- NMR spectroscopy
- X-ray crystallography

Parameters (Resolution[Å] , R-Value, R-Free, Space Group):

[enable rich-text](#)

PDB Number:

PDB Link:

d

Reference (Primary Citation):

[enable rich-text](#)

Reference Link:

e

Ligand Information:

Ligand Chemical Component: *

☐ Yes ☐ No

Type of Ligand:

Ligand Name:

Action:

Formula:

Figura 40. Campos de escrita do cadastro de estruturas protéicas de veneno de abelhas que permitem a categorização da estrutura. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. Está dividido em quatro partes. a) Título da estrutura a ser cadastrada e inserção dos autores e categorização do tipo de conteúdo, b) A primeira parte do cadastro está relacionada com as informações sobre a proteína, c) A segunda parte do cadastro está relacionada com as informações sobre o animal, d) Terceira parte do cadastro são informações sobre a estrutura, e) Quarta parte do cadastro são informações sobre o ligante.

evenom/node/add/experiment

Submit Laboratorial Data

Title: *

Content type: *

Authors information

Authors: *

Institution: *

Assay: *

enable rich-text

Additional information:

Files

Assay image

Arquivo...

Allowed extensions: jpg, bmp, gif and others

Upload

Assay complementary data

Changes made to the attachments are not permanent until you save this post.

Attach new file:

Arquivo...

Allowed extensions: txt, pdf, doc and xls

Upload

Log message:

An explanation of the additions or updates being made to help other authors understand your motivations.

File attachments

Menu settings

URL path settings

Comment settings

Site map settings

Authoring information

Publishing options

Preview Submit

Figura 42. Campos de escrita do cadastro de dados laboratoriais de experimentos que permitem a categorização da estrutura. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. Está dividido em três partes. a) Título do experimento a ser cadastrado e inserção dos autores e, categorização do tipo de conteúdo e inserção da instituição onde foram realizados os experimentos, b) Informações a respeito dos experimentos e informações adicionais, c) Campos para envio de arquivos adicionais que sejam relacionados aos experimentos.

The screenshot shows a web browser window with the address bar displaying 'venom/node/add/references'. The page title is 'Submit Bee venom references'. The form is divided into three main sections, each highlighted with a red border and a red letter label:

- Section a:** Contains fields for 'Title: *', 'Content type: *' (a dropdown menu), 'Details' (a collapsed section), 'Type of Reference: *' (a dropdown menu), 'Year:', 'Authors: *', 'Publisher:', and 'Language: *' (a dropdown menu).
- Section b:** Contains a large text area for 'Abstract: *' and a link labeled 'enable rich-text'.
- Section c:** Contains fields for 'Field of study: *' (a dropdown menu), 'Institution:', 'URL:', and a section for 'Archive' with a note 'Changes made to the attachments are not permanent until you save this post.' Below this is an 'Attach new file:' section with a file input field and an 'Arquivo...' button. At the bottom, it shows 'Allowed extensions: pdf' and an 'Upload' button.

Figura 43. Campos de escrita do cadastro de referências de veneno de abelhas que permitem a categorização da estrutura. Podem ser cadastradas as informações através de termos livres e termos já categorizados. Está dividido em três partes. a) Título da estrutura a ser cadastrada e inserção dos autores, categorização do tipo de conteúdo, ano em que foi publicado as referências, linguagem da referência e editora da publicação b) O resumo da referência, c) Informações adicionais com inserção da instituição onde foram realizados os experimentos, inserção da área de estudo e inserção do *site* para a referência.

As categorias criadas para classificação dos dados cadastrados no sistema são adicionadas pelo administrador do sistema (Tabela 15) e possibilitam que os dados não fiquem dispersos no sistema por isso a importância de uma categorização correta quando um conteúdo é cadastrado.

As categorias do sistema estão divididas em:

Tabela 15. Categorias do sistema *Bee Venom*.

Categoria	Função
Protein	Tipos de proteínas de veneno
Animal	Tipo de animais
Genus Animal	Gênero do animal
Scientific name (animal)	Nome científico do animal
Sequence type	Nucleotídeo ou aminoácido
Action (Ligand)	Forma de ação do ligante na estrutura
Activity	Atividade do composto da planta
Authors	Autores de referências de abelhas
Authors (laboratorial data)	Autores dos dados laboratoriais
Classification (protein)	Classificação da proteína
Content type	Tipo de conteúdo a ser cadastrado
Country	País da planta antiveneno
EC number	Número de classificação das enzimas
Family (plant)	Família das plantas
Field of study	Área de estudo da referência
Formula (Ligand)	Formula química do ligante
Institution (<i>Bee venom</i> reference)	Instituição da referência de abelha
Institution (laboratorial data)	Instituição dos dados laboratoriais
Language	Linguagem das referências de abelhas
Ligand	Nome do ligante
Part of plant used	Parte da planta usada nas plantas antiveneno
Publisher	Editora da referência de abelha
Scientific name (plant)	Nome científico da planta
Structure (Authors)	Autores da estrutura
Structure (obtaining Method)	Métodos de obtenção
Type of Ligand	Tipos de ligante
Type of reference	Tipos de referências
Type of Structure	Tipos de estrutura
Year	Ano da publicação da referência

Até o momento estão armazenadas no sistema 12 espécies de plantas medicinais categorizadas 408 seqüências de proteínas de venenos de animais, 08 estruturas de proteínas e 04 referências de abelhas categorizadas. Entretanto, posteriormente, serão adicionados outros dados.

4.4. Bioinformática estrutural

4.4.1. Melitina

A estrutura de Melitina (2MLT) obtida através do banco de dados públicos do PDB foi inserida no programa Almond (Tripos(Inc.), 2005) e Q-Site Finder (Laurie et al., 2005) para a análise dos campos de interação. A Melitina é uma proteína de, aproximadamente, 26 aminoácidos. Devido ao seu pequeno tamanho, surgiu a dificuldade de encontrar um ligante que se ligasse, exclusivamente, com o sítio ativo, provocando a inibição da proteína. As análises no Almond e no Q-Site Finder servem para identificar os locais onde os ligantes

devem se ligar. A estrutura de Melitina utilizada possui duas cadeias, pois quando foi realizado o processo de obtenção de sua estrutura obteve-se nessa conformação. Todas as análises posteriores a Melitina têm duas cadeias, pois na natureza ela ocorre nesse *fold*. O programa Almond faz análise para três grupos químicos de prova diferentes: hidrofóbicos, oxigênio de carbonila e nitrogênio de amida. A utilização desses grupos de provas distintos tem por objetivo a definição de sítios receptores virtuais no sítio ligante, para grupos com características químicas consideradas relevantes na realização de interações de ligantes com a proteína.

O grupo de prova hidrofóbico identifica os sítios na proteína que favorecem a acomodação, do ponto de vista energético, de porções hidrofóbicas de ligante. O grupo de prova oxigênio de carbonila representa fragmentos de ligantes que podem agir como receptores de ligação de hidrogênio. O grupo de prova nitrogênio de amida identifica regiões na proteína que favorecem interações com regiões doadoras de ligação de hidrogênio em ligantes (Pastor et al., 2000).

No campo de interação do grupo químico de prova nitrogênio de amida existem regiões capazes de receber ligações de hidrogênio. Entretanto, esses sítios ocorrem na extremidade das proteínas, regiões que são ricas nesse tipo de doadores. Contudo, essas regiões doadoras não ocorrem no sítio ativo da proteína, ou seja, no aminoácido 14 (uma prolina). Na Figura 44, o aminoácido 14 está marcado com um círculo e não é possível identificar sítios virtuais no sítio ativo da proteína.

Figura 44. Resultado obtido do Almond da proteína Melitina, sendo o campo de prova nitrogênio de amida. A região com círculo representa o local do sítio ativo da proteína. As regiões em azul (*) são os locais onde, potencialmente, ocorreriam ligações com amidas. A ocorrência dessa região é na extremidade da proteína.

Em relação ao campo de interação do grupo químico de prova hidrofóbica foram encontradas regiões que permitem uma acomodação de regiões hidrofóbicas. Uma das regiões ocorre exatamente sobre o sítio ativo, na prolina, pois a prolina possui um anel aromático, causando, assim, uma região hidrofóbica. Dessa forma, um bom ligante para essa proteína deve ter uma região hidrofóbica interagindo com a prolina. O sítio ativo está circulado na Figura 45.

Figura 45. Resultado obtido do Almond da Melitina, sendo o campo de prova hidrofóbico. A região com círculo representa o local do sítio ativo da proteína. As regiões em branco (*) são os sítios onde existem campos de força para interações do tipo pontes de hidrogênio, que estão próximos ao sítio ativo da proteína.

Em relação ao campo de interação do grupo químico de prova oxigênio de carbonila foram encontradas regiões que possuem grupos receptores de ligação de hidrogênio. Essas regiões ocorrem nos aminoácidos finais da proteína e não apresentam sítios virtuais no sítio ativo da proteína. O sítio ativo está circulado na Figura 46.

Figura 46. Resultado obtido do Almond da Melitina, sendo o campo de prova oxigênio da carbonila. A região com círculo representa o local do sitio ativo da proteína. As regiões em vermelho (*) são os sítios de ligação de hidrogênio que ocorrem na extremidade da proteína.

Os campos de força encontrados através do programa Almond se localizam na extremidade da proteína. Apenas um sítio virtual foi encontrado próximo ao sitio ativo e somente em caso de sítios hidrofóbicos, demonstrando a dificuldade de um ligante interagir com a Melitina. Entretanto, no desenvolvimento de ligantes para inibir o veneno, é essencial inibir a Melitina por ser um componente majoritário do veneno. Uma possibilidade que poderia ser usada seria utilizar um ligante que fosse capaz de interagir com o sítio ativo e a extremidade da proteína, simultaneamente.

Alguns trabalhos têm citado que a extremidade da proteína, juntamente com o sítio ativo, seriam responsáveis por sua atividade, demonstrando que um inibidor deve interagir com as duas regiões (Raghuraman e Chattopadhyay, 2007).

A proteína foi submetida a um programa chamado Q Site-Finder (Laurie et al., 2005) (<http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/qsitefinder/>), que faz uma busca na estrutura da proteína por sítios de interação com outras moléculas. Durante a busca foram localizados o sítio ativo e outras regiões que possam interagir com moléculas. Na Figura 47, pode-se observar com círculo vermelho, o anel aromático da prolina (14 aa), que representa o sítio ativo, onde é possível observar, no retângulo preto, uma região marrom que representa o local de interação com o sítio ativo. O retângulo preto representa essa região que seria o sítio ativo (Dempsey, 1990). As outras regiões em marrom representam locais de interação da

proteína com ligantes. Foram representadas no total 10 posições, sendo a primeira identificada e com maior relevância próximo ao sítio ativo.

Figura 47. Resultado obtido do site Q-Site Finder da Melitina. A região em marrom representa os locais da proteína que têm sítios de interação com ligantes ou proteínas. Os círculos em vermelho representam os sítios ativos da Melitina. O retângulo preto marca o sítio identificado no sitio ativo.

Esse tipo de análise foi importante, pois confirmou os sítios encontrados anteriormente e confirmou o sítio ativo, onde os inibidores devem interagir. Através dessas análises foi possível identificar as características necessárias e o local que um ligante deve interagir para causar a inibição da Melitina.

4.4.2. Screening Virtual

As simulações de *screening* virtual foram realizadas com o software GOLD (Verdonk et al., 2003) para a Fosfolipase A2 disponível no PDB (1POC). A base de dado utilizada foi: *Ilbdiverse*. A base de dado foi utilizada com o objetivo de selecionar compostos com o potencial de se ligarem através da abordagem de *docking* flexível, presente no software GOLD (Verdonk et al., 2003). Na simulação, foi selecionada apenas a melhor orientação para as 10 melhores estruturas filtradas pelo “software” para a base de dados. Dessa forma, foram escolhidas as 10 melhores orientações. Na Figura 48, é possível visualizar todos os ligantes sobrepostos, demonstrando que os ligantes possuem estruturas similares, com tamanho aproximado e com os mesmos grupos químicos. Todas apresentam anéis aromáticos.

Figura 48. Todos os inibidores de Fosfolipase A2 selecionados através do GOLD na base de dados do *Ilbdiverse*. Os 10 ligantes foram sobrepostos, onde pode-se observar que possuem estruturas similares. Duas formas de visualizar os ligantes sobrepostos em A e em B. As estruturas das proteínas são visualizadas através do programa PYMOL

Na Figura 49, podem ser visualizados todos os ligantes selecionados, demonstrando suas estruturas similares, podendo ser visualizadas na forma plana.

Figura 49. Todos os inibidores de Fosfolipase A2 selecionados através do *software* GOLD na base de dados do *Ilbdiverse*. O número ao lado dos 10 ligantes representa o número do ligante dentro da base de dado do *Ilbdiverse*.

As moléculas selecionadas foram avaliadas quanto às propriedades físico-químicas relacionadas aos parâmetros da Regra dos Cinco, de Lipinski et al. (1997), as quais foram calculadas e são mostradas na Tabela 16. Segundo a Regra dos Cinco, a maioria dos fármacos que apresentam biodisponibilidade por via oral obedece pelo menos três dos seguintes parâmetros: peso molecular menor que 500 (kda), Log P menor que 5, número de receptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10 e número de doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5. Todos os 10 compostos selecionados nas simulações de *screening* virtual se enquadram nos parâmetros da Regra dos Cinco. Apenas dois compostos tiveram um dos valores acima do permitido no Log de P. Na Tabela 16 é possível visualizar os valores de *score* dos compostos obtidos através do software GOLD (Lipinski et al., 1997; Lipinski, 2004).

Tabela 16. Resultado obtido do software GOLD na coluna *scores* e resultados obtidos dos parâmetros da Regra dos Cinco. Em vermelho são apresentados os valores que ultrapassaram o valor limite.

Composto	Score	NOMES	Peso Molecular (kda)	Aceptores	Receptores	Log Probabilidade	Violações
7	32,95	'(+)-himbacine'	309,39	3	1	3,2356	0
25	35,62	'(+/-)-Butaclamol'	280,34	3	3	2,823	0
26	32,56	'(+/-)-Chloro-APB'	361,57	2	1	5,0452	1
40	35,54	'(+/-)-PPHT'	329,85	3	2	4,4767	0
41	35,92	'(+/-)-SKF 38393, N-allyl-'	309,49	2	1	5,1888	1
52	33,84	'(-)-Frondosin D'	295,41	3	2	3,9587	0
76	34,1	'(4-benzyl-piperidin-1-yl)-(5-amidinomethyl-3ah-indol-2-yl)-methanone'	338,43	4	1	3,7732	0
163	33,44	'1-benzyl-5-methoxy-2-methyl-1h-indol-3-yl)-acetic acid'	326,47	3	1	3,0305	0
240	35,33	'1r,2s,3r,4s-tetrahydro-benzo[a]anthracene-2,3,4-triol'	345,58	3	0	4,1112	0
455	32,43	'3-O-Methylcalocarpin'	361,51	2	2	0,851899	0

Os ligantes foram visualizados juntamente com a proteína Fosfolipase A2. Os ligantes interagiram com a Fosfolipase A2 no sítio ativo da proteína, que também foi confirmado através do *síte* Q-Site Finder (Figura 50). Essa primeira análise foi preliminar, para, posteriormente, ser mais bem avaliada com outros softwares. Entretanto, os resultados encontrados foram satisfatórios, as moléculas selecionadas obtiveram *scores* bons e próximos, além de bons valores nas análises da Regra dos Cinco.

Figura 50. A proteína Fosfolipase A2 interagindo com todos os ligantes selecionados através do software GOLD, sendo visualizadas na forma de linhas (A) e da estrutura secundária (B) no software PYMOL (DeLano, 2002)

A proteína e as moléculas foram submetidas ao *site Q* – Site Finder, onde se buscou identificar as regiões na proteína que possuem sítios de interação. Na Figura 51, foi avaliada a proteína sem os ligantes, sendo possível identificar os principais sítios da proteína.

Figura 51. Resultado do site Q - Site Finder da proteína Fosfolipase A2 sem inibidores e com os sítios de interações possíveis.

A proteína com os inibidores também foram submetidos ao *site Q* – Site Finder (Figura 52) e observou-se os ligantes interagindo com um dos sítios identificados e ligados ao sítio ativo interagindo com a histidina (34 aa), aspartato (64 aa) e tirosina (87 aa), que são os principais componentes do sítio ativo. Os aminoácidos aspartato e a tirosina têm regiões de ligação a hidrogênios, sendo importantes sítios de interação da Fosfolipase A2. Os ligantes interagem com esses sítios; entretanto, são necessárias mais análises para confirmar a inibição (Annand et al., 1996).

Figura 52. Avaliação da Fosfolipase A2 e os ligantes através do *site Q site-finder*, onde foram identificados as regiões da proteína que interagem com outras moléculas. Nessa figura, pode-se observar que todos os inibidores ficaram sobrepostos à região onde ocorre o sítio ativo. Na parte A da figura tem uma visão geral e na parte B um *zoom* no sítio ativo.

4.5. Ensaios laboratoriais

4.5.1. Extratos Vegetais das Plantas do Banco de Germoplasma da USP/RP

4.5.1.1. Coleta dos vegetais

As plantas selecionadas foram localizadas e coletadas em seu 'habitat' natural ou cultivadas e identificadas. Inicialmente, foram selecionadas para os experimentos somente as plantas da família Fabaceae, devido a sua grande importância econômica. Não foram coletadas amostras das espécies vegetais: *Schizolobium parahyba*, *Copaifera langsdorffii*, *Machaerum villosum*, e *Centrolobium domentosum*, pois nas árvores encontradas não foi possível obtenção de folhas. Já as espécies vegetais: *Platycamus elegans* e *Holocalyx balansae* foram coletadas; entretanto, não foi obtido material vegetal suficiente para as análises. As outras espécies foram coletadas, as extrações ocorreram com sucesso, e, materiais vegetais para todas as análises foram obtidos.

4.5.1.2. Preparação dos extratos

As espécies vegetais *Platycamus elegans* e *Holocalyx balansae* foram coletadas. Entretanto, a maioria das folhas estava velha e fungada, sendo assim não foram preparados extratos suficientes para análises. As demais espécies vegetais foram extraídas e liofilizadas. Após a preparação os extratos foram armazenados a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.2. Atividade fibrinogenolítica

O método descrito por Rodrigues et al. (2000) foi utilizado com algumas modificações. Amostras contendo 50 μg de fibrinogênio bovino dissolvido em PBS foram incubadas com as soluções de venenos, por 2h a 37°C . As amostras incubadas foram, posteriormente, submetidas à eletroforese com gel de poliacrilamida de 12 % (Figura 53) (Rodrigues et al., 2001).

Figura 53. Fibrinogênio: 1-Fibri (80µg); 2- Fibri + *Apis mellifera* (0,5µg); 3- Fibri + *Apis mellifera* (1µg); 4- Fibri + *Apis mellifera* (5µg); 5- Fibri + *Apis mellifera* (10µg); 6- Fibri + *Apis mellifera* (20µg); 7- Fibri + *Apis mellifera* (30µg); 8- Fibri + *Apis mellifera* (50µg).

O extrato do veneno não causou degradação do fibrinogênio, apesar de haver um aumento da concentração. O surgimento da banda no canto inferior do gel se deve ao aumento da concentração do veneno.

4.5.3. Atividade Miotóxica

O gráfico 4 permite verificar que a fração Fosfolipase A2, comparativamente a uma fosfolipase, CB cdt, isolada, não induziu a miotoxicidade no músculo gastrocnemius do camundongo. Os efeitos de miotoxicidade produzidos pelo veneno podem ser evidenciados por meio da liberação *in vitro* de creatina cinase muscular. O efeito de hemorragia causado pelo veneno, provavelmente, está relacionado ao mecanismo de ação distinto.

Gráfico 4. Avaliação da atividade miotóxica do veneno de PLA2. Não foi encontrado atividade miotóxica.

4.5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Amostras de extratos e/ou inibidores em diferentes concentrações foram incubadas com venenos de serpentes por 30 min a 37°C e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes, para verificação da integridade das proteínas dos venenos para análises posteriores (Figura 54).

Figura 54. SDS-PAGE: 1- PPM; 2- *Apis mellifera* (5µg); 3- *Apis mellifera* (15µg); 4- *Apis mellifera* (30µg); 5- PLA2 *Apis mellifera* (0,1µg); 6- PLA2 *Apis mellifera* (0,5µg); 7-PLA2 *Apis mellifera* (3µg).

As proteínas se apresentaram de forma íntegra, sem degradação aparente, demonstrando a integridade do material. Desta forma puderam ser utilizadas nos experimentos posteriores.

4.5.5. Interação extratos ou inibidores-venenos:

Este experimento foi realizado através de incubação do veneno de *A. mellifera* e da toxina Fosfolipase A2 de *A. mellifera*, nas proporções de 1:10 e 1:50, por 30min a 37°C, com os extratos de caule e folhas. A precipitação, proteólise das proteínas dos venenos, ou ligação destas a alguma substância dos extratos, pode de visualizada em eletroforese com gel de poliacrilamida, na presença de agentes desnaturantes (Figura 55).

Figura 55. Gel SDS-PAGE: *Apis mellifera* + Casearia Folhas 28 e 29 (teste de degradação de proteínas). SDS-PAGE: 1- *Apis mellifera* VB (30µg); 2- *Apis mellifera* + Casearia Folhas 28 e 29 1:1; 3- *Apis mellifera* + Casearia Folhas 28 e 29 1:5; 4- *Apis mellifera* + Casearia Folhas 28 e 29 (1:10); 5- *Apis mellifera* + Casearia Folhas 28 e 29 (1:20).

O composto de *Casearia* folhas 28 e 29 causaram degradação dos componentes do veneno e com isso degradando o veneno. Dessa forma apresentou uma potencial atividade antiveneno.

4.5.6. Avaliação da atividade fosfolipásica indireta

Foram realizados ensaios iniciais com a finalidade de determinar qual seria a concentração a ser utilizada nos experimentos posteriores. Os ensaios foram realizados para o extrato total e para a Fosfolipase A2. Após a determinação da concentração foram realizados ensaios para verificar se temperatura, íons e tampão inibiriam a atividade fosfolipásica. Então, foram realizados os ensaios para avaliar a inibição da atividade fosfolipásica.

No primeiro experimento, onde se procurou identificar qual seria a concentração a ser utilizada nos experimentos, foi identificada a concentração de 5µg para o veneno total e 0,1µg para a Fosfolipase A2. Esses dois valores foram usados em todos os outros ensaios de atividade fosfolipásica, por serem valores médios aos comparados com as outras concentrações. Nestes valores, foi possível observar uma boa reação com uma menor utilização do veneno total e da Fosfolipase A2.

Os valores escolhidos no ensaio preliminar foram utilizados em todas as outras atividades fosfolipásicas. Todos os resultados das atividades fosfolipásicas estão representados nos gráficos 5 a 14 e encontram-se divididos em dois tipos: ensaios com o veneno total e ensaios com a Fosfolipase A2. As plantas, extratos ou compostos que apresentam atividade antiveneno com o veneno total foram também avaliadas contra a Fosfolipase A2. Entretanto, foram inseridas nesse trabalho somente os gráficos que apresentaram alguma inibição, de acordo com a Tabela 17 e Tabela 18, que resumem todos os resultados de atividade fosfolipásica.

Após a identificação da concentração do veneno total, foram realizados experimentos para verificar se o pH, EDTA, íons e temperatura inibiriam a atividade do veneno total. Entretanto, nenhum desses parâmetros causou inibição da ação do veneno total de *Apis mellifera*. Os experimentos com EDTA foram verificados, uma vez que sua atividade quelante é conhecida. Entretanto, foi observada atividade somente em uma concentração muito alta, impedindo, assim, a sua utilização. No caso dos íons, sabe-se que algumas Fosfolipases A2 são dependentes de cálcio, o que significa que na presença de cálcio sua ação seria aumentada. Entretanto, isso não ocorreu para o veneno total.

Posteriormente, foram realizados os experimentos com as plantas, inibidores artificiais e outros compostos. Os resultados podem ser observados na Tabela 17 para o

veneno total e na Tabela 18 para a Fosfolipase A2. As plantas que apresentaram inibição foram utilizadas em experimentos de teste de edema. Em relação às plantas do germoplasma da USP, três apresentaram inibição da atividade do veneno total: canafistula, pau-pereira e pau-ferro. As plantas pau-ferro e pau-pereira apresentaram inibição somente em concentrações mais altas. No caso da canafistula, houve inibição em todas as concentrações, sendo, então, mais eficiente que as outras duas. No caso da Fosfolipase A2, as plantas encontradas com atividade inibitória foram: canafistula, cabriúva, amendoim-bravo, jatobá, pau-pereira e pau-ferro, em todas as concentrações avaliadas, com exceção de jatobá e pau-pereira. Demonstrando um potencial de atividade anti-fosfolipase A2 de *Apis mellifera*, essas plantas devem ser melhor estudadas para compreensão dessa atividade, pois foram mais eficientes para inibir a proteína isolada, uma das razões desse resultado seria devido à ação do veneno ser sinérgica, isto é, os componentes interagem juntos. Não foram encontradas referências sobre essas plantas com a atividade antiveneno identificada. Esses resultados demonstram o grande potencial que o banco de germoplasma apresenta, dessa forma a sua conservação é de grande importância.

Nos experimentos foram também avaliados 7 inibidores, que já possuíam inibição eficiente comprovada. Entretanto, nas análises com veneno total e Fosfolipase A2 não foram observadas ação inibitória. No caso dos compostos CPs, somente o CP 47 apresentou inibição ao veneno total. Entretanto, ao serem avaliadas contra a Fosfolipase A2 não apresentaram ação inibitória. Os compostos Ps apresentaram inibição da atividade somente do composto P2 e P3 para o veneno total. Entretanto, para a Fosfolipase A2 isolada não foram encontradas atividades inibitórias. Foram também avaliados compostos do tipo CSF, que apresentaram atividade inibitória comprovada, com exceção de CSF 20, CSF 21 e CSF 27. No caso da Fosfolipase A2 não foram encontradas ação inibitória.

As outras plantas utilizadas são plantas existentes no laboratório de Toxinas Animais e Inibidores Naturais e Sintéticos, onde foram realizados os experimentos. Algumas destas plantas já possuem atividades anti-fosfolipásicas reconhecidas para veneno de outros organismos. As plantas obtidas no laboratório de Toxinas Animais e Inibidores Naturais e Sintéticos estão na Tabela 17 para veneno total e Tabela 18 para a Fosfolipase A2. Foram encontradas atividade inibitória em Mandevilla, Casearia, precipitado, acetato, EtOH Guaçatonga, Extrato aquoso, *Miconia fallax*, *Miconia albicans*, *Tibouchina stenocarpa*, *Stryphnodendro barbatiman*, Eclipta, *Sedum dendroideum* e *Anacardium humile* (46-65). Dentre as plantas com atividade inibitória, a Eclipta e Acetato inibiram somente em altas concentrações, já a *Tibouchina stenocarpa* inibiu somente em concentrações mais baixas. As plantas: *Anacardium humile* (46-65), Mandevilla, Casearia, *Miconia fallax*, *Sedum dendroideum*, apresentaram inibição em todas as concentrações, demonstrando uma maior

eficiência na atividade inibitória. Sendo assim, essas plantas apresentam um grande potencial para serem utilizadas como antiveneno de abelhas. Essas plantas não tinham sido identificadas como plantas antiveneno para abelhas, mas algumas já tinham sido identificadas como antiveneno em serpentes.

Nos experimentos com Fosfolipase A2, as plantas identificadas com atividade inibitória foram: *Miconia Albicans*, *Stryphnodendro barbatiman*, *Micania Fallax*, Mandi F RETOH, *Tibouchina stenoscarpa*, *Anacardium humile* (46 – 65), *Sedum dendroideum* 2 e 6, *Eclipta Alba* - dimetilwedelolactona (Eclidwl) e *Eclipta Alba* - wedelolactona (Ecliwl). Todas as plantas apresentaram inibição, sendo que: Eclidwl, *Sedum dendroideum* 2 e 6, *Stryphnodendro barbatiman*, Mandi F RETOH e *Anacardium humile* (46 – 65) foram mais eficientes, pois apresentaram uma inibição em um número maior de concentrações. Já a *Micania Fallax* apresentaram inibição somente em altas concentrações. No caso da Ecliwl, foi obtida inibição somente em concentrações menores. Entretanto, era esperado um maior número de inibições devido ao fato que a proteína isolada deveria ser mais facilmente inibida, que não foi observado nos resultados encontrados.

Tabela 17. Plantas utilizadas contra veneno total.

Plantas	Inibição	Concentração da inibição	Plantas/Inibidores	Inibição	Concentração da inibição
Canafistula	Sim	1:5; 1:10; 1:30	<i>Anacardium humile</i> (46-65)	Sim	1:1; 1:3; 1:5; 1:6; 1:12; 1:24
Cabriúva	Não		<i>Anacardium humile</i> (1-9)	Não	
Amendoim Bravo	Não		AH (10-23)	Não	
Jatobá	Não		I1	Não	
Pau-pereira	Sim	1:10	I2	Não	
Pau-ferro	Sim	1:30	I3	Não	
<i>Mikania glomerata</i>	Não		I4	Não	
Lippia 6	Não		I5	Não	
Mandevilla	Não		I6	Não	
Mandevilla (RAIZ)	Sim	1:5; 1:10; 1:30	I7	Não	
Zeyhenia	Não		CP 01	Não	
<i>Cordia verbanacea</i> (Cor e = 29)	Não		CP 02	Não	
<i>Bauhinia fortificata</i>	Não		CP 10	Não	
<i>Casearia silvestris</i>	Não		CP 11	Não	
<i>Amburana cearensis</i>	Não		CP 17	Não	
Casearina	Não		CP 20	Não	
Casearia	Sim	1:5; 1:10; 1:30; 1:60	CP 21	Não	
Extrato da Casearia (MeOH)	Não		CP 25	Não	
Extrato da Casearia (Precipitado)	Sim	1:10; 1:30	CP 26	Não	
Extrato da Casearia (Acetato)	Sim	1:30	CP 27	Não	
EtOH Guaçatonga	Sim	1:10; 1:30	CP 29	Não	
Extrato aquoso	Sim	1:10; 1:30	CP 31	Não	
Casearia folhas 20	Não		CP 32	Não	
Casearia folhas 21	Não		CP 33	Não	
Casearia folhas 22	Sim	1:10	CP 37	Não	
Casearia folhas 23	Sim	1:5; 1:10; 1:30	CP 39	Não	
Casearia folhas 25	Sim	1:5; 1:10; 1:30	CP 40	Não	
Casearia folhas 27	Não		CP 41	Não	
Casearia folhas 28 e 29	Sim	1:5; 1:10; 1:30	CP 42	Não	
<i>Miconia fallax</i>	Sim	1:5 1:10; 1:30	CP 43	Não	
<i>Miconia albicans</i>	Sim	1:1; 1:5	CP 46	Não	
<i>Miconia pipericarpa</i>	Não		CP 47	Sim	1:5
<i>Tibouchina stenocarpa</i>	Sim	1:5	CP 48	Não	
Raiz eclipta	Não		CP 50	Não	
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Sim	1:5	CP 51	Não	
Eclipta	Sim	1:30	CP 52	Não	
<i>Sedum dendroideum</i>	Sim	1:5; 1:10; 1:30	CP 53	Não	
Calos Sapindus Fração acida A1	Não		CP 54	Não	
Calos Sapindus MeOH/H ₂ O	Não		CP 55	Não	
Calos Sapindus CH ₂ CL ₂ /MeOH	Não		P1	Não	
Rp-18 Sapindus	Não		P2	Sim	1:10
Fração A2 Sapindus	Não		P3	Sim	1:10
Fração B2 Sapindus	Não		P4	Não	
<i>Sapindus calus</i> 1º F	Não		P5	Não	
<i>Sapindus saponaria</i> Calos 1º F	Não		P6	Não	
Phyllacantus	Não		P7	Não	
<i>Eclipta alba</i> (Eclidwl)	Não		P8	Não	

Tabela 18. Plantas avaliadas contra Fosfolipase A2.

Plantas	Inibição	Concentração da Inibição
Canafistula	Sim	1:5; 1:10; 1:30
Cabriúva	Sim	1:5; 1:10; 1:30
Amendoim Bravo	Sim	1:5; 1:10; 1:30
Jatobá	Sim	1:5; 1:30
Pau-pereira	Sim	1:5; 1:30
Pau-ferro	Sim	1:5; 1:10; 1:30
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Sim	1:5; 1:10; 1:30
SD2	Sim	1:1; 1:6; 1:10
SD3	Não	
SD6	Sim	1:1; 1:3; 1:6; 1:10
SD1	Não	
SD4	Não	
<i>Eclipta alba</i> - dimetilwedelolactona (Eclidwl)	Sim	1:1; 1:3; 1:6; 1:10
<i>Eclipta alba</i> - wedelolactona (Ecliwl)	Sim	1:6
<i>Cordia verbanacea</i> (COR – E = 29)	Não	
<i>Cordia verbanacea</i> - ácido rosmarinico (CV – AM =28)	Não	
Casearia Folhas 27	Não	
<i>Eclipta</i> - dimetilwedelolactona (DWL)	Não	
Casearia Folhas 22	Não	
CP 47	Não	
S 1P	Não	
P2	Não	
P3	Não	
<i>Bauhinia forficata</i>	Não	
<i>Miconia albicans</i>	Sim	1:10; 1:30
<i>Miconia fallax</i>	Sim	1:30
Mandi F RETOH	Sim	1:5; 1:10; 1:30
<i>Tibouchina stenoscarpa</i>	Sim	1:10; 1:30
<i>Sapindus saponaria</i>	Não	
<i>Eclipta Alba</i>	Não	
I1	Não	
I2	Não	
I3	Não	
I4	Não	
I5	Não	
I6	Não	
I7	Não	
<i>Anacardium humile</i> (46 – 65)	Sim	1:6; 1:12; 1:24
<i>Amburana cearensis</i>	Não	
<i>Mikania glomerata</i>	Não

Gráfico 5. Teste da atividade Fosfolipásica indireta. A: Avaliação para escolha da melhor dose de Veneno Total a ser utilizada durante os ensaios de avaliação da atividade fosfolipásica. B: Avaliação do efeito do pH sobre a atividade do veneno da *Apis*, demonstrando que o pH não interfere, significativamente, sobre a ação da Fosfolipase A2 C: Avaliação do efeito do EDTA sobre a atividade do veneno da *Apis*, demonstrando que o EDTA não interfere, significativamente, sobre a ação da Fosfolipase A2.

Gráfico 6. Teste da atividade Fosfolipásica indireta e avaliação do efeito das plantas sobre a atividade do veneno da *Apis*. A: Avaliação do efeito dos íons sobre a atividade do veneno da *Apis*, demonstrando que os íons não interferem, significativamente, sobre a ação da Fosfolipase A2. B: Avaliação do efeito da temperatura sobre a atividade do veneno da *Apis*, demonstrando que a temperatura não interfere, significativamente, sobre a ação da Fosfolipase A2. C: Avaliação do efeito das plantas coletadas na USP sobre a atividade do veneno da *Apis*. A Canafistula, Pau-Pereira e Pau-Ferro foram identificados como potenciais inibidores do veneno da *Apis*.

Gráfico 7. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre a atividade do veneno da *Apis*. A: Avaliação do efeito de Mandevilla sobre a atividade do veneno da *Apis*. Quando se utilizou raízes extraídas em extrato de álcool houve inibição completa do veneno da *Apis*. B: Avaliação do efeito da Casearia sobre a atividade do veneno da *Apis*. Com o aumento das concentrações foi possível observar alguma inibição; entretanto, o aumento da concentração pode ser tóxico. C: Avaliação do efeito de diversos extratos de plantas sobre a atividade do veneno da *Apis*. Somente o precipitado (1:30), ETOH Guaçatonga, extrato aquoso e acetato apresentaram inibição.

Gráfico 8. Avaliação do efeito de substâncias sintéticas sobre a atividade do veneno da *Apis*. A: Avaliação do efeito de extratos de CSF sobre a atividade do veneno da *Apis*. O CSF 28 e 29, CSF 23 e CSF 25 apresentaram inibição do veneno de *Apis*. B: Avaliação do efeito de extratos de CSF sobre a atividade do veneno da *Apis*. O CSF 28 e 29, CSF 23, CSF 25 e CSF 22 apresentaram inibição do veneno de *Apis*. C: Avaliação do efeito de extratos de CSF sobre a atividade do veneno da *Apis*. O CSF 28 e 29, CSF 23 e CSF 25 apresentaram inibição do veneno de *Apis*.

Gráfico 9. Avaliação do efeito dos extratos de plantas e substâncias sintéticas sobre a atividade do veneno da *Apis*. A: Avaliação do efeito de extratos de plantas sobre a atividade do veneno da *Apis*. O Barbatimão, *Miconia albicans*, *Miconia fallax*, *Eclipta* e *Tibouchina stenocarpa* apresentaram inibição do veneno de *Apis*. B: Avaliação do efeito de extratos de *Sedum dendroideum* sobre a atividade do veneno da *Apis*. Apresentou inibição do veneno de *Apis*. C: Avaliação do efeito de extratos de AH sobre a atividade do veneno da *Apis*. Os extratos de AH apresentaram inibição do veneno de *Apis*.

Gráfico 10. Avaliação do efeito de substâncias sintéticas sobre a atividade do veneno da *Apis*. A: Avaliação do efeito de extratos de CP sobre a atividade do veneno da *Apis*. O CP 47 apresentou inibição do veneno de *Apis*. B: Avaliação do efeito de extratos de P sobre a atividade do veneno da *Apis*. O P2 e P3 apresentaram inibição do veneno de *Apis*.

Gráfico 11. Avaliação do efeito dos extratos de plantas e substâncias sintéticas sobre a atividade da Fosfolipase A2 da *Apis*. A: Avaliação para escolha da melhor dose de Fosfolipase A2 a ser utilizada durante os ensaios de avaliação da atividade fosfolipásica. B: Avaliação do efeito de extratos do banco de germoplasma sobre a atividade de PLA2 de *Apis*. A canafistula, cabriúva, amendoim bravo, jatobá, pau-ferro e pau-pereira apresentaram inibição de PLA2 de *Apis*. C: Avaliação do efeito de extratos de Barbatimão sobre a atividade de PLA2 de *Apis*. Apresentaram inibição de PLA2 de *Apis*.

Gráfico 12. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre a atividade da Fosfolipase A2 da *Apis*. A: Avaliação do efeito de extratos de SD2 sobre a atividade de PLA2 de *Apis*. Apresentaram inibição de PLA2 de *Apis*. B: Avaliação do efeito de extratos de SD6 sobre a atividade de PLA2 de *Apis*. Apresentaram inibição de PLA2 de *Apis*. C: Avaliação do efeito de extratos de Frações isoladas sobre a atividade de PLA2 de *Apis*. Onde Eclidwl e Ecliwl apresentaram inibição de PLA2 de *Apis*.

Gráfico 13. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre a atividade da Fosfolipase A2 da *Apis*. A: Avaliação do efeito de extratos de *Miconia albicans* sobre a atividade de PLA₂ de *Apis*. A *Miconia albicans* apresentou uma pequena inibição de PLA₂ de *Apis*. B: Avaliação do efeito de extratos de *Miconia fallax* sobre a atividade de PLA₂ de *Apis*. A *Miconia fallax* apresentou uma pequena inibição de PLA₂ de *Apis*. C: Avaliação do efeito de extratos de Mandi F RETOH sobre a atividade de PLA₂ de *Apis*. O Mandi F RETOH apresentou inibição de PLA₂ de *Apis*.

Gráfico 14. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre a atividade da Fosfolipase A2 da *Apis*. A: Avaliação do efeito de extratos de *Tibouchina stenocarpa* sobre a atividade de PLA2 de *Apis*. A *Tibouchina stenocarpa* apresentou inibição de PLA2 de *Apis*. B: Avaliação do efeito de extratos de *Anacardium humile* sobre a atividade de PLA2 de *Apis*. O AH (46 – 65) apresentaram inibição de PLA2 de *Apis*.

4.5.7. Edema em camundongos

As plantas avaliadas nos experimentos seguem nas Tabelas 19 para o veneno total e 20 para a Fosfolipase A2. As plantas foram escolhidas a partir dos ensaios de atividade fosfolipásica indireta. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada planta e os valores médios foram inseridos nos gráficos. Os gráficos com os resultados do veneno total correspondem aos gráficos 15 a 20 e os gráficos da Fosfolipase A2 correspondem aos gráficos 21 a 26.

Nos experimentos de teste de edema poucas plantas ou compostos não apresentaram atividade inibitória para o veneno total. As que não inibiram foram: CSF 23, *Miconia fallax*, Precipitado, *Sedum dendroideum* 2 e 6, P2, CV – AM 28 e COR E 29 para o veneno total. Já a *Eclipta* - dimetilwedelolactona (DWL), apresentou inibição somente na concentração de 1:30 no tempo de 15 minutos. No tempo de 30 minutos não houve inibição. No tempo de 30 minutos as plantas: *Tibouchina stenoscarpa*, *Miconia Albicans*, CSF 28 e 29, AH (46 – 65), *Bauhinia forficata* apresentaram inibição. No tempo de 15 minutos, não houve diferença significativa para o controle. Provavelmente, as plantas demoram um tempo maior para interagir e reagir com o veneno total e o camundongo para causar uma inibição. Já as plantas: Mandevila, Barbatimão, *Eclipta próstata*, Balsamo, WL e Canafistula, apresentaram inibição no tempo de 15 minutos e 30 minutos, demonstrando uma maior eficiência e ação mais forte e um potencial de serem usadas como inibidores.

No caso da avaliação contra Fosfolipase A2 foi mais eficiente conforme esperado, devido ao fato da proteína estar isolada. As plantas e extratos: CSF 23, *Sedum dendroideum* 6, P2, CV – AM 28 e COR E não inibiram o veneno total. Já as plantas *Miconia fallax*, Precipitado, *Sedum dendroideum* 2 que não tinham apresentado inibição ao veneno total, quando avaliadas contra a proteína isolada apresentaram inibição, sendo essa inibição somente no tempo de 30 minutos. Isto pode ser devido à necessidade de um maior tempo para começo da inibição. O restante das plantas também causou inibição no tempo de 30 minutos, com exceção das plantas: *Casearia sylvestris*, *Eclipta próstata*, CSF 28 e 29, Balsamo, WL e Canafistula, que apresentaram inibição no tempo de 15 e 30 minutos, dessa forma demonstrando uma maior eficiência na inibição. As plantas selecionadas que apresentaram inibição têm que ser mais bem estudadas e avaliadas para que as suas atividades sejam melhores compreendidas e assim identificar o mecanismo de inibição.

Tabela 19. Plantas avaliadas no teste de edema veneno total.

Plantas	Diminuição do edema	Concentração da Inibição 15 min	Concentração da Inibição 30 min
Mandevila	Sim	1:30	1:5; 1:10; 1:30
Barbatimão	Sim	1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30
<i>Casearia sylvestris</i>	Sim	1:10; 1:30	1:10; 1:30
<i>Miconia fallax</i>	Não		
<i>Tibouchina stenoscarpa</i>	Sim		1:5; 1:10; 1:30
<i>Miconia albicans</i>	Sim		1:30
<i>Eclipta prostrata</i>	Sim	1:5; 1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30
Casearia folhas 28 e 29	Sim		1:5; 1:10; 1:30
Casearia folhas 23	Não		
Balsamo	Sim	1:5; 1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30
AH (46 – 65)	Sim		1:5; 1:10; 1:30
<i>Bauhinia forficata</i>	Sim		1:10; 1:30
Precipitado	Não		
SD2	Não		
SD6	Não		
P2	Não		
<i>Cordia verbanacea</i> - ácido rosmarinico (CV – AM 28)	Não		
<i>Cordia verbanacea</i> (COR E 29)	Não		
<i>Eclipta</i> - dimetilwedelolactona (DWL)	Sim	1:30	
<i>Eclipta</i> - wedelolactona (WL)	Sim	1:10; 1:30	1:10; 1:30
Canafistula	Sim	1:5; 1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30

Tabela 20. Fosfolipase A2 teste de edema.

Plantas	Diminuição do edema	Concentração da Inibição 15 min	Concentração da Inibição 30 min
Mandevila	Sim		1:5; 1:10; 1:30
Barbatimão	Sim		1:5; 1:10; 1:30
<i>Casearia sylvestris</i>	Sim	1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30
<i>Miconia fallax</i>	Sim		1:5; 1:10; 1:30
<i>Eclipta prostata</i>	Sim	1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30
Casearia folhas 28 e 29	Sim	1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30
Casearia folhas 23	Não		
Balsamo	Sim	1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30
AH (46 – 65)	Sim		1:5; 1:10; 1:30
<i>Bauhinia forficata</i>	Sim		1:5; 1:10; 1:30
Precipitado	Sim		1:5; 1:10; 1:30
SD2	Sim		1:5; 1:10; 1:30
SD6	Não		
P2	Não		
<i>Cordia verbanacea</i> - ácido rosmarinico (CV – AM 28)	Não		
<i>Cordia verbanacea</i> (COR E 29)	Não		
<i>Eclipta</i> - dimetilwedelolactona (DWL)	Sim		1:10; 1:30
<i>Eclipta</i> - wedelolactona (WL)	Sim	1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30
<i>Tibouchina stenoscarpa</i>	Sim		1:5; 1:10; 1:30
<i>Miconia albicans</i>	Sim		1:5; 1:10; 1:30
Canafistula	Sim	1:5; 1:10; 1:30	1:5; 1:10; 1:30

Gráfico 15. Teste de edema. A: Avaliação dos vários tempos do teste para escolha do tempo adequado para os experimentos com veneno de *Apis mellifera*. B: Avaliação dos vários tempos do teste para escolha do tempo adequado para os experimentos com veneno total e PLA₂, onde foram escolhidos os tempos 15 e 30 minutos. C: Avaliação dos vários tempos do teste para escolha do tempo adequando para os experimentos com PLA₂.

Gráfico 16. Teste de edema e avaliação do efeito das plantas e substâncias sintéticas sobre o edema. A: Avaliação para verificar se o PBS interferiria no teste para escolha do tempo adequado para os experimentos com veneno total e PLA₂. B: Avaliação da atividade de Mandevila sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. Onde em concentrações maiores apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*. C: Avaliação da atividade de Barbatimão sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. Nas concentrações maiores apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*.

Gráfico 17. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema. A: Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. Em concentrações maiores apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*. B: Avaliação da atividade de *Tibouchina stenocarpa* sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. Em concentrações maiores apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*. C: Avaliação da atividade de *Miconia albicans* sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. No tempo inicial causou um maior edema, entretanto no tempo de 30 minutos a maior concentração diminui o edema.

Gráfico 18. Avaliação do efeito dos extratos de plantas e substâncias sintéticas sobre o edema. A: Avaliação da atividade de *Eclipta prostata* sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*. B: Avaliação da atividade de CSF 28 e 29 sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. No tempo de 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*. C: Avaliação da atividade de Balsamo sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*.

Gráfico 19. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema. A: Avaliação da atividade de AH (46-65) sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. No tempo de 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*. B: Avaliação da atividade de *Bauhinia forficata* sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. No tempo de 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*. C: Avaliação da atividade de Dwl sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. Na concentração 1:30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*.

Gráfico 20. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema. A: Avaliação da atividade de WL sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*. B: Avaliação da atividade de Canafistula sobre o veneno total de *Apis* para verificar atividade. No tempo de 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade do veneno total de *Apis*.

Gráfico 21. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema contra PLA₂. A: Avaliação da atividade de Mandevilla sobre o PLA₂ de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA₂ de *Apis*. B: Avaliação da atividade de Barbatimão sobre o PLA₂ de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA₂ de *Apis*. C: Avaliação da atividade de Casearia sobre o PLA₂ de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA₂ de *Apis*.

Gráfico 22. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de *Miconia fallax* sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. No tempo 30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*. B: Avaliação da atividade de *Eclipta prostrata* sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*. C: Avaliação da atividade de CSF 28 e 29 sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*.

Gráfico 23. Avaliação do efeito dos extratos de plantas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de Balsamo sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*. B: Avaliação da atividade de Ah (46-65) sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. No tempo 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*. C: Avaliação da atividade de Mandevilla sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. No tempo 30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*.

Gráfico 24. Avaliação do efeito dos extratos de plantas e substâncias sintéticas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de Precipitado sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. No tempo 30 minutos apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*. B: Avaliação da atividade de SD2 sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. No tempo 30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*. C: Avaliação da atividade de DWL sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. No tempo 30, nas concentrações 1:10 e 1:30, apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*.

Gráfico 25. Avaliação do efeito das plantas sobre o edema contra PLA2. A: Avaliação da atividade de WI sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. No tempo 30, apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*. B: Avaliação da atividade de *Tibouchina stenocarpa* sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*. C: Avaliação da atividade de *Miconia albicans* sobre o PLA2 de *Apis* para verificar atividade. No tempo 30 apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA2 de *Apis*.

Gráfico 26. Avaliação da atividade de Canafistula sobre o PLA₂ de *Apis* para verificar atividade. Apresentou uma diminuição do edema, inibindo a atividade de PLA₂ de *Apis*.

5.CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- O banco de dados *Bee Venom* foi desenvolvido e está disponível para acesso através do endereço <http://gbi.fmrp.usp.br/beevenom/>. Novos dados devem ser inseridos, mantendo o sistema, constantemente atualizado. Os dados disponíveis no banco de dados são de domínio público permitindo o acesso ao sistema.
- A Melitina apesar de ser uma proteína de apenas 26 aminoácidos e ter uma estrutura linear, nas análises estruturais foi possível identificar regiões que serão os possíveis sítios de interação com outras proteínas para promover a inibição da Melitina. Nas análises do software Almond foi possível identificar que um possível inibidor deve apresentar regiões com propriedades hidrofóbicas, pois interagiria corretamente com o sítio ativo da proteína.
- A proteína Fosfolipase A2 foi analisada com o programa GOLD e foi possível identificar dez possíveis inibidores na base de dados *LibDiverse*. Os inibidores interagiram com a região do sítio ativo da proteína, apresentando potencial para inibir a Fosfolipase A2. Os dez inibidores apresentaram potencial de serem biodisponíveis, entretanto, devem ser mais analisados *in silico* para confirmação da atividade inibitória.
- As plantas do Germoplasma da FMRP/USP foram obtidas e extraídas para obtenção dos extratos. Nas análises, a planta que apresentou melhores inibições na atividade fosfolipásica indireta e de edema foi a Canafistula, que em todos os ensaios inibiu o veneno total e a proteína Fosfolipase A2. Já as plantas pau-pereira e pau-ferro, que também apresentaram inibição ao veneno total e Fosfolipase A2 somente nos ensaios de atividade fosfolipásica indireta. As plantas do Germoplasma demonstraram um grande potencial para serem utilizadas com possíveis plantas antiveneno.
- Os inibidores sintéticos avaliados não causaram inibição do veneno total e da proteína Fosfolipase A2, nos ensaios avaliados.
- As plantas *Eclipta prostrata*, *Cassipouira* folhas 28 e 29, *Balsamorhiza hirsuta* e *Strychnodendron barbatiman* depositadas no laboratório de Toxinas Animais e Inibidores Naturais e Sintéticos causaram inibição do veneno total e da proteína Fosfolipase A2 nos

ensaios realizados, sendo necessárias outras análises para um melhor entendimento de qual componente dos extratos é responsável pela inibição. Já as plantas *Casearia sylvestris*, *Eclipta* - wedelolactona (WL) foram mais eficientes para inibir o teste de edema, mas não inibiram a atividade fosfolipásica indireta.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, R. M. M. **Efeito de choques elétricos no comportamento das glândulas de veneno de operárias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)** UNESP:Rio Claro, SP: Dissertação de Mestrado 1996. 102 p.
- AGUNU, A., S. YUSUF, G. O. ANDREW, A. U. ZEZI e E. M. ABDURAHMAN Evaluation of five medicinal plants used in diarrhoea treatment in Nigeria. **J Ethnopharmacol** 101(1-3): 27-30, (2005).
- ALMEIDA, R. N., D. S. NAVARRO e J. M. BARBOSA-FILHO Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine** 8(4): 310-22, (2001).
- ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R., T. C. SINCERO, A. C. DA SILVA, L. A. SAVI, C. M. GAIDO, J. M. BETTEGA, M. MANCINI, M. T. DE ALMEIDA, R. A. BARBOSA, M. R. FARIAS, C. R. BARARDI e C. M. SIMOES Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia** 76(3-4): 374-8, (2005).
- ANNAND, R. R., M. KONTOYIANNI, J. E. PENZOTTI, T. DUDLER, T. P. LYBRAND e M. H. GELB Active site of bee venom phospholipase A2: the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87. **Biochemistry** 9:35(14): 4591-4601, (1996).
- ARIAS, M. C. e W. S. SHEPPARD Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera*L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 5(3): 557-566, (1996).
- ARITAJAT, S., S. WUTTEERAPOL e K. SAENPHET Anti-diabetic effect of *Thunbergia laurifolia* Linn. aqueous extract. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 35 Suppl 2: 53-8, (2004).
- ASASE, A., A. A. OTENG-YEBOAH, G. T. ODAMTTEN e M. S. SIMMONDS Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. **J Ethnopharmacol** 99(2): 273-9, (2005).
- BANKS, B. E. C. e R. A. SHIPOLINI **Chemistry and pharmacology of honey bee venom** **Venoms of the hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioral aspects**. T. Piek. London, Academy Press: 329-416. (1986).
- BARBOSA, F. B. C. Biotecnologia e a conservação da biodiversidade Amazônica, sua inserção na política ambiental. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília 18(2): 69-94, (2001).
- BARRAVIERA, B. **Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro, Editora de Publicações Biomédicas.(1999).
- BERMAN, H. M., J. WESTBROOK, Z. FENG, G. GILLILAND, T. N. BHAT, H. WEISSIG, I. N. SHINDYALOV e P. E. BOURNE. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research** 28: 235-242, (2000).
- BIONDO, R., A. M. PEREIRA, S. MARCUSSI, P. S. PEREIRA, S. C. FRANCA e A. M. SOARES Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie** 85(10): 1017-25, (2003).
- BIONDO, R., A. M. SOARES, B. W. BERTONI, S. C. FRANCA e A. M. PEREIRA Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Rep** 22(8): 549-52, (2004).
- BOCHNER, R. e C. J. STRUCHINER Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Cad. Saúde Pública** 18(3), (2002).

BOOCH, G., I. JACOBSON e J. RUMBAUGH. UML, **Guia do Usuário tradução**. Rio de Janeiro, Campus.(2006).

BORGES, M. H., A. M. SOARES, V. M. RODRIGUES, S. H. ANDRIÃO-ESCARSO, H. DINIZ, A. HAMAGUCHI, A. QUINTERO, S. LIZANO, J. M. GUTIERREZ, J. R. GIGLIO e M. I. HOMSI-BRANDEBURGO Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.** 27(1): 21-30, (2000).

BORGES, M. H., A. M. SOARES, V. M. RODRIGUES, F. OLIVEIRA, A. M. FRANSCHESCHI, A. RUCAVADO, J. R. GIGLIO e M. I. HOMSI-BRANDEBURGO Neutralization of proteases from Bothrops snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). **Toxicon** 39(12): 1863-1869, (2001).

BRANDEBURGO, M. A. M. **Comportamento de defesa (agressividade) e aprendizagem de abelhas africanizadas: análise de correlação entre variáveis biológicas e climáticas, herdabilidade e observação em colméias irmãs**. Universidade de São Paulo:Ribeirão Preto: Tese 1986.

CAMARGO, J. M. F. e A. C. STORT. **A Abelha: Apis mellifera Linnaeus**. São Paulo, EDART.(1973).

CARDOSO, C. **UML na prática: do problema ao sistema**. Rio de Janeiro, Editora Ciência Moderna Ltda.(2003).

CARDOSO, J. L. C., F. O. S. FRANÇA, F. H. WEN, C. M. S. MALQUE e J. V. HADDAD. **Animais Peconhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp.(2003).

CECHINEL FILHO, V. e R. A. YUNES Estratégias para Obtenção de compostos Farmacologicamente Ativos apartir de Plantas Medicinais. Conceitos Sobre Modificação Estrutural para Otimização. **Química Nova** 21(1): 99-105, (1998).

CHHETRI, D. R., P. PARAJULI e G. C. SUBBA Antidiabetic plants used by Sikkim and Darjeeling Himalayan tribes, India. **J Ethnopharmacol** 99(2): 199-202, (2005).

COSTA NETO, E. M. e J. M. PACHECO **Utilização medicinal de insetos no povoado de Pedra Branca**, Santa Terezinha, Bahia, Brasil. **Biotemas** 18(1): 113-133, (2005).

CRUZ-LANDIM, C. e F. C. ABDALLA. **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Ribeirão Preto, FUNPEC-Editora.(2002).

D'ÁVILA, M. e L. C. MARCHINI Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. **Boletim da Indústria Animal** 62(1): 79-90, (2005).

DADUANG, S., N. SATTAYASAI, J. SATTAYASAI, P. TOPHROM, A. THAMMATHAWORN, A. CHAVEERACH e M. KONKCHAIYAPHUM Screening of plants containing *Naja naja siamensis* cobra venom inhibitory activity using modified ELISA technique. **Anal Biochem** 341(2): 316-25, (2005).

DE BOER, H. J., A. KOOL, A. BROBERG, W. R. MZIRAY, I. HEDBERG e J. J. LEVENFORS Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. **J Ethnopharmacol** 96(3): 461-9, (2005).

DE LUCCA, R. (2004). **A Cura ameaçada**. Revista Terra.

DE SOUZA, G. C., A. P. HAAS, G. L. VON POSER, E. E. SCHAPOVAL e E. ELISABETSKY Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J Ethnopharmacol** 90(1): 135-43, (2004).

DELANO, W. L. **The PyMOL User's Manual**. Palo Alto, CA, USA, DeLano Scientific.(2002).

DEMPSEY, C. E. The actions of melittin on membranes. **Biochim Biophys Acta**. 1031(2): 143-161, (1990).

DINIZ, N. M. **Estudos dos processos de enxameagem e de abandono de colônias de abelhas africanizadas em zonas rurais e urbanas**. Departamento de Genética, Universidade de São Paulo:Ribeirão Preto: Dissertação de Mestrado 1990. 90 p.

ESCALANTE, T., A. M. FRANSCHESCHI, A. RUCAVADO e J. M. GUTIERREZ Effectiveness of Batimastat, a syntetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damaged induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. Pharmacol**. 60: 269-274, (2000).

GARCIA, E. S., A. C. P. SILVA, B. GILBERT, R. R. SANTOS e T. TOMASI. **Fitoterápicos**. Campinas.(1996).

GIBAS, C. e P. JAMBECK. **Desenvolvendo Bioinformática**. Rio de Janeiro, Campus.(2001).

GOLDEN, D. B., D. G. MARSH, A. KAGEY-SOBOTKA, L. FREIDHOFF, M. SZKLO, M. D. VALENTINE e L. M. LICHTENSTIEN Epidemiology of insect venom sensitivity. **Jama** 262(2): 240-244, (1989).

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **J. Med. Chemistry** 28(7): 849-857, (1985).

GUELICH, S. e S. GUNDAVAN. **Programação CGI com Perl** (O Reilly). Rio de Janeiro, Editora Ciência Moderna Ltda.(2001).

GUTIERREZ, J. M., C. AVILA, E. ROJAS e L. CERDAS An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon** 26: 411-413, (1988).

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science** 177: 314-322, (1972).

HASHIMOTO, G. Brazilian Plants <http://www.brazilian-plants.com>.

HEGNER, D., U. SCHUMMER e G. H. SCHNEPEL The interaction of a lytic peptide, melitin, with spin-labeled membranes. **Biochem. Biophys. Acta** 291: 15-22, (1973).

HERSCH-MARTINEZ, P., B. E. LEANOS-MIRANDA e F. SOLORZANO-SANTOS Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. **Fitoterapia** 76(5): 453-7, (2005).

HÖLTJE, H. D., W. SIPPL, D. ROGNAN e G. FOLKERS. **Molecular Modeling: Basic Principles and Applications**. Weinheim, Wiley-VCH.(2003).

[HTTP://BETA.UNIPROT.ORG/](http://BETA.UNIPROT.ORG/).

[HTTP://BMBPCU36.LEEDS.AC.UK/QSITEFINDER/](http://BMBPCU36.LEEDS.AC.UK/QSITEFINDER/).

[HTTP://WWW.DRUPAL.ORG](http://WWW.DRUPAL.ORG).

[HTTP://WWW.FSF.ORG/LICENSES](http://WWW.FSF.ORG/LICENSES).

[HTTP://WWW.INTELIGAND.COM/ILIBDIVERSE/INDEX.SHTML](http://www.inteligand.com/ilibdiverse/index.shtml).

[HTTP://WWW.MYSQL.COM](http://www.mysql.com).

[HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/SITES/ENTREZ?DB=PUBMED](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed).

[HTTP://WWW.PERL.COM/](http://www.perl.com/).

[HTTP://WWW.PHP.NET](http://www.php.net).

HUTT, M. J. e P. J. HOUGHTON A survey from the literature of plants used to treat scorpion stings. **J Ethnopharmacol** 60(2): 97-110, (1998).

JIMENEZ-FERRER, J. E., Y. Y. PEREZ-TERAN, R. ROMAN-RAMOS e J. TORTORIELLO Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning. **Phytomedicine** 12(1-2): 116-22, (2005).

KATO, E. C. **Polinização em melão (Cucumis melo L.) no Nordeste (campo aberto) e Sul (estufa) do Brasil, testando atrativo para Apis mellifera**. Universidade Estadual Paulista:Jaboticabal: Monografia (Graduação em Zootecnia) 1997. 82 p.

KIMURA, Y. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. **In Vivo** 19(1): 37-60, (2005).

KITCHEN, D. B., H. DECORNEZ, J. R. FURR e J. BAJORATH Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov** 3: 935-949, (2004).

KLOUCEK, P., Z. POLESNY, B. SVOBODOVA, E. VLKOVA e L. KOKOSKA Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. **J Ethnopharmacol** 99(2): 309-12, (2005).

KOCH, A., P. TAMEZ, J. PEZZUTO e D. SOEJARTO Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. **J Ethnopharmacol** 101(1-3): 95-9, (2005).

KRETTLI, A. U., V. F. ANDRADE-NETO, M. G. BRANDAO e W. M. FERRARI The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 96(8): 1033-42, (2001).

KUBINYI, H. Drug Research: Myths, Hype and Reality, **Nature Rev. Drug Discov.** 2: 665-668, (2003).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685, (1970).

LANS, C., T. HARPER, K. GEORGES e E. BRIDGEWATER Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. **BMC Complement Altern Med** 1: 10, (2001).

LAURIE, A. T. e R. M. JACKSON Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. **Bioinformatics** 21: 1908-1916, (2005).

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira **Quím. Nova** 30(6), (2007).

- LIMA, P. R. e M. R. BROCHETTO-BRAGA Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** 9(2), (2003).
- LIPINSKI, C. A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies** 1: 337-341, (2004).
- LIPINSKI, C. A., F. LOMBARDO, B. W. DOMINY e P. J. FEENEY Experimental and computational approaches to estimate solubility in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews** 23: 3-25, (1997).
- MAHANTA, M. e A. K. MUKHERJEE Neutralisation of lethality, myotoxicity and toxic enzymes of *Naja kaouthia* venom by *Mimosa pudica* root extracts. **J Ethnopharmacol.** 75(1): 55-60, (2001).
- MAIA, A. B. O potencial terapêutico da apitoxina. **Mensagem Doce** 66: 15-22, (2002).
- MARTZ, W. Plants with a reputation against snakebite. **Toxicon** 30(19): 1131-1142, (1992).
- MELLO, M. H. S. H., E. A. SILVA e D. NATAL Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. **Rev Saúde Pública** 37(2): 237-241, (2003).
- MELO, P. A., M. C. NASCIMENTO, W. B. MORS e G. SUAREZ-KURTZ Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. **Toxicon** 32(5): 595-603, (1994).
- MELO, P. A. e C. L. OWNBY Ability of wedelolactone , heparin and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their myotoxins. **Toxicon** 37(1): 199-215, (1999).
- MELONI, J. C. **Fundamentos de PHP**. Rio de Janeiro, Editora Ciência Moderna Ltda.(2000).
- MENDES, M. M., L. H. F. VALE, L. C. P. C. GEBRIM, A. HAMAGUCHI e M. I. HOMSI-BRANDEBURGO (2002). Inhibition of PLA 2, coagulant and hemorrhagic activities of *Bothrops alternatus* venom by *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) extract. VII Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia.
- MERCER, D. **Durpal - Creating Blogs, Forums, Portals, and Community Websites**, Packt Publishing.(2006).
- MICHELINAKIS, D. **Open Source Content Management Systems: An Argumentative Approach**. The University of Warwick:2004. 99 p.
- MORS, W. B., M. C. NASCIMENTO, B. M. PEREIRA e N. A. PEREIRA Plant natural products active against snake bite--the molecular approach. **Phytochemistry** 55(6): 627-42, (2000).
- MUELLER, H. L. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. **J. Asthma Res.** 3(4), (1966).
- PALMA, M. S. e M. R. BROCHETTO-BRAGA Biochemical variability between venoms from different honey bee (*Apis mellifera*) races. **Comp. Bioch. Physiol.** 106C(2): 423-427, (1993).
- PASTOR, M., G. CRUCIANI, I. MCLAY, S. PICKETT e S. CLEMENTI GRID-Independent descriptors (GRIND): a novel class of alignment-independent three-dimensional descriptors. **Journal of Medicinal Chemistry** 43: 3233-3243, (2000).
- PATRICK, G. L. **The why and the wherefore: drug targets**. An introduction to medicinal chemistry. New York, Oxford University Press: 8-23. (2005).

- PEIREN, N., F. VANROBAEYS, D. C. GRAAF, B. DEVREESE, J. V. BEEUMEN e F. J. JACOBS The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1752(1): 1-5, (2005).
- PEREZ, J. C., M. R. MCKELLER, J. C. PEREZ, E. E. SANCHEZ e M. S. RAMIREZ An internet database of crotaline venom found in the United States. *Toxicon* 39(5): 621-32, (2001).
- PUGA, R. D. **Conexão in silico entre Plantas Medicinais e Animais Venenosos.** Departamento de Genética, USP:Ribeirão Preto: Dissertação de Mestrado 2008. 54 p.
- RAGHURAMAN, H. e A. CHATTOPADHYAY Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep.* 27(4-5): 189-223, (2007).
- RING, C. S., E. SUN, J. H. MCKERROW, G. K. LEE, P. J. ROSENTHAL, I. D. KUNTZ e F. E. COHEN Structure-based inhibitor design by using proteins models for the development of antiparasitic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 3583-3587, (1993).
- RIZZINI, C. T., W. B. MORS e N. A. PEREIRA Plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas de animais, especialmente veneno de cobra. *Revista Brasileira de Farmácia* 69(4): 82-86, (1988).
- ROBBERS, J. E., M. K. SPEEDLE e V. E. TYLER. **Pharmacognosy and Pharmacobio-technology.** Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.(1993).
- RODRIGUES, V. M., A. M. SOARES, S. H. ANDRIO-ESCARSO, A. M. FRANCESCHI, A. RUCAVADO, J. M. GUTIERREZ e J. R. GIGLIO Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from Bothrops neuwiedi snake venom. *Biochimie* 83(6): 471-9, (2001).
- RODRIGUES, V. M., A. M. SOARES, R. GUERRA-SÁ, V. RODRIGUES, M. R. FONTES e J. R. GIGLIO Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from Bothrops neuwiedi snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 381: 213-224, (2000).
- ROSENFELD, G. **Animais peçonhentos e tóxicos do Brasil.** Introdução à geografia médica do Brasil. B. R. G. S. J. W. Lacaz C.S. São Paulo, Edgar Blücher: 430-475. (1972).
- RUPPELT, B. M., E. F. R. PEREIRA, L. C. GONÇALVES e N. A. PEREIRA Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. analgesic and anti-inflammatory activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86(2): 203-206, (1991).
- RUTTNER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybees** Berlin, Springer-Verlag.(1988).
- SILVA JR., P. G. P., M. M. MELO, R. R. CARDOSO, K. M. FERREIRA, F. V. FONSECA, L. A. LAGO e G. G. HABERMEHL (2002). Local treatment of experimental envenoming by *Bothrops alternatus* in dogs with the aqueous extract of *Kalanchoe brasiliensis*. VII Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia.
- SILVA, V. B. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes.** USP:Ribeirão Preto: Dissertação de Mestrado 2007. 128 p.
- SILVA, V. B. e C. H. T. P. SILVA Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. *Rev. Eletrônica de Farmácia* 4(1): 15-26, (2007).
- SILVEIRA, F. A., G. A. MELO e E. A. B. ALMEIDA. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação.** Belo Horizonte.(2002).

- SIROTKIN, K. NCBI: **Integrated Data for Molecular Biology Research Bioinformatics: Databases and Systems**. S. Letovsky, Springer US. (2006).
- SOARES, A. E. E., E. R. F. MICHELETTE, N. M. DINIZ e M. V. TEIXEIRA (1994). Dispersão das abelhas africanizadas nas Américas: aspectos comportamentais. X Congresso Brasileiro de Apicultura, Pousada do Rio Quente, Anais do X Congresso Brasileiro de Apicultura.
- SOARES, A. M., S. H. ANDRILHO-ESCARSO, Y. ANGULO, B. LOMONTE, J. M. GUTIERREZ, S. MARANGONI, M. H. TOYAMA, R. K. ARNI e J. R. GIGLIO Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys** 373(1): 7-15, (2000).
- SOARES, A. M., S. H. ANDRILHO-ESCARSO, Y. ANGULO, B. LOMONTE, J. M. GUTIERREZ, S. MARANGONI, M. H. TOYAMA, R. K. ARNI e J. R. GIGLIO Structural and functional characterization of a myotoxin I from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** 373: 7-15, (2000).
- SOARES, A. M., S. H. ANDRILHO-ESCARSO, R. K. BORTOLETO, L. RODRIGUES-SIMIONI, R. K. ARNI, R. J. WARD, J. M. GUTIERREZ e J. R. GIGLIO Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch Biochem Biophys** 387(2): 188-96, (2001).
- SOARES, A. M., R. GUERRA-SA, C. R. BORJA-OLIVEIRA, V. M. RODRIGUES, L. RODRIGUES-SIMIONI, V. RODRIGUES, M. R. FONTES, B. LOMONTE, J. M. GUTIERREZ e J. R. GIGLIO Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys** 378(2): 201-9, (2000).
- SOARES, A. M., A. H. JANUÁRIO, A. M. S. PEREIRA, M. V. LOURENÇO e P. S. PEREIRA Neutralizing Effects of Snake Venoms Exhibited by Brazilian Plants. REVIEW. **Drugs of the Future** 29(11): 1105-1117, (2004).
- SOARES, A. M., F. K. TICLI, S. MARCUSSI, M. V. LOURENÇO, A. H. JANUÁRIO, S. V. SAMPAIO, J. R. GIGLIO, B. LOMONTE e P. S. PEREIRA Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr Med Chem** 12(22): 2625-41, (2005).
- SOUZA BRITO, A. R. e A. A. SOUZA BRITO Medicinal Plant Research in Brazil: Data from regional and national meetings. **Medicinal Resources of the Tropical Forest**, (1996).
- TAN, P. T. J., A. M. KHAN e V. BRUSIC Bioinformatics for venom and toxin sciences. **Briefings In Bioinformatics** 4(1): 53-62, (2003).
- TAYLOR, R. D., P. J. JEWSEBURY e J. W. ESSEX A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design** 16: 151-166, (2002).
- TRIPOS(INC.). **Sybyl User Guide**, version 7.1. CA, USA, Tripos Inc.(2005).
- VERDONK, M. L., J. C. COLE, M. J. HARTSHORN, C. W. MULLRAY e R. D. TAYLOR Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**. 52: 603-609, (2003).
- VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia – Manual das plantas medicinais**. São Paulo, Agronômica Ceres.(1992).
- WADE, R. C. **Calculation and application of molecular interaction. Molecular interaction fields**. G. Cruciani. Weinheim, Wiley-VCH: 27-42. (2006).

WALL, L., T. CHRISTIANSEN e J. ORWANT. **Programação Perl**. Rio de Janeiro, Campus.(2001).

WALTHER, D. WebMol--a Java-based PDB viewer. **Trends Biochem Sci**. 22(7): 274-275, (1997).

WWW1.FOLHA.UOL.COM.BR/FOLHA/REUTERS/ULT112U12329.SHL.

WWW.BIOTECNOLOGIA.COM.BR/MATERIAS/.

WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV.

WWW.RCSB.ORG/PDB/HOME/HOME.DO.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa de experimentação animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 107/2007, sobre o projeto intitulado “*Busca de inibidores naturais contra venenos de abelhas*”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Silvana Giuliatti**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **31 de março de 2008**.

(We certify that the protocol nº 107/2007, about “*Search for natural inhibitors against bee venom*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **03/31/2008** meeting).

Ribeirão Preto, 1º de abril de 2008.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal