

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Campus Sorocaba

**CARACTERIZAÇÃO DA GLÂNDULA DE VENENO DA ABELHA *Xylocopa frontalis*  
(Hymenoptera, Apidae, Xylocopini) PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E  
FARMACÊUTICAS: UMA INVESTIGAÇÃO HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA E  
DE PERFIL PROTEICO**

Discente: Raphael Henrique da Silva  
Orientadora: Elaine Cristina Mathias da Silva

Sorocaba  
2025

Raphael Henrique da Silva

Caracterização da glândula de veneno da abelha *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini) para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas: uma investigação histológica, histoquímica e de perfil proteico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva

Financiamento da bolsa: Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Financiamento da pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Projeto Temático (Processo nº: 2017/21097-3)

Sorocaba  
2025

Silva, Raphael Henrique da

Caracterização da glândula de veneno da abelha  
*Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini)  
para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas: uma  
investigação histológica, histoquímica e de perfil  
proteico / Raphael Henrique da Silva -- 2025.  
60f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São  
Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba  
Orientador (a): Elaine Cristina Mathias da Silva  
Banca Examinadora: Elton Luiz Scudeler, Vanessa  
Rezende Bevilaqua  
Bibliografia

1. Lectinas. 2. Serino-proteases. 3. Abelha carpinteira. I.  
Silva, Raphael Henrique da. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -  
CRB/8 6979



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Raphael Henrique da Silva, realizada em 27/02/2025.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Elton Luiz Scudeler (UNESP)

Profa. Dra. Vanessa Rezende Bevilaqua (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

## AGRADECIMENTO

Ao longo dos anos, fui abençoado por ter o apoio inabalável de amigos, familiares, professores e colegas, que sempre me incentivaram a dar o meu melhor. A presença constante dessas pessoas na minha vida tornou possível que eu chegasse a este ponto da minha trajetória.

Agradeço primeiramente à minha base, que sempre foi meu apoio incondicional. Ao meu pai Odair e à minha mãe Adriana, que me incentivaram desde o início, mesmo quando eu não sabia qual caminho seguir. Sou grato à minha avó Margarida, minha eterna orientadora, que me ensinou o amor e sempre será meu lar, mesmo daí de cima. Aos meus tios, que foram meus segundos pais, e às minhas primas Joyce e Carol, companheiras de toda a vida. Por fim, à minha irmã Sophie, que sempre manteve a minha felicidade.

Sou imensamente grato à minha orientadora, Elaine Cristina Mathias da Silva, que foi a melhor que eu poderia ter. Com ela, aprendi sobre persistência, paciência, inteligência e a ver a vida de forma leve e alegre. Seu apoio e sabedoria foram fundamentais no meu crescimento acadêmico e pessoal. Agradeço por se tornar, além de orientadora, uma amiga sempre presente, disposta a me guiar com carinho e dedicação. Sou profundamente grato por tudo o que aprendi e pela confiança que depositou em mim.

Ao NuPECA e a todos que esse laboratório me apresentou. Em especial, agradeço à minha parceira de mestrado, Rebeca, pela parceria e dedicação ao longo de toda essa jornada; à minha parceira de coleta e cortes, Kyl, que esteve ao meu lado nas etapas mais desafiadoras; à minha parceira de estatística e de novas ideias, Rafaela, por sempre me incentivar a pensar de maneira inovadora e ampliar meus horizontes. Agradeço também à Karla, que me ajudou no processo final com toda sua paciência. Agradeço também ao LADIVE e ao Laboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Sistemas Bioluminescentes, que me deram todo o apoio no entendimento de diversas técnicas. Em especial, agradeço ao Gabriel, que me impulsionou nesta jornada final, permitindo que eu ampliasse meu conhecimento e alcançasse novos patamares

Por fim, sou grato ao meu lar, que se encontra nas pessoas. Aos meus amigos Rafaela, Caroline, Gabriel, Rafael e Gabriela, que, mesmo na correria da vida adulta, quando precisei me ausentar, continuam vibrando por mim com tanto carinho e apoio. Sou grato por cada momento compartilhado e, principalmente, por perceber que a amizade verdadeira não exige esforço constante ou algo em troca. Vocês permaneceram ao meu lado. Saibam que sempre estarei ao lado de cada um de vocês, com o mesmo afeto e dedicação, independentemente do tempo ou da distância.

A todos que fizeram de mim quem hoje sou, meu eterno obrigado. Amo vocês.

## RESUMO

**Henrique da Silva, Raphael. Caracterização da glândula de veneno da abelha *Xylocopa frontalis* (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini) para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas: uma investigação histológica, histoquímica e de perfil proteico. 2025. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba, 2025.**

Os himenópteros possuem mais de um milhão de espécies estimadas. Desde o século XVII, seu ferrão e estruturas associadas têm sido estudados, mas a maioria das pesquisas foca em algumas espécies de abelhas sociais. Os venenos de abelhas não-sociais ainda são pouco explorados, e os únicos estudos sobre toxinas das mamangavas do gênero *Xylocopa* foram com espécies exóticas. A bioprospecção desses venenos para a indústria farmacêutica é de interesse biotecnológico. Neste contexto, o presente estudo concentra-se na caracterização da glândula de veneno das abelhas não-sociais nativas da espécie *Xylocopa frontalis*. O objetivo geral do presente estudo é realizar uma análise histológica e histoquímica das glândulas de veneno da abelha não-social *Xylocopa frontalis*, de forma comparativa com a abelha eussocial *Apis mellifera*, em conjunto com uma avaliação do perfil dos componentes proteicos do veneno de *X. frontalis*. Para isso, após a coleta, realizada na região de Sorocaba - SP, e anestesia dos insetos, as glândulas de veneno foram dissecadas e, posteriormente, fixadas em paraformaldeído 4%. Após fixação, os órgãos foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool, incluídos em historesina, e submetidos posteriormente a microtomia para obtenção de lâminas histológicas e histoquímicas, submetidas à coloração com Hematoxilina-Eosina para caracterização morfológica e a diferentes colorações histoquímicas (P.A.S., Azul de Bromofenol, Xylidine Ponceau e Sudam Black) para detecção de macromoléculas de carboidratos, proteínas e lipídios. Realizou-se a quantificação da marcação positiva para proteínas, por meio da intensidade de pixels, das seções histológicas submetidas à técnica histoquímica de Xylidine Ponceau, com análise estatística no software R. Procedeu-se a dosagem proteica das glândulas de veneno de *Xylocopa frontalis* e *Apis mellifera* pelo método de Bradford, e a comparação das concentrações foi realizada via bootstrapping. Para a caracterização proteica, empregou-se SDS-PAGE, analisando-se a mobilidade das proteínas que formam bandas em gel e determinando-se a massa molecular por regressão linear no Excel. Em *X. frontalis*, o aparelho de veneno é 5 vezes maior do que em *A. mellifera*, com um reservatório e uma glândula adaptados para defesa com presença de musculatura bem desenvolvida, o que preserva a permanência do aparato no ato de ferroar. Os dados da histoquímica indicam predominância protéica em ambas as espécies, sem presença de lipídios. *A. mellifera* possui concentração 8,5 vezes maior de proteínas no extrato total, enquanto *X. frontalis* tem secreção proteica menos concentrada no lúmen do reservatório da glândula de veneno, com presença de proteínas de massas moleculares indicativas de serem lectinas, serino-proteases e proteínas multiméricas.

Palavras-chave: Lectinas, serino-proteases, abelha carpinteira.

## ABSTRACT

Hymenoptera have an estimated population of over one million species. Their iron and associated structures have been studied since the 17th century, but most research has focused on a few species of social bees. The venoms of non-social bees are still poorly explored, and the only studies on *Xylocopa* toxins have analyzed foreign species. The bioprospecting of these venoms for the pharmaceutical industry is of biotechnological interest. In this context, the present study focuses on the characterization of the venom gland of native non-social bees of the species *Xylocopa frontalis*. The general objective of the present study is to perform a histological and histochemical analysis of the venom glands of the non-social bee *X. frontalis*, in comparison with the eusocial bee *Apis mellifera*, together with an evaluation of the protein component profile of the venom of *X. frontalis*. For this purpose, after a collection, carried out in the region of Sorocaba - SP, and anesthetized insects, the venom glands were dissected and subsequently introduced into 4% paraformaldehyde. After fixation, the organs were dehydrated in solutions with increasing concentrations of alcohol, embedded in historesin, and subsequently submitted to microtomy to obtain histological and histochemical slides, stained with hematoxylin-eosin for morphological characterization and to different histochemical stains (P.A.S., Bromophenol Blue, Xylidine Ponceau and Sudam Black) for detection of carbohydrate, protein and lipid macromolecules. A histochemical quantification of proteins by pixel intensity was performed using Xylidine Ponceau, with statistical analysis in the R software. Protein dosage of the venom glands of *X. frontalis* and *A. mellifera* was performed using the Bradford method, and the comparison of concentrations was performed via bootstrapping. For protein characterization, SDS-PAGE was used, analyzing the mobility of the bands in gel and determining the molecular mass by linear regression in Excel. In *X. frontalis*, the venom apparatus is 5 times larger than in *A. mellifera*, with a reservoir and a gland adapted for defense with greater muscular abundance, which preserves the permanence of the apparatus. Histochemical staining indicates protein predominance in both species, with no presence of lipids. *A. mellifera* has an 8.5 times higher concentration of proteins in the total extract, while *X. frontalis* has less technical protein binding in the lumen of the venom gland reservoir, with the presence of proteins with molecular masses indicative of being lectins, serine proteases and multimeric proteins.

Keywords: Lectins, serine proteases, carpenter bee.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
1.1. OBJETIVOS	12
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>13</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
2.1. COLETA DAS ABELHAS <i>Xylocopa frontalis</i> E <i>Apis mellifera</i>	24
2.2. ANÁLISES HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS COMPARADAS	27
2.3. QUANTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS PELA INTENSIDADE DE PIXELS	28
2.4. DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS GLÂNDULAS DE VENENO DE <i>Xylocopa frontalis</i> E <i>Apis mellifera</i>	29
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS DO ESTRATO TOTAL OBTIDAS ATRAVÉS DO MÉTODO DESCRITO POR BRADFORD (1976) DE <i>X. frontalis</i> e <i>A. mellifera</i>	29
2.6. PADRÃO PROTÉICO ELETROFORÉTICO DAS GLÂNDULAS DE VENENO DE <i>Apis mellifera</i> E <i>Xylocopa frontalis</i>	30
2.7. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE COM ANÁLISE GRÁFICA NO EXCEL	31
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas, pertencentes à mesma ordem das formigas e vespas, representam um grupo diversificado com mais de 20.000 espécies distribuídas pelo mundo (Hymenoptera, Apoidea, Anthophila), cada uma exibindo características biologicamente distintas (Michener, 2007; Trapp *et al.*, 2017). No Brasil, há cerca de 2.500 espécies de abelhas divididas em cinco famílias principais: Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae e Megachilidae (Silva *et al.*, 2014). Esses insetos são essenciais para a preservação da diversidade de plantas, tanto nativas quanto cultivadas, em habitats naturais (Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010). Além disso, evidências arqueológicas e antropológicas demonstram que as abelhas desempenham um papel significativo no conhecimento cultural de diversos povos indígenas ao redor do planeta, incluindo antigas civilizações como os egípcios e maias (Sheppard *et al.*, 2001; Ayala *et al.*, 2013; González, 2013).

Estudos recentes têm revelado preocupações significativas sobre o declínio das populações de abelhas na Europa, América do Norte, Latina e Brasil (Biesmeijer *et al.*, 2006; Martins e Melo, 2010; Potts *et al.*, 2010; Cameron *et al.*, 2011). Com dados alarmantes, houve a redução de até 96% na abundância relativa de algumas espécies de abelhas norte-americanas entre 1990 e 2010, além de uma diminuição de até 87% nas áreas geográficas originais dessas espécies (Cameron *et al.*, 2011). Outro estudo sobre polinizadores indicou uma possível perda de áreas adequadas para a maioria das espécies de abelhas analisadas no Brasil (Giannini *et al.*, 2012). Além disso, pesquisas apontam que os polinizadores de maracujazeiros do gênero *Xylocopa*, abelhas não sociais, podem sofrer uma redução de até 90% em sua distribuição no Cerrado brasileiro (Giannini *et al.*, 2013). De forma semelhante, projeções para a América Latina estimam uma diminuição de 8% a 18% nas populações de abelhas responsáveis pela polinização do café, o que pode comprometer até 30% das áreas destinadas à produção futura da cultura (Imbach *et al.*, 2017). Diante desse cenário preocupante, é evidentemente necessário aprofundar o conhecimento sobre as abelhas nativas do Brasil, para melhor avaliar o status dos polinizadores e os serviços de polinização, reforçando a urgência de obter informações mais acessíveis e abrangentes sobre essas espécies (Berenbaum *et al.*, 2007).

Os recursos naturais oriundos das abelhas, disponíveis em grande quantidade e amplamente explorados por seres humanos há muito tempo para diversos fins, como alimentação, medicina e agricultura (Al-Rubaie *et al.*, 2024), incluem também substâncias

específicas com propriedades terapêuticas, como o veneno de abelha, que tem sido tradicionalmente utilizado no tratamento de doenças inflamatórias (Bava *et al.*, 2023).

Os venenos provenientes de abelhas, cobras, escorpiões e aranhas são amplamente reconhecidos e investigados por suas propriedades medicinais (Pinto, 2011; Ferraz, 2012). Animais peçonhentos representam uma fonte valiosa para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras. Medicamentos derivados de veneno de cobra são empregados no tratamento de condições como hipertensão, infarto do miocárdio, síndrome coronariana aguda, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar e outras enfermidades (Bulgarelli, *et al.*, 2010). A terapia com veneno de abelha, por exemplo, é aplicada no tratamento de diversas condições musculoesqueléticas, como dor lombar, osteoartrite de joelho, doença de Parkinson, capsulite adesiva e síndrome dos ovários policísticos (Jang e Kim, 2020; Sung, *et al.*, 2023). Embora os venenos animais possuam propriedades tóxicas, sua aplicação terapêutica é explorada devido aos efeitos benéficos que podem proporcionar. Essa abordagem destaca o potencial desses compostos naturais na busca por tratamentos inovadores e eficazes para diversas patologias (Sung *et al.*, 2021).

Os venenos de vespas e abelhas sociais, têm sido amplamente estudados devido à sua composição rica em peptídeos, desempenhando um papel essencial na defesa dos ninhos e proteção contra predadores também. O veneno de abelha é uma mistura complexa de diversos compostos, cada um com várias propriedades farmacológicas (Malek *et al.*, 2023). Em contrapartida, os venenos de espécies não-sociais ainda necessitam de mais pesquisas, pois permanecem inexplorados (Kazuma, *et al.*, 2017). Até o momento dessa pesquisa, os únicos estudos analisando toxinas do veneno de abelha parassocial do gênero *Xylocopa* existentes são da abelha carpinteira japonesa *Xylocopa apendiculata circumvolans* (Kazuma, *et al.*, 2017; Kawakami, *et al.*, 2017); da abelha europeia *Xylocopa violacea* (Von Reumont, *et al.*, 2022) e da abelha australiana *Xylocopa aruana* (Shi, *et al.*, 2022).

O foco de longa data no estudo de venenos nas abelhas eussociais, como as do gênero *Apis*, e em abelhas do gênero *Bombus*, não consideram que as abelhas não-sociais nativas têm grande relevância do ponto de vista evolutivo e dos serviços ecossistêmicos que desempenha para a manutenção da flora brasileira. Como exemplo desse aporte na ecologia, as abelhas pertencentes ao gênero *Xylocopa*, conhecidas pelo seu tamanho, desempenham um papel destacado como polinizadores eficientes de flores de grande dimensão (Silva *et al.*, 2014), como a crotalária (*Crotalaria juncea* L.), a flor do maracujazeiro (*Passiflora edulis* L.), da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. e Bonpl.), do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) e dos cactos da pitaia (*Hylocereus* spp.). Seu tamanho permite que elas alcancem as estruturas

reprodutivas dessas flores, facilitando ou aprimorando o processo de polinização e, assim, impactando positivamente a quantidade e a qualidade dos frutos gerados (Farias-Silva e Freitas, 2021).

Sabendo da importância das investigações de perfil proteico do veneno de abelhas para identificar as potenciais proteínas para uso terapêutico, o conhecimento existente sobre a glândula de veneno da espécie modelo *Apis mellifera* que é a mais estudada, contribui para o entendimento das características das glândulas de veneno de outras abelhas, inclusive aquelas que ainda não foram analisadas sob essa abordagem. Apesar de pequenas diferenças na morfofisiologia das glândulas entre diferentes espécies, sua estrutura e função geral são bastante semelhantes (Cruz-Landim e Abdalla, 2002). Diante disso, pode-se inferir que tanto o tubo quanto o reservatório possuem a mesma estrutura celular em *A. mellifera* e *Xylocopa frontalis*. Como *A. mellifera* é amplamente utilizada como espécie modelo em pesquisas, essa semelhança estrutural sugere que características observadas em sua glândula de veneno podem, em grande parte, ser extrapoladas para *X. frontalis*, reforçando a aplicabilidade dos conhecimentos obtidos em estudos comparativos.

Outrossim, o estudo apresenta uma análise comparativa das glândulas de veneno de *A. mellifera* e *X. frontalis*, buscando esclarecer suas semelhanças e diferenças estruturais. Além disso, apresenta uma investigação histoquímica do veneno, fornecendo subsídios para estudos bioquímicos voltados à prospecção de peptídeos bioativos de *X. frontalis* com potencial aplicação farmacêutica. A identificação desses compostos pode ter implicações significativas no desenvolvimento de novos medicamentos ou terapias. Paralelamente, o estudo reforça a importância da conservação da espécie que está em consonância com alguns Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU (Nações Unidas Brasil, 2025). Os ODS representam uma agenda global estabelecida pela Organização das Nações Unidas para promover o desenvolvimento sustentável em diversas áreas, abordando desafios ambientais, sociais e econômicos de forma integrada. Dentre esses objetivos, destacam-se aqueles voltados para a preservação da biodiversidade, o avanço da ciência na área da saúde e a adoção de práticas responsáveis no uso dos recursos naturais.

Uma vez que o conhecimento sobre os efeitos farmacológicos de seu veneno viabiliza a bioprospecção para futura síntese e produção industrial de veneno para fins terapêuticos, a exemplo do que ocorre com venenos de serpentes, esse potencial biotecnológico está diretamente alinhado ao ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), que visa assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todas as idades. A pesquisa pode contribuir para o desenvolvimento de novos tratamentos médicos, explorando compostos bioativos presentes

no veneno para a criação de fármacos inovadores, o que pode beneficiar a saúde pública e ampliar as opções terapêuticas para diversas doenças.

Além disso, ao evidenciar o valor biotecnológico desses compostos, destaca-se a necessidade da conservação de *X. frontalis* e, conseqüentemente, de seu habitat. A destruição de áreas naturais pode comprometer a sobrevivência dessa espécie e, por consequência, a continuidade das pesquisas sobre seu veneno. Essa preocupação está diretamente ligada ao ODS 15 (Vida Terrestre), que tem como objetivo proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, frear a perda da biodiversidade e garantir a preservação de espécies ameaçadas.

Por fim, a bioprospecção responsável do veneno reforça a importância de práticas que garantam sua exploração de forma sustentável, sem comprometer os recursos naturais e a preservação da espécie. Esse princípio está alinhado ao ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), que incentiva o uso eficiente dos recursos naturais, a redução do impacto ambiental das atividades produtivas e a adoção de práticas sustentáveis na cadeia de produção. Ao propor o uso biotecnológico do veneno, o estudo reflete a necessidade de políticas de manejo responsável, garantindo que a extração de veneno não comprometa a população de *X. frontalis* nem seu papel ecológico no ecossistema.

## 1.1. OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa foi caracterizar histologicamente e histoquimicamente o aparato de veneno da abelha não-social *X. frontalis*, especificamente o reservatório de veneno e o filamento secretor que compõe a glândula de veneno, de forma comparativa com a espécie-modelo eussocial *A. mellifera*, bem como avaliar o perfil protéico das duas espécies. Ao comparar esses resultados entre espécies, pretende-se identificar semelhanças e diferenças histológicas, histoquímicas e de perfil proteico, de forma a demonstrar as possíveis particularidades deste órgão e do veneno em *X. frontalis*.

Para atingir o objetivo geral, os objetivos específicos foram:

- 1- Caracterização da glândula e reservatório de veneno da *X. frontalis*, comparando com *A. mellifera* por meio de análise histológica e histoquímica;
- 2- Realizar a quantificação da intensidade da marcação histoquímica positiva das proteínas totais do veneno em secções histológicas do reservatório coradas com Xylidine Ponceau.
- 3- Quantificar as proteínas totais do órgão e do veneno, determinando suas massas moleculares por eletroforese.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

Ao longo da história humana, entrelaça-se a narrativa da Toxicologia, uma ciência dedicada ao estudo dos efeitos adversos de substâncias químicas nos organismos. A trajetória dessa área da ciência remonta a tempos remotos, evidenciando-se em diversos marcos históricos, que trazem reflexões no mundo moderno.

Uma revisão histórica realizada por Fukushima e Azevedo (2008, p.3) (Fig. 1), demonstra que cerca de 5000 a.C., na China, o imperador Shen Nung, desempenhou um papel crucial ao testar cerca de 365 ervas para tratar doenças, introduzindo assim o conhecimento sobre plantas medicinais na cultura chinesa. Na antiguidade, por volta de 1500 a.C., o papiro de Ebers, um dos mais antigos documentos com informações toxicológicas, revelou os conhecimentos médicos do antigo Egito. Esse papiro, adquirido por Edwin Smith em 1862 e posteriormente comprado por Georg Moritz Ebers em 1872, destacou-se por conter dados sobre anatomia humana e estrutura vascular, e prescrições de substâncias curativas, incluindo cerca de 700 a 800 princípios ativos conhecidos. Na Suméria, por volta de 1400 a.C., textos associados à figura mitológica Gula indicaram a ligação da toxicologia com práticas de magia e envenenamentos, sublinhando a presença dessa ciência em diferentes culturas antigas. Durante o período Homérico, Homero descreveu o uso de veneno em flechas em suas obras "A Odisseia" e "A Ilíada". Já em 399 a.C., Sócrates foi condenado a morrer bebendo cicuta, um alcalóide vegetal tóxico, demonstrando um entendimento notável do mecanismo de ação tóxica. No contexto das grandes figuras históricas, Alexandre o Grande, um dos maiores conquistadores da antiguidade, encontrou seu fim por envenenamento em 323 a.C.

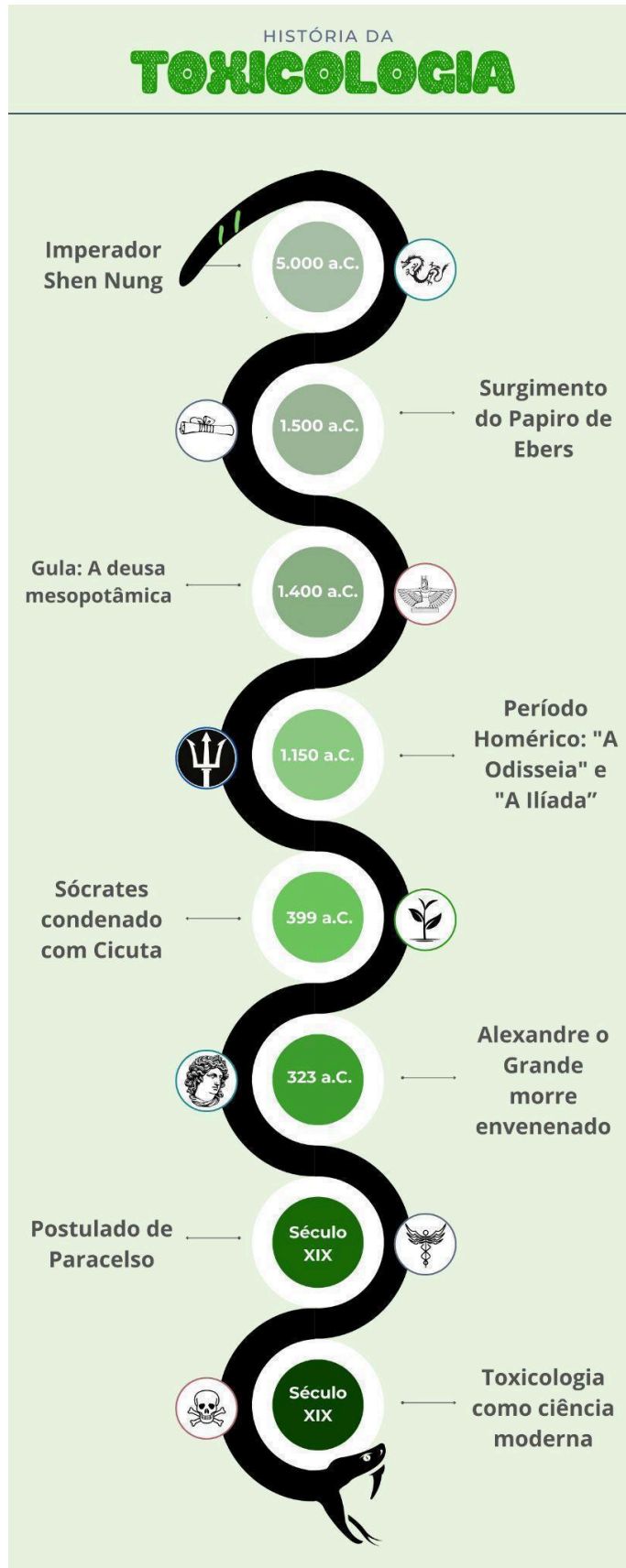
O século XIX testemunhou um marco significativo quando Paracelsus postulou que a diferença entre o que cura e o que envenena é a dose, estabelecendo fundamentos teóricos essenciais para a toxicologia como disciplina científica. Nesse período, a Toxicologia moderna começou a se configurar como uma ciência distinta, impulsionada pelo desenvolvimento da química na Europa.

Além das figuras mencionadas, personagens históricos como Mitridates IV, Cleópatra, membros da família Borgia, Leonardo da Vinci, Catarina de Médici e Mateu J. B. Orfila contribuíram de maneiras diversas para a evolução da Toxicologia, cada um deixando sua marca única na história dessa ciência, mostrando que o uso do veneno não é de origem atual (Fukushima e Azevedo, 2008).

Venenos constituem complexas misturas de proteínas com uma ampla gama de atividades biológicas (Cunha e Martins, 2012). Peptídeos do veneno são moléculas

biologicamente ativas, mirando proteínas específicas e receptores celulares alvos. Aplicados clinicamente, atuam como agentes hipotensores, antitrombóticos, anticoagulantes, analgésicos, entre outros. Essas substâncias que possuem utilidade no diagnóstico de distúrbios hemostáticos, são ferramentas bioquímicas para estudar mecanismos celulares e servem como base para o desenvolvimento de novos medicamentos, exemplificados por captopril, tirofibana e eptifibatide (Waheed, *et al.* 2017).

Figura 1: Linha do tempo da história da Toxicologia.



Fonte: Autoria própria

A descoberta do Captopril, o primeiro medicamento anti-hipertensivo inibidor da enzima conversora de angiotensina, surgiu de estudos sobre os efeitos do veneno da cobra jararaca (*Bothrops jararaca*), conduzidos por Sérgio Ferreira e Rocha e Silva (1965) na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses estudos destacaram os efeitos hipotensores do veneno. Em doses elevadas para pacientes com insuficiência renal, o Captopril pode causar neutropenia (redução da contagem de neutrófilos no sangue) ou proteinúria (presença de proteína na urina, geralmente, a albumina). Alterações de paladar, erupções cutâneas e febre medicamentosa são efeitos tóxicos menos graves, ocorrendo em até 10% dos pacientes (Barreiro e Fraga, 2001; Benowitz, 1998; Fink, 1997).

Além do captopril, cuja descoberta exemplifica o potencial da bioprospecção para o desenvolvimento de fármacos inovadores, diversas espécies nativas também produzem compostos bioativos com possíveis aplicações terapêuticas. O lapachol, um naftoquinona extraído da casca interna de árvores da família Bignoniaceae, especialmente *Tabebuia impetiginosa*, tem demonstrado propriedades antimicrobianas e antitumorais, sendo estudado como um potencial agente no combate ao câncer (Almeida, *et al.*, 2024). Da mesma forma, toxinas encontradas no veneno da aranha-armadeira (*Phoneutria nigriventer*) apresentam promissoras ações analgésicas e anti-inflamatórias, além de atividade antimicrobiana que pode contribuir para o desenvolvimento de novos antibióticos (Yacoub, *et al.*, 2020). Já as secreções da rã *Phyllomedusa bicolor* possuem um complexo conjunto de toxinas com efeitos citotóxicos e antitumorais, além de propriedades antibacterianas e antiprotozoárias. Essas secreções são utilizadas no “Ritual Kambô” e exploradas tanto na medicina tradicional quanto em estudos científicos para potenciais aplicações farmacológicas (Nogueira, *et al.*, 2022).

O uso terapêutico do veneno de abelha também acontece e é uma prática antiga (Bava *et al.*, 2023), realizada de diversas maneiras, como através de ferroadas de abelhas vivas, injeções de pequenas doses de veneno e acupuntura. Apesar dos riscos associados, como toxicidade e anafilaxia, a acupuntura com veneno de abelha é considerada uma abordagem segura e oferece propriedades farmacológicas importantes do ponto de vista biotecnológico (Lin e Hsieh, 2020).

A apitoxina também exhibe efeitos neuroprotetores. Estudos em modelos de camundongos mostraram que o veneno pode reduzir a progressão e melhorar as funções cognitivas em doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica. Além disso, a habilidade do veneno de neutralizar radicais livres o classifica como uma substância com propriedades antioxidantes, sugerindo seu potencial uso na terapia

de condições fisiológicas e patológicas associadas ao aumento do estresse oxidativo (Malek et al., 2023).

Apesar de haver relatos sobre efeitos biológicos intrigantes do veneno bruto de abelhas carpinteiras (*Xylocopa*), a estrutura e a função biológica dos peptídeos presentes no veneno ainda não foram completamente compreendidas (Kawakami et al., 2017). Em relação à abelha nativa *X. frontalis*, a pesquisa realizada até o momento, é inédita.

As grandes abelhas carpinteiras do gênero *Xylocopa*, com mais de 730 espécies em 48 subgêneros, são majoritariamente tropicais e subtropicais. Estudadas há quase 300 anos, incluindo cerca de 60 espécies, elas são importantes para compreender o comportamento social e o impacto das limitações ecológicas na sua evolução (Gerling; Velthuis; Hefetz, 1989).

A *Xylocopa frontalis* (Olivier, 1789) é uma espécie pertencente ao reino Animalia e ao filo Arthropoda. Dentro deste filo, ela se classifica na classe Insecta e na ordem Hymenoptera, que inclui as abelhas, vespas e formigas. Mais especificamente, esta espécie está na subordem Apocrita e na superfamília Apoidea, que agrupa as abelhas verdadeiras. Ela faz parte da família Apidae e da subfamília Xylocopinae, conhecida por suas abelhas carpinteiras. Dentro desta subfamília, a *Xylocopa frontalis* pertence à tribo Xylocopini e ao gênero *Xylocopa*, caracterizando-se como uma das várias espécies desse gênero que habitam diferentes regiões (Minckley, 1998).

A abelha carpinteira *X. frontalis* possui um tamanho médio de corpo de aproximadamente 30 mm de comprimento, sendo caracterizada por ser uma abelha parassocial de grande porte (Fig. 2). Os machos exibem listras amarelas alternadas com listras pretas no abdômen, enquanto as fêmeas podem apresentar listras vermelhas intercaladas com pretas. Essas abelhas geralmente nidificam escavando galerias em troncos de árvores mortas e desempenham um papel crucial como polinizadores (Gerling; Velthuis; Hefetz, 1989; Freitas et al., 2020; A.B.E.L.H.A., 2024).

Figura 2: Tamanho médio de corpo de fêmeas de das abelhas *X. frontalis* (a esquerda) em comparação com *A. mellifera* (a direita).



Fonte: Autoria própria

A abelha *X. frontalis*, desempenha um papel crucial na polinização de diversas plantas brasileiras, sendo uma das espécies mais frequentes desse gênero no país. Reconhecidas pelo grande porte e capacidade de voo, essas abelhas exploram extensas áreas de forrageamento, demonstram fidelidade floral e utilizam a vibração para a coleta de pólen (Melo, 2024). Sua habilidade de acessar recursos limitados de maneira eficiente, aliada à longevidade e gerações sobrepostas, torna *X. frontalis* um modelo valioso para estudos (Buchmann e Minckley, 2019).

A escolha da espécie *X. frontalis* para este estudo se justifica pela sua importância ecológica como polinizadora de diversas plantas brasileiras, desempenhando um papel essencial na manutenção da biodiversidade e na preservação de ecossistemas. Embora o gênero *Xylocopa* já tenha sido abordado em alguns estudos, *X. frontalis* ainda é pouco explorada cientificamente, e no que diz respeito à sua glândula de veneno, os estudos são inexistentes, o que torna sua investigação relevante para preencher lacunas no conhecimento sobre essa abelha nativa.

A glândula de veneno em *A. mellifera*, que pode ser correlacionada com *X. frontalis*, tem origem ectodérmica e consiste em um ou vários filamentos secretores constituídos por um epitélio simples que desembocam em um reservatório, o qual pode ter ou não músculos associados ao epitélio (Cruz-Landim e Baldissera, 1967).

A glândula propriamente dita é composta por duas camadas de células: a região da camada interna, denominada íntima, que é constituída por um epitélio pavimentoso simples, que está coberto por cutícula na superfície luminal multilaminada, e possui função de secretar

a cutícula e os canalículos, enquanto a região da camada externa é formada por células secretoras que revestem o tubo glandular e o reservatório, sendo esse último podendo ser de forma parcial (Abreu et al., 2005; Arruda, *et al.*, 2007).

No epitélio secretor, encontram-se células com diferentes alturas. Essa variação no tamanho está relacionada à fase de atividade das células. Normalmente, as células tendem a ser mais pavimentosas no reservatório, quando estão presentes, e mais cilíndricas na bifurcação terminal (Cruz-Landim e Baldissera, 1967). A altura das células também é influenciada pela quantidade de secreção acumulada em seu interior, a qual diminui quando a abelha entra na fase regressiva (Cruz-Landim e Baldissera, 1967; Cruz-Landim e Abdalla, 2002).

A parede do reservatório também pode ou não conter células secretoras. Tanto as células secretoras do tubo secretor quanto as do compartimento da íntima possuem canalículos excretos separados (Roat; Nocelli; Cruz-Landim, 2006).

As células secretoras possuem núcleos grandes e esféricos, situados mais próximo à base das células. Já os núcleos menores e elípticos são encontrados perto da luz e são característicos das células que formam os canalículos (Owen e Bridges, 1976; Nocelli; Roat; Moraes, 2002).

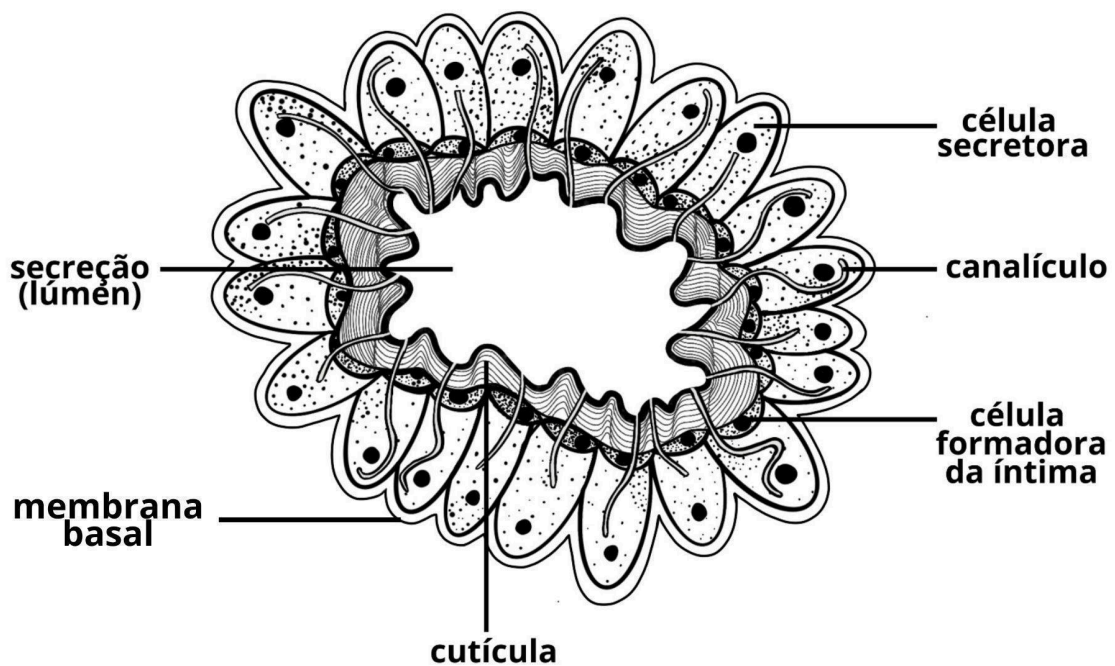
Canalículos atravessam a camada de cutícula, na região da íntima, dirigindo-se ao epitélio secretor e culminando em uma estrutura chamada aparato terminal, no lúmen. Nessa área, há várias microvilosidades, que permitem a liberação da secreção para o canalículo, o qual a transporta para o lúmen da glândula, onde é então armazenada no reservatório (Fig. 3) (Cruz-Landim e Kitajima, 1966; Bridges e Owen, 1984; Cruz-Landim e Abdalla, 2002).

As células secretoras são identificadas por uma abundância de retículo endoplasmático rugoso, complexos de Golgi, mitocôndrias e vesículas secretoras (Bridges e Owen, 1984; Roat et al., 2004; Roat; Nocelli; Cruz-Landim, 2006), o que indica uma alta atividade de síntese proteica. O citoplasma dessas células é repleto de numerosas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, vários complexos de Golgi e grandes núcleos com múltiplos nucléolos, além de muitas mitocôndrias associadas às microvilosidades direcionadas ao espaço secretor. Em contraste, as células da íntima que secretam a cutícula e os canalículos, têm poucas organelas, núcleos menores e picnóticos (Bridges e Owen, 1984; Cruz-Landim e Abdalla, 2002).

A membrana plasmática basal das células secretoras na região glandular não forma dobras (labirinto basal) como ocorre nas células epiteliais do reservatório. Nessas células do reservatório, há uma abundância de mitocôndrias e um retículo endoplasmático rugoso (RER)

associado às dobras da membrana, com o RER formando cisternas curtas e distribuídas pelo citoplasma. Por outro lado, nas células glandulares, o RER organiza-se em cisternas alongadas e dispostas em pilhas. Segundo Cruz-Landim e Abdalla (2020), as microvilosidades das células do reservatório são mais largas e possuem uma terminação estreita, ao passo que as das células glandulares mostram-se menos expansivas e com menor projeção aparente.

Figura 3: Desenho esquemático da glândula de veneno de *X. frontalis* e *A. mellifera*.



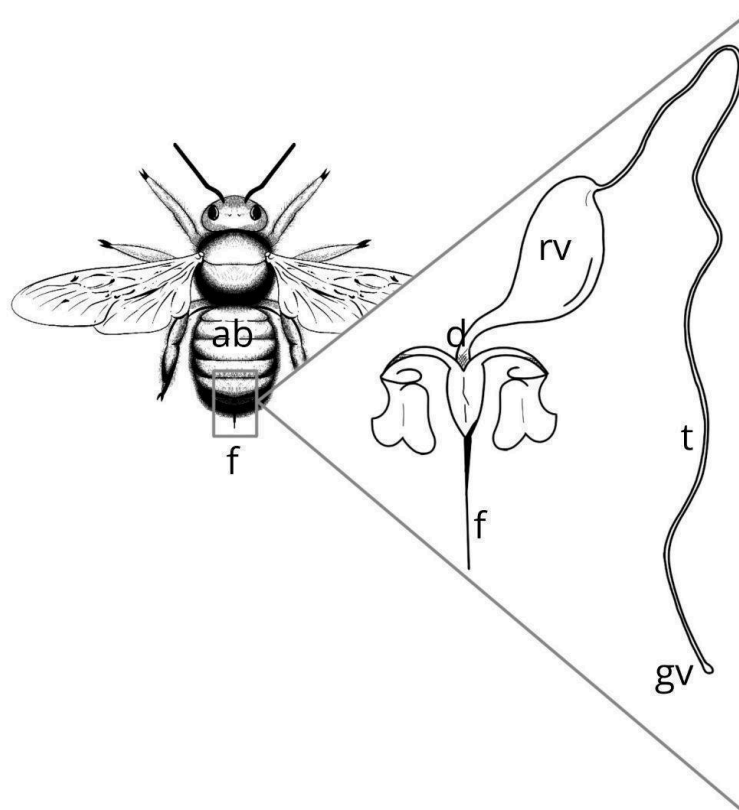
Fonte: Autoria própria

A organização das células da glândula e do reservatório indica que este último se origina da primeira estrutura. As diferenças microscópicas entre as células dessas regiões sugerem que cada uma desempenha um papel distinto no processo de produção do veneno. As células do reservatório, com suas dobras na membrana basal e um aparato intracelular especializado, poderiam ter a capacidade de absorver substâncias presentes na hemolinfa. Essas substâncias podem ser incorporadas ao veneno ou, inversamente, substâncias presentes no reservatório podem ser removidas e retornadas à hemolinfa. Essa capacidade de absorção e secreção sugere que o reservatório pode ter uma função adicional à de armazenamento, atuando também como um órgão excretor auxiliar (Bridges e Owen, 1984; Abreu et al., 2000; Cruz-Landim e Abdalla, 2002).

Quanto às estruturas do aparato de veneno de *A. mellifera* e *X. frontalis*, ambas pertencentes à mesma família de abelhas, embora apresentem algumas diferenças anatômicas, essas espécies possuem várias semelhanças estruturais no órgão que podem proporcionar a compreensão sobre seu comportamento defensivo.

Normalmente, a glândula de veneno consiste em um fino tubo secretor de comprimento variável, que se divide em duas partes na extremidade mais distante (região distal) e, próximo à sua base (região proximal), há uma dilatação em formato de bolsa, denominado reservatório, onde o veneno é armazenado (Abreu *et al.*, 2000; Arruda *et al.*, 2007). Porém, nas tribos Xylocopini, as abelhas podem não apresentar essa bifurcação na região distal da glândula (Fig. 4) (Hermann e Mullen, 1974; Lello, 1976; Arruda *et al.*, 2007). A parte final da glândula, após a bifurcação, é comumente vista como a própria glândula, enquanto o tubo que a conecta ao reservatório é entendido como canal secretor. Contudo, toda a extensão da glândula secreta substâncias (Cruz-Landim e Baldissera, 1967; Abreu *et al.*, 2005; Arruda, *et al.*, 2007).

Figura 4: Desenho esquemático da morfologia esperada do aparato de veneno de abelhas da tribo Xylocopini.



ab: abdômen; f: ferrão; d: duto excretor; rv: reservatório de veneno; t: túbulo da glândula de veneno; gv: glândula de veneno.

Fonte: Autoria própria, baseado na ilustração de Cruz-Landim e Abdalla, pg 155, 2002

É importante ressaltar que a abelha *A. mellifera* pode conter mais de 300  $\mu\text{g}$  de veneno sendo armazenados em seu reservatório glandular, com uma média estimada de 360  $\mu\text{g}$  (Biló *et al.*, 2005; Brizola-Bonacina, Alves e Moraes, 2006; Komi e Shafaghat, 2018; Ullah *et al.*, 2023). No entanto, a quantidade de veneno injetada em uma única ferroada é menor, variando entre 50 e 140  $\mu\text{g}$  (Ozdemir *et al.*, 2011, Moreno e Giralt, 2015; Ullah *et al.*, 2023).

Em concentrações elevadas, o veneno de *A. mellifera* pode provocar inflamação, dor e reações alérgicas. Contudo, estudos realizados com modelos animais sugerem que concentrações baixas de veneno (até 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) podem ter efeitos terapêuticos positivos, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas, anticâncer e antimicrobianas (Malek *et al.*, 2023). O veneno de *A. mellifera* é composto por uma mistura de aminoácidos, peptídeos, amins biogênicas, proteínas, açúcares, compostos voláteis, fosfolipídios, feromônios e água. O principal e mais tóxico componente é a proteína melitina, que

representa de 50 a 60% do veneno. Embora a melitina seja pouco alergênica, é a responsável pela dor intensa que se sente após a ferroada desse Hymenoptera (Sobral, *et al.*, 2016; Pucca *et al.*, 2019).

No que diz respeito às proteínas presentes em Hymenopteras, é válido ressaltar que normalmente incluem peptídeos tóxicos, antimicrobianos, enzimas como fosfolipases, metaloproteinases, serino-proteases, hialuronidases, além de lectinas, toxinas enzimáticas e proteínas multiméricas (Malek *et al.*, 2023). Em geral, o perfil proteico do veneno de abelhas consiste em fontes de enzimas ativas, citotoxinas e neurotoxinas (Mitchell, 2006). Dentre os principais componentes, destacam-se:

- Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>): enzima glicoproteica que hidrolisa fosfolipídeos das membranas plasmáticas, provocando lise celular. Apresenta atividades neurotóxicas e de agregação plaquetária, além de atuar de maneira sinérgica com a melitina, intensificando sua toxicidade (Dotimas e Hider, 1987; Ownby, 1997). Massa molecular estimada: 13 a 19 Kilodaltons (kDa).
- Hialuronidase: conhecida como "fator de difusão", essa enzima hidrolisa o ácido hialurônico, componente adesivo dos interstícios celulares, facilitando a dispersão dos componentes do veneno pelo tecido (Dotimas e Hider, 1987). Massa molecular estimada: 50 kDa.
- Melitina: o principal componente do veneno, representando cerca de 50% do peso seco, com forte atividade hemolítica e ação inflamatória, além de facilitar a penetração das toxinas no sistema circulatório (Habermann, 1972; Dotimas e Hider, 1987; Ownby *et al.*, 1997). Massa molecular estimada: 3 kDa.
- Apamina: o menor peptídeo neurotóxico conhecido, com ação específica no sistema nervoso central e periférico, influenciando a atividade neuronal sem causar lise celular (Habermann, 1972). Massa molecular estimada: 2 kDa.
- Peptídeos degranuladores de mastócitos (mastoparanos): presentes no veneno de vespas sociais, esses peptídeos induzem reações alérgicas e inflamatórias por meio da ativação de mastócitos (Pawson e Nash, 2000). Massa molecular estimada: 15 kDa.
- Metaloproteinase: enzima associada a mionecrose, danos na pele e edema, que degradam componentes da matriz extracelular, provocando hemorragia e inflamação no local da ferroada (Gallagher *et al.*, 2005). Massa molecular estimada: 20 a 25 kDa.
- Serino-protease: alérgeno que degrada proteínas teciduais e plasmáticas, favorecendo a inflamação e podendo desencadear disfunção de múltiplos órgãos (Schmidt *et al.*, 1980; Santos *et al.*, 2011). Massa molecular estimada: 30 a 40 kDa.

- Lectinas: proteínas capazes de se ligar a carboidratos específicos, participando da modulação da resposta imune e inflamatória (Rubistein et al., 2004). Massa molecular estimada: 60 a 80 kDa.
- Proteínas multiméricas: compostas por múltiplas subunidades polipeptídicas, podendo ser homomultiméricas ou heteromultiméricas, e desempenham funções importantes no veneno de abelhas, como a modulação imunológica, a ação enzimática e a permeabilidade celular (UniProt, 2025). Massa molecular varia de 20 a 300 kDa.

Estudos proteômicos em *Xylocopa violacea*, *Xylocopa aruana* e *Xylocopa apendiculata circumvolans* demonstraram que os principais componentes do veneno secretado são grandes peptídeos amplamente conhecidos em venenos de abelhas, incluindo a família de enzimas fosfolipase A<sub>2</sub>, além de pequenos peptídeos semelhantes à melitina e à apamina. A melitina atua diretamente em neurônios sensoriais de mamíferos, induzindo comportamentos espontâneos de dor, efeito potencializado pela presença da fosfolipase A<sub>2</sub>. Já os peptídeos semelhantes à apamina demonstraram ser bloqueadores relativamente fracos dos canais de potássio ativados por cálcio (KCa) de pequena condutância, sugerindo uma possível modulação na sinalização neuronal e nos efeitos neurotóxicos do veneno (Von Reumont *et al.*, 2022; Shi, *et al.* 2022).

Além dessas toxinas, também foi descrito um pequeno peptídeo, a xilopina (massa molecular de 1.900,3 Da), que apresenta potencial atividade antimicrobiana (Kazuma, *et al.*, 2017). A possível presença da xilopina em outras espécies de abelhas do gênero *Xylocopa*, que podem possuir mecanismos de defesa antimicrobiana distintos, pode ter implicações relevantes para a bioprospecção e o desenvolvimento de aplicações farmacológicas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. COLETA DAS ABELHAS *Xylocopa frontalis* E *Apis mellifera*

A comparação das distâncias de voo para forrageamento entre as duas espécies é pertinente para contextualizar a coleta. Hagle et al. (2011) relatam que abelhas da espécie *A. mellifera* são capazes de percorrer distâncias consideráveis, variando entre 800 metros e 1 quilômetro a partir da colmeia, em busca de recursos alimentares. Já para *X. frontalis*, Somanathan et al. (2019) afirma que, devido ao seu maior porte e à robustez de seus músculos de voo, essa espécie é capaz de realizar deslocamentos mais longos, com uma média de forrageamento que pode alcançar até 10 km.

A coleta de abelhas para estudos científicos exige abordagens cuidadosas que minimizem o impacto ambiental. Esse processo foi conduzido no campus da UFSCar em Sorocaba e no Sistema Agroflorestal (SAF), nas proximidades do campus, sendo que ambas são áreas livres de agrotóxicos e com plantações orgânicas de maracujazeiros. Foi adotado um método que se aproveita do período de abertura das flores dos maracujazeiros amarelos, entre 13h e 17h, conforme descrito por Cobert e Willmer (1980) e Siqueira et al. (2009). Durante a coleta, percorreu-se um transecto de aproximadamente 22,92 metros no campus (Fig. 5A) e 48,75 metros no SAF (Fig. 5B), margeando a plantação de maracujá, com o objetivo de realizar a coleta manual de *X. frontalis*, utilizando recipientes para captura da abelha na flor (Fig. 6), durante o processo de visitação das flores do maracujazeiro.

Figura 5: Transectos percorridos para a coleta da abelha *X. frontalis*.



(A) Região do campus da Universidade Federal de São Carlos, em Sorocaba-SP, com distância total de 22,92 metros. (B) Região do Sistema Agroflorestal (SAF), nas proximidades do campus da Universidade Federal de São Carlos, em Sorocaba-SP, com distância total de 48,75 metros.

Fonte: Autoria própria

Os recipientes utilizados para a coleta foram selecionados com atenção, consistindo em potes transparentes com tampas, perfurados para garantir a circulação de ar, minimizando o estresse das abelhas. Antes da utilização, os recipientes foram higienizados com água, sabão e álcool 70% para assegurar a integridade das amostras coletadas.

Figura 6: Coleta de abelha *X. frontalis* na flor do maracujazeiro, com auxílio de um recipiente perfurado, diretamente na flor.



Fonte: Autoria própria

Após a captura, as abelhas, ainda dentro dos potes, foram acondicionadas em uma caixa de isopor forrada com gelo, visando à redução de sua atividade metabólica. O tempo máximo entre a captura e o transporte para a incubadora climatizada (tipo B.O.D.) foi de 2 horas. Logo após a coleta, o preparo para a dissecação foi realizado no mesmo dia, garantindo a preservação das características biológicas das amostras.

O mesmo procedimento foi adotado para a captura de *A. mellifera*, realizada em flores de lavanda localizadas nas proximidades do restaurante universitário do campus. Todas as abelhas foram coletadas utilizando o pote para captura diretamente na flor, enquanto forrageavam, com extremo cuidado para evitar danos às asas ou ao corpo dos espécimes. Após a coleta, as abelhas também foram acondicionadas em uma caixa de isopor com gelo que mantinha o recipiente climatizado. No entanto, devido à maior quantidade de indivíduos e à facilidade de captura, o tempo entre a coleta e o transporte para a incubadora B.O.D. foi reduzido para 15 minutos.

Os dados relacionados à coleta, como local, data, hora e condições climáticas, foram registrados imediatamente após cada amostragem. Cada recipiente coletor foi devidamente identificado, permitindo um controle maior de informações ao longo do estudo. Em ambas as espécies, o número de indivíduos coletados foi de 5 abelhas.

## 2.2. ANÁLISES HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS COMPARADAS

Dada a relevância de elucidar as características histológicas do reservatório e do filamento proximal das glândulas de veneno de abelhas parassociais nativas, com o propósito de realizar uma comparação entre essas estruturas com a abelha modelo *A. mellifera*, e definir as particularidades específicas de cada espécie, torna-se imperativo conduzir uma investigação mais aprofundada da morfologia da glândula de veneno. Tal abordagem visa identificar os constituintes das glândulas, contribuindo assim para uma compreensão mais aprimorada do veneno produzido.

Após a coleta, realizada na região de Sorocaba - SP, e anestesia por aproximadamente 15 minutos no freezer das abelhas *X. frontalis* (n=5), e 5 minutos das abelhas *A. mellifera* (n=5), as glândulas de veneno foram dissecadas em solução salina (NaCl 7,5g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,38g/L e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72g/L) e fixadas em paraformaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1M com pH de 7,4. Os órgãos, após 24 horas de fixação, foram transferidos para o tampão fosfato de sódio por 30 minutos, desidratados em soluções com concentrações gradativamente crescentes de álcool, sendo 60 minutos cada, e então colocados em resina de embebição por até 7 dias (Silva-Zacarin et al., 2012). Após este procedimento, os órgãos foram incluídos em historesina, e posteriormente, realizou-se a microtomia para obtenção de 3 lâminas histológicas de cada animal, contendo 3 secções de um órgão em cada lâmina no caso de *X. frontalis*, e 3 secções de cinco órgãos em cada lâmina no caso de *A. mellifera*, sendo as secções de 3 µm de espessura em ambas as espécies. Após isso, as secções histológicas das glândulas de veneno foram submetidas a diferentes colorações: Hematoxilina-Eosina para análise morfológica, Reação do ácido periódico de Schiff (P.A.S.) para detecção de carboidratos e glicoconjugados neutros, Azul de Bromofenol e Xylidine Ponceau para detecção de proteínas totais, e Sudan Black para detecção de lipídios neutros, analisadas sob microscópio de luz e fotografadas para avaliação qualitativa das suas características morfológicas e histoquímicas.

Para as microfotografias de análise morfológica e histoquímica foram selecionadas 3 lâminas de cada indivíduo, por espécie, que melhor representavam a totalidade da área do órgão, com 2 imagens obtidas por região do órgão na secção histológica escolhida e por aumento correspondente às diferentes objetivas (2x, 10x, 20x, 40x e 100x).

Na quantificação da intensidade de pixels para marcação positiva de proteínas, foi selecionada uma lâmina de cada indivíduo, sendo três secções coradas com Xylidine Ponceau que tivessem a área completa do reservatório no campo de visão, de onde foram obtidas 15

imagens também por indivíduo, de diferentes regiões do reservatório, garantindo uma captura ampla da área que contém a secreção, sem sobreposições, todas fotodocumentadas com objetiva de 40x.

As padronizações das fotografias no software de formação de imagem CellSens foram: valores de brilho máximo de 207 e mínimo de 0, intensidade média de 139,35 e número total de pixels em 3.137.536. O intervalo de intensidade dos pixels foi mantido constante, de 0 a 255. O brilho e o contraste foram mantidos em 50, com Gamma ajustado em 1.

O uso do software ImageJ, mede a intensidade dos pixels nas regiões de interesse (ROIs), que reflete a intensidade da marcação positiva, a qual reflete a concentração de proteínas (na coloração Xylidine Ponceau, por exemplo), gerando dados quantitativos como área e intensidade média da marcação em pixels. A imagem foi invertida, gerando um negativo, para evitar a contagem de áreas vazias durante a análise. O ROI foi fixo com largura (w) de 1.400 pixels e altura (h) de 1.400 pixels. Os dados foram exportados no R para realizar análises estatísticas, permitindo a interpretação precisa das diferenças de intensidade das marcações positivas entre amostras.

### **2.3. QUANTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS PELA INTENSIDADE DE PIXELS**

A metodologia adotada nesta análise foi desenvolvida em etapas sucessivas, com o objetivo de comparar as quantificações de proteínas entre as diferentes espécies de abelhas analisadas. Primeiramente, os dados foram coletados e organizados em um arquivo do Excel, contendo as variáveis categóricas "Especie" (referente à espécie de abelha) e "Abelha" (identificador individual), além das medidas de quantificação de proteínas. Esses dados foram preparados para serem analisados utilizando técnicas estatísticas apropriadas.

As análises dos dados foram conduzidas no software R, versão 4.4.2 (R CORE TEAM, 2024). Inicialmente, os dados obtidos por quantificação indireta de proteínas, utilizando a técnica histoquímica com Xylidine Ponceau, foram processados com a eliminação das pseudoréplicas, referentes às imagens do mesmo indivíduo, calculando-se a média por indivíduo. Posteriormente, a homogeneidade dos dados e a normalidade dos resíduos foram verificadas pelos testes de Bartlett (Bartlett, 1937) e Shapiro-Wilk (Royston, 1982), respectivamente. A comparação entre as espécies foi realizada por ANOVA one-way.

#### **2.4. DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS GLÂNDULAS DE VENENO DE *Xylocopa frontalis* E *Apis mellifera***

Os tubos contendo as glândulas de veneno (filamento) juntamente com o reservatório das duas espécies receberam 20 µL de tampão detergente e 1 µL de antiprotease. As glândulas foram trituradas por um minuto com o auxílio de um bastão. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 14.000g, e os sobrenadantes, equivalentes aos extratos glandulares, foram integrados em um pool correspondente a 25 reservatórios de *A. mellifera* e outro correspondente a 5 reservatórios de *X. frontalis*. Posteriormente, os dois *pools* foram transferidos para novos tubos para a dosagem das proteínas totais, e dissolvidos em mais 45µL de tampão detergente a fim de reduzir a concentração.

A quantificação de proteínas foi realizada conforme o método modificado descrito por Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão. Para cada amostra, foram realizadas três leituras em espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation – GENESYS 10UV) a 595 nm, com adição de 7,5 µL de amostra e 7,5 µL do corante Coomassie Blue em cada leitura. A cubeta controle continha apenas o tampão detergente e o corante.

Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo das concentrações finais de proteínas e posteriormente analisados por meio de testes estatísticos apropriados.

#### **2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS DO ESTRATO TOTAL OBTIDAS ATRAVÉS DO MÉTODO DESCRITO POR BRADFORD (1976) DE *X. frontalis* e *A. mellifera***

A comparação das concentrações de proteína do aparato de veneno (glândula de veneno e reservatório) entre as duas espécies de abelhas, obtidas por meio da técnica bioquímica de Bradford, foi realizada utilizando uma abordagem baseada em bootstrapping, com auxílio do software R, versão 4.4.2 (R CORE TEAM, 2024). Essa metodologia foi escolhida devido ao fato de cada espécie ter sido representada por uma única amostra por espécie, compostas por um *pool* de 25 indivíduos para *A. mellifera* e 5 indivíduos para *X. frontalis*, a partir da qual foram realizadas três leituras.

Inicialmente, calculou-se a média das três leituras técnicas para cada espécie. Em seguida, aplicou-se o procedimento de reamostragem com reposição (bootstrapping) para estimar a distribuição da diferença entre as médias das espécies. Para isso, foram geradas

10.000 amostras bootstrap, reamostrado aleatoriamente, com reposição, os valores de concentração de proteína dentro de cada espécie.

Para cada reamostragem, foi calculada a diferença das médias. A partir da distribuição gerada, determinou-se o intervalo de confiança de 95% para essa diferença, além de um valor de p empírico, correspondente à proporção de amostras bootstrap cuja diferença foi maior ou igual a zero.

Por fim, a diferença entre as médias foi visualizada utilizando a abordagem de estatística de estimação, conforme descrito por Ho et al. (2019).

## **2.6. PADRÃO PROTÉICO ELETROFORÉTICO DAS GLÂNDULAS DE VENENO DE *Apis mellifera* E *Xylocopa frontalis***

Com o objetivo de analisar as concentrações proteicas das amostras, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida, empregando um gradiente de 5% a 20% em condições desnaturantes, dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), seguindo a metodologia descrita por Hames e Rickwood (1990).

Para a montagem dos géis, utilizou-se um sistema de placas dispostas em formato de sanduíche. Inicialmente, foi preparado o gel de resolução, que constitui a camada inferior, contendo 10% de acrilamida-bisacrilamida, 0,375M TRIS-HCl (pH 8,8), 0,1% de SDS, 0,05% de persulfato de amônio e 0,05% de TEMED. Posteriormente, adicionou-se o gel de empilhamento sobre o gel de resolução, com a seguinte composição: 4% de acrilamida-bisacrilamida, 0,125M TRIS-HCl (pH 6,8), 0,1% de SDS, 0,05% de persulfato de amônio e 0,1% de TEMED.

As amostras protéicas provenientes de maceração do reservatório e da glândula de veneno, de um indivíduo de *X. frontalis* e um *pool* de 5 indivíduos de *A. mellifera*, foram preparadas pela mistura, na proporção de 1:1 com o tampão de amostra, cuja composição inclui: 0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8), 20% de glicerol, 40% de SDS 10%, 10% de 2-mercaptoetanol e 2% de azul de bromofenol. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos em bloco termostático, com o objetivo de promover a desnaturação das proteínas. Após esse processo, os tubos foram centrifugados a 14.000g por 10 minutos para separação entre sobrenadante, pellet e homogenato.

Para a identificação das bandas protéicas, foram utilizados marcadores de massa molecular conhecidos (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards). Os géis foram posicionados em uma cuba de eletroforese e imersos no tampão de corrida, composto por

16,3% de TRIS, 78% de glicina e 5,4% de SDS (pH 8,3). O processo de eletroforese ocorreu sob tensão constante de 120 V, durante 60 minutos.

Ao término da corrida eletroforética, os géis foram cuidadosamente retirados e imersos em uma solução corante contendo Comassie Blue, mantidos sob agitação leve por aproximadamente uma hora. A seguir, os géis foram submetidos a sucessivas trocas de água, também sob agitação suave, a cada 20 minutos, até que as bandas protéicas se tornassem visíveis. Por fim, os géis foram retirados, envolvidos em papel celofane e armazenados para preservação adequada.

Os géis foram fotografados para posterior análise das bandas e cálculo da mobilidade relativa e das massas moleculares das proteínas.

## **2.7. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE COM ANÁLISE GRÁFICA NO EXCEL**

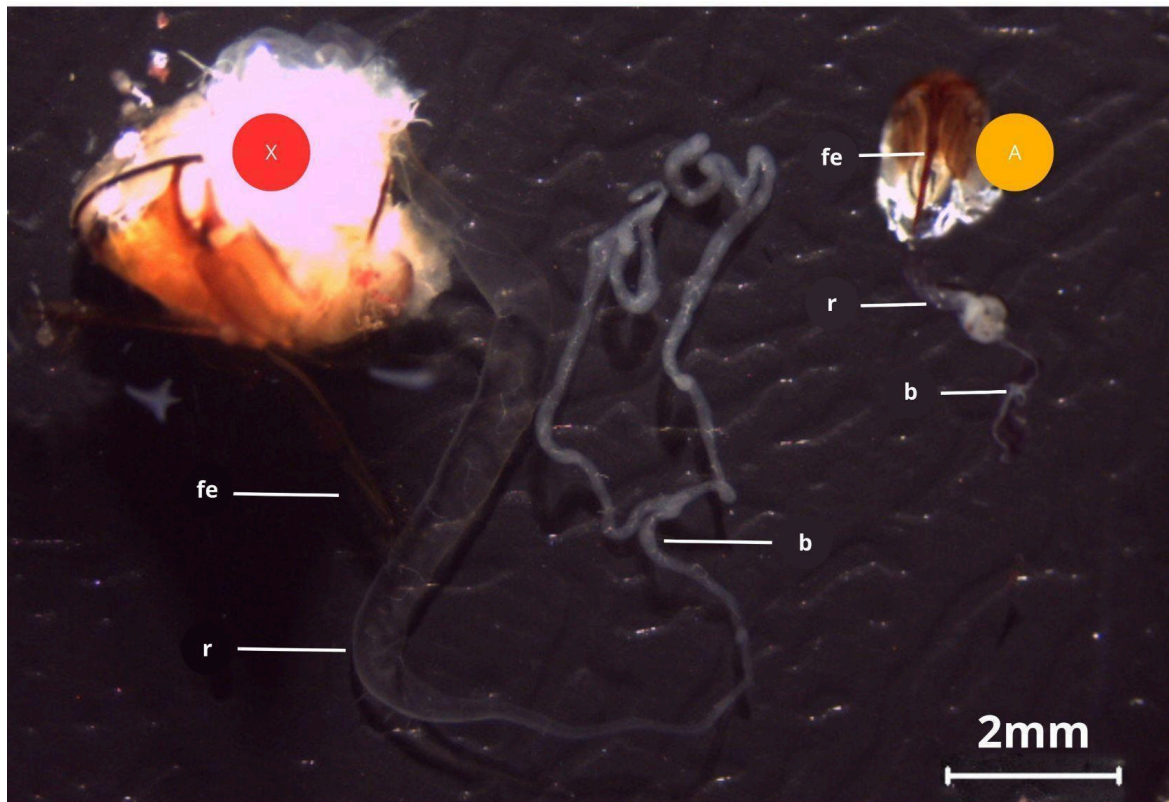
Para estimar a massa molecular de proteínas por SDS-PAGE, foi medida a distância percorrida pelas bandas no gel, incluindo amostras desconhecidas e padrões com massas moleculares conhecidas. Esses dados foram organizados em uma tabela no Excel, onde foi calculado o logaritmo das massas conhecidas. Em seguida, foi construído um gráfico de dispersão relacionando a distância percorrida com o logaritmo do peso molecular, ajustando uma linha de tendência linear e obtendo sua equação. Com essa equação, foi calculado o logaritmo das massas das amostras desconhecidas a partir da distância percorrida e, por fim, foi aplicada a antilogaritmização para determinar a massa molecular em kDa.

## **3. RESULTADOS**

Ao realizar uma análise macroscópica da estrutura do aparelho de veneno, composto pelo reservatório e pela glândula de veneno em ambas as espécies, *X. frontalis* e *A. mellifera*, observou-se uma diferença significativa no tamanho desse conjunto anatômico (Fig. 7). Em *X. frontalis*, o reservatório de veneno, juntamente com a glândula associada, apresenta dimensões consideravelmente maiores, sendo aproximadamente 5 vezes maior de comprimento, em comparação com *A. mellifera*. Essa diferença pode ser atribuída à morfologia corporal distinta de *X. frontalis*, que é considerada uma abelha grande, sendo que sua fisiologia exigiria uma quantidade maior de veneno para defesa, em consonância com sua maior robustez física. A diferença de tamanho do aparato de veneno entre as espécies também

pode refletir variações no comportamento defensivo, na composição do veneno e na pressão seletiva enfrentada por cada uma em seus respectivos habitats.

Figura 7: Comparação macroscópica das glândulas de veneno de *X. frontalis* (X à esquerda), e *A. mellifera* (A à direita), após dissecação do animal

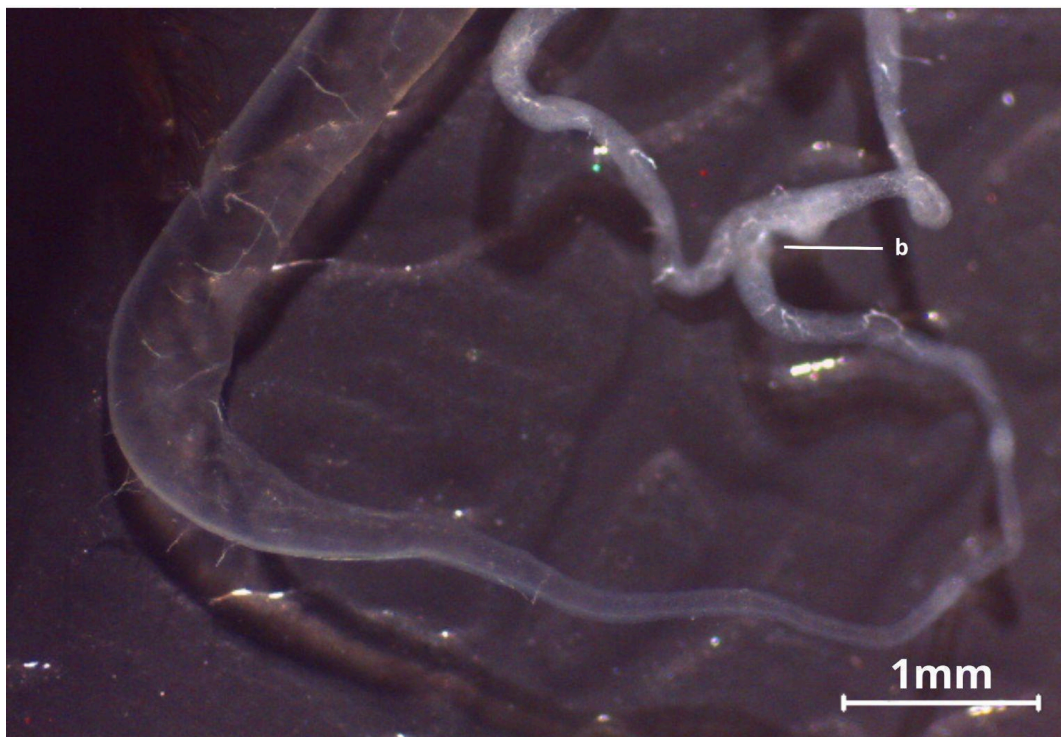


b - bifurcação; fe - ferrão; r - reservatório.

Fonte: Autoria própria

Além disso, algumas abelhas pertencentes à tribo Xylocopini podem, em certos casos, não apresentar a bifurcação terminal no tubo glandular. No entanto, por meio da análise macroscópica realizada após a dissecação, foi possível observar a presença dessa bifurcação, característica que se assemelha ao padrão morfológico descrito para o modelo comparativo, *A. mellifera* (Fig. 8).

Figura 8: Reservatório ligado à glândula de veneno com bifurcação terminal de *X. frontalis*



Fonte: Autoria própria

Enquanto *A. mellifera* contém em média 360  $\mu\text{g}$  de veneno, *X. frontalis* pode conter em média 3.000  $\mu\text{g}$  de veneno, quantidade essa definida experimentalmente após maceração do reservatório e glândula de veneno da abelha, para nível comparativo.

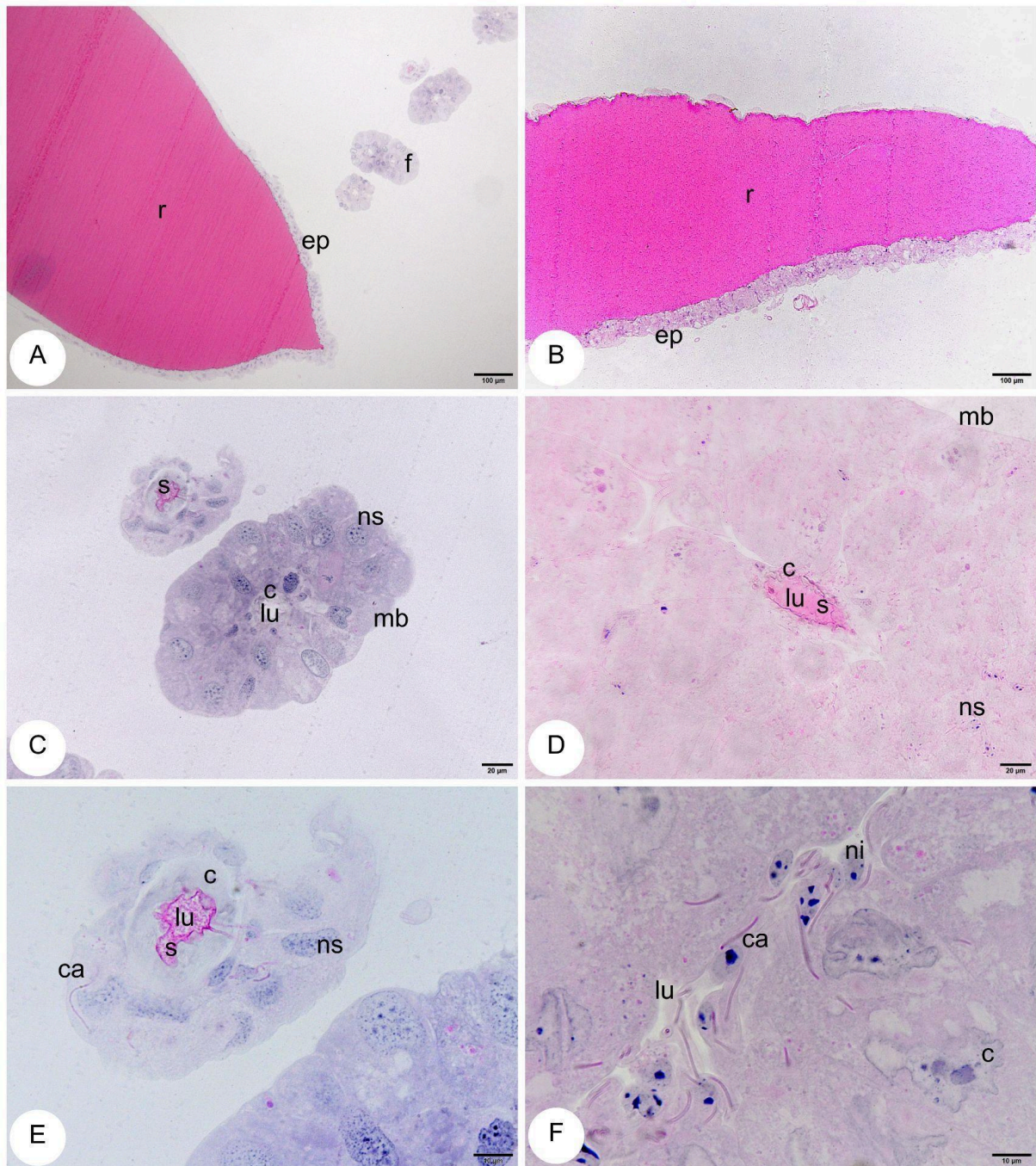
Em uma análise histológica geral, na espécie *A. mellifera* (Fig. 9A), o reservatório armazena um material acidófilo homogêneo, com a presença de um epitélio basófilo, conectado a um filamento secretor. Em contraste, na espécie *X. frontalis* (Fig. 9B), o reservatório conectado ao filamento é mais longo, com um epitélio mais espesso em comparação com o de *A. mellifera*. Há uma secreção acidófila no lúmen, visualmente mais predominante em relação a *A. mellifera*.

Ao analisar as características histológicas do filamento secretor, nota-se que em *A. mellifera* (Fig. 9C), o filamento é constituído em um epitélio de células secretoras com formato cilíndrico, com núcleos esféricos e em diferentes posições nas células, que envolve um lúmen. A cutícula, que está presente na porção apical do epitélio, pode ser vista circundando o lúmen, dentro do qual pode estar a secreção armazenada. Já em *X. frontalis* (Fig. 9D), as células secretoras apresentam-se de formato cilíndrico, com núcleos esféricos, compondo o epitélio, próximos à membrana basal. A cutícula nesta espécie é mais espessa em

comparação com *A. mellifera*, a qual por sua vez limita o lúmen contendo a secreção armazenada.

Ao observar o filamento glandular em detalhes, em *A. mellifera* (Fig. 9E), a estrutura filamentosa revela canalículos, que são conectados à cutícula, em atividade de liberação da secreção, além de células secretoras com núcleos que apresentam cromatina dispersa, indicando alta atividade secretora. Em *X. frontalis* (Fig. 9F), os canalículos contendo secreção acidófila são visivelmente mais frequentes comparados ao observado em *A. mellifera*, e as células formadoras da íntima, que secretam tanto a cutícula quanto os canalículos, exibem núcleos elípticos.

Figura 9: Secções histológicas da glândula de veneno de *A. mellifera* (A, C, E) e *X. frontalis* (B, D, F), corados com Hematoxilina e Eosina para a observação de estruturas ácidas e básicas

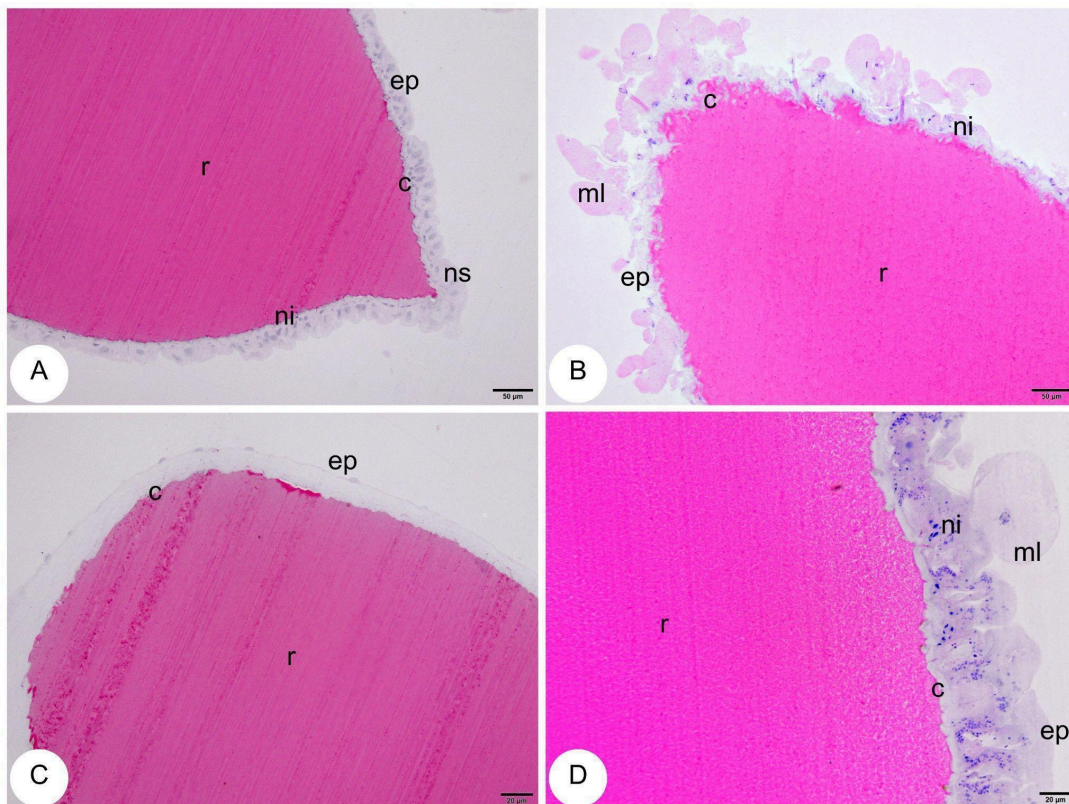


Imagens A e B são cortes transversais, e C, D, E e F cortes longitudinais; r - reservatório; ep - epitélio; f - filamento proximal; c - cutícula; s - secreção; lu - lúmen; ns - núcleo de células secretoras; mb - membrana basal; ni - núcleo de células da íntima; ca - canalículo. Barras de escala = 100 µm para A e B; 20 µm para C e D; 10 µm para E e F

Fonte: Autoria própria

Realizando uma comparação do reservatório de veneno de ambas as espécies, em *A. mellifera* (Fig. 10A), é possível identificar o reservatório, que está associado às células secretoras e às células formadoras da íntima junto à cutícula. Em *X. frontalis* (Fig. 10B), o epitélio do reservatório, a cutícula e as células formadoras da íntima que a secreta, também são observados, mas destaca-se a presença de feixes de músculo esquelético acoplados externamente ao epitélio do reservatório. A superfície luminal multilaminada de *A. mellifera* (Fig. 10C), geralmente é revestida por células cilíndricas, sendo estas mais pronunciadas na bifurcação terminal, quando presentes. Já em *X. frontalis* (Fig. 10D), a musculatura está geralmente presente e associada externamente ao epitélio glandular, e as células epiteliais estão mais visíveis.

Figura 10: Secções histológicas transversais do reservatório de veneno de *A. mellifera* e *X. frontalis*, corados com Hematoxilina e Eosina para a observação de estruturas ácidas e básicas.

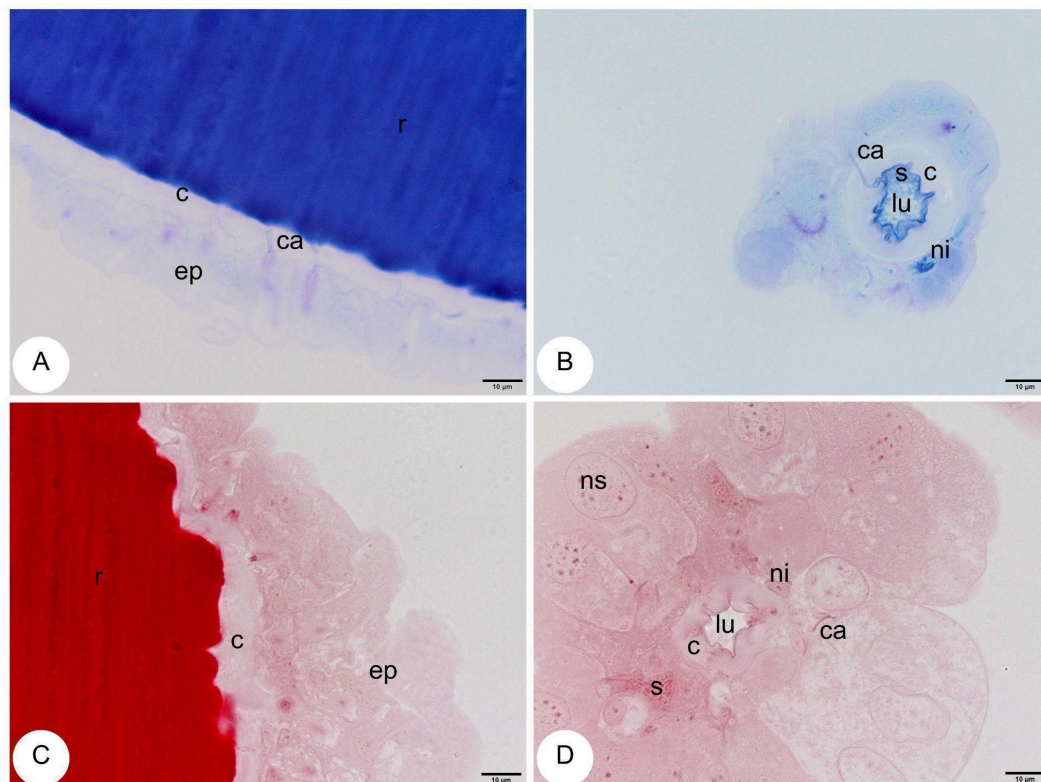


r - reservatório; ep - epitélio; c - cutícula; ns - núcleo de células secretoras; ni - núcleo de célula formadora da íntima; ml - músculo esquelético. Barras de escala = 50 µm para A e B; 20 µm para C e D

Fonte: Autoria própria

A coloração PAS + Azul de Bromofenol foi realizada em ambas as espécies, destacando diferentes componentes do reservatório de veneno. Em *A. mellifera* (Fig. 11A), a secreção do reservatório de veneno foi evidenciada como uma substância predominantemente proteica. Esse achado foi confirmado pela Fig. 11C, onde a coloração com Xylidine Ponceau também destacou a secreção positiva no reservatório, embora não tenha havido uma coloração intensa do epitélio. Nos canalículos, é possível observar a presença de glicoconjugados e/ou carboidratos, evidenciados pela reação positiva ao PAS, e de proteínas evidenciada pelo Azul de Bromofenol. A secreção da glândula de veneno, visualizada em Fig. 11B e Fig. 11D.

**Figura 11:** Secções histológicas do reservatório e glândula de veneno de *A. mellifera* (filamento proximal), corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) + Azul de Bromofenol (A e B) para observação de glicoconjugados neutros e Xylidine Ponceau (C e D) para a observação de proteínas

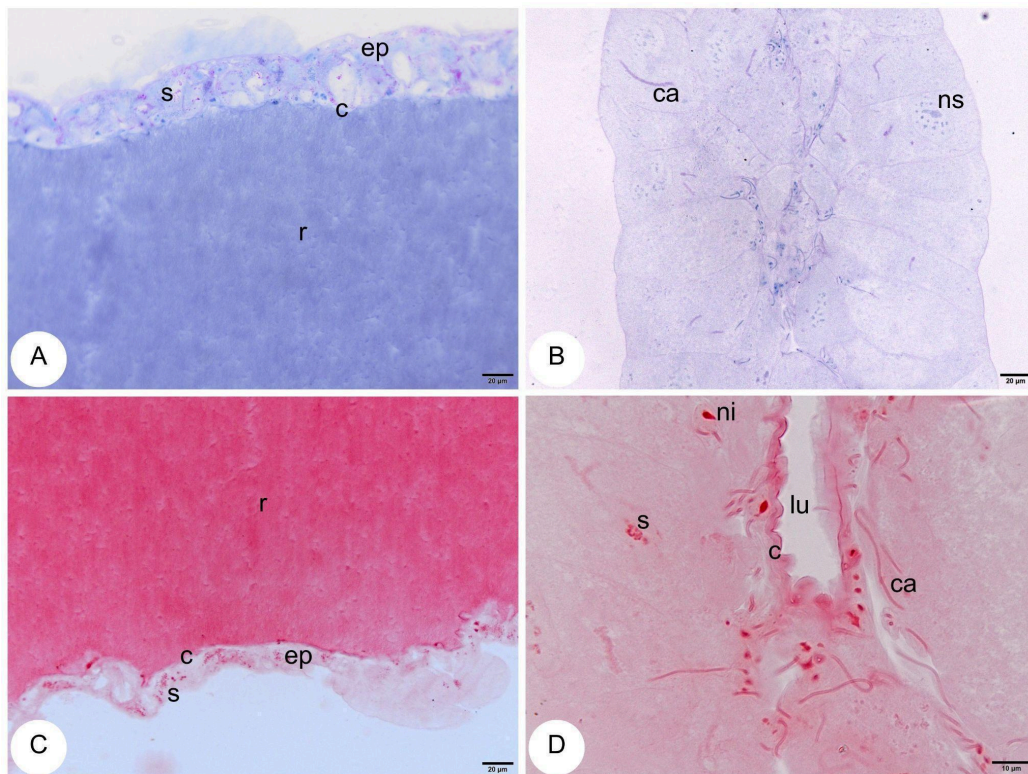


Imagens A e C são cortes transversais, e B e D cortes longitudinais. r - reservatório; ep - epitélio; c - cutícula; ca - canalículo; ns - núcleo de células secretoras; ni - núcleo de células da íntima; s - secreção; lu - lúmen. Barras de escala = 10 µm

Fonte: Autoria própria

Em *X. frontalis*, a análise histoquímica também foi realizada. Observa-se a marcação positiva na coloração magenta do PAS no epitélio do reservatório, indicando a presença de glicoconjugados (Fig. 12A). Além disso, é evidente que o reservatório armazena uma secreção predominantemente proteica, o que foi confirmado pela intensa coloração com Xylidine Ponceau na Figura 12C. Os canalículos também evidenciaram a presença de carboidratos (Fig. 12B) e proteínas (Fig. 12D).

Figura 12: Secções histológicas do reservatório e glândula de veneno de *X. frontalis* (filamento proximal), corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) + Azul de Bromofenol (A e B) para observação de glicoconjugados neutros e Xylidine Ponceau (C e D) para a observação de proteínas



Imagens A e C são cortes transversais, e B e D cortes longitudinais. r - reservatório; ep - epitélio; c - cutícula; ca - canalículo; ns - núcleo de células secretoras; ni - núcleo de células da íntima; s - secreção; lu - lúmen. Barras de escala = 20 µm para A,B e C; 10 µm para D

Fonte: Autoria própria

A coloração Sudan Black foi aplicada para a análise histoquímica, porém resultou predominantemente em marcação inespecífica, visível como tons de cinza e preto no

*background*, que não são considerados positivos. Na Figura 13A, que representa os órgãos de *A. mellifera*, observa-se o reservatório, juntamente com o epitélio e os filamentos, todos apresentando apenas coloração inespecífica, sem destaque de estruturas lipídicas específicas que estariam marcadas em azul escuro. Na Figura 13B, a glândula de veneno de *A. mellifera* é mostrada, incluindo detalhes como o lúmen, a secreção, a cutícula e o núcleo das células secretoras. No entanto, todas essas estruturas também apresentam apenas uma marcação inespecífica, sem diferenciação ou evidência clara de acúmulo de substâncias lipídicas específicas.

Figura 13: Secções histológicas do reservatório e glândula de veneno de *A. mellifera* (filamento proximal), corados com Sudan Black, para a observação de lipídios,

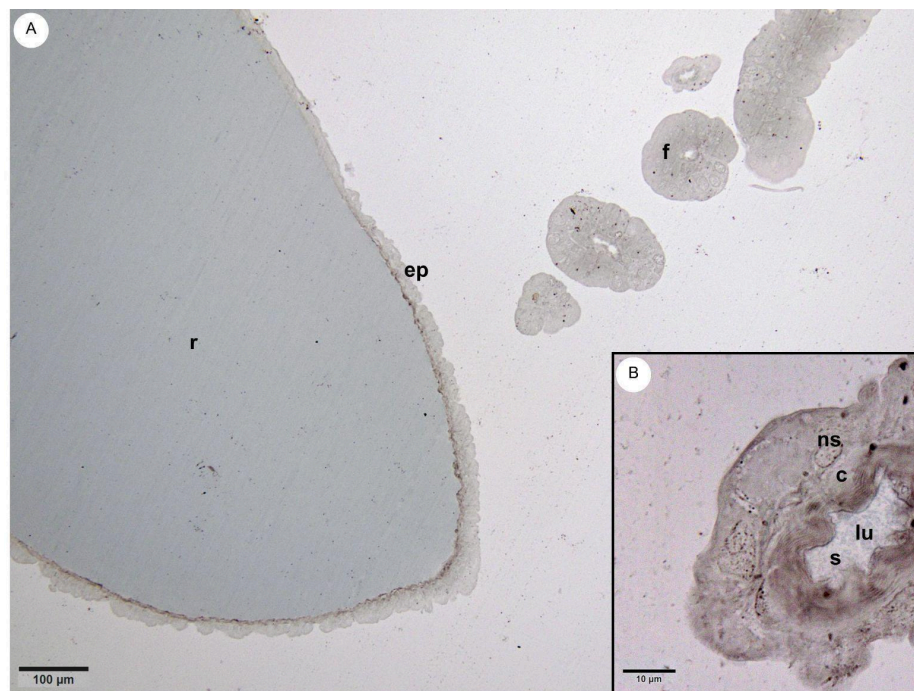


Imagem A se refere ao reservatório de veneno em corte transversal e B à glândula de veneno em corte longitudinal. r - reservatório; ep - epitélio; c - cutícula; f - filamento; ns - núcleo de células secretoras; s - secreção; lu - lúmen. Barras de escala = 100 µm para A; 10 µm para B

Fonte: Autoria própria

O mesmo padrão de marcação inespecífica observado em *A. mellifera* também se aplica à espécie *X. frontalis*. Na Figura 14A, o reservatório, o epitélio e a musculatura esquelética são visíveis, mas todos demonstram apenas marcação inespecífica, exibindo tons de cinza e preto, sem qualquer destaque de componentes lipídicos. Na Figura 14B, a glândula

de veneno de *X. frontalis* é apresentada, incluindo o lúmen, a cutícula, a secreção, e os núcleos das células secretoras, além das células da íntima. No entanto, semelhante ao que foi observado anteriormente, todas essas estruturas também apresentam marcação inespecífica, sem qualquer realce ou diferenciação particular de lipídios na secreção.

Figura 14: Secções histológicas do reservatório e glândula de veneno de *X. frontalis* (filamento proximal), corados com Sudan Black, para a observação de lipídios

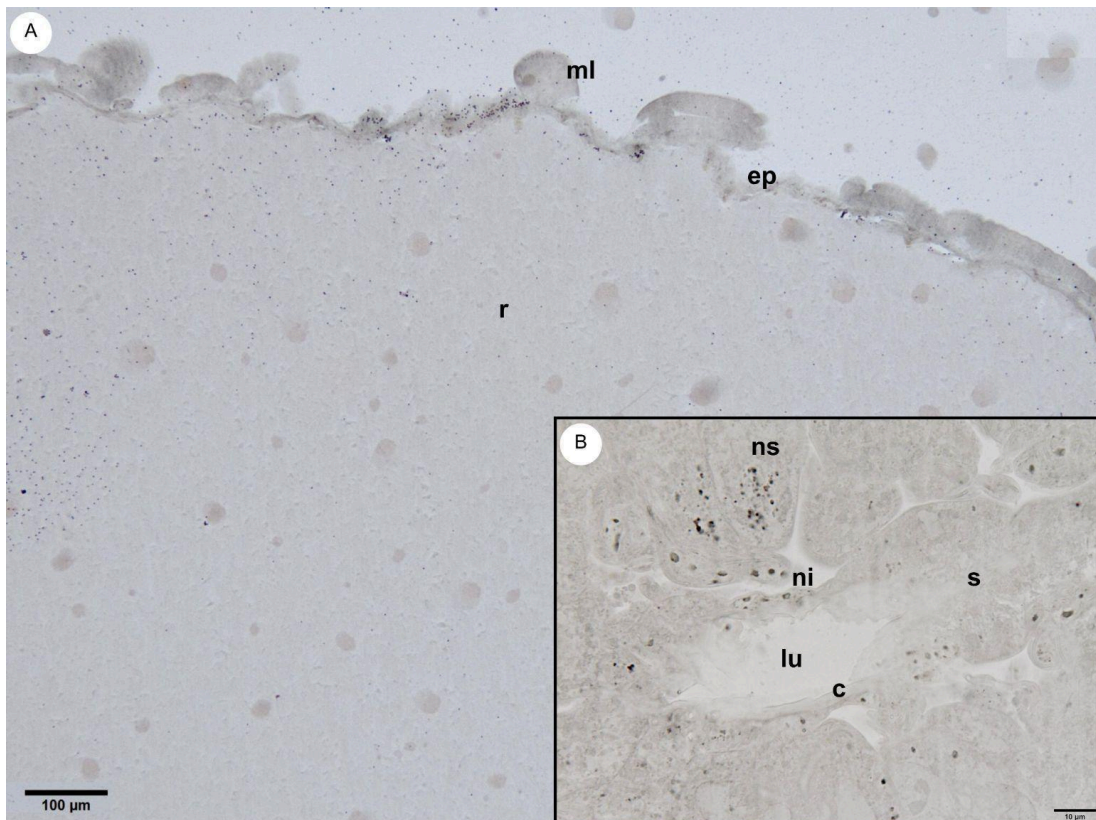


Imagem A se refere ao reservatório de veneno em corte transversal e B à glândula de veneno em corte longitudinal. r - reservatório; ep - epitélio; c - cutícula; ns - núcleo de células secretoras; ni - núcleo de células da íntima; s - secreção; lu - lúmen. Barras de escala = 100 µm para A; 10 µm para B

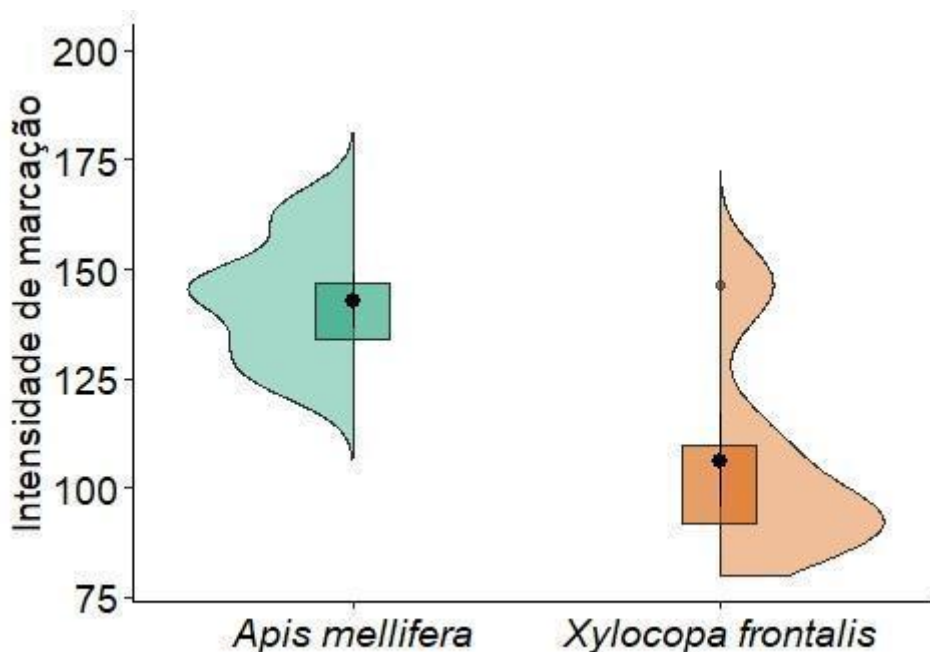
Fonte: Autoria própria

A coloração com Sudan Black não evidenciou positividade para lipídios de forma específica para ambas as espécies, *A. mellifera* e *X. frontalis*. Em todas as imagens analisadas, a secreção presente no reservatório foi considerada negativa para lipídios pela coloração com Sudan Black.

A análise da variabilidade dos pixels das concentrações de proteínas revelou uma influência significativa das espécies. Os indivíduos de *A. mellifera* apresentaram, em média,

uma intensidade de marcação 1,35 vezes maior na técnica histoquímica de Xylidine Ponceau do que os indivíduos de *X. frontalis* [ $F(1,8) = 8.647, p = 0.019$ ], indicando maior concentração de proteínas no veneno de *A. mellifera* (Fig. 15).

Figura 15: Intensidade de marcação pela técnica histoquímica de Xylidine Ponceau, utilizada como estimativa do conteúdo proteico no reservatório de veneno de duas espécies de abelhas



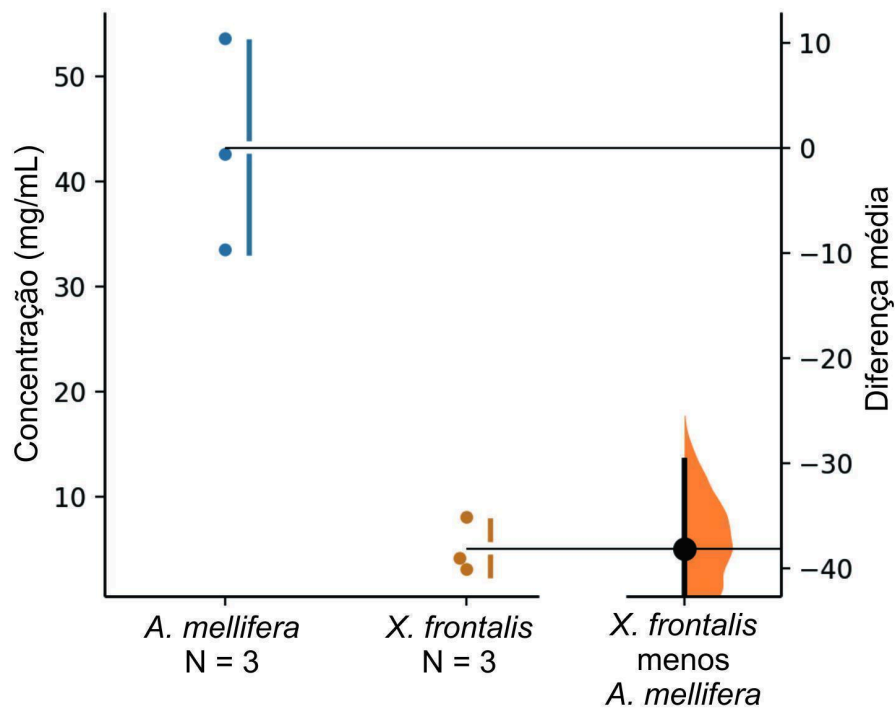
Os valores no eixo Y representam a intensidade média dos pixels, refletindo a saturação da marcação. O retângulo indica o intervalo interquartil (IQR), o ponto preto dentro do retângulo mostra a média dos dados, ponto preto menor fora do retângulo indica outlier e o violin plot mostra a distribuição dos dados e a densidade dos valores.

Fonte: Autoria própria

Esses resultados refletem a variabilidade biológica significativa entre *A. mellifera* e *X. frontalis*. Dentro das espécies, também foram observadas diferenças notáveis, indicando variações intraespecíficas que são significativas.

Utilizando a técnica de Bradford, a concentração de proteínas presente no reservatório de veneno também foi maior nos indivíduos da espécie *A. mellifera* (bootstrapping,  $p = 0$ ). Em média, a concentração de proteínas em *X. frontalis* foi 8,5 vezes menor que a concentração de *A. mellifera* (Fig. 16).

Figura 16: Concentração de proteínas estimada pela técnica Bradford utilizando reservatórios de veneno de duas espécies de abelhas



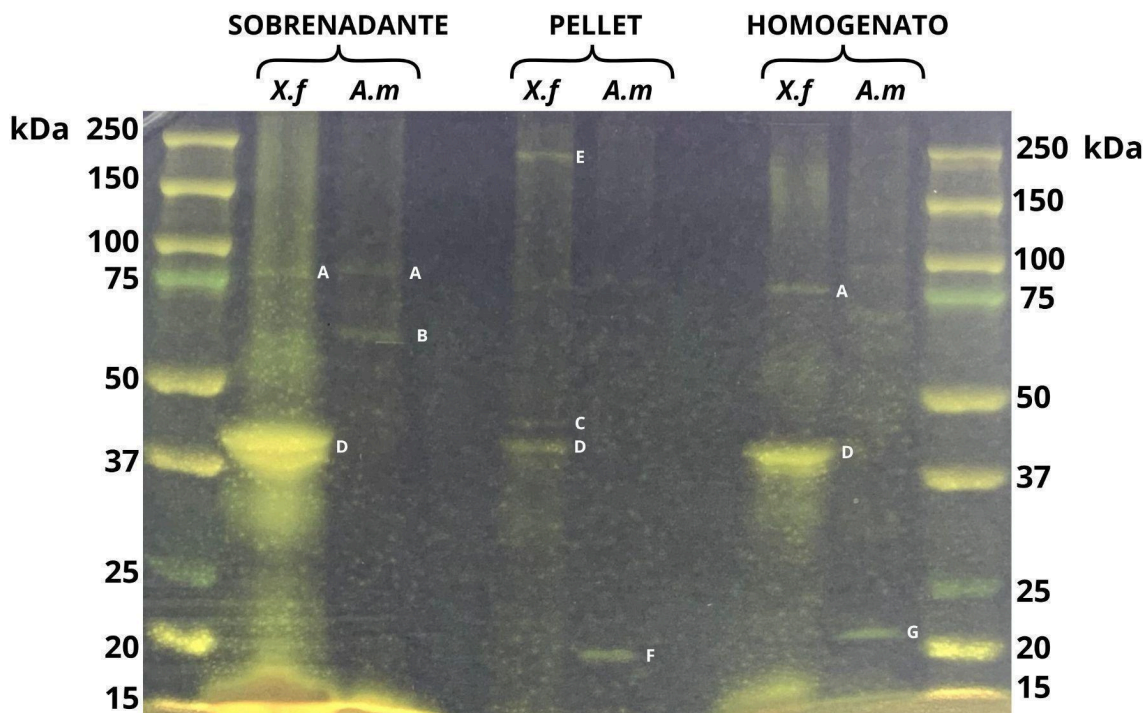
Pontos indicam os valores obtidos em cada leitura da amostra, linha horizontal preta indica a média e linhas vertical o intervalo de confiança dos dados. No eixo Y direito é possível ver a diferença entre as médias das duas espécies.

Fonte: Autoria própria

Essa diferença observada entre as espécies, evidenciada tanto pela análise histoquímica quanto pela quantificação bioquímica, reforça a consistência dos resultados obtidos da histoquímica (Xylidine Ponceau) e sugere uma possível correlação entre a atividade secretora e a quantidade de proteína armazenada no saco de veneno.

A amostra de veneno das espécies *X. frontalis* e *A. mellifera* foi analisada utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE. O material foi fracionado em sobrenadante, pellet e homogenato, permitindo a observação de padrões protéicos distintos entre as espécies, assim como descrito nos métodos (Fig. 17). A presença de alguns peptídeos de maior massa molecular no veneno foi confirmada, corroborando estudos proteômicos anteriores.

Figura 17: Gel de poliacrilamida na técnica de SDS-PAGE para observação de substâncias proteicas organizadas em bandas, com diferentes massas moleculares (kDa); imagem em negativo.



Fonte: Autoria própria

No sobrenadante, fração que tende a corresponder à porção solúvel do veneno após centrifugação, contendo principalmente peptídeos, enzimas solúveis e outras proteínas de menor peso molecular, foi observada a presença da banda pré-denominada D apenas na espécie *X. frontalis*. Em contrapartida, a banda B se apresentou mais definida na espécie *A. mellifera*. Apesar dessas diferenças, ambas as espécies exibiram a banda A, evidenciando uma semelhança entre os perfis proteicos desta fração.

No pellet, fração que compreende as proteínas menos solúveis, agregadas ou associadas a estruturas celulares, foram identificadas as bandas E, C e novamente a banda D exclusivamente na espécie *X. frontalis*. Por outro lado, a banda F foi observada apenas em *A. mellifera*, sugerindo diferenças na composição proteica associada às frações menos solúveis do veneno entre as espécies.

No homogenato, que representa a amostra total do veneno, contendo tanto as proteínas solúveis quanto as não solúveis, as bandas A e D foram mais aparentes em *X. frontalis*. Em contrapartida, a banda G foi observada apenas em *A. mellifera*, reforçando a existência de

diferenças entre os perfis proteicos totais das duas espécies. Tanto no sobrenadante quanto no homogenato, a banda D de *X. frontalis* foi a que mais se intensificou nesta técnica.

Oligopeptídeos do veneno, com massa molecular abaixo de 15 KDa, não formam bandas porque difundem-se no gel e, portanto, não são visualizados por meio desta técnica.

Através do cálculo da equação da linha de tendência do gráfico gerado, foi possível estimar a massa molecular em kDa das bandas desconhecidas, por meio do padrão já conhecido (Tabela 1).

Tabela 1. Representação dos resultados obtidos do cálculo de kDa das bandas desconhecidas

<b>Bandas desconhecidas</b>	<b>kDa calculado</b>
E	231,6327696
A	78,66834252
B	66,57328694
C	45,51976381
D	40,15133594
G	21,3845443
F	19,20436714

Fonte: Autoria própria

Com base nos valores estimados de massa molecular, é possível inferir que a banda E, com aproximadamente 231 kDa, possa corresponder a uma proteína multimérica de transporte de cálcio localizada na membrana celular (UniProt, 2025).

As bandas A e B, com massas moleculares estimadas em aproximadamente 78 kDa e 66 kDa, respectivamente, provavelmente correspondem a lectinas, proteínas não imunológicas com alta afinidade por carboidratos.

As bandas D e C, com massa molecular estimada em aproximadamente 40 kDa e 45kDa, respectivamente, provavelmente correspondem a serino-protease, uma enzima multifuncional com atividade catalítica que desempenha um papel importante no veneno de abelhas.

Já as bandas G e F, com massa molecular estimada em aproximadamente 19 e 21 kDa, respectivamente, podem corresponder a Metaloproteinases, uma classe de enzimas que desempenham um papel fundamental na degradação de proteínas da matriz extracelular.

#### 4. DISCUSSÃO

Morfologicamente, na região posterior do abdômen de *X. frontalis*, o aparelho de inoculação de veneno é composto pelo ferrão, que está acoplado a um duto excretor. Esse duto termina no reservatório de veneno, uma estrutura onde o veneno é armazenado temporariamente antes da liberação. O reservatório, por sua vez, está conectado ao tubo glandular bifurcado, que se estende até a parte final do aparelho, onde se localiza a glândula de veneno propriamente dita.

É importante notar que o tubo glandular, ao longo de toda a sua extensão, apresenta características histológicas semelhantes às encontradas nas células secretoras da glândula de veneno, segundo Cruz-Landim e Baldissera (1967), Abreu, *et al.* (2005) e Arruda, *et al.* (2007). Isso indica que, embora haja distinções morfológicas entre as diferentes regiões anatômicas do sistema glandular, o epitélio secretor mantém uma uniformidade celular em termos de função e estrutura ao longo do tubo, o que pode sugerir um papel contínuo na produção e secreção de componentes do veneno.

Ademais, os músculos que movimentam a bolsa de veneno em *A. mellifera* auxiliam tanto na inserção do ferrão quanto na liberação do veneno. Eles continuam a bombear o veneno mesmo depois de o ferrão ficar preso no alvo e a abelha se afastar, o que leva à ruptura do abdômen e à morte da operária. Já nas rainhas, a musculatura é mais robusta, evitando a ruptura do abdômen após o uso do ferrão (Herman 1982; Cruz-Landim e Abdalla, 2002). De forma semelhante, na análise histológica do reservatório de veneno em *X. frontalis*, a musculatura também se mostrou mais evidente, possivelmente devido à sua robustez e maior presença de músculos.

A natureza química do veneno de *A. mellifera* é amplamente descrita na literatura (Altmann *et al.*, 1991; Banks e Shipolini, 1986; Shipolini *et al.*, 1971; Schmidt; Blum; Overal, 1986; ). A secreção, que é alcalina durante o processo de produção e armazenamento, passa por uma acidificação após ser liberada (Abreu; Silva; Camargo-Mathias, 2010). Essa mudança no pH, assim como estudado por Kumar e Devi (2004), está relacionada à distribuição das enzimas fosfatases ácida e alcalina, sendo a primeira mais abundante na glândula e a segunda no reservatório, observada através da coloração pela Hematoxilina que tem caráter básico, sendo atraída por substâncias ácidas referente à glândula, e da abundante coloração pela Eosina que tem caráter ácido, sendo atraído por substâncias básicas do reservatório.

A diferença observada no tamanho do aparelho de veneno entre as duas espécies, permite inferir que *X. frontalis* exibe um reservatório maior e uma glândula de veneno mais desenvolvida, que pode ser interpretada como uma adaptação às diferentes demandas

ecológicas e comportamentais dessas abelhas. *X. frontalis*, sendo uma abelha não-social de grande porte, depende de um aparato de veneno maior, possivelmente devido ao seu comportamento defensivo, que requer maior quantidade de veneno para lidar com predadores ou competidores, e não perde o ferrão após ferroar. Essa necessidade é exacerbada pelo fato de que *X. frontalis* não possui o suporte de uma colônia para defesa, ao contrário de *A. mellifera*, uma abelha social cujas defesas dependem mais da cooperação entre os membros da colônia. O tamanho reduzido do aparelho de veneno em *A. mellifera*, que perde o ferrão após a ferroadada e morre, pode refletir essa divisão de mecanismos defensivos, onde o veneno desempenha um papel mais estratégico e econômico.

A análise histológica revelou algumas diferenças na composição e organização das células secretoras e das estruturas associadas ao veneno, como a cutícula e os canalículos. Essas diferenças podem refletir pressões seletivas distintas entre as espécies. Em *X. frontalis*, o epitélio mais espesso e a presença de uma secreção acidófila mais abundante sugerem uma produção mais intensa de veneno, o que pode estar relacionado a uma necessidade de um maior armazenamento para uma possível defesa mais pronunciada. A presença de mais canalículos conectados à cutícula e a maior espessura dessa estrutura indicam que o processo de secreção do veneno é mais afluente em *X. frontalis*, resultando em um veneno com maior volume de produção.

Já em *A. mellifera*, o epitélio mais fino e a menor quantidade de secreção no lúmen indicam um perfil de secreção menos volumoso, porém mais concentrado, o que pode estar alinhado com o papel defensivo dessas abelhas. Esse papel defensivo pode exigir um veneno mais concentrado, possivelmente contendo menos água, em razão do tamanho menor da abelha. Além disso, como a abelha morre ao se defender, é provável que a alta concentração do veneno seja essencial para garantir maior potência por ferroadada. Isso é reforçado pelas contrações musculares contínuas que ajudam a injetar o veneno de forma eficaz, mesmo após o ferrão ter se desprendido. A presença de núcleos com cromatina dispersa nas células secretoras de *A. mellifera* pode indicar uma maior atividade de transcrição gênica refletindo na flexibilidade na síntese de secreção, ajustando a produção de veneno conforme necessário, o que reflete o comportamento defensivo das abelhas sociais, que é mais reativo e depende da ameaça presente.

Outro aspecto notável é a presença de feixes de músculo esquelético associados ao reservatório de veneno de *X. frontalis*, algo que não foi tão observado em *A. mellifera*. A musculatura está também envolvida na expulsão do veneno de forma mais eficiente, indicando uma adaptação fisiológica para melhorar a defesa por meio de uma descarga mais

eficaz de veneno. Em contrapartida, a ausência de músculos bem desenvolvidos no reservatório de *A. mellifera* reforça a hipótese de que seu sistema de veneno não é projetado para liberações massivas, pois o mecanismo de liberação do veneno ocorre de forma passiva: ao ferroar, a operária perde o ferrão e o aparelho associado, que permanece fixado no alvo enquanto a musculatura pulsante continua a bombear o veneno. No entanto, a principal dispersão do veneno ocorre devido ao movimento da própria vítima ao tentar remover o ferrão, pressionando o reservatório e facilitando a liberação. Assim, o volume de veneno injetado ativamente pelo auxílio da musculatura da abelha é relativamente baixo.

Por outro lado, em *X. frontalis*, o ferrão não é perdido após a ferroada, tornando essencial que todo o veneno seja injetado rapidamente para garantir a eficácia do ataque ou defesa. Nesse contexto, a musculatura que envolve o saco de veneno é mais robusta e bem desenvolvida, permitindo uma liberação ativa e eficiente da secreção tóxica no momento da ferroada. Esse mecanismo confere uma vantagem adaptativa à abelha carpinteira, uma vez que sua sobrevivência depende da capacidade de se defender e escapar rapidamente. Estratégia semelhante é observada em algumas vespas, que apresentam musculatura bem desenvolvida para garantir a injeção imediata do veneno, reforçando a relação entre a morfologia do aparelho de ferrão e a ecologia da espécie.

A ausência de marcação positiva com o Sudan Black, mesmo sendo comum a presença de fosfolipídios em veneno de *A. mellifera* (Sobral, *et al.*, 2016; Pucca *et al.*, 2019) indica que os componentes lipídicos no veneno de ambas as espécies são escassos a ponto de não serem detectados por meio desta técnica histoquímica. Isso sugere que o veneno tem uma composição principalmente proteica, sendo os lipídios pouco envolvidos na composição do veneno secretado, e que o método histoquímico empregado não detectou sua presença. Este fato é importante, pois confirma que o foco funcional do veneno está em suas propriedades bioquímicas relacionadas às proteínas.

A reação de PAS evidenciou a presença de glicogênios no epitélio secretor e glicoconjugados nos canalículos, o que pode estar relacionado, respectivamente, ao metabolismo energético inerente da atividade secretora da glândula e de glicoconjugados associados aos demais componentes do veneno. A presença de possíveis glicoconjugados PAS-positivos no canalículo pode ser indicativa da secreção de uma enzima glicoproteica, a Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) é uma enzima amplamente encontrada no veneno de *A. mellifera*, podendo também estar presente em *X. frontalis*. Essa enzima catalisa a hidrólise da ligação acil éster graxo sn-2 dos fosfoglicerídeos, resultando na liberação de ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. Além de seu papel na toxicidade do veneno, a PLA<sub>2</sub> pode estar envolvida em

atividades antibacterianas, anticoagulantes e na mediação de processos inflamatórios (Leandro, *et al.*, 2015). A presença de glicogênio nas células secretoras pode estar diretamente ligada à produção dessa enzima, uma vez que carboidratos podem atuar como fonte de energia para a biossíntese e secreção de proteínas glandulares. No entanto, apesar da confirmação da PLA<sub>2</sub> nas análises histoquímicas, sua detecção no gel de SDS-PAGE não foi possível, provavelmente devido a sua massa molecular entre 13 e 19 kDa, enquanto a leitura do gel foi precisa apenas para proteínas acima de 20 kDa.

Já a coloração positiva de Azul de Bromofenol indica proteínas nas glândulas e reservatórios de ambas as espécies, sugerindo que o veneno de *X. frontalis* e *A. mellifera* tem uma base proteica significativa, como esperado de acordo com Cunha e Martins (2012), Sobral, *et al.* (2016) e Pucca *et al.* (2019).

Os resultados das leituras de intensidade de pixels para a quantificação de proteínas coradas com Xylidine Ponceau indicam diferenças significativas entre *A. mellifera* e *X. frontalis*, com *A. mellifera* apresentando concentrações proteicas superiores. Essa tendência é reforçada pelos dados obtidos por meio do ensaio de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. A congruência entre os métodos confirma a diferença expressiva no conteúdo proteico do veneno dessas espécies, sugerindo variações tanto na composição bioquímica quanto na funcionalidade das proteínas presentes.

Essa diferença pode ser atribuída a fatores biológicos e evolutivos distintos entre as espécies. *A. mellifera*, como abelha altamente social e produtora de mel, pode demandar uma produção de proteínas mais elevada para funções associadas à defesa e comunicação química, o que se reflete na maior concentração em seu veneno. Por outro lado, *X. frontalis*, uma abelha não-social, pode ter mecanismos de defesa e ecologia diferentes, resultando em uma menor necessidade de proteínas diversas em seu veneno.

A análise da Figura 15, gerada a partir da quantificação da concentração proteica por intensidade de pixels corados com Xylidine Ponceau, revela tanto variações intraespecíficas quanto interespecíficas, evidenciando que a concentração de proteínas pode diferir entre indivíduos da mesma espécie. Essa variação pode estar associada à ausência de padronização da idade das abelhas no momento da coleta, um fator determinante na dinâmica da produção e armazenamento do veneno. Em *A. mellifera*, por exemplo, sabe-se que o reservatório de veneno atinge sua capacidade máxima no 16º dia de desenvolvimento, coincidente com a transição para a fase de forrageamento. Além disso, a formação do reservatório ocorre de maneira gradativa, com as células mais antigas se degenerando para evitar gasto energético desnecessário (Cruz-Landim e Abdalla, 2002). A fisiologia de *A. mellifera* serve como

referência para interpretar os achados em *X. frontalis*, considerando suas diferenças etológicas e longevidade. *X. frontalis* possui um ciclo de vida mais longo, vivendo de dois a três meses ainda após a cópula, período no qual cuida da prole. Diferente de *A. mellifera*, que tem uma expectativa de vida total média de 45 dias e perde o ferrão após a ferroadada, enquanto *X. frontalis* pode ferroadar múltiplas vezes sem perder o aparato de inoculação. Dessa forma, dependendo da idade do indivíduo analisado, não se espera que as concentrações sejam iguais. Vale ressaltar também que não é esperado que a glândula de veneno de *X. frontalis* esteja em regressão, assim como em *A. mellifera*, sendo essencial explicitar essa distinção para evitar a suposição equivocada de que *X. frontalis* segue o mesmo padrão degenerativo observado em *A. mellifera*.

A abelha *X. frontalis* apresenta um veneno com menor concentração proteica por área avaliada em comparação ao de *A. mellifera*, porém em maior volume, o que sugere uma estratégia defensiva adaptada às suas necessidades ecológicas e comportamentais. Uma hipótese é que o maior volume de veneno serve para compensar sua menor toxicidade, garantindo que o efeito defensivo seja eficaz mesmo em concentrações proteicas mais baixas. Essa quantidade aumentada pode permitir a *Xylocopa* liberar doses maiores em situações de defesa, assegurando uma resposta eficaz contra predadores ou competidores. Além disso, o grande volume de veneno pode ter um papel dissuasivo, já que a liberação de uma grande quantidade pode intimidar potenciais ameaças. Como abelha não-social e territorial, a *X. frontalis* enfrenta diferentes pressões seletivas em relação às abelhas sociais como *A. mellifera*. Suas defesas incluem não apenas o veneno, mas também sua força física, investidas, mordidas, ejeção de fezes em intrusos, entre outros (Marchi e Melo, 2010), sugerindo que o veneno volumoso funciona como uma forma de proteção complementar a essas outras estratégias. Assim, a maior produção de veneno pode ser um mecanismo adaptativo que possibilita à espécie enfrentar múltiplas ameaças sem esgotar rapidamente suas reservas de veneno, proporcionando vantagens em ambientes competitivos e territoriais.

A análise eletroforética revelou diferenças marcantes na composição proteica dos venenos de *X. frontalis* e *A. mellifera*, sugerindo distintas estratégias bioquímicas de ação. Embora ambas as espécies compartilhem alguns componentes proteicos, como prováveis lectinas, as proporções e distribuições dessas proteínas diferem substancialmente, o que pode impactar os efeitos fisiológicos do veneno em seus alvos biológicos.

No veneno de abelhas, as lectinas podem desempenhar um papel na modulação da resposta imune, possivelmente reconhecendo padrões específicos de carboidratos em microrganismos. Em invertebrados, essas proteínas têm sido associadas a mecanismos de

defesa da resposta imune inata (Bayne, 1990; Sharon e Lis, 2004). Além disso, as lectinas podem facilitar a disseminação dos componentes tóxicos do veneno ao interagir com glicoconjugados das células-alvo, intensificando a resposta inflamatória e contribuindo para os efeitos citotóxicos observados no envenenamento (Zingali; Bianconi; Monteiro, 2001). A massa molecular dessas proteínas é compatível com as bandas A e B, sugerindo sua presença em ambas as espécies. No sobrenadante, *X. frontalis* apresentou a banda A, embora em menor recorrência quando comparado a *A. mellifera*, onde essas proteínas podem estar nas bandas A tanto no sobrenadante, quanto no homogenato, e B no sobrenadante. No entanto, no homogenato de *X. frontalis*, a presença dessas potenciais lectinas voltou a ser expressiva, sugerindo que sua distribuição pode estar relacionada à estrutura do veneno ou ao local de produção e armazenamento dessas proteínas. Essa diferença sugere que, enquanto o veneno de *A. mellifera* possui uma composição mais rica em proteínas de massa molecular que variam de 60 a 80 kDa (prováveis lectinas) no sobrenadante e no homogenato, o de *X. frontalis* pode apresentar uma regulação diferenciada desses componentes, possivelmente com funções específicas relacionadas à sua biologia e estratégia de envenenamento.

Dentre os achados mais relevantes, destaca-se a abundância de proteínas de massa molecular aproximada de 40 kDa na banda D, possivelmente composta por serino-proteases, no sobrenadante de *X. frontalis*, em contraste com *A. mellifera*, que não apresentou. Essa classe de enzimas atua degradando outras proteínas do tecido no local da ferroadada, facilitando a dispersão dos componentes tóxicos. Além disso, as serino-proteases podem modular processos inflamatórios ao interagir com proteínas plasmáticas, influenciando a coagulação sanguínea, a fibrinólise e a agregação plaquetária (Serranos, 2013). Essa atividade enzimática pode contribuir para os efeitos locais, como edema e necrose, e, em casos mais severos, pode desencadear reações sistêmicas, como a disfunção de múltiplos órgãos (Schmidt *et al.*, 1986). O fato de as serino-proteases também estarem possivelmente presentes, embora em menor quantidade, no pellet e no homogenato, sugere que essas enzimas são produzidas ativamente pelo epitélio secretor do veneno, mas podem estar distribuídas em outras regiões da amostra, talvez associadas à matriz extracelular do tecido glandular ou a vesículas de secreção.

A possível predominância de proteínas composta por serino-proteases em *X. frontalis* indica um mecanismo de ação potencialmente mais voltado para a degradação tecidual e modulação inflamatória, o que pode influenciar a eficácia do envenenamento e sua dispersão no organismo da vítima. Em contraste, *A. mellifera* não demonstrou essa mesma abundância dessas enzimas no sobrenadante, sugerindo que o perfil proteolítico do veneno da abelha social pode ser menos dependente dessas proteases específicas.

Outro achado relevante foi a presença, exclusivamente no pellet de *X. frontalis*, da banda E, indicativa de proteínas multiméricas, com massas moleculares que variam de 20 a 300 kDa, possivelmente uma proteína de transporte de cálcio localizada na membrana celular. Essas proteínas, como canais iônicos dependentes de voltagem, são essenciais para a regulação do equilíbrio iônico e da sinalização celular, permitindo a passagem seletiva de íons  $\text{Na}^+$  conforme o gradiente eletroquímico. A presença dessa proteína sugere que o veneno de *X. frontalis* pode atuar em alvos celulares específicos, alterando fluxos iônicos e afetando diretamente a excitabilidade neuronal ou a contração muscular.

Em contrapartida, um fator exclusivo do veneno de *A. mellifera* foi a detecção das bandas G e F, com massas moleculares aproximadas de 21 kDa e 19 kDa respectivamente, indicativas de metaloproteinases no pellet e no homogenato, proteínas ausentes em *X. frontalis*. As metaloproteinases desempenham um papel crítico na degradação da matriz extracelular e no aumento da permeabilidade vascular, facilitando a disseminação dos componentes do veneno. Sua possível presença pode explicar, ao menos em parte, a alta eficiência da ferroada de *A. mellifera* em gerar inflamação e dano tecidual.

A análise por SDS-PAGE não revelou a presença de hialuronidases na amostra, indicando que essas enzimas não foram detectadas por essa técnica.

A tentativa de visualizar peptídeos de menor massa molecular, como melitina, apamina, mastoparanos, fosfolipase  $\text{A}_2$ , xilopina e xilopinina, utilizando um gel de maior concentração, não resultou na definição de bandas claras. A formação de uma mancha difusa sugere a presença desses peptídeos, mas a técnica utilizada não foi suficiente para sua discriminação precisa. Dessa forma, os resultados indicam que a eletroforese SDS-PAGE, por si só, não é adequada para a caracterização completa do veneno de *X. frontalis*. Mas é possível que todos esses compostos podem estar presentes no veneno da abelha nativa *X. frontalis*.

## 5. CONCLUSÃO

Este estudo caracterizou detalhadamente o aparelho de veneno de *X. frontalis* e o comparou com *A. mellifera*, revelando diferenças morfológicas, histológicas e bioquímicas significativas. *X. frontalis* possui um reservatório maior e uma glândula mais desenvolvida, com epitélio secretor espesso, secreção acidófila abundante e canalículos conectados à cutícula, sugerindo um processo de secreção mais ativo e um mecanismo de liberação mais eficiente, ao contrário do sistema passivo de *A. mellifera*, que exhibe epitélio mais fino e secreção menos volumosa, mas provavelmente mais concentrada, condizente com seu comportamento defensivo coletivo. A histoquímica mostrou que o veneno de ambas as

espécies é essencialmente proteico, sem lipídios e carboidratos na secreção luminal, mas com carboidratos no epitélio glandular. A quantificação proteica indicou maior concentração de proteínas no veneno de *A. mellifera*, possivelmente para maximizar a potência da ferroada única das operárias, enquanto *X. frontalis* apresenta menor concentração proteica, mas maior volume de veneno, o que pode compensar essa diferença. A variação intraespecífica sugere influência da idade e condição fisiológica na produção de veneno, destacando a necessidade de estudos futuros sobre o desenvolvimento glandular. Como a técnica de SDS-PAGE não identificou peptídeos menores, análises proteômicas mais sensíveis são recomendadas para elucidar a composição do veneno e suas implicações biológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELHAS E PRODUÇÃO DE ALIMENTOS NO BRASIL. **Associação brasileira de estudos em abelhas**. Apidae: Xylocopini. Disponível em: <https://abelha.org.br/xylocopa-frontalis/>. Acesso em: 8, jan de 2024.

ABREU, R.M.M., F.H. CACTANO, R.L.M.S. MORAES & M.I. CAMARGO-MATHIAS. Ultramorphology and histology of the venom gland of workers of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) before and after an electrical shock treatment. **Sociobiology** 46: 289-298, 2005.

ABREU, R. M. M.; SILVA DE MORAES, R. L. M.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Micron (Oxford, England: 1993)**, v. 41, n. 2, p. 172–175, 2010.

ALMEIDA, Z. L. et al. Lapachol, a natural food component, interacts with human serum albumin: Insights of its impact on the pharmacokinetics of clinically used drugs. **International journal of biological macromolecules**, v. 282, n. Pt 6, p. 137520, 2024.

AL-RUBAIE, W. K. et al. Current trends and technological advancements in the study of honey bee-derived peptides with an emphasis on state-of-the-art approaches: A review. **Separations**, v. 11, n. 6, p. 166, 2024.

ALTMANN, F. et al. Characterization of the isoforms of phospholipase A2 from honeybee venom. **Insect biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 467–472, 1991.

ARRUDA, V. M. et al.. Análise morfológica da glândula de veneno de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) em populações de Mato Grosso do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 203–209, mar. 2007.

AYALA, R. Abelhas mexicanas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae): diversidade, distribuição e conhecimento indígena. Em: VIT, P.; PEDRO, D. (Eds.). **Legacy of Stingless Bees**. Nova York, NY: Springer Science, 2013. p. 135–152.

BANKS, B. E. L. Shipolini Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. Em: IPEK, T. (Ed.). **Venoms of the Hymenoptera**. [s.l.] Academic Press, 1986. p. 330–403.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Society of London. **Series A - Mathematical and Physical Sciences**, v. 160, n. 901, p. 268–282, 18 maio 1937.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Planejamento racional baseado no mecanismo de ação: fármacos inteligentes. In: \_\_\_\_\_. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 83-124.

BAVA, R. et al. Therapeutic use of bee venom and potential applications in veterinary medicine. **Veterinary sciences**, v. 10, n. 2, p. 119, 2023.

BAYNE, C. J. Phagocytosis and Non-Self Recognition in Invertebrates. **Bioscience**, v. 40, n. 10, p. 723–731, 1990.

BENOWITZ, N. L. Agentes anti-hipertensivos. In: KATZUNG, B. G. (Ed.). **Farmacologia básica e clínica**. Trad. Fernando Diniz Mundim; Patrícia Josephine Voeux. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 117-134.

BERENBAUM, M. R.; BERNHARDT, P.; BUCHMANN, S. Status dos polinizadores na América do Norte. **Washington: National Academies Press**, 2007.

BIESMEIJER, J. C.; REEMER, M. Declínios paralelos em polinizadores e plantas polinizadas por insetos na Grã-Bretanha e na Holanda. **Science**, v. 313, p. 351–354, 2006.

BILÓ, B. M. et al. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. **Allergy**, v. 60, n. 11, p. 1339–1349, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRIDGES, A.R.; OWEN, M.D. The morphology of the honey bee (*Apis mellifera* L.) venom gland and reservoir. **Journal of Morphology**, New York, US: Alan R. Liss, v.181, p. 69-86, 1984.

BRIZOLA-BONACINA, A. K.; ALVES JR., V. V.; MORAES, M. M. B. DE .. Relação entre o tamanho da glândula ácida e a quantidade de veneno produzido em abelha africanizada, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), na região de Dourados, MS. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 210–214, mar. 2006.

BUCHMANN, S. L., AND R. L. MINCKLEY. Large Carpenter Bees (Xylocopa). **Encyclopedia of Social Insects**. 1–4. 2019.

BULGARELLI, D., et al. Efeito da terapia LED (Light Emitting Diode) na mionecrose e edema induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*, no músculo gastrocnêmio. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 19, p. 217, 2010.

CAMERON, S. A. et al. Padrões de declínio generalizado em abelhas norte-americanas. **Anais da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América**. v. 108, p. 662–667, 2011.

COBERT, S. A.; WILLMER, P. G. Pollination of the yellow passion fruit: nectar, pollen and carpenter bees. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**, v. 95, p. 655-666, 1980.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. Glândulas exócrinas das abelhas, **FUNPEC-RP**, Ribeirão Preto. 2002.

CRUZ-LANDIM, C. & BALDISSERA, S. Diferenças entre as glândulas veneníferas da rainha e das operárias de *Apis mellifera*. **Cienc. Cult.** 19: 556-561, 1967.

CRUZ-LANDIM, C.; KITAJIMA, E.W. Ultraestrutura do aparelho venenífero de *Apis* (Hymenoptera, Apidae). **Memórias do Instituto Butantan**. Simpósio Internacional, São Paulo, SP: Instituto Butantan, v. 33, n. 3, p. 701-710, 1966.

CUNHA, E. D., & MARTINS, O. A. (2012). Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – Uma Revisão. **Revista Eletrônica de educação e ciência**, 2(2), 21-26.

DOTIMAS, E. M.; HIDER, R. C. Honeybee venom. **Bee world**, v. 68, n. 2, p. 51–70, 1987.

FARIAS-SILVA, F. J.; FREITAS, B. M. Thermoregulation in the large carpenter bee *Xylocopa frontalis* in the face of climate change in the Neotropics. **Apidologie**, v. 52, n. 2, p. 341–357, 2021.

FERRAZ, C. P. M. **Estudo in vitro da nefrotoxicidade do veneno total e fração fosfolipase A2 da serpente *Bothropoides insularis* (AMARAL, 1921)**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

FINK, G. D. Drogas anti-hipertensivas. In: BRODY, T. M. et al. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. Trad. Amaury José da Cruz Junior et al. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 139-151.

FREITAS, B. M. et al. **Polinização agrícola por insetos no Brasil: um Guia para Fazendeiros, Agricultores, Extensionistas, Políticos e Conservacionistas**. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, , 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.6094/UNIFR/151237>>

FUKUSHIMA, A. R.; AZEVEDO, F. A. História da Toxicologia. Parte I–breve panorama brasileiro. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 1, n. 1, 2008.

GALLAGHER, P. et al. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: in vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 441, n. 1, p. 1–15, 2005.

GERLING, D.; VELTHUIS, H. H. W.; HEFETZ, A. Bionomics of the large carpenter bees of the genus *Xylocopa*. **Annual review of entomology**, v. 34, n. 1, p. 163–190, 1989.

GIANNINI, T. C. *et al.* Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. **Ecological modelling**, v. 244, p. 127–131, 2012.

GIANNINI, T. C. *et al.* Identifying the areas to preserve passion fruit pollination service in Brazilian Tropical Savannas under climate change. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 171, p. 39–46, 2013.

GONZALEZ, V. H.; GRISWOLD, T.; ENGEL, M. S. **Obtaining a better taxonomic understanding of native bees: where do we start?** **Systematic entomology**, v. 38, n. 4, p. 645–653, 2013.

- HABERMANN, E. Bee and wasp venoms: The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. **Science** (New York, N.Y.), v. 177, n. 4046, p. 314–322, 1972.
- HAGLE, J. R. et al. Foraging range of honey bees, *Apis mellifera*, in alfalfa seed production fields. **Journal of Insect Science, Minnesota**. v, v. 11, p. 1–12, 2011.
- HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. Gel eletrophoresis of proteins: a pratical approach. **IRL. Press**, p. 119:122, 1990.
- HERMAN, H.R. Social Insects. vol. I, II, III. **Acdemic Press**. USA, 1982.
- HERMANN, H.R. & M.A. MULLEN. The hymenopterous poison apparatus. XI. *Xylocopa virginica* (Hymenoptera: Xylocopidae). **J. Ga. Entomol. Soc.** 9: 246-252, 1974.
- IMBACH, P. *et al.* Coupling of pollination services and coffee suitability under climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 39, p. 10438–10442, 2017.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. **As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro**. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 59-62, 2010
- JANG, S.; KIM, K. H. Clinical effectiveness and adverse events of bee venom therapy: A systematic review of randomized controlled trials. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 558, 2020.
- KAWAKAMI, H. et al. Isolation of biologically active peptides from the venom of Japanese carpenter bee, *Xylocopa appendiculata*. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 23, n. 1, 2017.
- KAZUMA, K. et al.. Peptidomic analysis of the venom of the solitary bee *Xylocopa appendiculata circumvolans*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, p. 40, 2017.
- KOMI, D. E. A.; SHAFAGHAT, F. Zwiener Immunology of bee venom Clin. Clin. **Rev. Allergy Immunol**, v. 54, p. 386–396, 2018.
- KUMAR, N. R.; DEVI, A. A study on biochemical composition of the sting gland (poison gland) and the reservoir (poison sac) of the dwarf honey bee *Apis florea* F. workers. **Journal of applied and natural science**, v. 6, n. 1, p. 101–105, 2014.
- LEANDRO, L. F. et al.. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 1, p. 147–155, mar. 2015.
- LELLO, E. Anatomy and histology: V. (Hymenoptera, Apidae). **J. Kans. Entomol. Soc.**, v. 49, p. 85–99, 1976.
- LIN, T.-Y.; HSIEH, C.-L. Clinical applications of bee venom acupoint injection. **Toxins**, v. 12, n. 10, p. 618, 2020.

MALEK, A. et al. Can bee venom be used as anticancer agent in modern medicine? **Cancers**, v. 15, n. 14, p. 3714, 2023.

MARCHI, P.; MELO, G. R. Biologia de nidificação de *Xylocopa (Neoxylocopa) frontalis* (Olivier) (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini). **Oecologia Australis**, v. 14, n. 01, p. 210–231, 2010.

MARTINS, A. C.; MELO, G. A. R. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil? **Journal of insect conservation**, v. 14, n. 2, p. 207–210, 2010.

MELO, A. L. DE S. E. C. *Xylocopa frontalis* (Oliver) e *Xylocopa griseescens* (Lepelletier) (Apidae, Xylocopini) no cerrado: serviços de polinização no maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener), comportamentos de nidificação e dinâmica populacional. [s.l.] Universidade de São Paulo. **Agência de Bibliotecas e Coleções Digitais**, 2024.

MICHENER, C. D. The bees of the world. 2. ed. **Baltimore, MD, USA**: Johns Hopkins University Press, 2007.

MINCKLEY, R. L.. A cladistic analysis and classification of the subgenera and genera of the large carpenter bees, tribe Xylocopini (Hymenoptera: Apidae) / by Robert L. Minckley. Lawrence, Kan. : **Natural History Museum**, The University of Kansas, 1998.

MITCHELL, A. Africanized killer bees: a case study. **Critical care nurse**, v. 26, n. 3, p. 23–6, 28–31; quiz 32, 2006.

MORENO, M.; GIRALT, E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: Melittin, apamin and mastoparan. **Toxins**, v. 7, n. 4, p. 1126–1150, 2015.

NOCELLI, R. C. F. **Contribuição à análise do processo de africanização de *Apis mellifera* (hymenoptera, apidae): características do desenvolvimento das glândulas de dufour e de veneno.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, 2003.

NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; SILVA DE MORAES, R. L. M. Alterations induced by juvenile hormone in glandular cells of the *Apis mellifera* venom gland I - application on the larvae (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 40, n. 2, p. 457–464, 2002.

NOGUEIRA, T. A. C. The Amazonian kambô frog *Phyllomedusabicolor* (Amphibia: Phyllomedusidae): Current knowledge on biology, phylogeography, toxinology, ethnopharmacology and medical aspects. **Frontiers in Pharmacology**, n. 13, 2022.

NOIROT, N., QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annu. Rev. Entomol.** 19, 61–80, 1974.

**Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.** Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 20 fev. 2025.

OLIVEIRA, V. S. **Bioprospecção de fosfopeptídeos de veneno da vespa *Apoica pallens*.** Repositório Institucional da UNESP, 2019.

OWEN, M.D.; BRIDGES, A.R. Aging in the venom glands of queen and worker bees (*Apis mellifera* L.). Some morphological and chemical observations. **Toxicon**, Elmsford, NY., US: Pergamon Press, v. 14, p. 1-5, 1976.

OWNBY, C. L. et al. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 35, n. 1, p. 67–80, 1997.

OZDEMIR, C. *et al.* Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 41, n. 9, p. 1226–1234, 2011.

PAWSON, T.; NASH, P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. **Genes & development**, v. 14, n. 9, p. 1027–1047, 2000.

PINTO, José Roberto Aparecido dos Santos. **Caracterização do antígeno-5, alérgeno do veneno da vespa social *Polybia paulista* com uma abordagem proteômica**. 2011. 109 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011.

POTTS, S. G. *et al.* **Global pollinator declines: trends, impacts and drivers**. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010.

PUCCA, M. B., CERNI, F.A., OLIVEIRA, I. S., JUEKIS, T. P., ARGEMÍ, L., SORENSEN, C. V., AHMADI, S., BARBOSA, J. E., LAUSTSEN, A. H. Bee Update: Current Knowledge on Bee Venom and Bee Envenoming Therapy. **Frontiers in Immunology**, 2019.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

ROAT, T. C. *et al.* Juvenile hormone effect on the venom gland secretory cycle in workers of *Apis mellifera* (Hymenoptera Apidae). **Sociobiology**, v. 43, n. 2, p. 193–199, 2004.

ROAT, T. C.; NOCELLI, R. C. F.; DA CRUZ LANDIM, C. The venom gland of queens of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae): morphology and secretory cycle. **Micron** (Oxford, England: 1993), v. 37, n. 8, p. 717–723, 2006.

ROYSTON, J. P. An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. **Applied Statistics**, v. 31, n. 2, p. 115, 1982.

RUBISTEIN, N. et al. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 1, p. 1–12, 2004.

SCHMIDT, J. O.; BLUM, M. S.; OVERAL, W. L. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 24, n. 9, p. 907–921, 1986.

- SANTOS, L. D. et al. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1403–1412, 2011.
- SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, v. 62, p. 19–26, 2013
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.
- SHEPPARD, W. S.; SHOUKRY, A.; KAMEL, S. A abelha do Nilo - a abelha do antigo Egito nos tempos modernos. **American Bee Journal**, v. 141, p. 260–263, 2001.
- SHI, N. *et al.* Venom composition and pain-causing toxins of the Australian great carpenter bee *Xylocopa aruana*. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 2022.
- SHIPOLINI, R. A. *et al.* Phospholipase A from bee venom. **European journal of biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 459–468, 1971.
- SILVA-ZACARIN, E. C. M.; *et al.* Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, ed. 1, p. 696–703, 2012.
- SIQUEIRA, K. M. M. DE . *et al.* Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 1–12, mar. 2009.
- SILVA, C. I. *et al.* **Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil**. São Paulo: Instituto de Estudos Ambientais. 7p. 2014.
- SILVA, C. I. et al., Manejo dos polinizadores e polinização de flores do maracujazeiro. 1ª ed. **São Paulo: Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo**, 2014. 64 p.
- SOBRAL, F. *et al.* Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 94, p. 172–177, 2016.
- SOMANATHAN, H.; SARYAN, P.; BALAMURALI, G. S. Foraging strategies and physiological adaptations in large carpenter bees. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, v. 205, n. 3, p. 387–398, 2019.
- SUNG, S. H., *et al.*, (2021). Animal Venom for Medical Usage in Pharmacopuncture in Korean Medicine: Current Status and Clinical Implication. **Toxins**, 13(2), 105. <https://doi.org/10.3390/toxins13020105>
- SUNG, S.-H. *et al.* Bee venom acupuncture for neck pain: A review of the Korean literature. **Toxins**, v. 15, n. 2, p. 129, 2023.

TRAPP, J.; MCAFEE, A.; FOSTER, L. J. Genomics, transcriptomics and proteomics: enabling insights into social evolution and disease challenges for managed and wild bees. **Molecular ecology**, v. 26, n. 3, p. 718–739, 2017.

ULLAH, A. *et al.* Pharmacological properties and therapeutic potential of honey bee venom. **Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 31, n. 1, p. 96–109, 2023.

**UniProt.** Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M7GN60/entry>>. Acesso em: 18 fev. 2025.

VON REUMONT, B. M.; DUTERTRE, S.; KOLUDAROV, I. Venom profile of the European carpenter bee *Xylocopa violacea*: Evolutionary and applied considerations on its toxin components. **Toxicon: X**, v. 14, n. 100117, p. 100117, 2022.

WAHEES, H., MOIN, S. F., & CHOUNDHARY, M. I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. **Current medicinal chemistry**, 24(17), 1874–1891, 2017. <https://doi.org/10.2174/092986732466617060509154>

YACOUB, T. *et al.* Antimicrobials from venomous animals: **An overview. Molecules** (Basel, Switzerland), v. 25, n. 10, p. 2402, 2020.

ZINGALI, R. B.; BIANCONI, M. L.; MONTEIRO, R. Q. Interaction of bothrojaracin with prothrombin. **Haemostasis**, v. 31, n. 3–6, p. 273–278, 2001.