



**ATIVIDADE BIOLÓGICA, TOXICIDADE E COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DA PEÇONHA DA ESPÉCIE *Ectatomma brunneum*
(Smith)**

Rafaella Caroline Bernardi

Dourados – MS
08/2017





Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Unidade Universitária de Dourados

Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais

**ATIVIDADE BIOLÓGICA, TOXICIDADE E COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DA PEÇONHA DA ESPÉCIE *Ectatomma brunneum*
(Smith)**

**Acadêmica Rafaella Caroline Bernardi
Orientadora Dra. Claudia Andréa Lima Cardoso**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Recursos Naturais”.

Dourados – MS

08/2017



B444a Bernardi, Rafaella Caroline

Atividade biológica, toxicidade e composição química da
peçonha da espécie *Ectatomma brunneum* (Smith) / Rafaella
Caroline Bernardi. Dourados, MS: UEMS, 2017.

91p. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Recursos Naturais – Universidade
Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade. Universitária de
Dourados, 2017.

"Aprendi que a coragem não é a ausência do medo, mas o triunfo sobre ele. Senti medo mais vezes do que consigo recordar, mas escondi-o atrás de uma máscara de ousadia. O homem de coragem não é o que não sente medo, mas aquele que o vence."

Nelson Mandela

Aos meus pais, que com luta e dedicação me deram sua maior herança, a
educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo aos meus pais, Eloi e Rita, pela dedicação, amor, paciência e sacrifícios, afim de sempre me manterem no caminho do conhecimento.

Ao meu irmão, Rafael, meu grande exemplo profissional, meu sempre *big brother*, obrigada por sempre estar ao meu lado acreditando no meu potencial e me ajudando nos *checks* da vida, você realmente é especial.

Ao meu esposo Eduardo, que ao longo destes 13 anos sempre me permitiu ser quem eu sou. Obrigada por me permitir voar, eu te amo.

A minha família, por todos vocês nunca deixarem de acreditar em mim, amo vocês.

A família LABECO, obrigada pelo companheirismo, conhecimento, apoio, cafés e risadas. Em especial, quero agradecer aos meus amigos e colegas de trabalho Ellen, Angélica, Junior e Denise, sem vocês esses quase quatro anos teriam sido muito mais difíceis. Obrigada pelo apoio, por dividirem seu conhecimento e por sempre estarem dispostos a trabalhar mais.

Aos secretários do PGRN, Rafael e Elisangela, por sempre estarem dispostos a nos ajudar.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), a Universidade Estadual de Maringá (UEM) e Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), pela colaboração no desenvolvimento deste estudo.

Aos professores Dra. Melyssa Negri (UEM), Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira (UFGD), Dra. Alexeia Barufatti Grisolia (UFGD) e, principalmente Dr. José Eduardo Serrão (UFV) e Dr. Leandro Licursi de Oliveira (UFV), pelo acolhimento, ensinamentos e apoio no desenvolvimento deste estudo.

Aos colaboradores Me. Luis Fernando Benitez Macorini (UNIGRAN), Dr. Edvaldo Barros (UFV), Dr. Bruno do Amaral Crispim (UFGD) e Me. Fabiana Gomes da Silva Dantas (UFGD).

À Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS), meu “lar” nos últimos quase 11 anos.

A todos os meus professores da Graduação em Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, obrigada pela grande oportunidade de crescer ao lado de vocês.

À FUNDECT pelo suporte financeiro.

Em especial quero agradecer imensamente aos meus orientadores do doutorado e mestrado Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso (UEMS), Dr. William Fernando Antonialli Junior (UEMS), Dra. Pollyanna Pereira Santos (UFMA), Dr. Sandro Marcio Lima (UEMS) e Dr. Luis Andrade da Cunha (UEMS), que sem dúvida foram os principais responsáveis pelo meu desenvolvimento profissional nos últimos quase seis anos. Obrigada pela colaboração, paciência, dedicação e acima de tudo, muito obrigada pelo exemplo de profissionalismo.

Enfim, a todas as pessoas que me ajudaram a enfrentar mais esse obstáculo importante em minha vida, onde fui em busca de conhecimento.

Obrigada por tudo.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	2
1. Capítulo - Considerações Gerais	3
1.1 <i>Ordem Hymenoptera</i>	3
1.1.1 <i>Família Formicidae</i>	4
1.2 <i>Peçonha na Família Formicidae</i>	5
1.2.1 <i>Composição química e variações adaptativas</i>	5
1.2.2 <i>Funções da peçonha</i>	7
1.2.3 <i>Peçonha como produto natural</i>	8
1.3 <i>Espécie <u>Ectatomma brunneum</u></i>	10
1.4 <i>Objetivo</i>	11
Objetos gerais	11
Objetivos específicos	12
<i>Referências Bibliográficas</i>	12
2. Capítulo - Potencial mutagênico, genotóxico, citotóxico e tóxico da peçonha de <i>Ectatomma brunneum</i> Smith a partir de testes <i>in vitro</i>	19
<i>Resumo</i>	19
<i>Abstract</i>	19
<i>Introdução</i>	20
<i>Métodos</i>	22
Coleta de material e preparo da peçonha	22
Bioensaio <i>in vitro</i> para determinação do índice mutagênico e citotóxico a partir do testes de Ames	22
Bioensaio do efeito mutagênico, genotóxico e citotóxico em <i>A. cepa</i>	24
Bioensaio para determinação da toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>	25
<i>Resultados</i>	26
Bioensaio <i>in vitro</i> para determinação do índice mutagênico e citotóxico a partir do teste de Ames	26
Bioensaio do efeito mutagênico, genotóxico e citotóxico em <i>A. cepa</i>	26
Bioensaio para determinação da toxicidade sobre <i>A. salina</i>	27

<i>Discussão</i>	28
<i>Conclusões</i>	31
<i>Referencial bibliográfico</i>	32
3. Capítulo - Atividade antimicrobiana e composição química da peçonha de <i>Ectatomma brunneum smith</i> (1858) (Formicidae: Ectatomminae)	36
<i>Resumo</i>	36
<i>Abstract</i>	37
<i>1.Introdução</i>	37
<i>2.Materiais e Métodos</i>	39
2.1. Área de coleta e preparo do material de estudo.....	39
2.2. Análise dos aminoácidos livres da peçonha	40
2.3. Proteômica da peçonha.....	40
2.3.1. Eletroforese bidimensional em gel	40
2.3.2. Obtenção e análise das imagens	41
2.3.3. Digestão das amostras	41
2.3.4. MALDI-TOF/TOF	42
2.3.5. Identificação das proteínas	42
2.4. Atividade antimicrobiana da peçonha	43
<i>3. Resultados e Discussão</i>	44
3.1. Análise dos aminoácidos livres da peçonha	44
3.2. Proteômica da peçonha.....	46
3.3. Atividade Antimicrobiana da peçonha	56
<i>4. Conclusão</i>	58
<i>Referencial Bibliográfico</i>	59
4. Capítulo - Estudo biomonitorado da atividade antibacteriana da peçonha de <i>Ectatomma brunneum SMITH</i> (1858)	66
<i>Resumo</i>	66
<i>Abstract</i>	67
<i>1. Introdução</i>	67
<i>2. Materiais e Métodos</i>	69
2.1. Área de estudo e preparo das amostras	69

2.2. Atividade de inibição bacteriana da peçonha	70
2.3. Estudo biomonitorado da atividade antibacteriana da peçonha	71
Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) biomonitorado pela atividade bacteriana da peçonha.....	71
Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	72
Digestão das amostras	72
Espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight/time-of-flight).....	73
Identificação das proteínas	73
2.4. Cromatografia Gasosa da peçonha	74
3. <i>Resultados</i>	75
3.1 Atividade de inibição bacteriana e estudo biomonitorado da peçonha	75
3.2 Compostos da peçonha identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	77
4. <i>Discussão</i>	80
4.1 Atividade de inibição bacteriana e estudo biomonitorado da peçonha	80
4.2 Compostos da peçonha identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas da peçonha	83
5. <i>Conclusão</i>	83
<i>Referencial Bibliográfico</i>	84
5. Capítulo - Considerações finais	91

RESUMO

Os produtos naturais são uma importante fonte de agentes terapêuticos e, dentre os recursos de potencial farmacológico, as peçonhas de formigas apresentam perfil promissor, uma vez que a ação antipatogênica deste material glandular é uma característica comum à imunidade inata destes animais, atributo que tem impulsionado os estudos com a peçonha destes insetos nas últimas décadas. No entanto, apesar do potencial como fonte de agentes terapêuticos, poucos estudos foram realizados com esse grupo, quando comparado com o número de espécies descritas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade da peçonha da formiga *Ectatomma brunneum*; composição química; além de testar sua ação antimicrobiana e isolar e identificar compostos de ação antibacteriana. O estudo da mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade da peçonha foi realizado a partir de diferentes modelos biológicos, que exigem pouca amostra e que oferecem correlação com atividades de interesse biológico; para o estudo da composição da peçonha foram aplicadas técnicas de cromatografia líquida, cromatografia gasosa, eletroforese e, espectrometria de massas; a atividade biológica da peçonha foi testada sobre bactérias e fungos e, um estudo biomonitorado guiou o isolamento e identificação de agentes antibacterianos. Nossos resultados destacam que a peçonha da espécie não apresentou ação mutagênica ou genotóxica em concentrações menores que 500 µg/mL, no entanto, apresenta ação citotóxica, com atuação sobre a proliferação celular. Foi identificada na peçonha da espécie a presença de aminoácidos na forma livres, com provável atuação sobre a potencialização dos efeitos ofensivos da peçonha. Também identificamos a presença de proteínas com ação alergênica, inflamatória, proteolítica, além de proteínas atuantes sobre imunidade inata; e, compostos de menor polaridade com ação presumível na comunicação química, além de alcaloides. A peçonha de *E. brunneum* apresentou ação antimicrobiana de amplo espectro, com peptídeos catiônicos anfifílicos apresentando ação antibacteriana. Os resultados deste estudo acrescentam o conhecimento dos constituintes da peçonha de *E. brunneum*, que fornecem informações sobre a ação da peçonha, alergenidade e propriedades antimicrobianas. Por fim salientamos o potencial farmacológico deste material glandular, considerando sua ação antimicrobiana de amplo espectro, atuação antiproliferativa, além dos seus bons resultados para ação genotóxica e mutagênica.

Palavras-chave: Fármaco, Hymenoptera; Imunidade Inata; Peptídeo Antimicrobiano; Produto Natural; Toxicologia Genética.

ABSTRACT

Natural products are an important source of therapeutic agents and, among pharmacological potential resources, ant venoms have a promising profile, since the antipatogenic action of this glandular material is a common feature of the innate immunity of these animals, a characteristic that has boosted the studies with the venom of these insects in the last decades. However, despite the potential as a source of therapeutic agents, few studies have been carried out with this group when compared to the number of described species. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of toxicity of the ant venom *Ectatomma brunneum*; chemical composition; besides testing its antimicrobial action and isolating and identifying compounds of antibacterial action. The study of the toxicity of venom was carried out from different biological models, which require little sample and that offer correlation with activities of biological interest; for the study of the composition of the venom were applied techniques of liquid chromatography, gas chromatography, electrophoresis and mass spectrometry; the biological activity of the venom was tested on bacteria and fungi, and a biomonitoring study guided the isolation and identification of antibacterial agents. Our results point out that the venom of the species did not present a mutagenic or genotoxic action in concentrations lower than 500 µg / mL. However, it has a cytotoxic action, acting on cell proliferation, we also identified the presence of proteins with allergenic, inflammatory, proteolytic action, in addition to proteins acting on innate immunity; we also identified the presence of amino acids in the free form, with probable action on the potentiation of the offensive effects of the venom and, compounds of lower polarity with action presumed in chemical communication, besides alkaloids. The *E. brunneum* venom showed broad spectrum antimicrobial activity, with amphiphilic cationic peptides presenting antibacterial action. The results of this study add knowledge about the constituents of *E. brunneum* venom, contributing in the process of understanding of action, allergenicity and antimicrobial properties. Finally, we highlight the pharmacological potential of this glandular material, considering its broad spectrum antimicrobial action, antiproliferative action, as well as its good results for genotoxic and mutagenic action.

Key-words: Antimicrobial Peptide; Drug; Genetic Toxicology; Hymenoptera; Innate Immunity; Natural Product.

1. CAPÍTULO - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 ORDEM HYMENOPTERA

A ordem Hymenoptera é uma das mais diversas e abundantes entre os insetos (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Este grupo é representado pelas formigas, abelhas e vespas, com a maioria das espécies exibindo comportamento solitário, no entanto o perfil de organização social também está presente na ordem. Neste aspecto as formigas se destacam, uma vez que todas as espécies são eussociais (WILSON, 1990; AUSTIN & DOWTON, 2000).

A eussocialidade é caracterizada por divisão permanente de tarefas reprodutivas, com cuidados cooperativos com a prole, castas reprodutivas e estéreis e, sobreposição de gerações entre genitores e prole (WILSON, 1971). Esse sistema de organização biológica é encontrado em Hymenoptera sociais (formigas, vespas sociais e abelhas sociais), em cupins (Infraordem Isoptera, Ordem Blattaria), além de outros animais, como por exemplo, o mamífero rato-toupeira-pelado (*Heterocephalus glaber*) (BOURKE, 2014).

O singular domínio dos insetos e de outros artrópodes terrestres pode ser atribuído em parte, a grande diversidade de mecanismos morfológicos e químicos de predação e defesa. Particularmente nos himenópteros as diversas espécies evoluíram estes mecanismos conforme sua biologia e comportamento, sendo o ambiente, com suas variações climáticas e com diferentes tipos de fontes alimentares, um fator determinante neste processo (WHITMAN et al., 1990).

Entre os aparatos químicos de predação e defesa, os aculeatas, grupo mais derivado da ordem, desenvolveram a partir do opositor ancestral um sofisticado sistema que inclui um mecanismo de injeção e produção de peçonha (WHITMAN et al., 1990; BRANDÃO, 1999). Segundo Cassier et al. (1994) esta estrutura é composta de modo geral, por uma porção secretora formada pela glândula de peçonha e glândula covoluta; um saco de armazenamento e; por um ferrão (Figura 1).

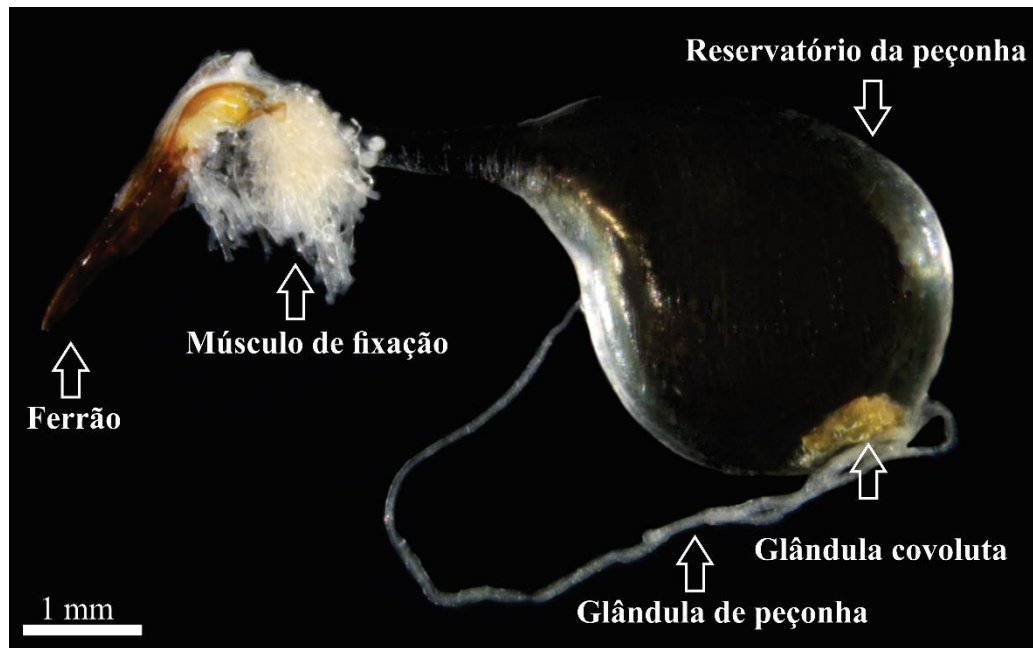


Figura 1. Aparelho de ferrão da espécie de formiga *Ectatomma brunneum*. Foto Karen Andrea Salazar Nino, 2017.

A grande diversidade taxonômica e ecológica dos Hymenoptera e, as pressões evolutivas, permitiram que estes animais empregassem sua peçonha para vários propósitos além das funções iniciais de captura de presas, entre os exemplos estão: defesa contra predadores e patógenos; comunicação química, atuando como feromônio de alarme, e; como herbicida (SCHMIDT, 1982; ORIVEL et al., 2001; FREDERICKSON et al., 2007).

1.1.1 Família Formicidae

A família Formicidae, representante de todas as formigas, apresenta até o momento aproximadamente 16 mil espécies e subespécies descritas (ANTWEB, 2017), distribuídas em 20 subfamílias, quatro delas extintas (BOLTON, 1994; WARD, 2010; BRADY et al., 2014). Estão presentes de forma dominante em todos os biomas terrestres, sobretudo na região tropical, ocupando uma faixa territorial que vai da linha do Equador a latitudes de aproximadamente cinquenta graus e, em termos de altitude, podem ser encontradas do nível do mar até 3.000 metros (BRANDÃO, 1999). Na floresta amazônica, por exemplo, as formigas juntamente com os cupins, correspondem a um percentual de biomassa maior que

todos os outros grupos de seres vivos, exercendo importante papel ecológico nesse bioma (FOURCASSIÉ & OLIVEIRA, 2002).

As formigas são insetos holometábolos (CAMPOS-FARINHA et al., 1977) e se caracterizam por apresentar pecíolo, antenas do tipo geniculadas e glândula metapleurial, uma sinapomorfia do grupo (FERNÁNDEZ & PALACIO, 2003). A família exhibe hábitos alimentares muito diversos o que contribuiu com seu sucesso evolutivo, variando desde representantes que se alimentam de fungos (GONÇALVES, 1945), exsudatos de nectários florais e extraflorais (DELABIE et al., 2003), “*honeydew*” de pulgões, cochonilhas e cigarrinhas (DELABIE & FERNÁNDEZ, 2003), sementes (GORDON, 2002), além de outros grupos que são predadores, ou onívoros (FOWLER et al., 1991).

1.2 PEÇONHA NA FAMÍLIA FORMICIDAE

1.2.1 Composição química e variações adaptativas

A família Formicidae pertence a um dos grupos mais abundantes de organismos peçonhentos na natureza (TOUCHARD et al., 2016) com 71% das espécies apresentando ferrão funcional, uma vez que algumas subfamílias perderam sua habilidade de ferroar ao longo da evolução, ou mesmo, direcionaram o uso da peçonha para outros fins (TOUCHARD et al., 2016).

A peçonha das formigas é uma complexa mistura de hidrocarbonetos, sais, açúcares, aminas, alcaloides, ácidos, aminoácidos livres, proteínas e peptídeos (SANTOS et al., 2011; FOX et al., 2012; AILI et al., 2014, 2016, 2017; TOUCHARD et al., 2015a, 2016), resultado de um processo evolutivo de milhões de anos, o qual permitiu o desenvolvimento e incorporação de uma grande quantidade de diferentes conjuntos de compostos (CASEWELL et al., 2013).

Entre as variações interespecíficas representadas por diferentes compostos na peçonha, as formigas podem apresentar perfil químico de predação generalista ou, especializado para presas singulares (TOUCHARD et al., 2016), por exemplo, a espécie *Psalidomyrmex procerus* apresenta a peçonha especializada para predação de minhocas, já a espécie *Strumigenys* spp. especializou-se para predação de representantes da ordem Collembola e, a espécie

Megaponera analis, preda espécies específicas de cupins (CERDÁ & DEJEAN, 2011). Outra variação química que encontrada entre as diferentes espécies, pode ser observada no comportamento de predação em massa ou solitário. Enquanto muitas formigas superam suas presas atacando em grande número, algumas espécies são caçadoras solitárias, sugerindo que sua peçonha apresente constituintes com maior potencia para subjugar rapidamente suas presas (ORIVEL & DEJEAN, 2001).

Dentro das modificações presentes na família, algumas espécies apresentam adaptações para pulverização da peçonha a partir de uma abertura chamada acidóporo, mantendo a estrutura glandular ancestral (ATTYGALLE & MORGAN, 1984; TRAGUST et al., 2013). A peculiaridade desta alteração de injeção da peçonha afetou consideravelmente a natureza química dos componentes segregados por estas glândulas, promovendo a seleção natural de compostos voláteis, entre eles o ácido fórmico (ácido metanoico), um importante feromônio de alarme, que junto ao ácido acético são defensivos eficientes contra competidores e predadores, incluindo vertebrados (ATTYGALLE & MORGAN, 1984; TRAGUST et al., 2013; BEARD, 1963). Outra modificação observada dentro da Família foi descrita no gênero *Dorylus*, uma vez que este grupo de formigas passou a usar o ferrão e suas glândulas secretoras como fonte de feromônios de trilha, sofrendo adaptações nos constituintes químicos da peçonha para esta atuação (BILLEN & GOBIN, 1996).

Apesar dos padrões encontrados dentro de cada espécie, a composição da peçonha pode variar intraespecificamente em resposta a variações ambientais (TOUCHARD et al., 2015b), à idade (HAIGHT & TSCHINKE, 2003) ou, de acordo com a casta a qual pertence (TOUCHARD et al., 2015a). Além disso, estudos com outros animais peçonhentos também descrevem heterogeneidade proteica conforme a época de extração da peçonha (BINFORD, 2001).

A variação intraespecífica da peçonha em resposta a diferenças ambientais foi avaliada nos estudos realizado por Cologna et al. (2013) e Touchard et al. (2015b), respectivamente, com a as espécies de formiga *Dinoponera quadriceps* e *Odontomachus haematodus*. Recentemente no estudo realizado por Aili et al. (2017), investigando a peçonha da formiga *Paraponera clavata*, foi encontrada variação na composição da peçonha mesmo entre colônias da mesma população e, entre as hipóteses sugeridas, estão o polimorfismos genéticos ou pequenas variações ambientas entre a área de coleta. Segundo Tsai et al. (2004), a variação da composição da peçonha pode ser explicada pela expressão diferencial de um conjunto de

genes, em resposta à exposição a diferentes condições ecológicas e ontogenéticas, portanto, uma característica comum deste material glandular.

1.2.2 Funções da peçonha

Dentro da família Formicidae a função primordial da peçonha esta associada à predação e, de forma mais derivada, na defesa contra predadores. Mais recentemente em escala evolutiva, a peçonha também passou a apresentar traços adaptativos que conferiram a este material glandular função na comunicação química, a partir da ação de compostos que atuam como ferômonio (ORIVEL et al., 2001; TOUCHARD et al., 2015, 2016). Em algumas espécies de formiga a peçonha também apresenta especializações em sua função, por exemplo, a espécie amazônica *Myrmelachista schumanni* (Formicinae) cria a partir da atuação herbicida de sua peçonha, áreas quase exclusivamente constituídas por *Duroia hirsuta*, um mirmecófito que protege as colônias desta espécie de formiga em suas hastes ocas (FREDERICKSON et al., 2005, 2007).

Entre as funções mais derivadas da peçonha está sua atuação contra patógenos. Neste aspecto, a presença de compostos com ação antipatogênica está ligada a mecanismos de imunidade inata comum aos animais, uma vez que estes são expostos diariamente a milhões de agentes patogênicos por contato, ingestão e inalação. (HANCOCK & SCOTT, 2000; ANDERSSON et al., 2016; MYLONAKIS et al., 2016). Entretanto, em animais eussociais a presença de compostos atuantes na imunidade inata é de suma importância, visto que o convívio próximo entre os indivíduos e a homogeneidade genética são fatores que contribuem na disseminação de patógenos (ORIVEL et al., 2001; STOW et al., 2007; HOGGARD et al., 2011; BARACCHI & TRAGUST, 2017), sendo que a evolução da socialidade foi acompanhada pela evolução de compostos antipatogênicos nas formigas (STOW et al., 2007; HOGGARD et al., 2011).

Neste contexto, a peçonha faz parte de adaptações fisiológicas de insetos sociais para prevenir o estabelecimento e disseminação de patógenos e, junto a adaptações organizacionais e comportamentais, é intitulada como imunidade social (CREMER et al., 2007). Especificamente em formigas predadoras, Orivel et al. (2001) e mais recentemente Baracchi & Tragust (2017), justificam a função antimicrobiana da peçonha pela necessidade de minimizar o potencial de infecção por bactérias, fungos e vírus, uma vez que transportam as

suas presas, logo após a imobilização, para seus ninhos, aumentando o risco de infecção por microrganismos.

Entre os vários compostos antipatogênicos da peçonha, o papel dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) é destacado como uma das principais ferramentas imunitárias presentes neste material glandular (HANCOCK & SCOTT, 2000; ANDERSSON et al., 2016; MYLONAKIS et al., 2016; TOUCHARD et al., 2016), sendo que o repertório quantitativo e qualitativo destes PAMs varia conforme a natureza das ameaças ambientais enfrentadas por cada espécie durante a evolução (MYLONAKIS et al., 2016), característica que certamente é outro fator relevante na pressão seletiva dos constituintes da peçonha destes animais (MOREAU, 2013). Além disso, outros compostos da peçonha podem agir na defesa contra microrganismos, entre os exemplos, os alcaloides (JOUVENAZ et al., 1972; LI et al., 2012).

Os estudos relacionados à compreensão da atuação e variação dos agentes antipatogênicos da peçonha, além de contribuir com o conhecimento a respeito da fisiologia e evolução de Formicidae, também fomentam o interesse sobre este material glandular como um importante produto natural de potencial terapêutico (TOUCHARD et al., 2016; AILI et al., 2017).

1.2.3 Peçonha como produto natural

Os produtos naturais são fontes tradicionais e ricas de agentes terapêuticos que são utilizados há séculos pela cultura popular (GUO, 2017). A partir dos avanços da ciência foi possível comprovar algumas dessas funções e extrair compostos bioativos purificados, permitindo a utilização do agente específico que apresenta a atividade de interesse, ou mesmo, permitindo a síntese deste material (GUO, 2017). Entre 1981 e 2010, 33% de todos os fármacos aprovados para utilização humana foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, sendo que 68% de todos os novos antimicrobianos produzidos tiveram sua origem de agentes extraídos da natureza (NEWMAN & GRAGG, 2010; BROWN et al., 2014).

Apesar do foco da medicina sobre produtos naturais ter sido excessivamente voltada para o estudo de plantas terrestres, algas e fungos (DIAS et al., 2012), agentes terapêuticos de origem animal também foram explorados (KING, 2011; KOH & KINI, 2012; HARVEY, 2014; KOOL et al., 2016; TOUCHARD et al., 2016; SEABROOKS & HU, 2017). Em

particular, a peçonha animal é uma promissora fonte de moléculas de interesse para produção de novas drogas, apresentando elevada especificidade e potência das suas toxinas em alvos moleculares de sistemas biológicos dos mamíferos (KING, 2011; KOH & KINI, 2012; HARVEY, 2014), sendo que este material glandular tem sido a origem de alguns fármacos desenvolvidos nas últimas décadas (KOH & KINI, 2012).

O número e a diversidade de agentes bioativos na peçonha e as milhares de espécies animais que os produzem, indicam que esse material glandular constitui uma ampla fonte de potenciais agentes terapêuticos a serem explorados (KOOL et al., 2016), no entanto, até o momento, a maior parte dos estudos com peçonha tem focado em espécies de cobras, aranhas e escorpiões, negligenciando as formigas, que apresentam um número muito mais expressivo de espécies peçonhentas do que a união de todos os grupos mais estudados (TOUCHARD et al., 2015, 2016). Esta falta de dados ocorre principalmente devido à quantidade limitada de peçonha que pode ser obtida a partir de um único indivíduo (LIMA & BROCHETTO-BRAGA, 2003; PLUZHNIKOV et al., 2014, AILI et al., 2014, 2017). Touchard et al. (2016) discute que grupos mais estudados produzem de 100 a 300.000 µg de peçonha por indivíduo, enquanto formigas produzem de 10 a 300 µg. Além disso, outra dificuldade é a natureza laboriosa de disseções e extração deste material glandular (FOX et al., 2015). Entretanto, o desenvolvimento de técnicas sofisticadas de isolamento de compostos de interesse e os avanços em espectrometria de massas, se tornaram ferramentas essenciais para no progresso em pesquisas com a peçonha do grupo (AILI et al., 2014, 2017).

Entre os exemplos com resultados promissores que tem impulsionado os estudos com a peçonha de formigas, podemos citar: ação anti-inflamatória e antitumoral da peçonha de *Pachycondyla sennaarensis* (BADR et al., 2012); ação anti-inflamatória de proteínas isolada da peçonha de *Pseudomyrmex triplarinus* (PAN & HINK, 2000); ação antibacteriana (JOUVENAZ et al., 1972; LI et al., 2012) e atitumoral (ARBISER et al., 2007) do alcaloide Solenopsin isolado da peçonha de *Solenopsis invicta*; atividade antibacteriana descrita a partir do peptídeo Ponericin isolado da peçonha de *Pachycondyla goeldii* (ORIVEL et al., 2001), do peptídeo bicarinina isolado da peçonha da formiga *Tetramorium bicarinatum* (TÉNÉ et al., 2016) e do peptídeo Δ -Myrtoxin-Mp1a (Mp1a) isolado de *Myrmecia pilosula* (DEKAN et al., 2017); também foram descritas a atividade parasiticida, antibacteriana (LIMA et al., 2016) e efeito anticonvulsivante da peçonha de *Dinoponera quadriceps* (NÔGA et al., 2016).

1.3 ESPÉCIE *Ectatomma brunneum*

O gênero *Ectatomma*, endêmico na região Neotropical, apresenta 15 espécies conhecidas, 11 delas encontradas no Brasil (DELABIE et al., 2015). Formigas deste gênero apresentam entre suas características divisão entre a casta de operária e rainha, além do macho, com diferenciação morfológica entre as fêmeas, uma vez que a rainha é visualmente maior que as operárias (ANTONIALLI-JUNIOR & GIANNOTTI 1997). As *Ectatomma* também são reconhecidas por apresentar aparelho de ferrão funcional, com produção de peçonha (DELABIE et al., 2015) e, junto a outros três gêneros (*Typhlomyrmex*, *Rhytidoponera* e *Gnamptogenys*) formam à subfamília Ectatomminae (KUGLER & BROWN, 1982).

A espécie *Ectatomma brunneum* Smith 1858 (Figura 2) tem ampla distribuição na América Latina (BROWN, 1958), nidificando em áreas abertas como bordas de florestas ou clareiras, culturas, pastagens e matas secundárias (KEMPF, 1972). As formigas desta espécie são predadoras generalistas com comportamento de caça solitário (PORTER, 1989; EVANS & PIERCE, 1995), em geral, se alimentam de artrópodes terrestres, apresentando preferência sobre térmitas ou outras formigas (MILL, 1982; OVERAL, 1986; GIANNOTTI & MACHADO, 1992; MARQUES et al., 1995). O nome *E. brunneum*, nomeado por Smith em 1858, é o hoje o nome válido para espécie, que anteriormente era descrita como *E. quadridens*, nomeada por Fabricios em 1793 (BOLTON, 1995).

A espécie teve a peçonha explorada em alguns estudos recentes, sendo que seu potencial farmacológico foi evidenciado em todos os resultados (PLUZHNIKOV et al., 2014; TOUCHARD et al, 2015a; AILI et al., 2016). Pluzhnikov et al. (2014) avaliando a peçonha da espécie isolou e caracterizou três peptídeos com atividade antibacteriana (Ponericin Q42, Ponericin Q49 e Ponericin Q50). O peptídeo Q42, na forma sintética, também foi testado contra as células K562 de leucemia crônica humana miogênica e células vermelhas do sangue não tumorais, no entanto, não apresentou seletividade entre as linhagens testadas (PLUZHNIKOV et al., 2014). Touchard et al (2015a) encontraram a presença de ligações dissulfeto em peptídeos encontrados na peçonha de *E. brunneum*. Resultado parecido foi descrito por Aili et al. (2016) que investigando o perfil de peptídeos presentes na peçonha desta espécie, descreveu ligações dissulfeto em 5% dos peptídeos detectados.



Figura 2. Operária da formiga *Ectatomma brunneum* (ANTWEB, 2017).

As ligações dissulfeto limitam a estrutura do peptídeo em estruturas rígidas tridimensionais, que fornecem a este melhor estabilidade química, aumentando a resistência à degradação proteolítica in vivo e formando farmacóforos bem definidos, que podem ser modulados por mutações simples de aminoácidos (ZHOU et al., 1993). Essas características tornam os peptídeos da peçonha ricos em cisteína, os principais componentes ativos da peçonha animal que resultam em sua atividade farmacológica (KING & HARDY, 2013).

Apesar das investigações realizadas com a peçonha de *E. brunneum*, os estudos com a espécie ainda estão em etapas preliminares e novos estudos ainda são essenciais para complementar seu conhecimento, tanto dos aspectos que explorem sua biologia, até novas características que indiquem o potencial da espécie como modelo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

1.4 OBJETIVO

Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo estudar a peçonha da espécie de formiga *E. brunneum* (Smith) quanto a sua toxicidade, composição química e atividade biológica, com

intuito de fornecer mais informação sobre sua viabilidade e potencial como modelo de agente terapêutico, além de fornecer subsídio para a compreensão da função dos seus constituintes químicos.

Objetivos específicos

Avaliar o potencial de toxicidade, citogenotoxicidade e mutagenicidade da peçonha da espécie *E. brunneum*, que são critérios essenciais no estudo de viabilidade de um possível modelo de agente terapêutico.

Determinar a composição em relação a aminoácidos e proteínas na peçonha da espécie *E. Brunneum* e testar o potencial de inibição microbiana da peçonha bruta desta espécie frente a cepas microbianas.

Isolar e identificar as substâncias de atuação antibacteriana utilizando um estudo biomonitorado da peçonha de *E. brunneum*, realizado frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AILI, S. R.; TOUCHARD, A.; ESCOUBAS, P.; PADULA, M. P.; ORIVEL, J.; DEJEAN, A.; NICHOLSON, G. M. Diversity of peptide toxins from stinging ant venoms. **Toxicon**, v. 92, p. 166-178, 2014.

AILI, S. R.; TOUCHARD, A.; KOH, J. M. S.; DEJEAN, A.; ORIVEL, J. Comparisons of Protein and Peptide Complexity in Poneroid and Formicoid Ant Venoms. **Journal of Proteome Research**, v. 15, p. 3039-3054, 2016.

AILI, S. R.; TOUCHARD, A.; PETITCLERC, F.; DEJEAN, A.; ORIVEL, J.; PADULA, M.P.; ESCOUBAS, P.; NICHOLSON, G. M. Combined peptidomic and proteomic analysis of electrically stimulated and manually dissected venom from the South American bullet ant *Paraponera clavata*. **Journal of Proteome Research**, v. 16, p. 1339-1351, 2017.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43-45, 2016.

ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; GIANNOTTI, E. Nest architecture and population dynamics of the Ponerinae ant *Ectatomma opaciventre* Roger (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Advanced Zoology**, v. 18, p. 64-71, 1997.

ANTWEB. Disponível a partir de: <https://www.antweb.org/>. Acessado em 21 de junho de 2017.

ARBISER, J. L.; KAU, T.; KONAR, M.; NARRA, K.; RAMCHANDRAN, R.; SUMMERS, S. A.; VLAHOS, C. J.; YE, K.; PERRY, B. N.; MATTER, W.; FISCHL, A.; COOK, J.;

- SILVER, P. A.; BAIN, J.; COHEN, P.; WHITMIRE, D.; FURNESS, S.; GOVINDARAJAN, B.; BOWEN, J. P. Solenopsin, the alkaloidal component of the fire ant (*Solenopsis invicta*), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis. **Blood**, v. 109, p. 560-565, 2007.
- ATTYGALLE, A. B.; MORGAN, E. D. Chemicals from the glands of ants. **Chemical Society Reviews**, v. 13, p. 245-278, 1984.
- AUSTIN, A. D.; DOWTON, M. **Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control**. Collingwood-Austrália: CSIRO Publishing, 2000. 468 p.
- BADR, G.; GARRAUD, O.; DAGHESTANI, M.; AL-KHALIFA, M. S.; RICHARD, Y. Human breast carcinoma cells are induced to apoptosis by samsun ant venom through an IGF-1-dependant pathway, PI3K/AKT and ERK signaling. **Cellular Immunology**, v. 273, p. 10-16, 2012.
- BARACCHI, D.; TRAGUST, S. Venom as a Component of External Immune Defense in Hymenoptera. **Evolution of Venomous Animals and Their Toxins**, p. 213-233, 2017.
- BEARD, R. L. Insect toxins and venoms. **Annual Review of Entomology**, v. 8, p. 1-18, 1963.
- BILLEN, J.; GOBIN, B. Trail following in army ants (Hymenoptera, Formicidae). **Netherlands Journal of Zoology**, v. 46, p. 272-280, 1996.
- BINFORD, G. J. An analysis of geografic and intersexual chemical variation in venom of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). **Toxicon**, v. 39, p. 955-968, 2001.
- BOLTON B. **Identification Guide to the Ant Genera of the World**. Cambridge-Inglaterra: Harvard University Press, 1994. 222 p.
- BOLTON, B. **A new general catalogue of the ants of the world**. Cambridge-Inglaterra: Harvard University Press, 1995. 504 p.
- BOURKE, A. F. G. Hamilton's rule and the causes of social evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 369, p. 20130362, 2014.
- BRADY, S.; FISHER, B.; SCHULTZ, T.; WARD, P. The rise of army ants and their relatives: diversification of specialized predatory doryline ants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 93, 2014
- BRANDÃO, C. R. F. **Hymenoptera. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo-Brasil: FAPESP, 1999. p. 141-146.
- BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 413-418, 2014.
- BROWN-JUNIOR, W. R. Contributions toward a reclassification of the Formicidae. II Tribe Ectatomminae (Hymenoptera). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard**, v. 118, p. 175-362, 1958.
- CAMPOS-FARINHA, A. E. C.; JUSTI- JUNIOR, J.; BERGMANN, E. C.; ZORZEON, F. J.; NETTO, S. M. R. **Formigas urbanas**. São Paulo-Brasil: Instituto Biológico, 1977. 20 p.
- CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Cell Press**, v. 28, p. 219-29, 2013.

- CASSIER, P.; TEL-ZUR, D.; LENSKY, Y. The sting sheaths of honey bee workers (*Apis mellifera* L.): Structure and alarm pheromone secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, p. 23-32, 1994.
- CERDÁ, X.; DEJEAN, A. Predation by ants on arthropods and other animals. In: POLIDORI, C. **Predation in the Hymenoptera: an evolutionary perspective**. Kerala- India: Trans World Research Network, 2011. p. 39-78.
- COLOGNA, C. T.; CARDOSO, J. D. S.; JOURDAN, E.; DEGUELDRE, M.; UPERT, G.; GILLES, N.; UETANABARO, A.P.T.; COSTA NETO, E.M.; THONART, P.; PAUW, E. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 413-422, 2013.
- CREMER, S.; ARMITAGE, S. A.; SCHMID-HEMPEL, P. Social immunity. **Current Biology**, v. 17, p. R693-R702, 2007.
- DEKAN, Z.; HEADY, S. J.; SCANLON, M.; BALDO, B. A.; LEE, T. H.; AGUILAR, M. I.; DEUIS, J. R.; VETTER, I.; ELLIOT, A. G.; AMADO, M.; COOPER, M. A. Δ -Myrtoxins-Mp1a is a helical heterodimer from the venom of the Jack Jumper ant with antimicrobial, membrane disrupting and nociceptive activities. **Angewandte Chemie**, v. 129, p. 8615-8610, 2017.
- DELABIE, J. H.; FEITOSA, R. M.; SERRÃO, J. E.; MARIANO, C. D. S. F.; MAJER, J. D. **As formigas poneromorfas do Brasil**. Bahia-Brasil: SciELO Editus-Editora da UESC, 2015. 477 p.
- DELABIE J. H. C.; FERNÁNDEZ, F. Relaciones entre hormigas y “homópteros” (Hemiptera: Sternorrhyncha y Auchenorrhyncha). In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá-Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 181-200.
- DELABIE J. H. C.; OSPINA, M.; ZABALA, G. Relaciones entre hormigas y plantas: una introducción. In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá-Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 167-180.
- DIAS, D. A.; Urban, S.; Roessner, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012.
- EVANS, J. D.; PIERCE, N. E. Effects of diet quality and queen number on growth in Leptothoracine ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 103, p. 91-99, 1995.
- FERNÁNDEZ, F.; PALACIO, E. E. Sistemática y filogenia de las hormigas: breve repaso a propuestas. In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá-Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2003. p. 29-44.
- FOURCASSIÉ, V.; OLIVEIRA, P. S. Foraging ecology of the giant Amazonian ant *Dinoponera gigantea* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae): activity schedule, diet and spatial foraging patterns. **Journal of Natural History**, v. 36, p. 2211-2227, 2002.
- FOX, E. G. P.; PIANARO, A.; SOLIS, D. R.; DELABIE, J. H. C.; VAIRO, B. C.; MACHADO, E. A.; BUENO, O. C. Intraspecific and intracolony variation in the profile of venom alkaloids and cuticular hydrocarbons of the fire ant *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera: Formicidae). **Psyche**, p. 1-10, 2012.

- FOX, E. G. P.; SOLIS, D. R.; DOS SANTOS, L. D.; PINTO, J. R. A. S.; MENEGASSO, A. R. S.; SILVA, R. C. M. C.; PALMA, M. S.; BUENO, O. C.; MACHADO, E. A. A simple, rapid method for the extraction of whole fire ant venom (Insecta: Formicidae: Solenopsis). **Toxicon**, v. 65, p. 5-8, 2015.
- FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; BRANDÃO, C. R. F.; DELABIE, J. H. C.; VASCONCELOS, H. L. Ecologia nutricional de formigas. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo-Brasil: Manole, 1991. p. 131-22.
- FREDERICKSON, M. E.; GREENE, M. J.; GORDON, D. M. Ecology: 'Devil's gardens' bedevilled by ants. **Nature**, v. 437, 495-496, 2005.
- FREDERICKSON, M. E.; GORDON, D. M. The devil to pay: A cost of mutualism with *Myrmelachista schumanni* ants in 'devil's gardens' is increased herbivory on *Duroia hirsuta* trees. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 274, p. 1117-1123, 2007.
- GIANNOTTI, E.; MACHADO, V. L. L. Notes on the foraging of two species of Ponerinae ants: Food and resources and daily hunting activities (Hymenoptera: Formicidae). **Bioikos**, v. 6, p. 7-17, 1992.
- GONÇALVES, C. Saúvas do Sul e Centro do Brasil. **Boletim Fitossanitário**, v. 3-4, p. 183-218, 1945.
- GORDON, D. **Formigas em ação: como se organiza uma sociedade de insetos**. Rio de Janeiro-Brasil: Jorge Zahar Editor, 2002. 144 p.
- GUO, Z. R. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, p. 119-136, 2017.
- HAIGHT, K. L.; TSCHINKEL, W. R. Patterns of venom synthesis and use in the fire ant, *Solenopsis invicta*. **Toxicon**, v. 42, p. 673-682, 2003.
- HANCOCK, R. E.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 8856-8861, 2000.
- HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193-200, 2014.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Cambridge: Belknap Press, 1990.732p.
- HOGGARD S. J.; WILSON, P. D.; BEATTIE, A. J.; STOW, A. J. Social complexity and nesting habits are factors in the evolution of antimicrobial defences in wasps. **PLoS One**, v. 6, p. e21763, 2011.
- JOUVENAZ, D. P.; BLUM, M. S.; MACCONNELL, J. G. Antibacterial Activity of Venom Alkaloids from the Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta* Buren1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, p. 291-293, 1972.
- KEMPF, W. W. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, v. 15, p. 1-344, 1972.
- KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, p. 1469-1484, 2011.
- KING, G. F.; HARDY, M. C. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 475-496, 2013.
- KOH, C. Y.; KINI, R. M.. From snake venom toxins to therapeutics—cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, p. 497-506, 2012.

- KOOL, J. Pharmaceutical properties of venom toxins and their potential in drug discovery. **Indonesian Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 1, 2016.
- KUGLER, C.; BROWN-JUNIOR, W. L. Revisionary and other studies on the ant genus *Ectatomma*, including the description of two new species. **Search Agriculture**, v. 24, p. 1-8, 1982.
- LI, S.; JIN, X.; CHEN, J. Effects of piperidine and piperidine alkaloids from the venom of red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren, on *Pythium ultimum* Trow growth in vitro and the application of piperidine alkaloids to control cucumber damping-off in the greenhouse. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1546-1552, 2012.
- LIMA, P. R.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical**, v. 9, p. 149-162, 2003.
- LIMA, D. B.; SOUSA, P. L.; TORRES, A. F. C.; RODRIGUES, K. A. F.; MELLO, C. P.; TESSAROLO, L. D.; QUINET, Y. P.; OLIVEIRA, M. R.; MARTINS, A. M. C. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. **Toxicon**, v. 120, p. 128-132, 2016.
- MARQUES, O. M.; VIANA, C. H. P.; KAMOSHIDA, M.; CARVALHO, C. A. L.; SANTOS, G. M. M. Hábitos de nidificação e alimentares de *Ectatomma quadridens* (Fabricius, 1793) (Hymenoptera, Formicidae) em Cruz das Almas - Bahia. **Insecta**, v. 4, p. 1-9, 1995.
- MILL, A. E. Faunal studies on termites (Isoptera) and observation on their ants predator (Hymenoptera: Formicidae) in the Amazon Basin. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, p. 253-256, 1982.
- MOREAU, S. J. "It stings a bit but it cleans well": Venoms of Hymenoptera and their antimicrobial potential. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, p. 186-204, 2013.
- MYLONAKIS, E.; PODSIADLOWSKI, L.; MUHAMMED, M.; VILCINSKAS, A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B**, v. 371, p. 20150290, 2016.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.
- NÔGA, D. A. M. F.; BRANDÃO, L. E. M.; CAGNI, F. C.; SILVA, D.; DE AZEVEDO, D. L. O.; ARAÚJO, A.; SANTOS, W. F.; MIRANDA, A.; SILVA, R. H.; RIBEIRO, A.M. Anticonvulsant Effects of Fractions Isolated from *Dinoponera quadriceps* (Kempt) Ant Venom (Formicidae: Ponerinae). **Toxins**, v. 9, p. 5, 2016.
- ORIVEL, J.; DEJEAN, A. Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae). **Toxicon**, v. 39, p. 195-201, 2001.
- ORIVEL, J.; REDEKER, V.; LE CAER, J. P.; KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; LONGEON, A.; CHAFFOTTE, A.; DEJEAN, A.; ROSSIER, J. P. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 17823-17829, 2001.
- OVERAL, W. L. Recrutamento e divisão de trabalho em colônias naturais da formiga *Ectatomma quadridens* (Fabr.) (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi (Zoologia)**, v. 2, p. 113-135, 1986.

- PAN, J.; HINK, W.F. Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. **Toxicon**, v. 38, p. 1403-1413, 2000.
- PLUZHNIKOV, K. A.; KOZLOV, S. A.; VASSILEVSKI, A. A.; VORONTSOVA, O. V.; FEOFANOV, A. V.; GRISHIN, E. V. Linear antimicrobial peptides from *Ectatomma quadridens* ant venom. **Biochimie**, v. 107, p. 211-215, 2014.
- PORTER, S. D. Effects of diet on the growth of laboratory fire ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Kansas Entomological Society**, v. 62, n. 2, p. 288-291, 1989.
- SANTOS, L. D.; MENEGASSO, A. R. S.; PINTO, J. R. S. P.; SANTOS, K. S.; CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Proteomics**, v. 11, p. 1403-1412, 2011.
- SCHMIDT, J. O. Biochemistry of insect venoms. **Annual Review of Entomology**, v. 27, p. 339-368, 1982.
- SEABROOKS, L.; HU, L. Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2017.
- STOW, A.; BRISCOE, D.; GILLINGS, M.; HOLLEY, M.; SMITH, S.; LEYS, R.; SILBERBAUER, T.; TURNBULL, C.; BEATTIE, A. Antimicrobial defences increase with sociality in bees. **Biology Letters**, v. 3, p. 422-424, 2007.
- TÉNÉ, N.; BONNAFÉ, E.; BERGER, F.; RIFFLET, A.; GUILHAUDIS, L.; SÉGALAS-MILAZZO, I.; PIPYC, B.; AGNÈS COSTEC, A.; LEPRINCE, J.; TREILHOU, M. Biochemical and biophysical combined study of bicarinalin, an ant venom antimicrobial peptide. **Peptides**, v. 79, p. 103-113, 2016.
- TOUCHARD, A.; DEJEAN, A.; ESCOUBAS, P.; ORIVEL, J. Intraspecific variations in the venom peptidome of the ant *Odontomachus haematodus* (Formicidae: Ponerinae) from French Guiana. **Journal of Hymenoptera Research**, v. 47, p. 87-101, 2015. b.
- TOUCHARD, A.; KOH, J. M. S.; AILI, S. R.; DEJEAN, A.; NICHOLSON, G. M.; ORIVEL, J.; ESCOUBAS, P. The complexity and structural diversity of ant venom peptidomes is revealed by mass spectrometry profiling. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, p. 385-396, 2015. a.
- TRAGUST, S.; MITTEREGGER, B.; BARONE, V.; KONRAD, M.; UGELVIG, L. V.; CREMER, S. Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. **Current Biology**, v. 23, p. 76-82, 2013.
- TSAI, I. H.; WANG, Y. M.; CHEN, Y.; TSAI, T. S.; TU, M. C. Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Biochemical Society**, v. 223, p. 215-223, 2004.
- TOUCHARD, A.; AILI, S. R.; FOX, E. G. P.; ESCOUBAS, P.; ORIVEL, J., NICHOLSON, G. M.; DEJEAN, A. The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms. **Toxins**, v. 30, p. 1-28, 2016.
- WARD, P. S. Taxonomy, phylogenetics and evolution. In: LACH, L.; PARR, C. L.; ABBOTT, K. L. **Ant ecology**. Oxford-Inglaterra: Oxford University Press, 2010. p. 3-17.
- WILSON, E. O. **Insect societies**. Cambridge-Inglaterra: Belknap Press of Harvard University Press, 1971. 548 p.

WILSON, E. O. **Success and Dominance in Ecosystems: The Case of the Social Insects.** Oldendorf/Luhe-Alemanha: Ecology Institute, 1990. 104 p.

WHITMAN, D. W.; BLUM, M. B.; ALSOP, D. W. Allomones: Chemicals for Defense. In: EVANS, D. L.; SMITH, J. **Insect Defenses.** Albany-EUA: State University of New York Press, 1990. p. 289-351.

ZHOU, N. E.; KAY, C. M.; HODGES, R. S. Disulfide bond contribution to protein stability: positional effects of substitution in the hydrophobic core of the two-stranded α -helical coiled-coil. **Biochemistry**, v. 32, p. 3178-3187, 1993.

2. CAPÍTULO - POTENCIAL MUTAGÊNICO, GENOTÓXICO, CITOTÓXICO, TÓXICO DA PEÇONHA DE *Ectatomma brunneum* SMITH A PARTIR DE TESTES *IN VITRO*

Potencial mutagênico, genotóxico, citotóxico e tóxico da peçonha de *Ectatomma brunneum* Smith a partir de testes *in vitro*

Mutagenic, genotoxic, cytotoxic and toxic potential of *Ectatomma brunneum* Smith venom from *in vitro* tests

Resumo

A peçonha de formiga é um produto natural promissor para o desenvolvimento de novas drogas, no entanto, este recurso ainda pouco explorado principalmente pela dificuldade de se obter quantidade suficiente deste material glandular. Considerando a inexistência de pesquisa que avaliem a instabilidade genética e o potencial tóxico da peçonha da formiga *Ectatomma brunneum*, espécie que apresenta atividade terapêutica promissora em sua peçonha, o objetivo deste estudo foi avaliar a mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade da peçonha da espécie, sobre ensaios biológicos que utilizem reduzida quantidade de amostra. Para o estudo foi realizado o teste de Ames e teste sobre células meristemáticas de *Allium cepa*, que avaliaram a instabilidade genética e celular e, teste de toxicidade sobre *Artemia salina*. Os resultados apontam que a peçonha não apresenta ação genotóxica ou mutagênica nas concentrações iguais ou menores que 500 µg/mL. Já a atuação citotóxica foi observada mesmo em baixas concentrações. Os resultados também mostram toxicidade sobre *A. salina*. Os dados evidenciam a eficiência dos modelos utilizados neste estudo para testes que avaliem a mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade da peçonha de formiga, além disso, é destacada a correlação de testes de citotoxicidade e toxicidade com inúmeras atividades biológicas de interesse terapêutico.

Palavras-chave

Fármaco - Hymenoptera - Produto natural - Toxicologia genética.

Summary

Ant venom is a promising natural product for the development of new drugs, however, this feature is still largely unexplored due to the difficulty in obtaining sufficient quantity of this glandular material. The objective of this study was to evaluate the mutagenicity, genotoxicity,

cytotoxicity and toxicity of the venom species of the species *Ectatomma brunneum*, a species that presents promising therapeutic activity in its venom, on biological assays using a small sample amount. For the study, the Ames test and the meristematic test of *Allium cepa*, which evaluated the genetic and cellular instability, and the toxicity test on *Artemia salina*, were performed. The results indicate that the venom does not present genotoxic or mutagenic action at concentrations equal to or less than 500 µg/mL. Cytotoxic activity was observed even at low concentrations. The results also show toxicity on *A. salina*. The data demonstrate the efficiency of the models used in this study for tests that evaluate the mutagenicity, genotoxicity, cytotoxicity and toxicity of the ant venom. In addition, the correlation of cytotoxicity and toxicity tests with innumerable biological activities of therapeutic interest is highlighted.

Key-words

Drug - Hymenoptera - Natural product - Genetic toxicology.

Introdução

Os produtos naturais constituem importante fonte de agentes terapêuticos (Guo, 2016) e, dentre estes recursos, a peçonha pode apresentar moléculas de interesse para o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que possui elevada especificidade quanto a agentes microbianos, além de compostos que podem apresentar propriedades com alvos moleculares em mamíferos, como células tumorais (King, 2011; Harvey, 2014). Entre os animais peçonhentos, o estudo com a peçonha de formigas apresenta efeitos farmacológicos promissores que impulsionam o desenvolvimento de pesquisas com a peçonha da família Formicidae (Ordem Hymenoptera) (Touchard et al., 2016), como ação antimicrobiano (Orivel et al., 2001; Li et al., 2012; Tené et al., 2016; Dekan et al., 2017), anti-inflamatório (Pan e Hink, 2000), antitumoral (Arbiser et al., 2007; Badr et al., 2012; Bosque et al., 2014), antinociceptiva (Souza et al., 2012), parasiticida (Lima et al., 2016) e anticonvulsivante (Lopes et al., 2013; Nôga et al., 2016). Em meio as diferentes espécies estudadas destaca-se a espécie predadora *Ectatomma brunneum*, que apresenta ampla distribuição na América Latina, além de dados preliminares significativos quanto à presença de agentes de potencial terapêutico na peçonha (Pluzhnikov et al., 2014; Touchard et al., 2015a; Aili et al., 2016)

Apesar das pesquisas promissoras já realizadas com formigas, ainda são considerados escassos os estudos com a peçonha deste grupo (Fox et al., 2012; Pluzhnikov et al., 2014; Touchard et al., 2016), quando considerando que esta família é constituída de aproximadamente 16.000 espécies e subespécies descritas (AntWeb, 2017). Dentre os entraves relacionados à investigação de novos compostos bioativos a partir da peçonha destes

insetos, destaca-se principalmente a dificuldade de se obter o produto (peçonha) em quantidade suficiente, uma vez que é limitado o volume de peçonha extraída de cada indivíduo (Fox et al., 2012; Pluzhnikov et al., 2014; Aili et al., 2017). Outro desafio está relacionado à mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade destes produto natural, que pode ser um fator limitante para sua aplicação terapêutica (Simões et al., 2016). Neste aspecto, estudos que avaliem a peçonha quanto sua atuação sobre a instabilidade genética e a toxicidade sobre modelos biológicos, são de extrema relevância no estudo de novos agentes terapêuticos a partir desse material glandular.

O estudo da atuação mutagênica, genotóxica, citotóxica e tóxica de um produto com potencial farmacológico, normalmente é realizado utilizando-se de modelos animais que requerem elevado custo e condições controladas de manutenção, demandam quantidade relativamente alta do produto utilizado, além de exigirem previamente procedimentos burocráticos e éticos para sua aplicação (Simões et al., 2016). Neste aspecto, testes equivalentes, no entanto, que requerem menores exigências de aplicação, além de menor quantidade de amostra, um requisito necessário para o estudo da peçonha de formigas, podem gerar os mesmos resultados, com alta confiabilidade, de modo simples e rápido (Meyer et al., 1982; Kado et al., 1983; Cabrera e Rodriguez, 1999; Grant, 1999). Ademais, alguns destes bioensaios também podem indicar correlação com atividades de interesse farmacológico (Meyer et al., 1982; Zani et al., 1995), além de correlação com agentes carcinógenos (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000), podendo fornecer informações prévias que direcionem o estudo com a peçonha.

Entre os testes alternativos para a avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade, destacam-se: o teste de Ames, que é sensível a agentes mutagênicos e citotóxicos e, manifesta sua resposta baseado na indução de mutações reversas empregando uma bactéria auxotrófica para histidina (his-), que na presença de agentes mutagênicos reverte seu caráter de auxotrofia e passa a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido (Zeiger, 2001; Varella et al., 2004); o teste com células meristemáticas de *Allium cepa*, que é sensíveis a agentes mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos (Cabrera e Rodriguez, 1999; Grant, 1999) e, é executado a partir de sementes germinadas sob irrigação do agente estudado; e, o teste sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, que é um modelo sensível para avaliação da toxicidade e determinação da dose letal para 50% dos indivíduos (DL50) (Meyer et al., 1982), dado que se correlaciona com a razão entre a dose tóxica e a dose capaz de produzir a resposta terapêutica desejada (Mello et al., 2004).

Considerando a inexistência de pesquisa que avaliem a instabilidade genética e o potencial tóxico da peçonha da formiga *E. brunneum* (Smith) (Hymenoptera, Formicidae), o objetivo do trabalho foi avaliar a mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade da peçonha na forma bruta, em diferentes ensaios biológicos e correlacionar o estudo de citotoxicidade e toxicidade com atividades biológicas descritas na literatura.

Métodos

Coleta de material e preparo da peçonha

Foram coletadas operárias em atividade de forrageamento da espécie de formiga *E. brunneum* de forma aleatória, no município de Dourados - Mato Grosso do Sul / Brasil (22°11'51.08"S; 54°55'51.12"W). Em laboratório, as formigas foram crio-anestesiadas, dissecadas e os reservatórios da peçonha com o material glandular (Figura 1), localizados no interior do abdômen, foram removidos do inseto e alocados em microtubos contendo 50 µL de água ultrapura e mantidos em gelo durante todo o processo de extração. Após o processo de dissecação o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C, para separação da membrana do invólucro do reservatório, da peçonha. Em seguida, o sobrenadante contendo a peçonha foi transferido para outro microtubo, congelado e posteriormente liofilizado (Alpha 1.2/LD-plus, Christ, Alemanha).

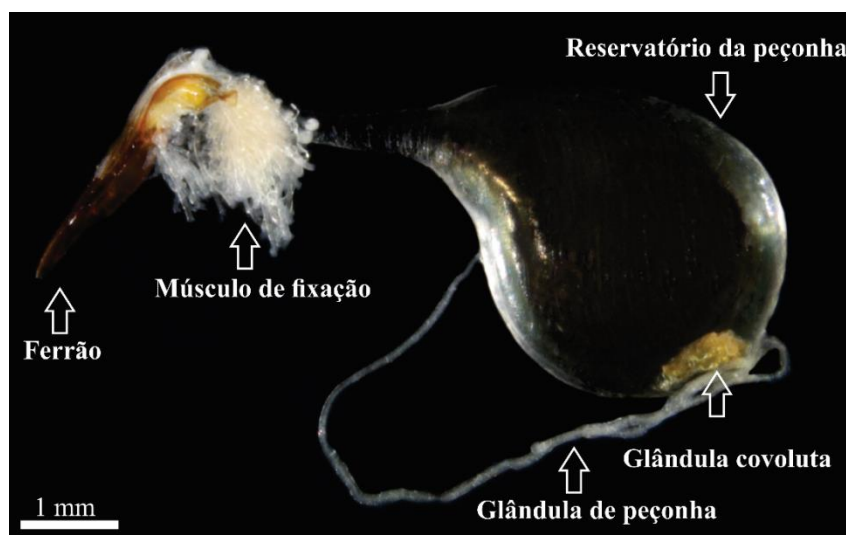


Figura 1. Aparato da peçonha de *E. brunneum* contendo reservatórios da peçonha com o material glandular, além de outras estruturas associadas.

Bioensaio *in vitro* para determinação do índice mutagênico e citotóxico a partir do teste de Ames

Para a realização do ensaio foi utilizado o método de microsuspensão, com adaptações, propostas por Kado et al. (1983), modificada a partir do testes desenvolvido por Maron e Ames (1983). Os ensaios foram realizados com cepas de *Salmonella enterica* subespécie *entérica* serovar Typhimurium TA 98 (hisD3052/rfa/urvB/pKM101/Ap^R) e TA 100 (hisG46/rfa/ΔuvrB/pKM101/Ap^R), ambas doadas pelo setor de Toxicologia e Genotoxicidade da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), na presença e ausência de ativação metabólica, a partir de homogenato de fígado de mamífero ou fração microssomal S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos, garantindo a identificação de agentes de ação indireta (Maron e Ames, 1983).

Para o preparo do inoculo a suspensão bacteriana foi incubada por 12 horas e em seguida concentrada por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, para obter densidade de 1-2 x 10⁹ bactérias/mL e, por fim, ressuspensa em solução tampão fosfato de sódio 0,2 mM (pH 7,4). No ensaio sem ativação metabólica, foram utilizados 5 µL com de um das diferentes concentrações da peçonha (500, 150, 50, 15, 5 e 1,5 µg/mL) diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO), 50 µL da suspensão bacteriana e 50 µL de tampão fosfato 0,2 mM (pH 7,4). O ensaio com ativação metabólica seguiu os mesmos passos do teste anterior, no entanto, foram adicionados 50 µL da fração microssomal S9, em substituição ao tampão fosfato de sódio. Na sequência, foram pré-incubados por 90 minutos a 37 °C.

Após a pré-incubação, 2 mL de top ágar foram adicionados à solução e os tubos foram homogeneizados e vertidos em placas com Ágar Mínimo Glicosado (AMG). O número de colônias revertentes por placa, *his+*, foi mensurado em número absoluto após 66 horas a 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os controles positivos utilizados nos ensaios sem ativação metabólica foram: 4-nitro-ofenilenodiamina (NPD) (10µg/placa) para linhagem TA 98 e azida sódica (2,5µg/placa) para a linhagem TA 100. Com ativação metabólica: 2-aminoantraceno (2-AA) (0,625 µg/placa) para as linhagens TA 98 e TA 100. Os controles negativos foram realizados com o solvente da amostra, DMSO (5 µL/placa).

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, EUA, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, EUA), adotando o modelo de Bernstein et al. (1982). O índice de mutagenicidade/citotóxico (IMTC) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IMTC = \frac{\text{Número de revertentes}}{\text{Controle negativo}}$$

A amostra foi considerada com potencial mutagênico quando o índice de mutagenicidade/citotóxico (IMTC) ≥ 2 em pelo menos uma das concentrações testadas e quando houve uma relação de dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos (Valente-Campos et al., 2009). As concentrações que apresentaram um IMTC $< 0,7$ foram consideradas citotóxicas (Kummrow et al, 2006).

Bioensaio do efeito mutagênico, genotóxico e citotóxico em *A. cepa*

A avaliação do efeito mutagênico, genotóxico e citotóxico sobre *A. cepa*, foi realizado a partir da metodologia de Grant (1982), com modificações, utilizando quatro concentrações da peçonha (1000; 500; 100; e 40 $\mu\text{g/mL}$) diluídas em água ultrapura. O herbicida trifluralina 0,02% (v/v) foi empregado como controle positivo e a água ultrapura como controle negativo.

Para teste de cada concentração de amostras e dos controles, foi preparada uma placa de Petri forrada com papel germitest umedecido com o tratamento correspondente, onde 60 sementes de *A. cepa*, variedade Baía periforme, foram distribuídas de forma equidistantes. As placas com as sementes foram mantidas em condições controladas em câmara de germinação por 96 horas, com fotoperíodo curto (12 horas luz: 12 horas escuro) e em temperatura constante de $22\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, sendo irrigadas com seus respectivos tratamentos durante o período de incubação. Na sequência, as sementes germinadas foram contadas e o comprimento das raízes em cada tratamento foi aferido utilizando paquímetro digital (Digpack, Brasil).

Após o período de germinação as raízes de *A. cepa* foram fixadas em solução de Carnoy 3:1 (v/v) por 24 horas. Em seguida o fixador foi substituído e as amostras foram armazenadas em geladeira até o momento da análise. Para a montagem das lâminas as raízes foram hidrolizadas com ácido clorídrico (HCl) 1N a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos e corado por Reativo de Schif, baseado em método Feulgen, por 1 hora e 30 minutos. Foram preparadas 5 lâminas do meristema de cada tratamento, analisando 1000 células de cada repetição em microscópio óptico, no aumento de 400 x, totalizando 5000 células por concentração de peçonha testada.

A atividade mutagênica dos tratamentos e controles foi avaliada usando a contagem de micronúcleos recorrendo à determinação do índice mutagênico (IMT), dado pela equação:

$$IMT = \frac{N^{\circ} \text{ total de células com micronúcleo}}{N^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

A análise da atividade genotóxica, que avalia as anormalidades cromossômicas em células meristemáticas de raiz de *A. cepa*, foi realizada por meio da determinação do índice de alterações cromossômicas (IAC):

$$IAC = \frac{N^{\circ} \text{ total de alterações cromossômicas}}{N^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

A determinação da citotoxicidade foi efetuada utilizando os parâmetros: porcentagem de germinação (%GR), crescimento médio relativo da raiz (CMR), índice de germinação (IG), índice mitótico (IM) e índice de morte celular (IMC), de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\%GR = \frac{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas na solução teste}}{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

As médias do comprimento das raízes foram realizadas para a obtenção do crescimento relativo da raiz:

$$CMR = \frac{\text{Média do crescimento das raízes na solução teste}}{\text{Média do crescimento das raízes no controle}} \times 100$$

Os dados anteriores foram compilados para o cálculo de índice de germinação, identificando a toxicidade dos tratamentos:

$$IG = \%GR \times CMR$$

Os efeitos citotóxicos foram também avaliados usando determinação do índice mitótico (IM) e índice de morte celular (IMC) utilizando as seguintes equações:

$$IM = \frac{N^{\circ} \text{ total de células em mitose}}{N^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

$$IMC = \frac{N^{\circ} \text{ total de células mortas}}{N^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

Para a análise estatística de *A. cepa* foi usado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com Dunn's a *posteriori*. Todos os testes foram realizados usando o software plataforma R Core Team (2016), com o nível de significância de 0,005.

Bioensaio para determinação da toxicidade sobre *A. salina*

O teste de toxicidade foi realizado conforme método descrito por Lacerda et al. (2011), com modificações, utilizando como modelo biológico de larvas da espécie de microcrustáceo *A. salina*. Cistos da *A. salina* foram incubados durante 48 horas em solução salina (pH 8) com iluminação (60 W) e aeração constantes para o desenvolvimento das larvas. As concentrações da peçonha de *E. brunneum* (50, 25, 15, 10, 5 e 1 µg/mL) foram diluídas em solução salina (pH 8), além do controle contendo apenas o diluente. Para realização do ensaio foi utilizado 10 larvas de 2º estágio em 10 mL do tratamento, incluindo controle negativo. Após 24 horas de incubação o número de mortos foi contabilizado. O ensaio foi realizado em

triplicata. Para avaliação dos resultados uma curva analítica foi construída para determinação do DL50.

Resultados

Bioensaio *in vitro* para determinação do índice mutagênico e citotóxico a partir do teste de Ames

As diferentes concentrações da peçonha avaliadas com as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella* Typhimurium, na presença (+S9) e na ausência (-S9) de ativação metabólica foram apresentadas na Tabela 1. Os resultados demonstraram que a peçonha não induziu aumento significativo do número de colônias revertentes por placa, em relação ao controle negativo e positivo ($p > 0,05$), indicando ausência de mutagenicidade da peçonha. O mesmo foi confirmado pelo índice de mutagenicidade (< 2), portanto não sugerindo relação de dose resposta. No teste com a linhagem TA 100 sem ativação metabólica (-S9), foram observadas IMTC inferior a 0,7 para todas as concentrações, indicando citotoxicidade.

Tabela 1. Potencial mutagênico e citotóxico da peçonha de *E. brunneum* para as linhagens TA 98 e TA 100 na ausência e presença de ativação metabólica por S9.

TR ($\mu\text{g/mL}$)	Linhagem TA 98				Linhagem TA 100			
	S9 (-)		S9 (+)		S9 (-)		S9 (+)	
	CR	IMTC	CR	IMTC	CR	IMTC	CR	IMTC
CN	32,20 \pm 4,15	-	35,40 \pm 8,66	-	211,75 \pm 3,86	-	211,40 \pm 7,87	-
1,5	27,33 \pm 7,09	0,85	49,33 \pm 2,52	1,39	129,00 \pm 4,21	0,61 ^a	151,33 \pm 8,14	0,72
5	29,00 \pm 6,24	0,90	50,00 \pm 2,00	1,41	130,33 \pm 3,81	0,61 ^a	149,33 \pm 7,57	0,71
15	29,33 \pm 3,06	0,91	50,67 \pm 3,79	1,43	131,33 \pm 5,33	0,62 ^a	152,33 \pm 10,02	0,72
50	29,67 \pm 3,79	0,92	51,67 \pm 2,31	1,46	136,67 \pm 4,03	0,64 ^a	152,00 \pm 10,39	0,72
150	29,00 \pm 2,00	0,90	52,00 \pm 2,65	1,47	147,00 \pm 4,36	0,69 ^a	151,67 \pm 6,03	0,72
500	29,33 \pm 4,51	0,91	53,67 \pm 4,73	1,52	146,47 \pm 3,54	0,69 ^a	159,67 \pm 5,03	0,76
CP	306 \pm 5,66	9,25	195,50 \pm 10,61	5,50	1042,50 \pm 10,61	4,90	979,50 \pm 6,36	4,60

TR - Tratamento; CR - Colônias Revertentes; IMTC - índice de mutagenicidade e citotoxicidade (-): ausência; (+): presença; CN - Controle Negativo; CP - Controle Positivo; a - efeito citotóxico.

Bioensaio do efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico da peçonha de *E. brunneum* em *A. cepa*

De acordo com a Tabela 2 foi possível observar que as diferentes concentrações da peçonha interferiram gradativamente sobre todas as variáveis avaliadas nas raízes de *A. cepa* germinadas sob efeito das diferentes concentrações da peçonha. As análises estatísticas para IMT (KW = 16,01 - $p < 0,05$); IAC (KW = 16,673 - $p < 0,05$); CMR, usando os valores de crescimento da raiz (CR) (KW= 23,36 - $p < 0,05$); IM (KW= 19,25 - $p < 0,05$) e IMC (KW = 14.232 - $p < 0,05$) apontaram que há diferenças significativas entre as concentrações utilizadas em cada uma das variáveis investigadas. Testes estatísticos *a posteriori* apontaram que nenhuma das concentrações testadas apresentou IMT e IAC similar ao controle positivo, mas a concentração de 1000 µg/mL indicou mutagenicidade e genotoxicidade quando comparados ao controle negativo ($p < 0,05$). A atividade citotóxica foi observada nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL, observadas partir da interferência da peçonha no CR e IM em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), além de também de os resultados de IM, para as mesmas concentrações, não diferiram do controle positivo ($p > 0,05$). Já o IMC não apresentou diferença entre controle negativo e todas as concentrações testadas. As diferenças estatísticas são destacadas na Tabela 2.

Tabela 2. Potencial mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade da peçonha de *E. brunneum* avaliados sobre o desenvolvimento de sementes de *A. cepa*.

TR (µg/mL)	IMT %	IAC %	GR %	IG %	CMR %	IM %	IMC %
CN	0,02	1,43	100	100	100	58,4	0,17
40	0,02	1,51	98,15	94,75	97,33	57,66	0,21
100	0,08	1,54	98,15	83,51	91,38	54,56	0,34
500	0,10	2,23	94,44	66,00	81,24 ^a	39,29 ^{ab}	0,40
1000	0,15 ^a	2,30 ^a	94,44	62,95	79,34 ^a	33,87 ^{ab}	0,41
CP	3,36	20,28	79,63	26,22	51,20	22,66	3,00

TR - Tratamento; IMT - Índice de Mutagenicidade; IAC - Índice de Alteração Cromossômica; GR - Porcentagem de Germinação; CMR - Crescimento Médio Relativo da Raiz; IG- Índice de Germinação; IM - Índice Mitótico; IMC - Índice de Morte Celular; CP - Controle positivo; CN - Controle Negativo; a – apresenta diferença estatística significativa em relação CN ($p < 0,05$); b – não apresenta diferença estatística significativa em relação ao CP ($p > 0,05$);

Bioensaio para determinação da toxicidade da peçonha sobre *A. salina*

Todas as concentrações de peçonha de *E. brunneum* testadas apresentaram toxicidade sobre *A. salina*, enquanto o controle negativo não apresentou mortalidade do microcrustáceo. Para determinação do (DL50) foram empregadas as concentrações de peçonha em função da porcentagem de mortalidade, resultando em um $R^2=0,9803$ e DL50 de 19,51 µg/mL.

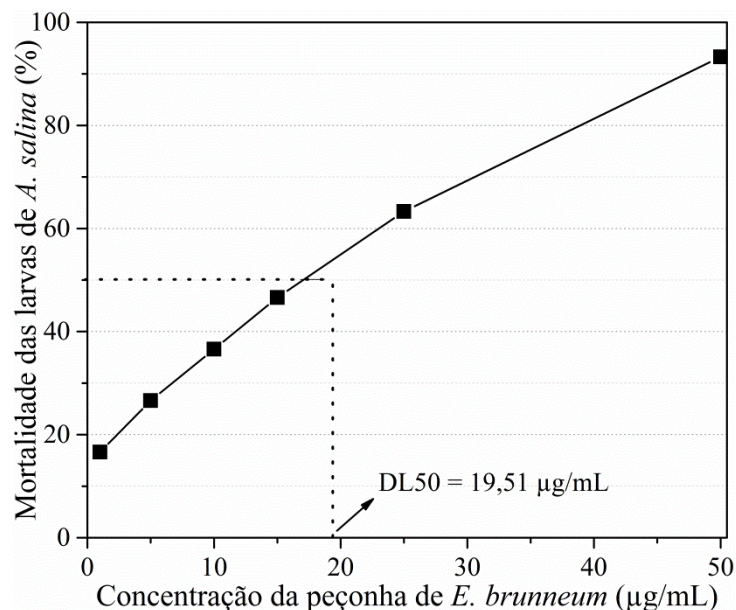


Figura 1. Porcentagem de mortalidade das larvas do microcrustáceo *A. salina* em função da concentração de peçonha da formiga *E. brunneum*.

Discussão

Ensaio de mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade sobre diferentes modelos biológicos são essenciais para avaliar os efeitos de um potencial agente terapêutico, sobretudo de um produto natural como a peçonha, que é conhecida principalmente por sua ação letal na captura presas (SCHMIDT, 1982; ORIVEL et al., 2001). Com base nos ensaios propostos neste estudo, a peçonha bruta da formiga *E. brunneum* não apresenta ação mutagênica ou genotóxica em baixas concentrações, no entanto, apresentou efeitos citotóxicos e tóxicos nos modelos testados.

O teste de Ames apontou que a peçonha não induziu o aumento significativo do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade foi negativo em ambas linhagens e concentrações testadas. O mesmo pode ser observado na ação indireta deste material glandular com o uso da fração microssomal S9. Complementarmente, uma vez que de acordo com a literatura o teste de Ames apresenta correlação com potencial carcinogênico em testes positivos para mutagenicidade (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000; FDA, 2012), nossos resultados podem indicar também que a peçonha da espécie não apresenta carcinogenicidade.

A *Food and Drug Administration* (FDA, 2012) recomenda a utilização do Teste de Ames (Maron e Ames 1983), como item de protocolo antes da realização de ensaios pré-clínicos. No entanto, o teste de Kado et al. (1983), utilizado neste estudo, é mais sensível que

a técnica convencional desenvolvida por Maron e Ames (1983) e mais adequada em concentrações menores de amostra, uma necessidade no estudo com a peçonha de formigas, entre outras famílias da ordem Hymenoptera, que apresentam reduzida quantidade deste material glandular por indivíduo (Touchard et al., 2016; Aili et al., 2017). Esta modificação consiste em concentrar as culturas das linhagens de *Salmonella* e reduzir a quantidade de amostra analisada, resultando em uma maior sensibilidade do ensaio (Kado et al., 1983).

O bioensaio utilizando *A. cepa* apresentou resultado similar ao teste de Ames, uma vez que as concentrações equivalentes testadas, também não apresentaram ação mutagênica, ou mesmo, genotóxica sobre a célula meristemática vegetal. No entanto, em concentrações mais elevadas, a peçonha pode interferir na instabilidade genética da célula, uma vez que a concentração de 1000 µg/mL apresentou genotoxicidade e mutagenicidade sobre *A. cepa*, diferindo significativamente do controle negativo.

A ação citotóxica da peçonha foi encontrada no teste de Ames sobre a linhagem TA 100 em todas as concentrações testadas, o qual pode ser entendido como um excesso de danos ocorridos no DNA provocando a morte das bactérias (Kummrow et al., 2006). Assim como exposto nos resultados de Ames, foi observada a atividade citotóxica da peçonha sobre as células de *A. cepa*, com interferência no CR e IM, sugerindo uma ação antiproliferativa, característica já atribuída à peçonha da formiga *Tetraponera rufonigra* testada sobre célula animal (Bosque et al., 2014). No entanto, diferente do teste de Ames, que apresentou citotoxicidade mesmo em concentração de 1,5 µg/mL, a ação citotóxica sobre *A. cepa* ocorreu apenas para a concentração de 500 e 1000 µg/mL.

Neste sentido, apesar dos resultados mostrarem menor sensibilidade da célula vegetal em relação a peçonha, a avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é um método validado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade (Grant, 1982; Cabrera e Rodriguez, 1999; Grant, 1999). Este modelo também apresenta vantagens de utilização para testes iniciais da peçonha bruta, uma vez que o crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, disponibilidade em qualquer época do ano, fácil manuseio, boa cinética de proliferação e cromossomos de número reduzido (Matsumoto et al., 2006), proporcionam respostas rápidas e completas para um *screening* inicial da peçonha, além de possuírem correlação com sistemas de testes em mamíferos, validando sua aplicação (Çelik e Äslanturk, 2007).

Portanto, o estudo do efeito da peçonha de *E. brunneum* sobre a instabilidade genética e celular de diferentes modelos biológicos, não apresentou ação mutagênica ou genotóxica para nenhum dos testes propostos neste estudo em concentração igual ou inferior a 500 µg/mL. Já a ação citotóxica ocorreu para todos os modelos biológicos usados, atuando diferentemente em relação às concentrações testadas sobre cada modelo estudado.

A determinação do DL50 é essencial para indicação do índice terapêutico de um fármaco, ou seja, é a razão entre a dose tóxica e a dose capaz de produzir a resposta clinicamente desejada (Mello et al., 2004). A partir dos resultados referentes a DL50 encontrados sobre *A. salina* (19,51 µg/mL), foi possível atribuir à peçonha de *E. brunneum* elevada toxicidade quando comparada a outras espécies peçonhentas. Veeruraj et al. (2014), utilizando o mesmo modelo biológico, observaram DL50 de 625000 µg/ml e 852000 mg/ml, respectivamente, com o veneno das espécies de anêmonas do mar *Stichodactyla mertensii* e *S. haddoni*. Nos estudos com a peçonha da espécie de cobra *Enhydrina schistosa* (Damotharan et al., 2015) e do veneno do peixe, *Arius maculatus* (Abirami et al., 2014), o DL50 em *A. salina* foi de aproximadamente 2,5 µg/mL. A alta toxicidade da peçonha *E. brunneum* pode ser atribuída ao seu comportamento de caça solitária, além do reduzido número de indivíduos direcionados para atividade de forrageio, tornando essencial a eficiência letal da peçonha da espécie para captura de presas.

Apesar dos resultados de atividade tóxica de produtos naturais serem fator importantes a serem considerado em um produto natural, estes também podem expor valiosos indícios de potencial terapêutico. Meyer et al. (1982) propõem que o grau de toxicidade apresentado sobre larvas de *A. salina*, é considerado ativo ou detentores de substâncias bioativas quando apresentados DL50 < 1000 µg/mL, correlacionando esta toxicidade com atividade antifúngica, viruscida, antibacteriana (MacRae et al., 1988) parasiticida (Sahpaz et al., 1994) e tripanossomicida (Zani et al., 1995).

Pluzhnikov et al. (2014) descreveram o potencial antibacteriano da peçonha de *E. brunneum*, confirmando a relação descrita por Meyer et al. (1982). No entanto, a peçonha desta espécie ainda é pouco explorada e tanto esta quanto outras correlações apontadas quanto à toxicidade sobre *A. salina*, parecem ser comuns à peçonha de formigas (Orivel et al., 2001; Lima et al., 2016; Téné et al., 2016; Dekan et al., 2017). Orivel et al. (2001) e mais recentemente Baracchi e Tragust (2017), justificaram a função antimicrobiana, antiviral e antiparasitária da peçonha de formigas predadoras, como a *E. brunneum*, como parte da imunidade inata destes animais, desenvolvida pela necessidade de minimizar o potencial de

infecção por bactérias, fungos e vírus, uma vez que estes transportam as suas presas, logo após a imobilização, para seus ninhos, aumentando o risco de infecção por microrganismos. Especificamente nos insetos eussociais, a homogeneidade genética dos indivíduos criam circunstâncias ideais para a disseminação de doenças infecciosas na colônia. Neste aspecto, estas características da peçonha de predadores, sobretudo dos animais peçonhentos sociais, tornam esse material glandular um importante objeto de estudo para pesquisa de novos agentes terapêuticos.

O bioensaio com *A. salina* também pode ser utilizado sistematicamente na avaliação prévia de extratos de potencial antitumoral (Meyer et al., 1982, Hamburger e Hostettmann, 1991; McLaughlin et al., 1993; Colman-Saizarbitoria et al., 1995). Neste contexto, a ação antitumoral da peçonha da família Formicidae não é incomum e já foi descrita em estudos com a peçonha de espécies de formigas como em *Solenopsis invicta* (Arbiser et al., 2007), *P. sennaarensis* (Badr et al., 2012) e *T. rufonigra* (Bosque et al. 2014).

Portanto, as correlações de atividades biológicas apresentadas com o teste com *A. salina* fomentam o interesse em mais estudos do potencial terapêutico de compostos da peçonha de *E. brunneum*. Além disso, o bioensaio com *A. salina* destaca-se por sua simplicidade, o que favorece sua utilização rotineira que se caracteriza por ser de baixo custo, rápido, não exigir técnicas assépticas rigorosas, visualização a olho nu e uso de pouca amostra para teste (Hamburger e Hostettmann, 1991).

Conclusões

A peçonha de *E. brunneum* não apresentou ação mutagênica ou genotóxica em concentrações iguais ou menores a 500 µg/mL para Ames e *A. cepa*, mas foi observada atividade citotóxica em ambos os testes, sendo que o modelo vegetal apresentou menor sensibilidade a peçonha, indicando ação apenas em concentrações acima de 500 µg/mL, enquanto a linhagem TA100 da bactéria *S. enterica* apresentou atividade citotóxica a partir de 1,5 µg/mL. Também foi positivo o teste de toxicidade sobre *A. salina* que apresentou DL50 de 19,51 µg/mL. Todos os testes se mostraram eficientes quanto a avaliação da mutagenicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade do material glandular testado, mesmo em pequenas concentrações, destacando o uso destes modelos biológicos para os estudos de instabilidade genética e toxicidade da peçonha de formigas. Ademais, considerando que a peçonha da espécie não apresenta potencial genotóxico e mutagênico em concentrações reduzidas e, a correlação entre toxicidade positiva e atividades biológicas de

interesse terapêutico, além dos resultados promissores já apresentados na literatura, o estudo ressalta a peçonha da espécie como uma potencial fonte de agentes modelo para produção de novas drogas.

Referencial bibliográfico

Abirami P, Arumugam M, Giji S, Nagarajan S. Bio-prospecting of catfish sting venom *Arius maculatus* available along south east coast of India. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014; 6: 110-115.

Aili SR, Touchard A, Koh JMS, Dejean A, Orivel J. Comparisons of Protein and Peptide Complexity in Poneroid and Formicoid Ant Venoms. *J Proteome Res*. 2016; 15: 3039-54.

Aili SR, Touchard A, Petitclerc F, Dejean A, Orivel J, Padula MP, Escoubas P, Nicholson, GM. Combined peptidomic and proteomic analysis of electrically stimulated and manually dissected venom from the South American bullet ant *Paraponera clavata*. *J Proteome Res*. 2017; 16: 1339-51.

AntWeb. <https://www.antweb.org/> (2017). Accessed 5 June 2017.

Arbiser JL, Kau T, Konar M, Narra K, Ramchandran R, Summers SA, Vlahos CJ, Ye K, Perry BN, Matter W, Fischl A, Cook J, Silver PA, Bain J, Cohen P, Whitmire D, Furness S, Govindarajan B, Bowen JP. Solenopsin, the alkaloidal component of the fire ant (*Solenopsis invicta*), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis. *Blood*. 2007; 109: 560-5.

Badr G, Garraud O, Daghestani M, Al-Khalifa MS, Richard Y. Human breast carcinoma cells are induced to apoptosis by samsum ant venom through an IGF-1-dependant pathway, PI3K/AKT and ERK signaling. *Cell Immunol*. 2012; 273: 10-6.

Baracchi D, Tragust S. Venom as a Component of External Immune Defense in Hymenoptera. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*. 2017; 213-33.

Bernstein RL, Born GH, Whritner RH. SEASAT altimeter determination of ocean current variability. *J Geophys Res*. 1982; 87: 3261-8.

Bosque I, Gonzalez-Gomez JC, Loza MI, Brea J. Natural tetraponerines: a general synthesis and antiproliferative activity. *J Org Chem*. 2014; 79: 3982–91.

Cabrera GL, Rodriguez DMG. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant biossays. *Mutat Res- Fund Mol M*. 1999; 426: 211-4.

Çelik TA, Aslantürk ÖS. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. *Biologia* 2007; 62: 292-6.

Colman-Saizarbitoria T, Gu Z-M, Zhao G-X, Zeng L, Kozlowski JF, McLaughlin JL. Venezenin: a new bioactive *Annonaceous acetogenin* from the bark of *Xylopia aromatica*. *J Nat Prod*. 1995; 58, 532-9.

Damotharan P, Veeruraj A, Arumugam M, Balasubramanian T. Isolation and Characterization of Biologically Active Venom Protein from Sea Snake *Enhydrina schistosa*. *J Biochem Mol Toxicol*. 2015; 29: 140-147.

Dekan Z, Heady SJ, Scanlon M, Baldo BA, Lee TH, Aguilar MI, Deuis JR, Vetter I, Elliot AG, Amado M, Cooper MA, Alewood D, Alewood PF. Δ -Myrtoxin-Mp1a is a helical

heterodimer from the venom of the Jack Jumper ant with antimicrobial, membrane disrupting and nociceptive activities. *Angew Chem.* 2017; 129: 8615-9.

FDA - Food and Drug Administration. International Conference on Harmonisation; guidance on S2 (R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice. *Fed regist.* 2012; 77: 33748.

Fox EGP, Pianaro A, Solis DR, Delabie JHC, Vairo BC, Machado EA, Bueno OC, 2012. Intraspecific and intracolony variation in the profile of venom alkaloids and cuticular hydrocarbons of the fire ant *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche.* 2012; 1-10.

Grant WF. Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mutat Res-Rev Genet.* 1982; 99: 273-91.

Grant WF. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations: a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat Res-Fund Mol M.* 1999; 426: 107-12.

Guo Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharm Sin B.* 2016; 7: 119-36.

Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry,* 1991; 30: 3864-74

Harvey AL. Toxins and drug discovery. *Toxicon.* 2014; 92: 193-200.

Kado NY, Langley D, Eisenstadt E. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res. Lett.* 1983; 121: 25-32.

King GF. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11: 1469-84.

Kummrow F, Magalhães D, Franco A, Umbuzeiro GA. Blue rayon e teste *Salmonella*/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras. *Rev Saúde Pública.* 2006; 40: 890-897.

Lacerda AM, Modolo AK, Matias RC, Pistori H, Yano M, Roel AR, Porto KRA. Screening de plantas com potencial fitotóxico. *Rev Bras Farm.* 2011; 92: 352-5.

Li S, Jin X, Chen J. Effects of piperidine and piperidine alkaloids from the venom of red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren, on *Pythium ultimum* Trow growth in vitro and the application of piperidine alkaloids to control cucumber damping-off in the greenhouse. *Pest Manag. Sci.* 2012; 68: 1546-52.

Lima DB, Sousa PL, Torres AFC, da França Rodrigues KA, Mello CP, Tessarolo LD, Quinet YP, Oliveira MR, Martins AMC. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadricaps* giant ant venom. *Toxicon.* 2016; 120: 128-32.

Lopes KS, Rios ER, De Carvalho Lima CN, Linhares MI, Costa Torres AB, Havt A, Quinet IP, Fonteles MMF, Martins AMC. The effects of the Brazilian Ant *Dinoponera quadricaps* venom on chemically induced seizure models. *Neurochem Int.* 2013; 63: 141-5.

McLaughlin JL, Chang C-J, Smith DL. Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumor compounds: review of recent progress. In: Kinghorn AD, Balandrin MF, editors. *Human Medicinal Agents from Plants.* Washington - USA: American Chemical Society; 1993. p. 112-37.

- MacRae WD, Hudson JB, Towers GHN. Studies on the pharmacological activity of amazonian Euphorbiaceae. *J Ethnopharmacol.* 1988; 22: 143-72.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res-Envir Muta.* 1983; 113: 173-215.
- Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet Mol Biol.* 2006; 29: 148-58.
- Mello JRBD, Maia JZ, Castro APD, Mello, FBD. Avaliação dos efeitos do *Pygeum africanum* rosaceae sobre a fertilidade de ratos. *Acta Sci Vet.* 2004; 32: 103-10.
- Meyer BN, Ferrigini NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982; 45: 31-4.
- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2000; 455: 29-60.
- Nôga DAMF, Brandão LEM, Cagni FC, Silva D, de Azevedo DLO, Araújo A, Santos WF, Miranda A, Silva RH, Ribeiro AM. Anticonvulsant Effects of Fractions Isolated from *Dinoponera quadriceps* (Kempt) Ant Venom (Formicidae: Ponerinae). *Toxins.* 2016; 9: 5.
- Orivel J, Redeker V, Le Caer JP, Krier F, Revol-Junelles AM, Longeon A, Chaffotte A, Dejean A, Rossier JP. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem.* 2001; 276: 17823-9.
- Pan J, Hink WF. Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon.* 2000; 38: 1403-13.
- Pluzhnikov KA, Kozlov SA, Vassilevski AA, Vorontsova OV, Feofanov AV, Grishin EV. Linear antimicrobial peptides from *Ectatomma quadridens* ant venom. *Biochimie.* 2014; 107: 211-5.
- Sahpaz S, Boris C, Loieau PM, Cortes D, Hacquemiller R, Laurens A, Cavé A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Med.* 1994; 60: 538-40.
- Simões CMO, Schenkel EP, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento.* Porto Alegre – Brazil: Artmed Editora; 2016.
- Téné N, Bonnafé E, Berger F, Rifflet A, Guilhaudis L, Ségalas-Milazzo I, Pipyc B, Agnès Costec A, Leprince J, Treilhou M. Biochemical and biophysical combined study of bicarinalin, an ant venom antimicrobial peptide. *Peptides.* 2016; 79: 103-13.
- Touchard A, Aili SR, Fox EGP, Escoubas P, Orivel J, Nicholson GM, Dejean A. The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms. *Toxins.* 2016; 30: 1-28.
- Touchard A, Koh JMS, Aili SR, Dejean A, Nicholson GM, Orivel J, Escoubas P. The complexity and structural diversity of ant venom peptidomes is revealed by mass spectrometry profiling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2015; 29: 385-396.
- Valente-Campos S, Dias CL, Barbour EDA, de Souza Nascimento E, de Aragão Umbuzeiro G. The introduction of the *Salmonella*/microsome mutagenicity assay in a groundwater monitoring program. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2009; 675: 17-22.

Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. Food Chem Toxicol. 2004; 42: 2029-35.

Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, Balasubramanian T. Isolation And Biological Properties Of Neurotoxin From Sea Anemone (*Stichodactyla mertensii*, *S. haddoni*). J. Toxicol. 2014; 5: 1-5.

Zani CL, Chaves PPG, Queiroz R, De Oliveira AB, Cardoso JE, Anjos AMG, Grandi TSM. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti- *Trypanosoma cruzi* activity. Phytomedicine. 1995; 2: 47-50.

Zeiger E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests? Mutat Res-Gen Tox En. 2001; 492: 9-38.

3. CAPÍTULO - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA PEÇONHA DE *Ectatomma brunneum* SMITH (1858) (FORMICIDAE: ECTATOMMINAE)

Composição química e atividade antimicrobiana da peçonha de *Ectatomma brunneum* SMITH (1858) (Formicidae: Ectatomminae)

Chemical composition and antimicrobial activity of the *Ectatomma brunneum* venom SMITH (1858) (Formicidae: Ectatomminae)

Destaques.

- Presença de um grande número de alergênicos.
- Presença de agentes com potencial atuação terapêutica.
- Presença de aminoácidos na forma livre.
- Ação antimicrobiana de amplo espectro.

Resumo.

A peçonha das formigas apresenta uma diversidade de atividades biológicas de potencial terapêutico, no entanto, o conhecimento da sua composição ainda é escasso, inviabilizando o entendimento da ação, alergenicidade e propriedades farmacológicas. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar aminoácidos e proteínas presentes na peçonha da formiga *Ectatomma brunneum* e testar sua atividade antimicrobiana. Os aminoácidos foram identificados utilizando a técnica de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodo e, a identificação ocorreu a partir de padrões. Para identificação das proteínas foi utilizada a técnica de fracionamento por eletroforese bidimensional em gel (2D), associada a espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF e banco de dados proteicos. A atividade antimicrobiana da peçonha foi testada a partir do estudo da concentração mínima inibitória e concentração mínima microbiocida, contra bactérias e fungos. Identificamos na peçonha a presença de aminoácidos na forma livres, sendo a alanina o de maior concentração. Nossos resultados também indicaram a presença de 104 *spots* no gel 2D, sendo que 21 deles foram identificados e classificados, de acordo com a função, em proteínas da peçonha, proteínas não tóxicas de proteção do reservatório e manutenção celular e, proteínas com função desconhecida. Entre as proteínas identificadas, destacamos a presença das alergênicas. Os dados de atividade antimicrobiana destacam a ação antimicrobiana de amplo espectro da peçonha da espécie, apresentando ação sobre a maioria das cepas testadas. Os resultados deste

estudo acrescentam o conhecimento dos constituintes da peçonha de *E. brunneum*, auxiliando no processo de entendimento da ação, alergenicidade e propriedades antimicrobianas da peçonha da espécie. Além disso, os resultados antimicrobianos enfatizam o potencial para o investimento em estudos biomonitorados para o isolamento dos constituintes de interesse, visto a ação de amplo espectro da peçonha desta espécie sobre bactérias e fungos.

Palavras-chave.

Alérgeno; Hymenoptera; Imunidade inata; Produto Natural; Proteômica.

Abstract

The venom of the ants presents a diversity of biological activities of therapeutic potential, however, the knowledge of its composition is still scarce, making it impossible to understand the action, allergenicity and pharmacological properties. Thus, the objective of this study was to identify amino acids and proteins present in the ant venom of *Ectatomma brunneum* and to test the antimicrobial activity of the venom of this species. Amino acids were identified using the liquid chromatography technique with diode arrangement detector, and the identification occurred from patterns. For the identification of the proteins, it was used the fractionation by two-dimensional electrophoresis technique in gel (2D), associated with MALDI-TOF / TOF type mass spectrometry and protein database. The antimicrobial activity of the venom was tested from the study of minimum inhibitory potential and minimum microbiocidal potential, against bacteria and fungi. Our results indicated the presence of amino acids in free form, alanine was the one with highest concentration. We also identified in the venom the presence of 104 spots in 2D gel, 21 were identified and classified, according to the function, in venom proteins, non-toxic proteins of reservoir protection and cellular maintenance, and proteins with unknown function. Among the proteins identified, we highlight the presence of allergens ones. The antimicrobial activity data highlight the broad spectrum antimicrobial action of the venom of the species, acting on most of the tested strains. The results of this study add knowledge of the constituents of *E. brunneum* venom, contributing in the process of understanding the action, allergenicity and antimicrobial properties of the venom of the species. In addition, the antimicrobial results emphasize the potential for investment in biomonitoring studies for the isolation of constituents of interest, given the broad spectrum action of *E. brunneum* venom on bacteria and fungi.

Key-Words.

Allergen; Hymenoptera; Innate immunity; Natural Product; Proteomics.

1. Introdução

As formigas (Hymenoptera, Formicidae) representam um grupo diverso de artrópodes (Rifflet et al., 2012), com o sucesso refletido pela representação de 15-20% da biomassa animal nas florestas tropicais (Wilson, 1990). Estes animais são considerados os principais predadores invertebrados, com algumas espécies possuindo adaptações evolutivas para este fim, a partir de modificações do aparelho ovopositor ancestral em ferrão e glândula para

produção de peçonha (Fitzgerald e Flood, 2006; Cerdá e Dejean, 2011; Touchard et al., 2016). No entanto, essa secreção glandular também é usada para defesa contra predadores, comunicação social ou mesmo, proteção contra patógenos (Orivel et al., 2001; Aili et al., 2014; Touchard et al., 2016; Baracchi e Tragust, 2017).

A peçonha das formigas é uma complexa mistura de hidrocarbonetos, sais, açúcares, aminas, alcaloides, ácidos, aminoácidos livres, peptídeos e proteínas (Santos et al., 2011; Fox et al., 2012; Aili et al., 2014, 2016; Touchard et al., 2016), resultado de um processo evolutivo de milhões de anos, o qual permitiu o desenvolvimento e incorporação de uma grande quantidade de diferentes conjuntos de compostos (Casewell et al., 2013). Apesar dos padrões encontrados dentro da peçonha de uma espécie, a composição pode variar intraespecificamente em resposta a variações ambientais (Touchard et al., 2015a; Bernardi et al., 2017), à idade do indivíduo (Haight e Tschinke, 2003) e, em Hymenoptera social, de acordo com a casta a qual pertence (Touchard et al., 2015a).

Há algumas décadas a peçonha da ordem Hymenoptera, em destaque as formigas, está sob intensa investigação como potencial fonte de compostos terapêuticos. Entre as inúmeras atividades de interesse farmacológico atribuídas a peçonha da família Formicidae, destacamos a ação antimicrobiana, já descrita na espécie de formiga *Solenopsis invicta* (Jouvenaz et al., 1972; Li et al., 2012), *Pachycondyla goeldii* (Orivel et al., 2001), *Myrmecia pilosula* (Zelezetsky et al., 2005; Dekan et al., 2017); *Odontomachus bauri* (Silva et al., 2015), *Tetramorium bicarinatum* (Téné et al., 2016), *Dinoponera quadriceps* (Lima et al., 2016), entre outras espécies.

Apesar da importância do estudo com a peçonha de formigas, o conhecimento da sua composição ainda é limitado, inviabilizando o entendimento da ação, alergenicidade e propriedades farmacológicas deste material glandular (Touchard et al., 2016). Esta falta de dados ocorre principalmente devido à quantidade limitada de peçonha que pode ser obtida a partir de um único indivíduo (Lima e Brochetto-Braga, 2003; Pluzhnikov et al., 2014, Aili et al., 2014, 2017), além da natureza laboriosa de dissecções e extração deste material glandular (Fox et al., 2015). Nas últimas décadas o desenvolvimento de técnicas sofisticadas de isolamento de compostos de interesse e os avanços em espectrometria de massas, se tornaram ferramentas essenciais para no progresso em pesquisas com a peçonha (Aili et al., 2014, 2017).

Assim, dada a ainda escassez de estudos sobre a peçonha de formigas e as novas técnicas disponíveis, o objetivo deste estudo foi identificar aminoácidos e proteínas presentes na peçonha da formiga *Ectatomma brunneum* (Smith), além de testar o potencial de inibição microbiano da peçonha bruta desta espécie.

A formiga foco deste estudo é uma predadora generalista da subfamília Ectatomminae (Bolton, 2003). Apesar da ampla distribuição geográfica da espécie (Brown-Junior, 1958), há poucos estudos que relatem sua biologia, especialmente com relação a sua peçonha (Pluzhnikov et al., 2014, Touchard et al., 2015b, Aili et al., 2016, Bernardi et al., 2017).

2. Materiais e Métodos

2.1. Área de coleta e preparo do material de estudo

Foram coletadas de forma aleatória, em Janeiro de 2015, no município de Dourados (estado do Mato Grosso do Sul, Brasil - 22°13'24.39"S; 54°54'44.53"W), operárias de *E. brunneum* em atividade de forrageamento. A região de coleta fica em uma área de transição entre mata atlântica e cerrado (Arruda e Daniel, 2007).

Em laboratório, as formigas foram crios anestesiadas e dissecadas em estereomicroscópio (estereomicroscópio S6D, Leica, Alemanha). Durante a dissecação, os reservatórios da peçonha foram alocados em eppendorfs contendo 50 µL de água ultrapura, permanecendo refrigerados durante todo o processo. Após a etapa de extração o material foi centrifugado (NT 805, Novatecnica, Brasil) a 12.000 rpm por 10 minutos, à 4 °C, para separação da membrana do reservatório, da peçonha. O sobrenadante foi então separado, filtrado em filtro 0,45 µm (Millipore, EUA) e congelado a -20 °C para posterior análise. Especificamente para o estudo de atividade antimicrobiana, a peçonha bruta foi liofilizada para o preparo das concentrações testadas (Alpha 1.2/LD-plus, Christ, Alemanha).

A concentração de proteínas totais presentes na peçonha foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

O estudo dos aminoácidos da peçonha de *E. brunneum*, assim como o estudo proteômico, foi realizado por meio de triplicata biológica, todas utilizando 100 indivíduos por repetição. Já o estudo da atividade de inibição microbiana ocorreu por triplicata metodológica, separando 3 alíquotas de uma única porção de peçonha.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, provenientes da Sigma-Aldrich (EUA), Bio-Rad (EUA), Dinâmica (Brasil), Labsynth (Brasil), Merk (Alemanha) ou Oxoid

(Brasil). Todos os tampões foram preparados usando água Milli-Q (ultrapurificador Master All 2000, Gehaka, Brasil).

2.2 Análise dos aminoácidos livres da peçonha

A análise dos aminoácidos foi feita pelo método descrito por Megías et al. (2015), com adaptações. Foram utilizados para as análises 200 µL da amostra de peçonha, 3 mL de tampão borato (pH 9,0), 24 µL de DL-2- Ácido aminobutírico (0,424 g/L) e 2 µL de Dietil etoximetil-enemalonato (DEEM). A solução foi agitada por 50 minutos e posteriormente filtrada em membrana de nylon 0,20 µm (Chromafil Xtra, Alemanha).

As análises foram realizadas empregando-se um cromatógrafo líquido (CL-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com Detector de Arranjo de Diodos (DAD) em uma coluna C18 ODS Hypersil (4,6/ 150 - Thermo Electron Corporation, EUA). Foi utilizado como fase móvel A uma solução de 25 mM de ácido acético e 0,02% (v/v) de azida de sódio em água (pH 6,0) e, como fase móvel B, 100% (v/v) de ACN. As fases foram previamente filtradas em membranas de nylon 0,20 µm e a coluna foi mantida a temperatura constante de 18 °C. O volume de injeção foi de 20 µL em um fluxo de 0,9 mL/minuto e, o gradiente aplicado foi: 4% a 12% de B em 3 minutos, 12% de B por 10 minutos, 12% a 31% de B em 17 minutos, 31% de B por 5 minutos.

A identificação foi realizada comparando-se os tempos de retenção e espectros dos padrões de aminoácidos (Alanina, Arginina, Cisteína, Isoleucina, Metionina, Prolina, Serina, Treonina, Triptofano e Valina) na região de 200 á 800 nm, com os picos obtidos nas amostras reais. Para análise quantitativa foi empregado o método de padrão externo para os dez aminoácidos avaliados, sendo que os valores obtidos de R^2 foram \geq que 0,9992.

2.3. Proteômica da peçonha

2.3.1 Eletroforese bidimensional em gel

As amostras da peçonha (100 µg de proteína) foram aplicadas por reidratação a fitas com gradiente de pH imobilizado (*Immobilized pH gradiente* - IPG, GE Healthcare - EUA) de 7 cm e pH 3-10 linear, por 10 horas, em solução de reidratação conforme especificações do fabricante (GE Healthcare - EUA) .

A focalização isoeétrica foi realizada em equipamento IPGphor Ettan III (GE Healthcare - EUA) com modo linear de voltagem (300 V por 12 horas, 1000 V por 30 minutos, 5000 V por 2 horas, 5000 V por 1 hora e, 200 V por 1 hora). As fitas de IPG foram

anteriormente incubadas em soluções de equilíbrio, primeiro em solução contendo 6 M ureia, 75 mM Hidroximetil Aminometano Cloridrato - Tris-HCl (pH 8.8), 29% (v/v) glicerol, 2% (w/v) Dodecil Sulfato de Sódio - SDS e 0.002% (v/v) azul de bromofenol, em seguida, foram mantidas por 15 minutos sob agitação em 1% (w/v) de Ditioneitol - DTT, e, na sequência em 2.5% (w/v) de iodoacetamida por mais 15 minutos.

A segunda dimensão (2D) foi realizada a partir de gel de poliacrilamida 14%, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970), SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), e instruções metodológicas do Mini-Protean Tetra Cell, em cuba vertical da Mini Protean II (Bio-Rad - EUA), sob corrente elétrica de 80 W por aproximadamente 100 minutos.

Os géis foram corados por 24 horas com Azul Brilhante de Coomassie G-250, conforme descrito por Görg et al. (2000) e armazenado a 21 °C em solução de conservação, 5% (v/v) de ácido acético.

2.3.2 Obtenção e análise das imagens

A digitalização do gel 2D foi realizada em equipamento Image Scanner III (GE-Healthcare, EUA) em modo de transparência 16 bit, nas cores vermelha-azul e 600 dpi (*dots per inch*) de resolução para documentação. As imagens foram analisadas utilizando o software Image Master 2D Platinum v.7 (GE Healthcare, EUA).

2.3.3 Digestão das amostras

O protocolo para digestão das amostras foi baseado em Shevchenko et al. (1996). Os *spots* obtidos a partir do gel bidimensional foram excisados e desidratados em solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 20mM bicarbonato de amônio (AMBIC) (pH 8,0). Após a desidratação os fragmentos dos géis foram incubados, sequencialmente, em solução de 65 mM de DTT por 30 minutos a 56 °C e em solução de 200 mM de iodoacetamida por 30 minutos (no escuro), á temperatura ambiente, seguido de lavagem em 100 mM de AMBIC (pH 8,0), e 100% (v/v) de ACN.

Os fragmentos dos géis foram tratados com solução de 10% (v/v) de ACN e 40 mM de AMBIC contendo enzima tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin®, Promega, EUA), em uma concentração de 25 ng/μL, e incubados a 37 °C por 16 horas. A extração dos compostos purificados nos fragmentos dos géis foi realizada pela adição de 5% (v/v) de ácido fórmico e 50% (v/v) de ACN. O extrato obtido foi concentrado a vácuo e solubilizado em 10

μL de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). As amostras foram dessalinizadas utilizando ponteiros ZipTip com resina C18 (Pipette Tips for Sample Preparation- Millipore, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, secas a vácuo e preparadas para espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight/time-of-flight*)

2.3.4 MALDI-TOF/TOF

O material obtido a partir da digestão em gel foi solubilizado em 10 μL de solução de 0.1% (v/v) de TFA e em seguida, misturados a matriz (2,5 mg/mL Matriz α -ciano-4-hidroxi-cinamico) preparada em 50% (v/v) de ACN e 0,1% (v/v) de TFA, na proporção de 1:1 (amostra: matriz). Alíquotas foram aplicadas em placa de aço MTP Anchor ChipTM 600/384 TF (Bruker Daltonics, EUA) e submetidos a espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF em aparelho Ultraflex III (Bruker Daltonics, EUA). Para a primeira fragmentação peptídica (MS), os espectros foram adquiridos em modo refletor (LPPepMix), com faixa de detecção de 500-5000 Da. Para segunda fragmentação (MS/MS) os espectros foram adquiridos em modo LIFT na faixa de massa de 40-1878 Da.

2.3.5 Identificação das proteínas

Os espectros de massas obtidos a partir do MALDI-TOF/TOF foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, EUA) e submetidos a dois software de pesquisa: MASCOT (Matrix Science Ltd, Reino Unido; Peptide Mass Fingerprint- PMF e MS/MS Ion Search) e Peaks DB 7.0 (Bioinformatic Solutions Inc., Canadá). As identificações do software MASCOT foram validadas pelo software Scaffold 4.0 (Proteome Software Inc., EUA). As identificações oriundas do Peaks 7.0 também foram validadas assumindo o FDR (*False Discovery Rate*) igual a 0.0%. Foram utilizadas as sequências proteicas e peptídicas depositadas no NCBI^{Inr} e no Swissprot, assumindo um erro de 0.5 Da. Reações de carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina foram utilizadas como modificações fixas e variáveis, respectivamente. Metazoa (Animais), Insecta, Formicidae, e “proteínas a partir de peçonha animal” (moluscos, serpentes, insetos, aracnídeos, anfíbios) foram selecionados como táxon para entrada nos bancos de dados.

As sequências sugeridas pelo programa PEAKS Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) e que apresentaram ALC (*Average Local Confidence*) igual ou superior a 70%, foram submetidos ao banco de pesquisa do MS Blast [<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>]. As sequências que mostraram alinhamentos

significativos com proteínas já descritas em formigas e peçonha animal foram consideradas como identificação positiva.

2.4 Atividade antimicrobiana da peçonha

A atividade antimicrobiana foi testada contra cepas de bactérias das espécies *Burkholderia cepacia* (NEWP 0059), *Escherichia coli* (ATCC 38731), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 15305), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Listeria monocytogenes* (ATCC 1011), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25232), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305) e fungos da espécie *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Saccharomyces cerevisiae* (Isolado pelo Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN), adquiridos a partir da *American Type Culture Collection* – ATCC, *North East White Pride* – NEWP.

Os microrganismos testados foram inoculados em caldo nutriente *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas a 37 °C por 24 horas para reativação das cepas. Os microrganismos foram semeados em placa contendo ágar Mueller Hinton e incubados novamente a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após o crescimento, o inóculo microbiano foi padronizado em salina 0,9% em uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, equivalente a 1 x 10⁸ UFC/mL (UFC – Unidade Formadora de Colônias), diluídos 1:10, um padrão de turvação utilizado para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos (Lennette et al., 1985).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada utilizando microplacas de 96 poços (orifícios), devidamente esterilizadas. Aos poços foram adicionados em volume padrão, 100 µL de caldo Mueller Hinton para bactéria e caldo Saboraud para fungo. Para cada microrganismo testado, 100 µL da peçonha foram adicionadas sob microdiluição seriada em caldo (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg/mL). Por fim, uma alíquota de 10 µL dos microrganismos padronizados em salina 0,9%, foi adicionado. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico tetraciclina (All Chemistry, Brasil - 4 mg/mL) para bactéria e cetoconazol (All Chemistry, Brasil – 4 mg/mL) para fungo e, como controle negativo água ultrapura, usada na diluição inicial da peçonha. Após a preparação e homogeneização dos poços, as microplacas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. Para um resultado eficaz, o extrato deve atingir um MIC <5 mg/mL. A MIC foi determinada por meio de leitura em espectrofotômetro de microplacas (TP Reader NM, Thermo Plate, USA) a 580 nm de absorbância.

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) uma alíquota de amostras dos poços, onde não ocorreu crescimento microbiano, foi retirada e inoculada placas de Petri contendo ágar Muller Hinton para o teste bactericida e ágar Sabouraud para o teste fungicida, mantidos à 37 °C por 24 horas. A CBM e CFM foram consideradas como a menor concentração na qual não houve crescimento dos microrganismos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise dos aminoácidos livres da peçonha

Foram identificados no total 5 aminoácidos livres (Figura 1, Tabela 1) na peçonha de *E. brunneum*, sendo que não houve variação qualitativa e pouca variação quantitativa entre as amostras avaliadas. Este resultado demonstra que a presença de aminoácidos na forma livre como constituintes da peçonha, parece ser uma característica comum, assim como já foi descrito em estudos da peçonha de outros animais (Hink et al., 1994; Kumar e Devi, 2014).

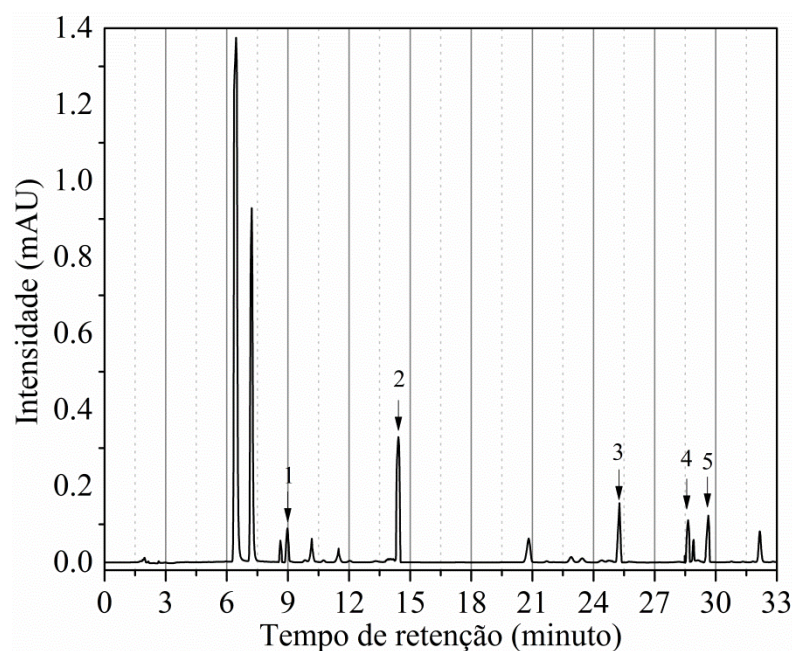


Figura 1. Cromatograma representativo de aminoácidos livres presentes na peçonha de *E. brunneum*. 1 - Serina, 2 - Alanina, 3 - Valina, 4 - Isoleucina, 5 - Triptofano.

O aminoácido livre de maior concentração foi a alanina, seguido de valina, triptofano, isoleucina e serina. Resultados similares foram encontrados na peçonha da *Vespa orientalis*, no qual encontraram 4 aminoácidos em comum aos encontrados na peçonha de *E. brunneum*, exceto triptofano, sendo a alanina, também, um dos aminoácidos de maior concentração na peçonha desta espécie (Ikan e Ishay, 1973). Kumar e Devi (2014) no estudo realizado com a

peçonha da abelha *Apis florea*, também destacaram a alanina como o aminoácido de maior concentração, identificando 5 aminoácidos na forma livre (lisina, glicina, alanina, prolina e triptofano), dois deles compartilhados com os resultados encontrados para *E. brunneum*.

Tabela 1. Concentração média de aminoácidos livres, por reservatório, presente na peçonha de *E. brunneum*.

	Tempo (minuto)	Aminoácido	Conteúdo médio / reservatório (ng)
1	8,83± 0,33	Serina	0,77 ± 0,06
2	14,69± 0,77	Alanina	6,55 ± 1,07
3	25,31± 0,38	Valina	1,26± 0,22
4	28,71± 0,25	Isoleucina	0,95± 0,06
5	29,10± 0,26	Triptofano	1,07± 0,08

Em outro estudo realizado com a peçonha da formiga *Pseudomyrmex triplarinus*, também foram identificados aminoácidos na forma livre. Em maior concentração foram o ácido aspártico, ácido glutâmico e prolina, juntos constituindo 72% da massa total dos aminoácidos livres da peçonha da espécie. Neste mesmo estudo, foram identificados 3 (serina, alanina e triptofano) dos 5 aminoácidos encontrados na peçonha de *E. brunneum* (Hink et al., 1994). Em estudos com outras espécies de animais peçonhentos também foram encontrados aminoácidos livres na peçonha (Russel, 1968; Ismail et al., 1974; Margaret e Phanel, 1988).

A função dos aminoácidos na peçonha, ainda é pouco explorada, mas estudos demonstraram a presença de aminoácidos neuroativos em vespas sociais, atuando como neurotransmissores inibitórios, entre eles a alanina (Curtis e Watkins, 1965; Abe et al., 1989). Segundo Abe et al. (1989), uma grande concentração destes aminoácidos transmissores podem provocar paralisia na presa, o que pode explicar a presença destes na peçonha.

Os aminoácidos geralmente geram inúmeros catabólitos, incluindo amônia, dióxido de carbono, ácidos graxos, glicose, ácido sulfídrico, corpos de cetona, óxido nítrico, ureia, ácido úrico, poliaminas e outras substâncias nitrogenadas com enorme importância biológica (Wu, 2009). Neste aspecto, os aminoácidos podem levar a formação de importantes aminas biogênicas, comuns à peçonha, usadas tanto para fins defensivos, quanto ofensivos (Weisel-Eichler e Libersat, 2004).

As aminas biogênicas podem atuar acentuando a dor, em reações edematosas da pele ou, no aumento da permeabilidade da peçonha, conseqüentemente, atuando como toxinas, juntamente com proteínas e peptídeos (Habermann, 1972; Edery et al., 1978; Weisel-Eichler e

Libersat, 2004). Entre as aminos biogênicas encontradas em Hymenoptera está, a histamina, serotonina, dopamina e epinefrina (adrenalina), respectivamente, metabólitos dos aminoácidos histidina, triptofano, e os dois últimos do aminoácido tirosina (Edery et al., 1978; Kandel et al., 2000; Weisel-Eichler e Libersat, 2004).

A serotonina, metabólito do aminoácido triptofano, detectado na peçonha desta espécie, é um importante causador de dor, no entanto, age potencializando o efeito algogênico de outros compostos presentes na peçonha, estimulando as terminações nociceptivas (Goodman et al., 1996; Rang et al., 2011). A serotonina, também é atribuída à função de facilitação da penetração da peçonha na célula, por aumento da permeabilidade celular (Habermann, 1972; Dotimas e Hider, 1987).

A presença de aminoácidos na forma livre é, portanto, uma característica comum a peçonha, com a função sendo atribuída a potencialização da ação ofensiva e defensiva desse material glandular.

3.2. Proteômica da peçonha

A partir da técnica de fracionamento 2D foi detectada a presença de 104 “spots” (Figura 2), com pontos isoelétricos que variaram no gel entre 4,70 a 9,43 e, massas moleculares entre 3 a 299 KDa. A geração dos 3 géis 2D, a partir de repetição biológica, apresentaram 92% de similaridade.

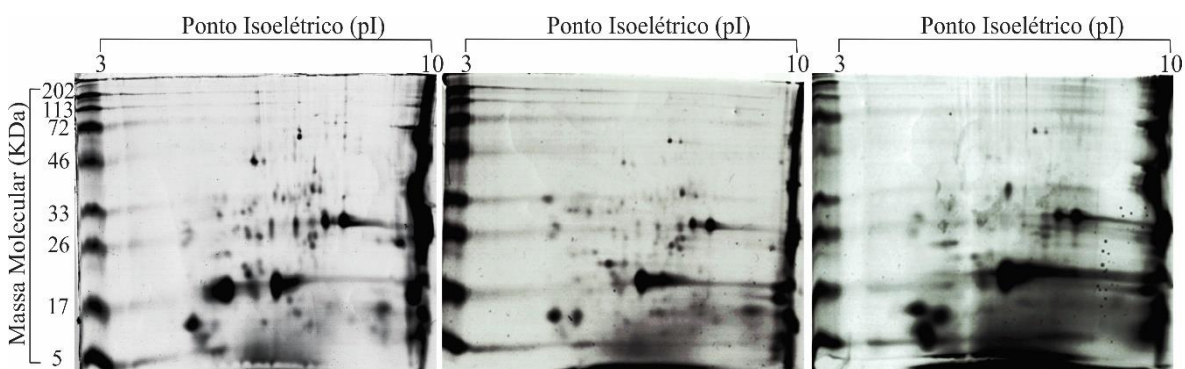


Figura 2. Gel bidimensional (14%) da peçonha da formiga *E. brunneum*.

Para identificação por espectrometria de massas, 91 spots mais expressos foram excisados e analisados. Vinte e um spots foram identificados positivamente dentro dos critérios estabelecidos neste estudo (Item 2.2.5), aproximadamente 20% dos spots detectados ou 23% dos spots excisados e analisados por MALDI-TOF-TOF (Tabela 2, Figura 3 gel representativo). Em volume relativo, as proteínas identificadas representam 69,63% de todas as proteínas do gel 2D. É importante evidenciar, no entanto, que os spots restantes não

apresentaram semelhança com quaisquer sequências conhecidas, o que realça a singularidade da peçonha de formiga e, também, o baixo número de sequências disponíveis em bases de dados. Esta dificuldade também foi encontrada por outros estudos com peçonha de himenópteros (Bouزيد et al., 2013; Sookrung et al., 2014; Torres et al., 2014; Aili et al., 2016).

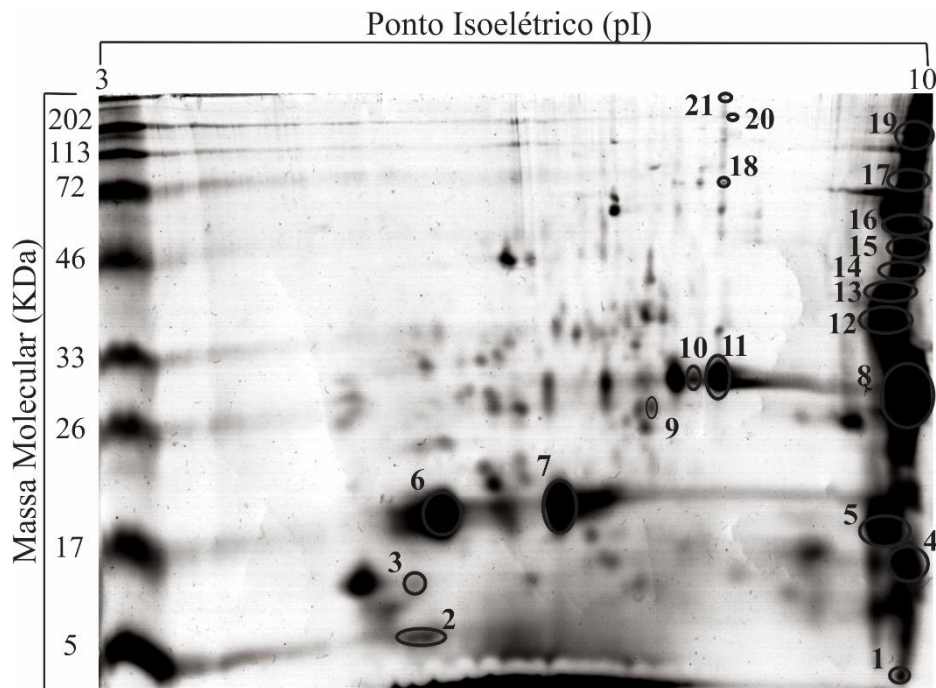


Figura 3. Gel bidimensional (14%) representativo da peçonha da formiga *E. brunneum* destacando as proteínas identificadas por MALDI-TOF-TOF.

Tabela 2. Proteínas identificadas na peçonha de *E. brunneum*, após fracionamento por gel 2D e análise por MALDI-TOF-TOF.

<i>Spot</i>	<i>pI</i>	<i>MM</i> (<i>kDa</i>)	<i>Proteína</i>	<i>Número de acesso</i>	<i>Sequência peptídica</i>	<i>Confiança dos resultados</i>	<i>Organismo</i>
1+¢	9,2	3	Enzima conjugadora modificadora da dobra de ubiquitina 1	J3SDM0_CROAD		62 mascot score	<i>Crotalus adamanteus</i> (serpente)
2+¢	5,2	5	Glipcan-6	V8P0M2_OPHHA		70 mascot score	<i>Ophiophagus Hannah</i> (serpente)
3+¢	5,1	10	Ribonucleoproteína A nuclear pequena U1	E1ZWA3_CAMFO		92 mascot score	<i>Camponotus floridanus</i> (formiga)
4*#£	9,3	12	Dipeptidil peptidase 4	E2AF09_CAMFO	VYYLATAPGEPTQR	94.58 (-10lgP) 2% cobertura	<i>C. floridanus</i> (formiga)
5*§ £	9,0	17	Alérgeno de veneno 3- like	XP_011871197	MVQSWYDEVAHFNR	ALC 70%	<i>Vollenhovia emeryi</i> (formiga)
6*~	5,4	18	Proteína de Centrômere J	V8PI61_OPHHA	VLKNGC(+57.02)HLIIFPNG TR	27.15 (-10lgP) 1 % coverage	<i>O. Hannah</i> (serpente)
7*£	6,4	19	Proteína Homeobox HB1	A0A026W958_CERBI	QLYNSVDNK	22.70 (-10lgP) 2% coverage	<i>Cerapachys biroi</i> (formiga)
8*§£	9,3	24	Alérgeno de veneno 3	XP_012222954	SWYDEVAHFNR	ALC 83%	<i>Linepithema humile</i>
*§£			Alérgeno de veneno 3- like	XP_012222954	RDSSWYDEVAHFNR	ALC 74%	<i>L. humile</i> (formiga)
9+¢	7,1	31	D-glucuronil C5-epimerase	A0A026WTR0_CERBI		84 mascot score	<i>C. biroi</i> (formiga)
10*§£	7,3	33	Alérgeno de veneno 3- like	XP_011704838	KWSDQGM(+15.99)NDAER	ALC 75%	<i>Wasmannia auropunctata</i> (formiga)
11*#	7,7	34	Proteína fosfatase CDC14A de	A0A091GAC7_9AVES	ASKVMAVNSSSAER	21.63	<i>Cuculus canorus</i>

			dupla especificidade			(-10lgP) 3% coverage	(ave)
12*§£	9,1	36	Alérgeno de veneno 3- like, parcial	XP_011705280	SWYDEVAHFNR	ALC 76%	<i>W. auropunctata</i>
*§£			Alérgeno de veneno 3- like, parcial	XP_011704844	HLLVC(+57.02)NYGPAGNF LGER	ALC 73%	<i>W. auropunctata</i> (formiga)
13*§£	9,1	39	Alérgeno de veneno 3- like	XP_014469499	SYLVC(+57.02)NYGPAGN M(+15.99)LGER	ALC 77%	<i>Dinoponera quadriceps</i> (formiga)
14*§£	9,2	42	Alérgeno de veneno 3- like	XP_011645540	HLLVC(+57.02)NYGPAGNF LGER	ALC 70%	<i>Pogonomyrmex barbatus</i> (formiga)
15*§£	9,2	45	Alérgeno de veneno 3- like	XP_011871198	SWYDEVAHM(+15.99)NR	ALC 74%	<i>Vollenhovia emeryi</i> (formiga)
16*£	9,2	54	Proteína UPF0550 C7orf28- like	E2A9V8_CAMFO	FNKLNLAYK	27.73 (-10lgP) 3 % coverage	<i>C. floridanus</i> (formiga)
17*§# £	9,3	72	Alérgeno de veneno 3	VA3_SOLIN	SYLVC(+57.02)NYGPAGNF LGER	ALC 71%	<i>Solenopsis invicta</i> (formiga)
18*£	7,7	82	Quinase tirosina-fosforilação- regulada de dupla especificidade	A0A026VWH5_CERBI	WGTAGGLNSGHQSLNSVS GGGGGGGGR	37.70 (-10lgP) 5% coverage	<i>C. biroi</i> (formiga)
19*#	9,3	117	Tensin	G7Y462_CLOSI	NGYPKNFLWR	47.93 (-10lgP) 9% coverage	<i>Clonorchis sinensis</i> (Platyhelminthes)
20*§£	7,8	162	Alérgeno de veneno 5	VA5_PACCH	NYGPAGNM(+15.99)LGER	ALC 78%	<i>Pachycondyla chinensis</i> (formiga)
21*£	7,7	299	Galactose-1-fosfato uridililtransferase	E9J1S0_SOLIN	MQDLSDSQQESLAVIM	21.90 (-10lgP) 3 % coverage	<i>S. invicta</i> (formiga)

+Identificado por Mascot Software; ¢Validado por Scaffold 4.0; *Identificado por Peak DB 7.0 software; §Identificado por sequência “de novo” e submetido ao banco de pesquisa MS BLAST; Táxon para entrada em banco de dados: #Metazoa, \$Insecta, £Formicidae, ~Peçonha animal.

Em geral, a maioria dos *spots* identificados foi atribuída a proteínas de espécies de formigas (Tabela 2), mas nenhum destes da formiga investigada, que apresenta, até então, 23 proteínas e peptídeos depositados em banco de dados (UniProt Database, 2017), três deles isolados da peçonha (Pluzhnikov et al., 2014). No entanto, deve-se levar em consideração as diferenças intraespecíficas entre diferentes populações. No estudo de Pluzhnikov et al. (2014), com a peçonha desta mesma espécie, as amostras foram extraídas de colônias nidificadas na Amazônia peruana, uma área com diferentes condições ecológicas, há mais de 2500 km da área de coleta deste estudo, dificultando o fluxo gênico entre estas populações. Segundo Tsai et al. (2004), a variação da composição da peçonha entre as populações pode ser explicada pela expressão diferencial de um conjunto de genes, em resposta à exposição a diferentes condições ecológicas e ontogenéticas.

A variação intraespecífica da peçonha de *E. brunneum* já foi discutido no estudo realizado por Bernardi et al. (2017), que destacou a variação do perfil químico da peçonha mesmo em indivíduos coletados na mesma região, atribuído estas diferenças as pequenas variações entre as áreas de coleta. Além disto, algumas espécies peçonhentas também apresentam heterogeneidade proteica conforme a época de extração da peçonha (Binford, 2001), outro fator que pode ser considerado aqui.

A variação proteica da peçonha, de acordo com a localização da coleta, também foi descrita no estudo realizado por Cologna et al. (2013) e Touchard et al. (2015a), respectivamente, com as espécies de formiga *Dinoponera quadriceps* e *Odontomachus haematodus*. Recentemente, no estudo realizado por Aili et al. (2017), investigando a peçonha da formiga *Paraponera clavata*, foi observado variação na composição da peçonha, mesmo entre colônias nidificadas na mesma região, e entre as hipóteses sugeridas, estão, polimorfismos genéticos ou pequenas variações ambientais entre a área de coleta, assim como observado por Bernardi et al. (2017). Portanto, ao que parece, a variação proteica da peçonha é algo comum a espécies peçonhentas.

Entre as 21 proteínas identificadas, 76,19% apresentaram homologia significativa com proteínas de formiga, 14,29% com proteínas de serpentes e, 9,52% com proteínas de espécies que não apresentam peçonha. No entanto para este último grupo, estas proteínas, em diferentes formas moleculares, foram detectadas em espécies de formiga e outras espécies peçonhentas (UniProt Database, 2017). Por exemplo, a proteína Tensin, foi identificada na espécie de formiga *Harpegnathos saltator* (código de acesso EAI_12409 - UniProt Database, 2017) e a proteína Proteína fosfatase CDC14A de dupla especificidade foi identificada na

espécie de formiga *Cerapachys biroi* (Código de acesso X777_04475 - UniProt Database, 2017).

As proteínas identificadas podem ser divididas, *a priori*, com base nas funções apresentadas no banco de dados UniProt database (2017), em cinco grupos: proteínas alergênicas (*spots* 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15,17 e 20); proteína com ação enzimática (*spots* 1, 4, 9, 11, 18 e 21); proteína estrutural (*spot* 6); proteína atuante no DNA e/ou RNA (*spots* 3 e 7); proteoglicana (referente ao *spot* 2) e; proteína com função desconhecida (referente ao *spot* 16 e 19). Entre esta classificação, o número de proteínas de maior detecção são as alergênicas e enzimáticas (Figura 4). Levando em consideração ao volume relativo dos 104 *spots* detectados no gel, a classe alergênica também apresenta maior volume entre as classes identificadas, seguido de proteína sem função conhecida, estrutural, atuante no DNA e/ou RNA, enzimática e, proteoglicana (Figura 5).

Um alérgeno é qualquer composto capaz de provocar uma reação alérgica, que pode, em casos mais extremos, culminar em choque anafilático (Touchard et al., 2016). As reações alérgicas, bem como a anafilaxia, são uma manifestação comum a peçonhas de espécies de Hymenoptera, resultando em reações mediadas por Imunoglobulina E (IgE) (Hoffman, 2006). Cerca de 20% da população humana desenvolve reação de hipersensibilidade do tipo 1 que resulta em uma série de sinais clínicos, como edema, fadiga, tonturas, náuseas, febre e inconsciência, bem como urticária, coceira, mal-estar, angioedema, constrição de peito, diarreia, dor abdominal, dispneia, sibilância, fraqueza, queda da pressão arterial, colapso, incontinência, cianose, doenças cardiovasculares e / ou sintomas gastrointestinais, podendo ocorrer choque anafilático sistêmico fatal (Nittner-Marszalska et al., 2004).

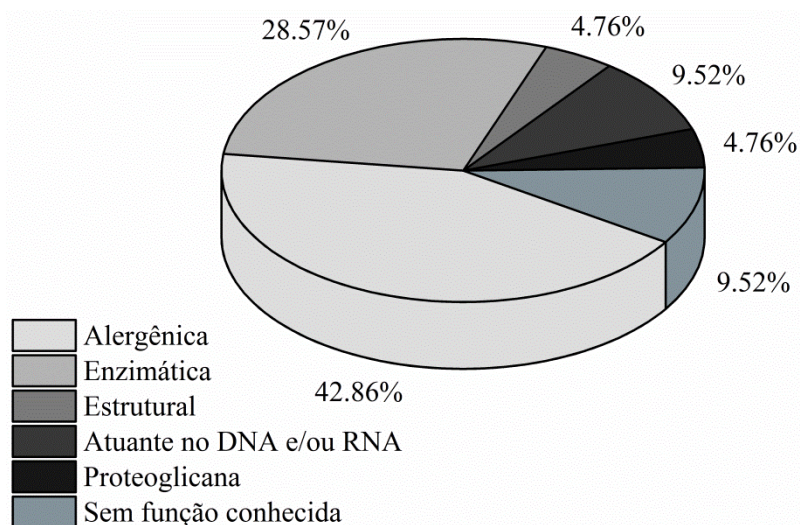


Figura 4. Classificação dos grupos de proteínas da peçonha da formiga *E. brunneum* relacionadas a função atribuída pelo UniProt database.

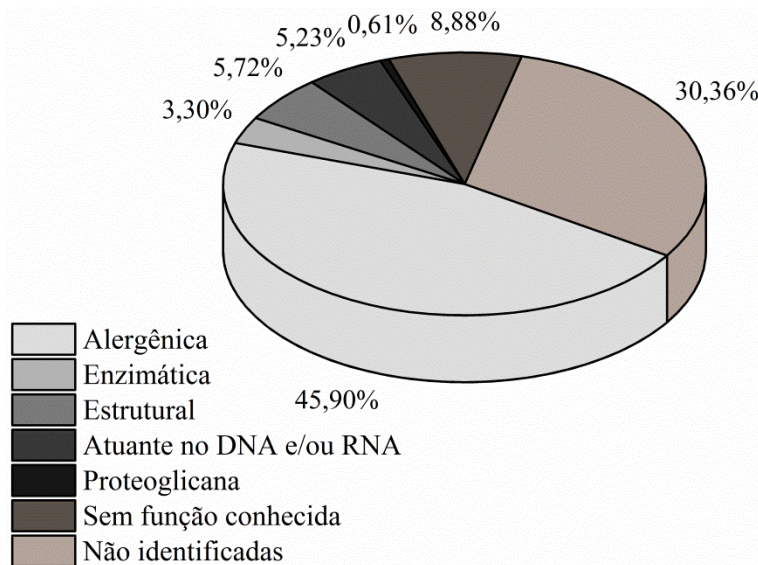


Figura 6. Volume relativo das classes de proteínas identificadas e proteínas gerais não identificadas na peçonha de *E. brunneum*.

A investigação da peçonha de *E. brunneum* revelou a presença das proteínas Alérgeno de veneno 3, em diferentes formas moleculares, e Alérgeno de veneno 5 (Tabela 2, spot 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15,17 e 20), que correspondem juntas, a aproximadamente 43% das proteínas identificadas na espécie ou 45,90% do volume relativo das proteínas detectadas no gel. A proteína Alérgeno de veneno 3, também conhecida como Sol i 3, descrito na formiga de fogo *S. invicta*, pertence à família de proteínas secretoras ricas em cisteína e representa a principal família de alérgenos de uma série de componentes identificados como a causa mais frequente de reações de hipersensibilidade após ferroadada desta espécie (Padavattan et al., 2008). Sugere-se que a sua presença pode acionar citocinas com potenciais efeitos sobre a resposta imune do hospedeiro (Anderson et al., 2006).

A segunda classe de maior representatividade em número de proteínas identificadas, as enzimas, apresentam alguns representantes com funções associadas à atividade citolítica (Nicholson, 2006). Em formigas, essa função na peçonha pode ser associada como uma importante ferramenta na pré-digestão, uma vez que as formigas adultas se alimentam de líquidos devido à incapacidade de digerir alimentos sólidos, como resultado de sua “cintura” estreita (Nicholson, 2006). A ação citolítica de enzimas presentes na peçonha auxilia na degradação das membranas celulares de presas e, portanto, liquefazendo-as, assim como ocorre na peçonha de aranha (Nicholson, 2006). Neste aspecto a presença da Galactose-1-fosfato uridililtransferase (GALT) (Tabela 2, spot 21), ainda não relatada em peçonha animal,

pode ter ação pré-digestiva. Esta enzima atua no processo metabólico da galactose (UniProt Database, 2017), um açúcar amplamente distribuído em plantas, animais e microrganismos, como constituinte de oligo e polissacarídeos (Ramachandran e Elumalai, 2012), o que pode explicar a presença de GALT na peçonha.

Entre as proteínas enzimáticas identificadas neste estudo, se destaca a multifuncional dipeptidilpeptidase 4 (DPP-4) (Tabela 2, *spot 4*), uma serino protease que tem presença comum na peçonha de cobras, escorpiões, aranhas, vespas e abelhas (Danneels et al., 2010). As serino proteases estão entre as proteínas responsáveis por processos inflamatórios provocados pela peçonha, além de estímulos de imunidade (Zychar et al., 2010; Danneels et al., 2010). A função de digestão e atividade antimicrobiana também já foi atribuída a enzimas desta família (Miyoshi et al., 2004; Danneels et al., 2010). Adicionalmente, as proteases são responsáveis pela necrose moderada em alguns tecidos após envenenamento, além de auxiliar na difusão da peçonha pelos tecidos da presa, no entanto, pouca informação está disponível sobre as proteases de peçonha em insetos, especialmente de formigas (Lima e Brochetto-Braga, 2003).

Como descrito entre as funções da DPP-4, esta a sua atuação na imunidade inata e, especificamente à descrição de proteínas desta família com atividades antimicrobiana, neste aspecto, é importante destacar que os animais são expostos a milhões de agentes patogênicos diariamente, por contato, ingestão e inalação e, a capacidade de evitar a infecção depende dos seus mecanismos de imunidade inata. Apesar do papel do sistema imunológico celular e humoral, o papel dos peptídeos e proteínas é evidenciado, sendo um dos mecanismos de defesa mais importante em insetos (Hancock e Scott 2000; Andersson et al., 2016; Mylonakis et al., 2016). Orivel et al. (2001) e, mais recentemente Baracchi e Tragust (2017), justificam a função antimicrobiana da peçonha de formigas eussociais predadoras pela necessidade de minimizar o potencial de infecção por bactérias, fungos e vírus, uma vez que transportam as suas presas, logo após a imobilização, para seus ninhos, aumentando o risco de infecção por microrganismos. Portanto, a presença de proteínas e peptídeos na peçonha, com atuação na imunidade inata, é uma característica comum e essencial na adaptação evolutiva destes animais.

A Enzima conjugadora modificadora da dobra de ubiquitina 1 (UFC1) (Tabela 2, *spot 1*), também conhecida como E1, apresenta entre as suas funções participação na degradação proteica, atuando como uma das enzimas do sistema ubiquitina, que tem função na degradação

seletiva de inúmeras proteínas de eucariotos (Hershko e Ciechanover, 1998) que, entre inúmeras atuações, também participa de processos de resposta imune (Hershko e Ciechanover, 1998; Yoo et al., 2015).

Apesar de a função ser pouco esclarecida, a proteína Tensin (Tabela 2, *spot* 19) colabora indiretamente na degradação de proteínas, uma vez que há evidências de sua atuação como substrato para proteases, agindo na interação entre meio extracelular, citoesqueleto e tradução de sinal (Lo et al., 2004). Adicionalmente, também foi atribuída a Tensin, atividade antifúngica (Nielsen et al., 2002), já destacada aqui, como um importante mecanismo de defesa destes animais.

As enzimas Quinase tirosina-fosforilação-regulada de dupla especificidade e Proteína fosfatase CDC14A de dupla especificidade (Tabela 2, *spot* 18 e 11), são proteínas constituintes das duas maiores famílias proteicas codificadas no genoma dos eucariotos (Zhang, 2001; Ceulemans et al., 2002), respectivamente, proteínas da família quinase e fosfatase. O processo de inserção e retirada de grupos fosfato em proteínas, receptores, transportadores e canais iônicos, função dessas duas famílias, altera substancialmente o funcionamento destes grupos e, relacionam-se com vários processos biológicos, entre eles a morte celular programada, processos alérgicos e imunidade inata (Zhang 2001; Ceulemans et al., 2002).

Proteínas da família quinase também foram identificadas na peçonha da espécie de vespa *Polybia paulista* (Santos et al., 2010) e da espécie de abelha *Apis mellifera carnica* (Peiren et al., 2008), desempenhando um suposto papel na fosforilação de proteínas, porém, não foi determinado se os alvos são as toxinas da peçonha, as proteínas das vítimas, ou mesmo, ambas. Santos et al. (2010) avaliou que as duas formas de arginina quinase presentes na peçonha de *P. paulista*, apresentaram potencial ação como alérgenos. Portanto, é possível que esta seja uma das ações da quinase na peçonha de *E. brunneum*. Adicionalmente, algumas proteínas da família quinase também podem atuar em processos inflamatórios (Myers et al., 1997).

A Proteína de Centrômero J (Tabela 2, *spot* 6), apesar de ser atribuída a função estrutural (UniProt Database, 2017), também é indicada como coativadora do complexo proteico *Nuclear Factor- κ B*, importante para vários eventos celulares, como inflamação, resposta imune, proliferação e apoptose (Koyanagi et al., 2005).

A proteoglicana Glipican-6 (Tabela 2, *spot* 2), apresenta interação seletiva com glicosaminoglicanas que contenham sulfato de heparano como unidade de carboidrato. Glicosaminoglicanas da família da heparina e sulfato de heparano são potentes bloqueadores da ação citolítica da peçonha (Lomonte et al., 1994). Além disto, a enzima D-glucuronil C5-epimerase (Tabela 2, *spot* 9), tem sua função atrelada a biossíntese de glicosaminoglicanas (UniProt Database, 2017). Portanto, estas proteínas de membrana celular, podem atuar na proteção dos tecidos da própria formiga, da ação de sua peçonha.

É importante salientar, que apesar dos cuidados tomados durante o processo de dissecação, parte da estrutura do reservatório, glândula covoluta, músculos e outras estruturas associadas ao ferrão, podem liberar seu conteúdo na peçonha. Em um estudo realizado com a espécie de vespa *P. paulista*, a proteína calponina foi identificada na peçonha e também foi atribuído a ela função na estrutura muscular do aparato ferroador (Santos *et al.*, 2010). Mais recentemente Aili et al. (2017) discutiram a técnica de extração da peçonha e a presença de proteínas de outras estruturas associadas, em seu estudo com a peçonha da espécie *P. clavata*.

Estudos transcriptômicos revelaram que a maioria das transcrições identificadas a partir do reservatório de peçonha são proteínas de organização celular, como proteínas ribossômicas (Bouziid et al., 2013; Torres et al., 2014), o que pode explicar a presença da proteína ribossômica Ribonucleoproteína A nuclear pequena U1 (Tabela 2, *spot* 3) e, da proteína Proteína Homeobox HB1 (Tabela 2, *spot* 7), que atua na regulação da transcrição do DNA (UniProt Database, 2017). Portanto, possivelmente, assim como as proteínas Glipican-6 e D-glucuronil C5-epimerase, estas não desenvolvem ação direta na peçonha de *E. brunneum*.

A atuação da proteína UPF0550 C7orf28-like (Tabela 2, *spot* 16), sem função conhecida (UniProt Database, 2017) ou sugerida, não pode ser esclarecida aqui.

Por fim, é possível classificar as proteínas identificadas baseado nas funções apontadas na literatura, como: proteínas da peçonha (1, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 e 21), proteínas não tóxicas de proteção do reservatório e manutenção celular (*spots* 2, 3, 7 e 9) e, proteínas com função desconhecida (*spots* 16). Seguindo o modelo de classificação indicado por Touchard et al., 2016, com modificações, as proteínas da peçonha podem ser divididas aqui em: proteínas alergênicas; proteínas de auxílio na pré-digestão; proteínas que promovem a difusão da peçonha, ou seja, envolvidas no processo de degradação proteica; proteínas que causam inflamação e; proteínas antimicrobianas (Figura 6).

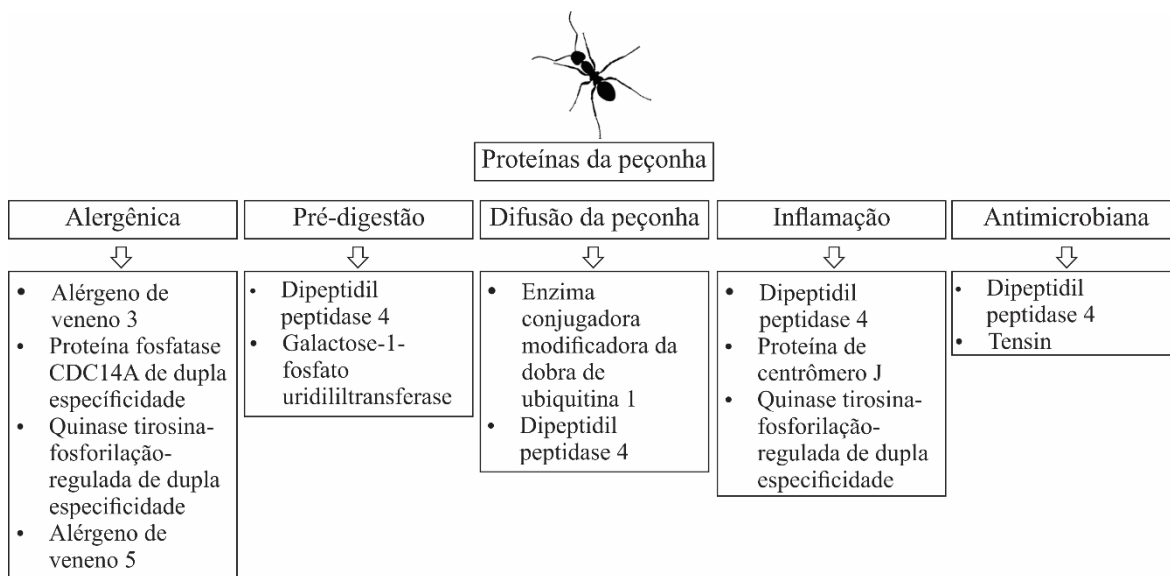


Figura 6. Funções proteicas atribuídas às proteínas da peçonha de *E. brunneum*.

Destacamos aqui, a quantidade de proteínas com função alergênica (*spot* 5, 8,10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18 e 20). Neste contexto, há relatos que aproximadamente 50% das proteínas da peçonha apresentem esta função (Bouزيد et al., 2013). Apesar de termos identificado 20% dos *spots* presentes na peçonha de *E. brunneum*, 52% destes apresentam função alergênica. As propriedades químicas exatas que levam à alergenicidade não são bem compreendidas e inúmeras famílias de proteínas podem funcionar como potentes alérgenos, diretamente ou ativando o sistema imunológico (Touchard et al., 2016).

3.3 Atividade antimicrobiana da peçonha

O estudo de atividade antimicrobiana apresentou atividade bacteriostática e fungistática para bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras testadas (Tabela 3), evidenciando ação de amplo espectro desta peçonha. Os resultados de CIM variaram entre 62,5 a 500 µg/mL e, os testes de CBM e CFM mostraram que a peçonha apresentou ação bactericida para *Klebsiella pneumoniae* e fungicida para *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, todos na concentração de 1000 µg/MI (Tabela 3).

A ação de amplo espectro da peçonha também foi observada no estudo de Zelezetsky et al. (2005) com a formiga *Myrmecia pilosula*, testando os peptídeos pilosulin 1 e 2. Cinco dos microrganismos testados são comuns ao nosso estudo (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, e *C. albicans*). Toxinas Ponericins, isoladas da peçonha da formiga *Pachycondyla goeldii*, também demonstraram atividade contra bactérias gram-positivas e negativas, além de fungos (Orivel et al., 2001). A bicarinina um peptídeo recentemente isolado da peçonha da formiga *Tetramorium bicarinatum*, foi ativa contra quinze

microrganismos (Téné et al., 2016), quatro deles compartilhados com nosso estudo (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da peçonha de *E. brunneum*.

Microrganismo	CIM (µg/mL)	CBM/CFM (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i> ⁺	250	-
<i>Listeria innocua</i> ⁺	62,5	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ⁺	62,5	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ⁺	125	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ⁺	250	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁺	125	-
<i>Burkholderia cepacia</i> ⁻	Ni	-
<i>Escherichia coli</i> ⁻	125	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ⁻	500	1000
<i>Candida albicans</i> ^f	500	1000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^f	250	1000

Ni não apresentou inibição para o microrganismo testado; + bactéria gram-positiva; - bactéria gram-negativa, *f* fungo.

É importante enfatizar, que a presença de proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana na peçonha é uma característica comum e, faz parte da imunidade inata destes animais.

Especificamente nos insetos eussociais, a homogeneidade genética dos indivíduos criam circunstâncias ideais para a disseminação de doenças infecciosas em seus ninhos. No entanto, segundo Stow et al. (2007) e Hoggard et al. (2011), a evolução da socialidade foi acompanhada pela evolução de compostos antimicrobianos no Hymenoptera. A peçonha faz parte de adaptações fisiológicas de insetos sociais para prevenir o estabelecimento e disseminação de parasitas e patógenos e, junto a adaptações organizacionais e comportamentais, é intitulada como imunidade social (Cremer et al., 2007). Portanto, a ampla atividade antimicrobiana da peçonha é uma importante especialidade para as formigas eussociais, auxiliando na imunidade da colônia (Turillazzi et al., 2006).

A ação antimicrobiana é descrita, principalmente, como atividade de PAMs catiônicos que se atraem eletrostaticamente por moléculas carregadas negativamente na membrana destes microrganismos, o que resulta em certa seletividade destes agentes, uma vez que células eucariontes apresentam o folheto externo constituído de lipídeos neutros ou

zwitterônicos (Brown e Hancock 2006; Mylonakis et al., 2016). Estabelecido o contato, os resíduos hidrofóbicos do PAM promovem a ancoragem à membrana microbiana, fazendo com que o folheto externo da membrana se expanda e se torne mais fino, criando poros ou mesmo causando lise (Mylonakis et al., 2016). No entanto, a ação antimicrobiana também já foi relatada para outros grupos de compostos, entre eles os alcaloides, que são comuns à peçonha (Jouvenaz et al., 1972; Li et al., 2012).

Pluzhnikov et al. (2014) testaram a peçonha bruta de *E. brunneum* contra as bactérias *Arthrobacter globiformis* VKM Ac-1112 e *E. coli* MH1, que apresentaram inibição de crescimento numa concentração de 7,5 µg/mL e 30 µg/mL, respectivamente. Deste estudo três peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Ponericin Q42, Ponericin Q49 e Ponericin Q50) da peçonha foram isolados e caracterizados. No entanto, apesar de se tratar da mesma espécie, não encontramos valores semelhantes MIC, como nos valores obtidos por Pluzhnikov et al. (2014) utilizando a peçonha bruta, mesmo quando os testes foram realizados com a mesma espécie de bactéria. Estas diferenças, de novo, podem ser creditadas as particularidades genéticas ou época de coleta de cada estudo. Hoggard et al. (2013) também descrevem variação de atividade antimicrobiana dos mecanismos de imunidade inata, sugerindo como hipótese o polimorfismo genético. Portanto, as diferenças de potencial antimicrobiano encontradas, podem ter ocorrido pela atuação de diferentes proteínas ou peptídeos, expressos conforme a natureza das necessidades e pressões ambientais enfrentadas por cada população.

4. Conclusão

Neste estudo foram identificados 5 aminoácidos livres, sendo a alanina o aminoácido de maior concentração. Os resultados destacaram a baixa variação quantitativa e a repetição de todos os aminoácidos em todas as repetições biológicas, evidenciando que a presença de aminoácidos na forma livre parece ser comum à peçonha. Também foram destacadas a presença de 104 *spots*, a partir do gel 2D, com 21 deles identificados a partir de espectrometria de massas e comparação por homologia em banco de dados. Os resultados apontam a presença de proteínas associadas à função alergênica, difusão da peçonha, pré-digestão, antimicrobiana, inflamação, proteínas não tóxicas de proteção do reservatório e manutenção celular e, proteínas com função desconhecida. Destacando a função alergênica para a maioria das proteínas identificadas. Os dados de atividade antimicrobiana evidenciaram a peçonha da espécie como um antimicrobiano de amplo espectro, apresentando ação sobre 10 das cepas testadas aqui.

Os resultados deste estudo acrescentam o conhecimento de parte dos constituintes da peçonha de *E. brunneum*, auxiliando no processo de entendimento da ação, alergenicidade e, atividade antimicrobiana, que é comum a estes insetos. Além disso, os resultados apontam a grande diversidade de moléculas que compõe a peçonha, mesmo dentro de uma única espécie e, a dificuldade de identificação, visto que os bancos para comparação dos resultados são limitados. O estudo também evidencia a carência de estudos mais aprofundados da função de proteínas presentes em peçonha animal. Adicionalmente, os resultados antimicrobianos enfatizam o potencial para o investimento em estudos biomonitorados, para o isolamento dos constituintes de interesse, visto a ação de amplo espectro da peçonha de *E. brunneum* sobre bactérias e fungos.

Referencial bibliográfico

- Abe, T., Hariya, Y., Kawai, N., Miwa, A., 1989. Comparative study of amino acid composition in an extract from hornet venom sacs: high content of neuroactive amino acids in *Vespa*. *Toxicon* 27, 683-688.
- Aili, S.R., Touchard, A., Escoubas, P., Padula, M.P., Orivel, J., Dejean, A., Nicholson, G.M., 2014. Diversity of peptide toxins from stinging ant venoms. *Toxicon* 92, 166-178.
- Aili, S.R., Touchard, A., Koh, J.M.S., Dejean, A., Orivel, J., 2016. Comparisons of Protein and Peptide Complexity in Poneroid and Formicoid Ant Venoms. *J. Proteome Res.* 15, 3039-3054.
- Aili, S.R., Touchard, A., Petitclerc, F., Dejean, A., Orivel, J., Padula, M.P., Escoubas, P., Nicholson, G.M., 2017. Combined peptidomic and proteomic analysis of electrically stimulated and manually dissected venom from the South American bullet ant *Paraponera clavata*. *J. Proteome Res.* 16, 1339-1351.
- Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B.J., Reynoso, D., Seitz, A.E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham, M., Valenzuela, J.G., 2006. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7, 52.
- Andersson, D.I., Hughes, D., Kubicek-Sutherland, J.Z., 2016. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist. Updat.* 26, 43-5.
- Arruda, L., Daniel, O. 2007. Florística e diversidade em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Aluvial em Dourados, MS.
- Baracchi, D., Tragust, S., 2017. Venom as a Component of External Immune Defense in Hymenoptera. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*, 213-233.
- Bernardi, R.C., Firmino, E.L.B., Mendonça, A., Sguarizi-Antonio, D., Pereira, M.C., da Cunha Andrade, L.H., Antonialli-Junior, W.F., Lima, S.M., 2017. Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum* Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. B* 175, 200-206.

- Binford, G.J. 2001. An analysis of geografic and intersexual chemical variation in venom of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). *Toxicon* 39, 955-968.
- Bolton, B., 2003. Synopsis and Classification of Formicidae. Memoirs of the American Entomological Institute, Gainesville, USA.
- Bouزيد, W., Klopp, C., Verdenaud, M., Ducancel, F., Vetillard, A., 2013. Profiling the venom gland transcriptome of *Tetramorium bicarinatum* (Hymenoptera: Formicidae): the first transcriptome analysis of an ant species. *Toxicon* 70, 70-81.
- Bradford, M.M., 1974. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown, K.L., Hancock, R.E., 2006 Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 24-30.
- Brown-Junior, W.L., 1958. Contributions toward a reclassification of the Formicidae, II, Tribe Ectatommini (Hymenoptera). *Bull. Mus. Comp. Zool.* 18,175-362.
- Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G., 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Cell Press* 28, 219-29.
- Cerdá, X., Dejean, A., 2011. Predation by ants on arthropods and other animals, in: Polidori, C. (Eds.), *Predation in the Hymenoptera: an Evolutionary Perspective*. Transworld Research Network, Kerala - India, pp. 39-78.
- Ceulemans, H., Stalmans, W., Bollen, M., 2002. Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *BioEssays* 24, 371-381.
- Cologna, C.T., Cardoso, J.D.S., Jourdan, E., Degueldre, M., Upert, G., Gilles, N., Uetanabaro, A.P.T., Costa Neto, E.M., Thonart, P., Pauw, E., 2013. Peptidomic comparison and characterization of the major componentes of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. *J. Proteomics* 94, 413-422.
- Cremer, S., Armitage, S.A., Schmid-Hempel, P., 2007. Social immunity. *Curr. Boil.* 17, R693-R702.
- Curtis, D.R., Watkins, J.C., 1965. The pharmacology of amino acids related to gamma-aminobutyric acid. *Pharmacol. Rev.* 1, 347-391.
- Danneels, E.L., Rivers, D.B., De Graaf, D.C., 2010. Venom proteins of the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*: recent discovery of an untapped pharmacopee. *Toxins* 2, 494-516.
- Dekan, Z., Heady, S.J., Scanlon, M., Baldo, B.A., Lee, T.H., Aguilar, M.I., Deus, J.R., Vetter, I., Elliot, A.G., Amado, M. Cooper, M.A., 2017. Δ -Myrtoxin-Mp1a is a helical heterodimer from the venom of the Jack Jumper ant with antimicrobial, membrane disrupting and nociceptive activities. *Angew. Chem.* 129, 8615-8610.
- Dkhil, M.A., Abdel-Baki, A.S., Al-Quraishi, S., Al-Khalifa, M., 2010. Anti-inflammatory activity of the venom from samsum ants *Pachycondyla sennaarensis*. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 4, 115-118.
- Dotimas, E.M., Hider, R.C., 1987. Honeybee venom. *Bee World* 68, 57-71.
- Ederly, H., Ishay, J., Gitter, S., Joshua, H., 1978. Venoms of vespidae, in: Bettini, S. (Ed.), *Arthropod venoms*. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 691-771.
- Fitzgerald, K.T., Flood, A., 2006. Hymenoptera stings. *Clin. Tech. Small An. P.*, 21, 194-204.

- Fox, E.G.P., Pianaro, A., Solis, D.R., Delabie, J.H.C., Vairo, B.C., Machado, E.A., Bueno, O.C., 2012. Intraspecific and intracolony variation in the profile of venom alkaloids and cuticular hydrocarbons of the fire ant *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche* 1-10.
- Fox, E.G.P., Solis, D.R., dos Santos, L.D., Pinto, J.R.A.S., Menegasso, A.R.S, Silva, R.C.M. C., Palma, M.S., Bueno, O.C., Machado, E.A., 2015. A simple, rapid method for the extraction of whole fire ant venom (Insecta: Formicidae: Solenopsis). *Toxicon* 65, 5-8.
- Goodman, L.S., 1996. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill, New York, USA.
- Görg, A., Obermaier, C., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
- Habermann, E., 1972. Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed. *Science* 177, 314-22.
- Haight, K.L., Tschinkel, W.R., 2003. Patterns of venom synthesis and use in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Toxicon* 42, 673-682.
- Hancock, R.E., Scott, M.G., 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8856-8861.
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
- Hink, W.F., Pappas, P.W., Jaworski, D.C., 1994. Partial characterization of the venom from the ant *Pseudomyrmex triplarina*. *Toxicon* 32, 763-372.
- Hoffman, D.R., 2006. Hymenoptera venom allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 30, 109-128
- Hoggard S.J., Wilson, P.D., Beattie, A.J., Stow, A.J., 2011. Social complexity and nesting habits are factors in the evolution of antimicrobial defences in wasps. *PLoS One* 6, e21763
- Hoggard, S.J., Wilson, P.D., Beattie, A.J., Stow, A.J., 2013. The effectiveness of antimicrobial defenses declines with increasing group size and genetic similarity. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106, 53-58.
- Ikan, R., Ishay, J., 1973. Free amino acids in the haemolymph and the venom of the oriental hornet, *Vespa orientalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 44, 949-952.
- Ismail, M., Osman, O.H., Gumaa, K.A., Karrar, M.A., 1974. Some pharmacological studies with scorpion (*Pandinus exitialis*) venom. *Toxicon* 12, 75-82.
- Jouvenaz, D.P., Blum, M.S., MacConnell, J.G., 1972. Antibacterial Activity of Venom Alkaloids from the Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta* Buren1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2, 291-293.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 2000. Principles of neural science, fourth ed. Elsevier, New York, USA.
- Koyanagi, M., Hijikata, M., Watashi, K., Masui, O., Shimotohno, K., 2005. Centrosomal P4. 1-associated protein is a new member of transcriptional coactivators for nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 280, 12430-12437.

- Kumar, N.R., Devi, A., 2014. Comparative biochemical studies on the macromolecular composition, free amino acids and enzymatic assay on the sting gland and reservoir of the european honey bee *Apis Mellifera* L. Int. J. Therap. Appl. 18, 30-35.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Lennette, E.H., 1985. Laboratory diagnosis of viral infections. Marcel Dekker, New York, USA.
- Li, S., Jin, X., Chen, J., 2012. Effects of piperidine and piperidine alkaloids from the venom of red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren, on *Pythium ultimum* Trow growth in vitro and the application of piperidine alkaloids to control cucumber damping-off in the greenhouse. Pest Manag. Sci. 68, 1546-1552.
- Lima, P.R., Brochetto-Braga, M.R., 2003. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 9, 149-162.
- Lima, D.B., Sousa, P.L., Torres, A.F.C., da França Rodrigues, K.A., Mello, C.P., Tessarolo, L.D., Quinet, Y.P., Oliveira, M.R. Martins, A.M.C., 2016. Antiparasitic effect of *Dinoponera quadriceps* giant ant venom. Toxicon 120, 128-132.
- Lo, S.H., 2004. Tensin. Int. J. Biochem. Cell Biol . 36, 31-34.
- Lomonte, B., Tarkowski, A., Bagge, U., Hanson, L.A., 1994. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. Biochem. Pharmacol. 47, 1509-1518.
- Margaret, G.R., Phanuel, G.J., 1988. Preliminary studies on the venom of three Indian spiders. Proc. Indian Acad. Sci. 97, 231-237.
- Megías, C., Cortés-Giraldo, I., Girón-Calle, J., Vioque, J., Alaiz, M., 2015. Determination of L-canavanine and other free amino acids in *Vicia disperma* (Fabaceae) seeds by precolumn derivatization using diethyl ethoxymethylenemalonate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. Talanta 131, 95-98.
- Myers, M.R., He, W., Hulme, C., 1997. Inhibitors of tyrosine kinases involved in inflammation and autoimmune disease. Curr. Pharm. Des. 3, 473-502.
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., Vilcinskas, A., 2016. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 371, 20150290.
- Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Kamio, T., Fujisaki, K., 2004. Enzymatic characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. J. Vet. Med. Sci. 66, 1195-1198.
- Nicholson, G.M., 2006. Spider venom peptides, in: Kastin, A. (Ed.), Handbook of biologically active peptides. Elsevier, San Diego, USA, pp. 461-472.
- Nielsen, T. H., Sørensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J.B., Christophersen, C., Givskov, M., Sørensen, J., 2002. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3416-3423.

- Nittner-Marszalska, M., Liebhart, J., Liebhart, E., Dor, A., Dobek, R., Obojski, A., Mađrala, W., 2004. Prevalence of Hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland. *Med. Sci. Monit.* 10, CR324-CR329
- Nôga, D.A.M.F., Brandão, L.E.M., Cagni, F.C., Silva, D., de Azevedo, D.L.O., Araújo, A., Santos, W.F., Miranda, A., Silva, R.H., Ribeiro, A.M., 2016. Anticonvulsant Effects of Fractions Isolated from *Dinoponera quadriceps* (Kempt) Ant Venom (Formicidae: Ponerinae). *Toxins* 9, 5.
- Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.P., Krier, F., Revol-Junelles, A.M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., Rossier, J.P., 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *J. Biol. Chem.* 276, 17823-17829.
- Padavattan, S., Schmidt M., Hoffman D.R., Marković-Housley Z., 2008. Crystal structure of the major allergen from fire ant venom, Sol i 3. *J. Mol. Biol.* 383, 178-185.
- Peiren, N., Graaf, D.C., Vanrobaeys, F., Danneels, B., Devreese, B., Beeumen, J.V., Jacobs, F.J., 2008. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon* 52, 72-83.
- Pluzhnikov, K.A., Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., Vorontsova, O.V., Feofanov, A.V., Grishin, E.V., 2014. Linear antimicrobial peptides from *Ectatomma quadridens* ant venom. *Biochimie* 107, 211-215.
- Ramachandran, M., Elumalai, E.K. 2012. Novel drug target identification on UDP-Glucose 4-epimerase enzyme in *Catharanthus roseus* by insilico model. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, S1047-S1051.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2011. *Farmacologia*. Elsevier, Rio de Janeiro, Brazil.
- Rifflet, A., Gavalda, S., Téné, N., Orivel, J., Leprince, J., Guilhaudis, L., Génin, E., Vétillard, A., Treilhou, M., 2012. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides* 38, 363-370.
- Russell, F.E., Alender, C.B., Buess, F.W., 1968. Venom of the scorpion *Vejovis spinigerus*. *Science* 159, 90-91.
- Santos, L.D., Santos, K.S., Pinto, J.R.A., Dias, N.B., Souza, B.M.D., Santos, M.F., Perales, J., Domont, G.B., Castro, F.M., Kalil, J.E., Palma, M.S., 2010. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *J. Proteome Res.* 9, 3867-3877.
- Santos, L.D., Menegasso, A.R.S., Pinto, J.R.S.P., Santos, K.S., Castro, F.M., Kalil, J.E., Palma, M.S., 2011. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Proteomics* 11, 1403-1412.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Silva, M.F., Mota, C.M., Miranda, V.D.S., Oliveira Cunha, A.D., Silva, M.C., Naves, K.S.C., Oliveira, F., Silva, D.A.O., Mineo, T.W.P., Santiago, F.M., 2015. Biological and enzymatic characterization of proteases from crude venom of the ant *Odontomachus bauri*. *Toxins* 7, 5114-5128.
- Sookrung, N., Wong-din-Dam, S., Tungtrongchitr, A., Reamtong, O., Indrawattana, N., Sakolvaree, Y., Visitsunthorn, N., Manuyakorn, W., Chaicumpa, W., 2014. Proteome and

- allergenome of Asian wasp, *Vespa affinis*, venom and IgE reactivity of the venom components. *J. Proteome Res.* 13, 1336-1344.
- Stow, A., Briscoe, D., Gillings, M., Holley, M., Smith, S., Leys, R., Silberbauer, T., Turnbull, C., Beattie, A., 2007. Antimicrobial defences increase with sociality in bees. *Bio. Letters* 3, 422-424.
- Téné, N., Bonnafé, E., Berger, F., Rifflet, A., Guilhaudis, L., Ségalas-Milazzo, I., Pipyc, B., Agnès Costec, A., Leprince, J., Treilhou, M., 2016. Biochemical and biophysical combined study of bicarinalin, an ant venom antimicrobial peptide. *Peptides* 79, 103-113.
- Torres, A.F.C., Huang, C., Chong, C.-M., Leung, S.W., Silva, A.R.B.P., Havt, A., Quinet, Y.P., Martins, A.M.C., Lee, S.M.Y., Rádis-Baptista, G., 2014. Transcriptome analysis in venom gland of the predatory giant ant *Dinoponera quadriceps*: insights into the polypeptide toxin arsenal of Hymenoptera. *PLoS One* 9, e87556.
- Touchard, A., Dejean, A., Escoubas, P., Orivel, J., 2015. Intraspecific variations in the venom peptidome of the ant *Odontomachus haematodus* (Formicidae: Ponerinae) from French Guiana. *J. Hymenopt. Res.* 47, 87-101. a.
- Touchard, A., Koh, J.M.S., Aili, S.R., Dejean, A., Nicholson, G.M., Orivel, J., Escoubas, P., 2015. The complexity and structural diversity of ant venom peptidomes is revealed by mass spectrometry profiling. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29, 385–396. b.
- Touchard, A., Aili, S.R., Fox, E.G.P., Escoubas, P., Orivel, J., Nicholson, G.M., Dejean, A., 2016. The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms. *Toxins* 30, 1-28.
- Tsai, I.H., Wang, Y.M., Chen, Y., Tsai, T.S., Tu, M.C., 2004. Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. *Biochem. Soc.* 223, 215-223.
- Turillazzi, S., Mastrobuoni, G., Dani, F. R., Moneti, G., Pieraccini, G., la Marca, G., Bartolucci, G., Perito, B., Lambardi, D., Cavallini, V., Dapporto, L., 2006. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17, 376-383.
- UniProt Database, 2017. <http://www.uniprot.org/>. (accessed 15.05.17).
- Weisel-Eichler, A., Libersat, F., 2004. Venom effects on monoaminergic systems. *J. Comp. Physiol. A* 190, 683-690.
- Wilson, E.O., 1990. *Success and Dominance in Ecosystems: The Case of the Social Insects*. Ecology Institute, Oldendorf/Luhe, Germany.
- Wu, G., 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids* 37, 1-17.
- Yoo, H.M., Park, J.H., Jeon, Y.J., Chung, C.H., 2015. Ubiquitin-fold modifier 1 acts as a positive regulator of breast cancer. *Front. Endocrinol.* 6, 36.
- Zelezetsky, I., Pag, U., Antcheva, N., Sahl, H.G., Tossi, A., 2005. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 358-364.
- Zhang, Z.Y., 2001. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 416-423.

Zychar, B.C., Dale, C.S., Demarchi, D.S., Gonçalves, L.R.C., 2010. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A 2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon* 55, 227-234.

4. CAPÍTULO - ESTUDO BIOMONITORADO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PEÇONHA DE *Ectatomma brunneum* SMITH (1858)

Estudo biomonitorado da atividade antibacteriana da peçonha de *Ectatomma brunneum* SMITH (1858)

Biomonitoring study of the antibacterial activity of the venom of *Ectatomma brunneum* SMITH (1858)

Destaques

- Presença de peptídeos com ação bactericida.
- Diversidade de compostos de menor polaridade com possível atuação na comunicação social.
- Presença de alcaloides com ação antitumoral conhecida.

Resumo.

A ação antipatogênica da peçonha é uma característica comum à imunidade inata das formigas e, a descoberta de toxinas naturais com atividade contra patógenos, pode levar à identificação de compostos modelo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, característica que tem impulsionado os estudos com peçonha de formigas nas últimas décadas. O objetivo deste estudo foi testar o potencial de inibição bacteriano da peçonha da espécie *Ectatomma brunneum*, isolando e identificando os agentes de interesse terapêutico e de atuação na imunidade destes animais. Em complemento, os compostos mais apolares da peçonha foram identificados e, sua função explorada com base na literatura. O estudo foi realizado a partir do isolamento biomonitorado de agentes antibacterianos da peçonha, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, a partir de técnicas de cromatografia líquida e gel 1D e, identificação por espectrometria de massas e banco de dados de proteínas e peptídeos. Os compostos de menor polaridade foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Nossos resultados mostraram a ação de inibição bacteriana de peptídeos catiônicos anfifílicos da peçonha desta espécie, como parte das ferramentas do sistema imune da espécie. Quatro proteínas apresentaram homologia com as bandas isoladas por gel 1D, todas com atividades conhecidas no sistema imune. Quarenta compostos de baixa massa molecular foram identificados na peçonha e entre as funções atribuídas a eles, está à atuação na comunicação química, proteção contra patógenos e

na potencialização na ação da peçonha frente à predação e defesa. Enfim, podemos descrever a peçonha como um coquetel de agentes imunitários e, mais estudos de atuação terapêutica desta espécie podem levar à identificação de compostos modelo para o desenvolvimento de novas drogas.

Palavras-chave.

Alcaloide, Antimicrobiano, Hymenoptera, Imunidade inata, Peptídeo,.

Abstract.

The antipathogenic action of venom is a common feature of the innate immunity of ants, and the discovery of natural toxins with activity against pathogens may lead to the identification of model compounds to develop new therapeutic agents, a feature that has boosted studies with ant venom in the last decades. The objective of this study was to test the bacterial inhibition potential of the venom of *Ectatomma brunneum* species, isolating and identifying the agents of therapeutic interest and the acting agents on the immunity of these animals. In addition, the most nonpolar compounds of the venom were identified and their function was explored based on the literature. The study was carried out from the biomonitorated isolation of the antibacterial agents of the venom, against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria, using liquid chromatography and 1D gel techniques, and identification by mass spectrometry and protein and peptide database. The lower polarity compounds were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Our results showed the bactericidal action of amphiphilic cationic peptides of *E. brunneum* venom as part of the immune system tools of the species. Four proteins showed homology with the bands isolated by 1D gel, all with known activities in the immune system. Forty low molecular mass compounds were identified in the venom and, among the functions attributed to them, is acting in chemical communication, protection against pathogens and in potentiation in the action of venom regarding predation and defense. Finally, we can describe *E. brunneum* venom as a cocktail of immune agents and further studies of therapeutic performance of this species may lead to the identification of model compounds for developing new drugs.

Key-Words.

Alkaloid, Antimicrobial, Hymenoptera, Innate immunity, Peptide,.

1. Introdução

No reino animal uma diversidade de espécies apresentam características evolutivas que proporcionam a produção de peçonha, a princípio como arma predatória e de defesa (Casewell et al., 2013), e, em alguns animais como ferramenta de comunicação (Schmidt, 1986; Holldobler e Wilson, 1990; Orivel et al., 2001). Além disso, em alguns grupos peçonhentos, a atuação da peçonha tem papel de destaque na defesa contra patógenos (Orivel et al., 2001; Stow et al., 2007; Baracchi e Tragust 2017). Neste contexto, esta ação antipatogênica é associada a um dos mecanismos de imunidade inata destes animais, que

usam essa ferramenta glandular na assepsia da presa (Hancock e Scott 2000; Orivel et al., 2001; Andersson et al., 2016; Mylonakis et al., 2016; Baracchi e Tragust 2017). Em insetos eussociais como as formigas (Hymenoptera, Formicidae), a função antipatogênica é acentuada, uma vez que essa condição comportamental exige mecanismos extras na preservação da saúde da colônia, visto que o convívio próximo entre os indivíduos e a homogeneidade genética, são fatores que contribuem na disseminação de patógenos (Orivel et al., 2001; Stow et al., 2007; Hoggard et al., 2011; Baracchi e Tragust 2017).

Apesar do papel do sistema imunológico celular e humoral na imunidade inata, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm papel de destaque (Hancock e Scott, 2000; Andersson et al., 2016; Mylonakis et al., 2016). A presença de PAMs em insetos é notória, uma vez que estes produzem o maior repertório destes agentes imunitários que qualquer outro grupo taxonômico, podendo apresentar variações intra e interespecíficas, influenciadas por pressões enfrentadas ao longo da evolução (Hoggard et al., 2011; Mylonakis et al., 2016). Além dos PAM, outros compostos da peçonha podem agir na defesa contra microrganismos, como os alcaloides (Jouvenaz et al., 1972; Li et al., 2012).

Microrganismos patogênicos certamente representam uma forte pressão seletiva na peçonha e a investigação da ação deste conjunto de substâncias glandular na imunidade inata, pode esclarecer importantes aspectos evolutivos destes animais (Moreau, 2013). No entanto, além da adição aos conhecimentos a respeito da fisiologia e evolução da peçonha desses insetos, a descoberta de toxinas naturais com atividade contra patógenos pode levar à identificação de compostos modelo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Touchard et al., 2016). Neste sentido, a peçonha destaca-se por sua elevada especificidade e a potência das suas toxinas em alvos moleculares de sistemas biológicos dos mamíferos (King, 2011), característica que têm impulsionado os estudos com a peçonha de formigas nas últimas décadas (Jouvenaz et al., 1972; Orivel et al., 2001; Zelezetsky et al., 2005; Rifflet et al., 2012; Pluzhnikov et al., 2014; Touchard et al., 2015, 2016; Dekan et al., 2017).

A ação antipatogênica da peçonha foi explorada em algumas espécies de formiga e, além disso, outras atividades de interesse farmacológico foram investigadas. Entre os exemplos de agentes terapêuticos isolados da peçonha, temos a ação antimicrobiana dos peptídeos pilosulin 1, 2 e Δ -Myrtoxin-Mp1a isolados da espécie *Myrmecia pilosula* (Zelezetsky et al., 2005; Dekan et al., 2017) e, dos peptídeos ponerin e bicarinina isolados, respectivamente, da peçonha das formigas *Pachycondyla goeldii* (Orivel et al., 2001) e *Tetramorium bicarinatum* (Téné et al., 2016); ação anti-inflamatória descrita a partir de

proteínas isoladas da peçonha de *Pseudomyrmex triplarinus* (Pan e Hink, 2000); peptídeos e uma proteína isolados da espécie *Dinoponera quadriceps* apresentaram ação anticonvulsivante (Nôga et al., 2016) e; ação antimicrobiana e antitumoral do alcaloide Solenopsin isolado da peçonha de *Solenopsis invicta* (Jouvenaz et al., 1972; Arbiser et al., 2007; Li et al., 2012).

Em contraste com o alto potencial da peçonha como agente terapêutico, estudos de composição e atividade biológica, da maioria das espécies de formigas, ainda são escassos (Touchard et al., 2016). Esta falta de dados ocorre principalmente devido à quantidade limitada de peçonha que pode ser obtida a partir de um único indivíduo (Lima e Brochetto-Braga, 2003; Pluzhnikov et al., 2014; Aili et al., 2017). Por outro lado, os avanços em técnicas sofisticadas de isolamento de compostos de interesse e espectrometria de massa, vem melhorando as possibilidades de análises da peçonha de formigas (Aili et al., 2017).

Assim, dado o interesse no estudo com a peçonha de formigas, o objetivo deste estudo foi testar o potencial de inibição da peçonha da espécie *Ectatomma brunneum* (Smith) frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, a partir de um estudo biomonitorado, isolar e identificar possíveis agentes modelo de potencial terapêutico e de atuação na imunidade inata destes animais. Em complemento, os compostos mais apolares da peçonha foram identificados e sua função na peçonha da espécie foi explorada a partir de dados da literatura.

2. Materiais e Métodos

2.1. Área de estudo e preparo das amostras

Operárias de *E. brunneum*, em atividade de forrageamento, foram coletadas de forma aleatória no município de Dourados - Mato Grosso do Sul - Brasil (22°13'24.39"S; 54°54'44.53"W). As coletas foram realizadas em outubro de 2015, no período de primavera. A área de coleta está em uma faixa de transição entre Mata Atlântica e Cerrado (Arruda e Daniel, 2007).

Em laboratório as formigas foram crio-anestesiadas e dissecadas em estereomicroscópio (estereomicroscópio S6D, Leica, Alemanha). Durante a dissecação, os reservatórios da peçonha foram alocados em eppendorfs contendo 50 µL de água ultrapura, permanecendo refrigerados durante todo o processo. Após a etapa de extração o material foi centrifugado (NT 805, Novatecnica, Brasil) a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C, para separação da membrana do reservatório, da peçonha. O sobrenadante foi então separado,

filtrado em filtro 0,45 µm (Millipore, EUA) e congelado a -20 °C para posterior análise. A concentração de proteínas totais presentes na peçonha foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão.

Todos os reagentes utilizados no estudo são de grau analítico, provenientes da Sigma-Aldrich (EUA), Bio-Rad (EUA) ou Dinâmica (Brasil). Toda água empregada neste estudo foi ultrapurificada usando sistema Milli-Q (Master All 2000, Gehaka, Brasil).

2.2 Atividade de inibição bacteriana da peçonha

A atividade de inibição bacteriana da peçonha foi testada contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 29214) e gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591 - *American Type Culture Collection*).

Culturas de cada uma das bactérias foram inoculadas em placas contendo meio Lúria-Bertani (LB) sólido e, incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, colônias de cada espécie de bactéria foram transferidas para meio LB líquido, incubadas a 37 °C e o crescimento acompanhado por 2 horas por leitura em espectrofotômetro Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 600 nm de absorvância.

Um total de 100 µL da solução bactéria/meio LB foram diluídos em meio LB até o volume final de 10 mL. O volume de 100 µL da solução contendo as bactérias foi adicionado em microplacas juntamente com 50 µL do extrato bruto da peçonha filtrada e, em seguida, incubadas a 37 °C por 18 horas. O crescimento das colônias foi avaliado em leitor de Elisa Versa Max (Molecular Devices, EUA) a 600 nm de absorvância. A atividade inibitória foi determinada pela inibição do crescimento bacteriano nas placas em comparação aos controles. Como controle positivo foi utilizado apenas meio de cultura com as bactérias testadas e como controle negativo apenas meio de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicata biológica.

Para avaliar a fração responsável pela atividade antibacteriana, 3 eppendorffs contendo cada 30 µL de peçonha, foram expostos, respectivamente, ao aquecimento, quebra de ligação peptídica e extração dos compostos de menor polaridade.

O teste de variação de temperatura ocorreu a partir do aquecimento a 95 °C por 30 minutos em banho a seco e posterior adição de 600 µL de meio LB líquido à peçonha. Para a ação enzimática, foram adicionados à peçonha 1µL de endoproteinase K, em seguida foi aquecido a 45 °C por 10 minutos e, na sequência, a 60 °C por 10 minutos, e, então,

adicionados 600 µL de meio LB líquido. Ao terceiro eppendorf com peçonha foram adicionados 200 µL de hexano, colocado sob agitação por 1 minuto, seguido de repouso por 3 minutos. A porção de menor polaridade da peçonha, junto ao solvente, foi utilizada no item 2.4.

A atividade de inibição bacteriana da peçonha aquecida a 95 °C, da peçonha tratada com proteinase K e da peçonha sem a fração de menor polaridade, foi testada como descrito para o teste de atividade com a peçonha bruta. Novamente todos os testes foram realizados em triplicata biológica.

2.3 Estudo biomonitorado da atividade antibacteriana da peçonha

Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) biomonitorado pela atividade bacteriana da peçonha

Três mL de peçonha bruta foram pré-fracionados por cromatografia de troca aniônica Mono Q 5/50 GL [GE Healthcare, EUA ($-\text{CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3^+$)]. A separação cromatográfica foi realizada em aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu, LC20A, EUA). A eluição dos peptídeos foi realizada em um fluxo de 1 mL/minuto e monitorado na faixa de absorvância de 220 nm. Como solvente A foi utilizado uma solução tampão de 50 mM Hidroximetil Aminometano Cloridrato (Tris-HCl) (pH 7,4), e como solvente B 50 mM Tris HCl e 1 M Cloreto de sódio (NaCl) (pH 7,4). A eluição foi realizada usando uma fase móvel binária do eluente A e eluente B. O gradiente aplicado foi: 0% de B por 10 minutos, 0 a 100 % de B em 40 minutos, 100% de B por 15 minutos. As proteínas da peçonha foram separadas em 35 frações, entre 10 e 45 minutos, coletadas a cada 1 minuto. Foi realizadas um total de quatro corridas acumulativas, totalizando 4 mL de amostra por fração.

As frações que não interagiram com a coluna, os 10 minutos iniciais da corrida, foram injetadas em uma coluna de troca catiônica Mono S 5/50 GL [GE Healthcare, Reino Unido ($-\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$)] sob os mesmos parâmetros de programação de gradiente do primeiro pré-fracionamento.

Todas as 70 frações geradas a partir do fracionamento por coluna aniônica e catiônica (fracionamento 1), foram encaminhadas para testes de atividade de inibição bacteriana, como descrito em 2.2.

As frações que apresentaram atividade foram submetidas, separadamente, a uma nova purificação por CLAE utilizando coluna C18 de fase reversa [Protein e Peptide C18 VyDac,

EUA, (código 218tp54, 4/25)]. Foi utilizado como tampão A uma solução aquosa contendo 0.1% (v/v) de ácido fórmico e, como tampão B, 80% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 0.1% (v/v) ácido fórmico, em um fluxo de 1 mL/minuto.

A eluição foi realizada usando uma fase móvel binária do eluente A e eluente B. O gradiente aplicado foi: 5% de B por 10 minutos, 5 a 80 % de B em 70 minutos e 80 % de A por 10 minutos. Foram coletadas 80 frações de cada uma das pré-frações oriundas da cromatografia por troca iônica. As frações foram secas em centrifuga a vácuo (SPD131DDA Savant, Thermo Fisher, EUA) e, posteriormente, lavadas três vezes em água ultrapura seguido por secagem a vácuo. Por fim, as frações (fracionamento 2) foram solubilizadas em 200 µL de água ultrapura e testadas para atividade de inibição bacteriana, como descrito no item 2.2.

As proteínas totais de todas as amostras foram quantificadas seguindo o método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão, e as frações com atividade de inibição bacteriana foram encaminhadas à Eletroforese Monodimensional (1D)

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ocorreu em gel 12% conforme metodologia descrita por Laemmli (1970), e instruções metodológicas do Mini-Protean Tetra Cell. Amostras contendo 20 µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em cuba vertical da Mini Protean II (Bio-Rad, EUA), em uma corrida de 80 W por aproximadamente 100 minutos.

O gel foi corado por 24 horas com Azul Brilhante de Coomassie G-250, conforme descrito por Görg et al. (2000) e armazenado a 21 °C em solução de conservação, 5% (v/v) de ácido acético. Posteriormente o gel foi digitalizado em equipamento Image Scanner III (GE-Healthcare, EUA), em modo de transparência 16 bit, nas cores vermelha-azul e 600 dpi (*dots per inch*) de resolução.

Digestão das amostras

As bandas foram obtidas a partir do gel monodimensional foram excisadas e desidratadas em solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e bicarbonato de amônio (AMBIC) (pH 8,0). Após a desidratação os fragmentos dos géis foram incubados, sequencialmente, em solução de 65 mM de DTT por 30 minutos a 56 °C e em solução de 200 mM de iodoacetamida por 30 minutos (no escuro), à temperatura ambiente, seguido de lavagem em 100 mM de AMBIC (pH 8,0), e 100% (v/v) de ACN.

Os fragmentos dos géis foram tratados com solução de 10% (v/v) de ACN e 40 mM de AMBIC contendo enzima tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin®, Promega, EUA), em uma concentração de 25 ng/μL, e incubados a 37 °C por 16 horas. A extração das substâncias purificadas nos fragmentos dos géis foi realizada pela adição de 5% (v/v) de ácido fórmico e 50% (v/v) de ACN. O extrato obtido foi concentrado a vácuo e solubilizado em 10 μL de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). As amostras foram dessalinizadas utilizando ponteiros ZipTip com resina C18 (Pipette Tips for Sample Preparation- Millipore, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e secas a vácuo.

Espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight/time-of-flight)

O material obtido a partir da digestão em gel foram solubilizados em 10 μL de solução de 0.1% (v/v) de TFA, e em seguida, misturados a matriz (2,5 mg/mL Matriz α-ciano-4-hidroxi-cinamico) preparada em 50% (v/v) de ACN e 0,1% (v/v) de TFA, na proporção de 1:1 (amostra: matriz). Alíquotas foram aplicadas em placa de aço MTP Anchor Chip™ 600/384 TF (Bruker Daltonics, EUA) e submetidos à espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-TOF em aparelho Ultraflex III (Bruker Daltonics, EUA). Para a primeira fragmentação peptídica (MS), os espectros foram obtidos em modo refletor (LPPepMix), com faixa de detecção de 500-5000 Da. Para segunda fragmentação (MS/MS) os espectros foram obtidos em modo *LIFT* na faixa de massa de 40-1878 Da.

Identificação das proteínas

Os espectros de massas obtidos a partir do MALDI-TOF-TOF foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, EUA) para a remoção de contaminantes e obtenção da lista de massas, que foi submetida ao software de pesquisa: Peaks DB 7.0 (Bioinformatic Solutions Inc., Canadá). As identificações foram validadas assumindo o FDR (*False Discovery Rate*) igual a 0.0%. Metazoa (Animais), Insecta, Formicidae, e “proteínas a partir de peçonha animal” (moluscos, serpentes, insetos, aracnídeos, anfíbios) foram selecionados como táxon para entrada nos bancos de dados. Os espectros das amostras também foram submetidos ao programa de sequenciamento de novo BioTools 3.2 (Bruker Daltonics, EUA).

A síntese do estudo biomonitorado da atividade antibacteriana da peçonha de *E. brunneum* pode ser observada na Figura 1.

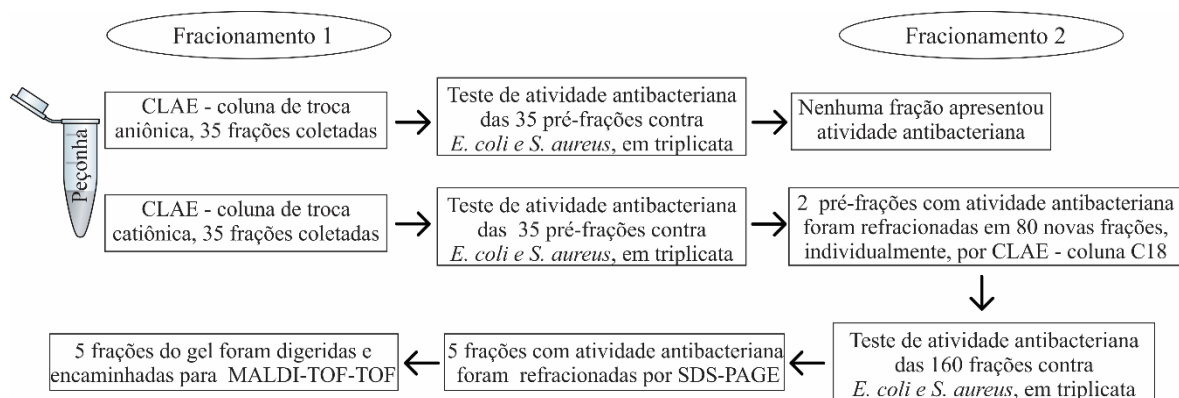


Figura 1. Síntese do fracionamento biomonitorado dos compostos com atividade antibacteriana da peçonha de *E. brunneum*.

2.4 Cromatografia Gasosa da peçonha

No item 2.2, as frações de menor polaridade extraídas da peçonha de *E. brunneum* foram utilizadas e identificadas nesta etapa do estudo, em triplicata biológica.

As análises foram realizadas empregando-se um cromatógrafo gasoso (GC-2010 Plus, Shimadzu, Japão) com detector de massas (GC-MS 2010 Ultra) usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme) e gás hélio como gás carreador. As condições de análise foram: volume de injeção de 1 µL, em modo *splitless*; rampa de aquecimento com temperatura inicial de 150 °C alcançando 300 °C a 3 °C/minuto e permanecendo na temperatura final por 10 minutos (60 minutos de corrida); a temperatura do injetor foi de 220 °C. As temperaturas do detector e da linha de transferência foram 250 °C e 200 °C, respectivamente. Os parâmetros de varredura do espectrômetro de massas incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 eV, na faixa de massa de 45 a 600 m/z e com intervalo de varredura de 0.3 segundos.

O índice de retenção (Van Den Dool e Kratz, 1963) foi calculado empregando uma mistura de padrões de alcanos lineares (C₁₄-C₃₆, Sigma Aldrich, EUA, com pureza ≥ 90%). Para a identificação das substâncias estes índices de retenção foram comparados com a literatura (Brown e Moore, 1979; Broph et al., 1983; Kaib et al., 1993; Provost et al., 1994; Meskali et al., 1995; Bonavita-Cougourdan et al., 1997; Monnin et al., 1998; Ruther et al., 1998; Howard et al., 2001; Steinmetz et al., 2003; Zhu et al., 2006; Ruther et al., 2011; Fox et al., 2012; Braga et al., 2013; Moore et al., 2014; Smith et al., 2014; Weiss et al., 2014; Gnatzy et al., 2015; Jansen et al., 2015; Braga et al., 2016; Silva et al., 2016) e associados à interpretação dos espectros de massas e comparação dos espectros com as bases de dados (NIST21 e WILEY229).

A área do pico de cada substância foi determinada por integração manual de cada cromatograma de íons totais. Em seguida todas as áreas foram transformadas em áreas percentuais relativas (abundância relativa).

3. Resultados

3.1 Atividade de inibição bacteriana e estudo biomonitorado da peçonha

Os resultados demonstram que a peçonha de *E. brunneum* apresenta atividade de inibição bacteriana contra as duas cepas testadas, *E. coli* e *S. aureus*, quando comparado aos controles (Tabela 1). Os testes com as frações submetidas à temperatura, proteinase K e extração dos compostos de menor polaridade, mostram que apenas com a quebra das ligações peptídicas, por proteinase, ocorreu à perda da atividade biológica da peçonha (Tabela 1), indicando que os peptídeos são os prováveis responsáveis pela inibição dos microrganismos usadas como modelo neste estudo.

Tabela 1. Atividade de inibição bacteriana da peçonha da formiga *E. brunneum* imposta a diferentes condições, em triplicata biológica.

Bactéria	Variações da peçonha					
	PB	PT	PPK	RP	CN	CP
<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	+
<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	+
<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	+
<i>S. aureus</i>	-	-	+	-	-	+
<i>S. aureus</i>	-	-	+	-	-	+
<i>S. aureus</i>	-	-	+	-	-	+

PB – Peçonha bruta; PT – Peçonha submetida ao aumento de temperatura; PPK – Peçonha submetida a proteinase K; RP – Resíduo de peçonha sem a fração de menor polaridade; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo; (-) – Não ocorreu crescimento bacteriano; (+) – Ocorreu crescimento bacteriano.

A atividade de inibição bacteriana da peçonha testada com as frações geradas por coluna catiônica (fracionamento 1, Figura 2 a), destacaram a ação antibacteriana nas frações coletadas no minuto 17 e 19. Nenhuma atividade foi observada nas frações coletadas por coluna aniônica, revelando que os peptídeos ativos apresentam carga positiva. Na segunda etapa de purificação (fracionamento 2, Figura 2 b) foram observadas, a partir da pré-fração 17, atividade antibacteriana nas frações coletadas no minuto 44 e 45 e, na pré-fração 19, no minuto 43 a 45. Todas as frações ativas apresentaram ação de inibição bacteriana para ambas as cepas testadas.

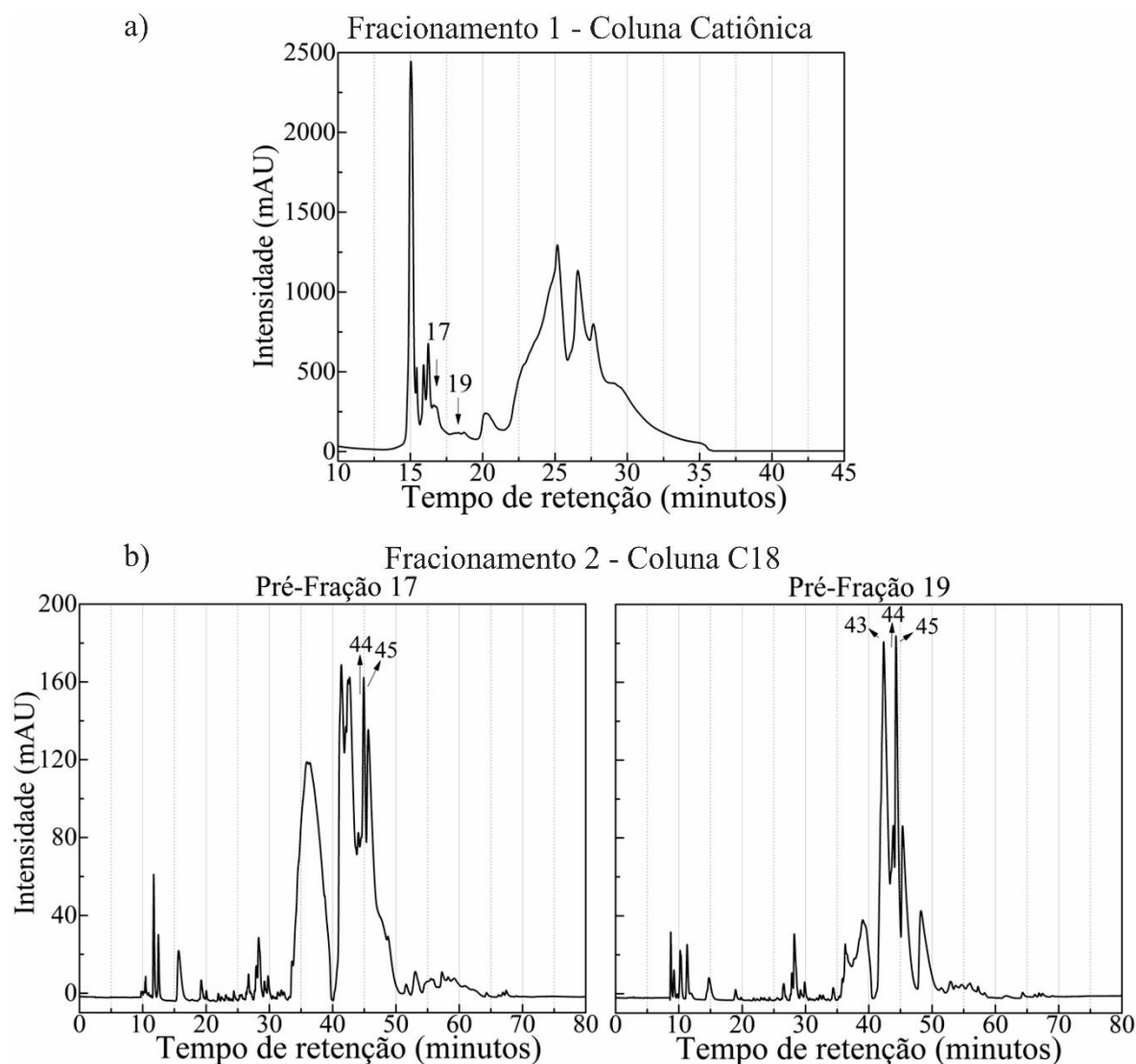


Figura 2. Cromatogramas representativos do estudo biomonitorado da atividade de inibição da peçonha da formiga *E. brunneum*, frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. a) Fracionamento 1 por CLAE em coluna catiônica, em destaque as frações com atividade de inibição bacteriana. b) Fracionamento 2 por CLAE em coluna de fase reversa C18, Pré-Fração 17 e 19, em destaque as frações com atividade de inibição bacteriana.

Para o fracionamento 2, as 5 frações apresentaram menor afinidade com a coluna quando houve maior equilíbrio entre os eluentes, indicando que os peptídeos ativos apresentam perfil anfipático.

O gel 1D realizado com as frações oriundas do fracionamento 2 e que exibiram atividade de inibição bacteriana, apresentaram uma única banda para cada fração, todas com massa molecular de aproximadamente 6,5 KDa (Figura 3). Quatro das cinco frações isoladas foram identificadas (Tabela 2), sendo duas delas atribuídas a proteínas de formiga (banda 1 e banda 4, Figura 3), uma a proteína de um cnidário e outra a proteína de um díptero. No entanto, estas duas últimas proteínas, Quinase de adesão focal 1 (banda 2, Figura 3) e

Monooxigenase contendo flavina (banda 5, Figura 3), em diferentes formas moleculares, já foram detectada em outras espécies de formiga e animais peçonhentos (UniProt Database), entre os exemplos, respectivamente, nas espécies de formiga *Harpegnathos saltator* (código de acesso E2BTJ2_HARSA - UniProt Database, 2017) e *Lasius niger* (código de acesso A0A0J7NS39_LASNI - UniProt Database, 2017).

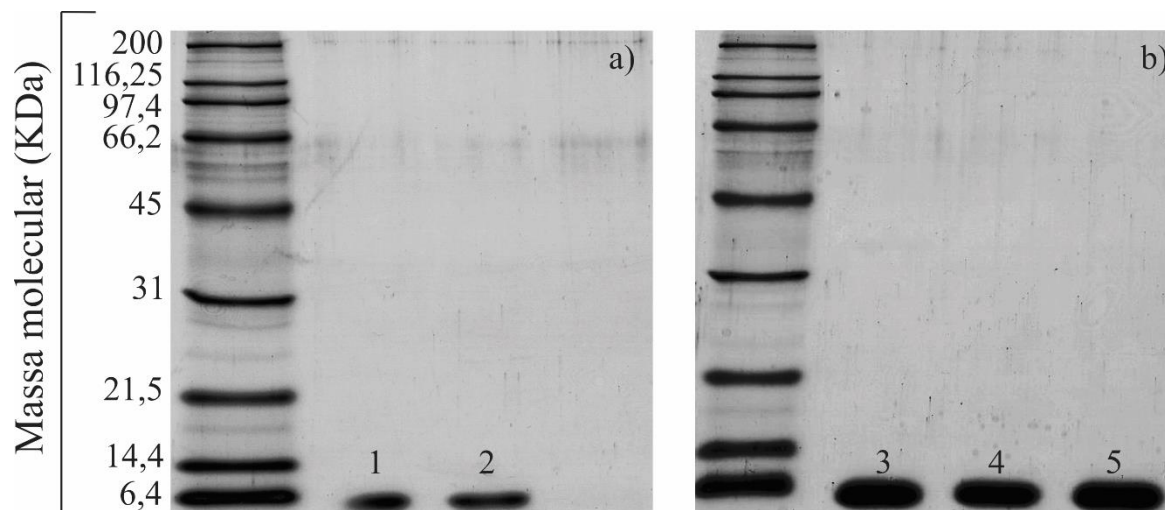


Figura 3. Eletroforese 1D da peçonha de *E. brunneum* previamente fracionada por CLAE em pré-fracionamento por coluna catiônica (fracionamento 1), seguida de coluna C18 de fase reversa (fracionamento 2). a) As bandas 1 e 2 correspondem, respectivamente, ao minuto 44 e 45 (fracionamento 2) da pré-fração 17 (fracionamento 1). b) As bandas 3 a 5 correspondem, respectivamente, ao minuto 43, 44 e 45 (fracionamento 2) da pré-fração 19 (fracionamento 1).

Tabela 2. Proteínas isoladas da peçonha de *E. brunneum* por CLAE e SDS-PAGE e identificadas por MALDI-TOF-TOF, a partir de estudo biomonitorado empregando as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Banda	Proteína	Número de acesso	Sequência peptídica	Confiança dos resultados e cobertura (%)	Organismo
1 *	Proteína CLIP-associado	A0A026W277	LN(+15.99)GAIK	22.45 (-10lgP) 1%	<i>Cerapachys biroi</i> (Formiga)
2 #	Quinase de adesão focal 1	T2MDJ8	KHDLYAIPFK	32.89 (-10lgP) 1%	<i>Hydra vulgaris</i> (Cnidário)
4 *	Endoribonuclease Dcr-1	F4WYQ9	HKDYIETVVK	20.18 (-10lgP) 1%	<i>Acromyrmex echinator</i> (Formiga)
5 \$	Monooxigenase contendo flavina	W8B8V8	IGLPIYAYPIK	22.52 (-10lgP) 3%	<i>Ceratitits capitata</i> (Díptero)

Táxons para entrada no banco de dados: # Metazoa, \$ Insecta, * Formicidae

3.2 Compostos da peçonha identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Foram identificados na peçonha 40 compostos de baixa massa molecular empregando CG-EM (Figura 4, Tabela 3). Os compostos apresentam comprimento de cadeia carbônica do C₁₅ ao C₃₁ e são atribuídos a 6 classes (alcanos, alcanos ramificados, alcenos, alcenos ramificados, alcadienos e alcaloides piridínicos), com a maior parte pertencendo aos alcanos ramificados, aproximadamente 63% da abundância relativa. Os compostos de maior abundância relativa, em destaque na Tabela 2 e Figura 4, correspondem juntos a aproximadamente 50% de todos os compostos identificados na peçonha.

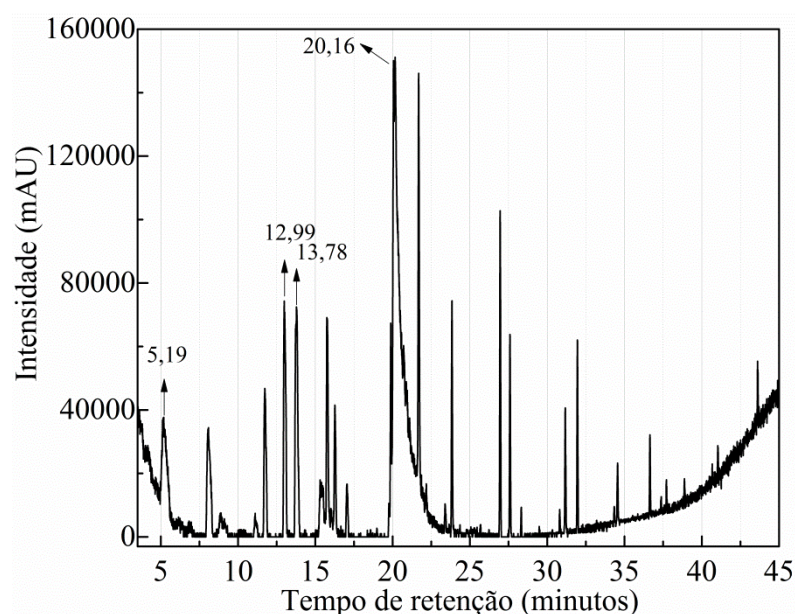


Figura 4. Cromatograma representativo dos compostos de menor polaridade da peçonha da formiga *E. brunneum* analisado por CG-EM. Em destaque os compostos de maior representatividade.

Tabela 3. Compostos de baixa massa molecular identificados na peçonha da formiga *E. brunneum*.

Tempo de retenção (minutos)	Compostos	Índice calculado	Abundância relativa
*5,194	Pentadecano	1506	7,23 ±3,25
6,214	3-Metilpentadecano	1567	0,41 ±0,11
8,084	Heptadecadieno	1665	5,71 ±2,36
8,893	Heptadecano	1705	1,36 ±0,82
10,033	5-Metilheptadecano	1753	0,66 ±0,10
11,106	Octadecano	1798	0,20 ±0,05
11,736	x-Metiloctadecano	1823	4,70 ±1,74
*12,990	3-Metiloctadecano	1872	8,16 ±4,40

*13,782	Nonadecano	1902	9,95 ±3,91
14,288	x-Metilnonacosano	1921	0,10 ±0,07
14,791	7-Metilnonacosano	1940	0,11 ±0,08
15,311	x-Metilnonadecano	1959	2,78 ±0,24
15,742	3-Metilnonadecano	1975	4,88 ±1,14
16,265	Eicosano	1994	0,92 ±0,17
17,042	2-Metil-6-tridecenil piperidina	2023	1,36 ±0,11
18,870	2-Metil-6-tridecil piperidina	2089	1,10 ±0,05
19,757	x-Metiheneicosano	2122	0,41 ±0,25
19,882	x-Metileneicosano	2126	2,38 ±0,88
20,108	x-Metileneicosano	2134	4,84 ±2,38
*20,161	x-Metileneicosano	2136	26,80 ±16,30
20,737	x-Metileneicosano	2158	0,63 ±0,52
21,688	Docosano	2192	3,93 ±1,40
22,182	x,y-Dimetileneicosano	2211	0,10 ±0,08
23,386	x-Metildocosano	2256	0,47 ±0,21
23,838	Tricoseno	2272	3,07 ±1,13
26,956	Tetracosano	2391	1,21 ±0,89
27,592	x,y-Dimetiltricosano	2415	2,12 ±0,58
28,328	10-; 11-; 12-Metiltetracosano	2445	0,08 ±0,04
30,810	x-Metilpentacosano	2544	0,14 ±0,02
31,172	11,15- Dimetilpentacosano	2558	1,41 ±0,80
31,957	Hexacosano	2590	0,72 ±0,12
34,341	4,12-Dimetihexacosano	2687	0,05 ±0,02
34,552	Heptacosano	2696	0,51 ±0,18
36,645	x,y-Dimetilheptacosano	2789	0,24 ±0,09
37,378	x-Metiloctosano	2822	0,11 ±0,06
37,709	10-; 11-Metiloctacosano	2837	0,18 ±0,10
38,876	5-Metilnonacosano	2889	0,11 ±0,08
40,626	x-Triaconteno	2970	0,03 ±0,02
41,039	x,y-Dimetilnonacosano	2989	0,08 ±0,03
43,606	x,y-Dimetilhentriacontano	3111	0,80 ±0,13

*Compostos com maior abundância relativa.

4. Discussão

4.1 Atividade de inibição bacteriana e estudo biomonitorado da peçonha

Os PAMs catiônicos foram os primeiros a serem relatados quanto à atividade biológica e, junto à característica anfifílica, compreendem o perfil mais comum de peptídeos com ação antibacteriana, apresentando uma grande diversidade de funções, características estruturais e propriedades biológicas, como atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e negativas, ação antifúngica, parasiticida e virucida (Hancock e Scott, 2000; Pushpanathan et al., 2013). Estes peptídeos estão amplamente distribuídos entre plantas até animais mais derivados e possuem muitas propriedades desejáveis as novas classes de antibióticos (Hancock e Scott, 2000; Guaní-Guerra et al., 2010; Andersson et al., 2016; Mylonakis et al., 2016).

A característica antibacteriana destes peptídeos pode ser explicada devido à interação eletrostática gerada a partir do perfil negativo e lipofílico da membrana externa da célula procarionte, característica que pode gerar certa seletividade, uma vez que células eucariontes apresentam o folheto externo constituído de lipídeos neutros ou zwitterônicos (Brown e Hancock, 2006; Mylonakis et al., 2016). Uma vez estabelecido o contato, os resíduos hidrofóbicos do PAM promovem a ancoragem a membrana microbiana, fazendo com que o folheto externo da membrana se expanda e se torne mais fino, criando poros ou mesmo causando lise (Mylonakis et al., 2016).

Pluzhnikov e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antibacteriana da peçonha de *E. brunneum* de uma população da Amazônia peruana, usando as bactérias *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O estudo forneceu a caracterização de 3 peptídeos com alta atividade antibacteriana, Ponericin Q-42, Ponericin Q-49 e Ponericin Q-50, no entanto, nenhum deles foi similar aos encontrados neste estudo. Essa variação pode ter ocorrido devido à influência das diferentes pressões ambientais, sobre a expressão gênica dos peptídeos presentes na peçonha destas populações, além da distinção genética, como já relatado em outros estudos com animais peçonhentos (Tsai et al., 2004).

A variação intraespecífica da peçonha já foi demonstrada para a espécie *E. brunneum*, que apresenta diferenças mesmo em uma única população, como descrito no estudo de Bernardi et al., (2017) e, assim como Aili et al. 2017, com a peçonha da formiga *Paraponera clavata*, atribuem a variação na composição da peçonha as pequenas variações ambientais entre a área de coleta, além de polimorfismos genéticos. Adicionalmente, algumas espécies

peçonhentas também apresentam heterogeneidade proteica conforme a época de extração da peçonha (Binford, 2001), outro fator que pode ser considerado neste estudo. Portanto, a variação encontrada entre os dois estudos com *E. brunneum* é uma condição comum que pode ser ocasionada por inúmeros fatores.

Embora se estime que o número de peptídeos biologicamente ativos de todas as espécies de animais peçonhentos seja próximo de 20 milhões, até recentemente apenas 75 PAMs foram descritos a partir da peçonha de espécies de formiga (Touchard et al., 2016). O número limitado de peptídeos descritos, somado a variação do perfil químico, que pode ocorrer mesmo dentro da espécie, tornam-se fatores determinantes para a dificuldade na identificação dos peptídeos. A complexidade na identificação de proteínas e peptídeos também foi relatada em outros estudos com peçonha de himenópteros (Bouzid et al., 2013; Sookrung et al., 2014; Torres et al., 2014; Aili et al., 2016).

A partir das 5 bandas geradas pelo gel 1 D (Figura 3) e uso de espectrometria de massas e banco de dados, não foi encontrada homologia com peptídeos já descritos, no entanto, 4 proteínas foram associadas às bandas isoladas (Tabela 2), seguindo a metodologia de identificação e parâmetros de confiança estabelecidos em 2.3. Além disso, todas as 4 proteínas já foram identificadas em formigas e apresentam funções associadas à reposta imunitária.

As proteínas CLIP-associado (CLASP) e Endoribonuclease Dcr-1 foram relacionadas ao sistema imune do percevejo *Anasa tristis* exposto a diferentes microrganismos patógenos (Shelby, 2013). A proteína CLASP 2, da mesma família de CLASP, também pode atuar como proteína do sistema de defesa do milho em resposta ao fungo *Blumeria graminis* (Mandal et al., 2014). Além disto, outras ribonucleases, já apresentaram atividade antibacteriana, além de antifúngica e antitumoral (Adinolfi et al., 1995; Harder e Schroder, 2002; Ngai e Ng, 2004).

A enzima FMO tem função atribuída a detoxificação e, resistência a toxinas e patógenos (Cashman, 2004; Koch et al., 2006). FMO foi descrita em humanos como um catalisador de desintoxicação, atuando sobre toxinas oriundas da dieta, convertendo estas em metabólitos não tóxicos (Cashman, 2004). Além disto, foi demonstrada a ação desta proteína na detoxificação de alcaloides (Miranda et al., 1991), uma classe de compostos presente na espécie *E. brunneum* (Tabela 3). Também foi discutido por Koch et al. (2006) a possibilidade de a FMO participar do mesmo processo nos fatores de virulência produzidos por patógenos.

Portanto, essa proteína pode atuar na detoxificação da presa devido à ação da peçonha ou mesmo, na detoxificação de presas contaminadas por patógenos, uma vez que essa servirá de alimento para colônia.

A proteína FAK 1 está envolvida em várias funções celulares, incluindo a disseminação celular, migração, apoptose e sobrevivência celular, além de processos de fagocitose de patógenos em animais (Hanks et al., 1988; Schlaepfer et al., 1999; Lamprou et al., 2007; Mamali et al., 2007; Serrels et al., 2007). Neste contexto, cabe aqui ressaltar que uma das principais respostas da atuação da imunidade contra a maioria dos patógenos bacterianos e fúngicos é a fagocitose. Em um estudo realizado por Roberts et al. (2009) foi observado o aumento da expressão gênica de FAK em ostras *Crassostreas gigas* contaminadas com bactérias e, Lamprou et al. (2007), descreveu a atuação de FAK na resposta imunitária da mosca *Ceratitis capitata* (Lamprou et al., 2007). Além disso, algumas proteínas da família das quinases podem também atuar em processos inflamatórios (Myers et al., 1997) e alérgicos (Santos et al., 2010), reações consideradas comuns na atuação da peçonha.

4.2 Compostos da peçonha identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas da peçonha

Uma vez que a peçonha de Hymenoptera é composta principalmente por proteínas e peptídeos (Casewell et al., 2013; Cologna et al., 2013; Touchard et al., 2015, 2016), é apropriado questionar a função dos compostos apolares, como os hidrocarbonetos, na peçonha, apesar da presença destes compostos não serem incomuns a esse produto glandular (Co et al., 2003; Morgan et al., 2003).

Blomquist e Bagnères (2010) sugerem que os hidrocarbonetos mais leves, com número inferior a 20 carbonos, podem desenvolver função como feromônio. Portanto, possivelmente, aos hidrocarbonetos de menor cadeia encontrados para a espécie, é designada alguma aplicação na comunicação química, função já atribuída à peçonha (Schmidt, 1986; Holldobler e Wilson, 1990; Orivel et al., 2001). A comunicação química é uma aquisição evolutiva essencial para manutenção da eussocialidade, neste aspecto, a atuação de compostos voláteis para este fim, pode ser direcionada a uma variedade de funções, entre elas, recrutar companheiras de ninho para fontes alimentares ou, atuar como um sistema de defesa, no recrutamento para ataque em massa (Holldobler e Wilson, 1990).

Os hidrocarbonetos de maior cadeia podem ser usados como hidrocarbonetos cuticulares (HCs), aquisição evolutiva essencial para manutenção destes insetos, principalmente no que se refere à eussocialidade. Os HCs atuam sobre o reconhecimento de companheiras de ninho e exercem função como uma camada isolante contra dessecação, substâncias tóxicas e microrganismos (Lenoir et al., 2001). Neste aspecto, já foi relatado que algumas espécies de Hymenoptera aplicam a peçonha sobre a cutícula de companheiras de ninho (Baracchi e Tragust, 2017), essa aplicação pode, portanto, contribuir para aquisição de hidrocarbonetos que atuem na superfície cuticular.

Outros compostos de destaque identificados na peçonha desta espécie pertencem a classe dos alcaloides piridínicos (2-Metil-6-tridecenil piperidina e 2-Metil-6-tridecil piperidina). Esta classe de compostos tem função atribuída a potencialização da ação de predação e defesa da colônia (Haight e Tschinkel, 2003; Haight, 2006) e é frequentemente encontrada em outras espécies de formiga (Morgan et al., 2003; Chen et al., 2009, 2010; Mashaly et al., 2010), no entanto, parecem ser uma particularidade desta família em Hymenoptera (Aniszewski, 2015).

Os mesmos alcaloides piridínicos encontrados em *E. brunneum*, também foram identificados na peçonha de *Solenopsis invicta* e *Solenopsis richteri* (Chen et al., 2009, 2010). Este grupo de alcaloides é predominante dentre todos os outros compostos presentes na peçonha de *S. invicta* (Jones et al., 1982) e fazem parte de uma das classes de substâncias naturais de maior evidencia, em virtude das propriedades tóxicas e farmacológicas demonstradas em diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* (Viegas Junior et al., 2004, 2005). Foram descritos a partir de alcaloides de formiga atividades antibacterianas, antifúngicas, antitumorais e inseticidas (Jouvenaz et al., 1972; Jones et al., 1982; Li et al., 2012; Rashid et al., 2013) e, sem dúvida, novos estudos podem somar a este grupo de atividades já destacadas.

5. Conclusão

Este estudo destaca a atuação de peptídeos catiônicos anfifílicos como agentes bactericidas da peçonha de *E. brunneum*. Neste contexto, é evidente a importância destes PAMs como atuantes na imunidade inata destes animais e ressalta-se o potencial destes peptídeos como fortes candidatos para modelos de agentes terapêuticos. Além disso, destaca-se a dificuldade de identificação destes agentes a partir de banco de dados, visto o baixo número de peptídeos já caracterizados, um contraste com o grande número de espécies da família Formicidae.

Destaca-se também, a partir da comparação com a literatura, a variação de compostos presentes na peçonha de uma única espécie de formiga em resposta às pressões ambientais, podendo interferir também nos PAMs expressos para cada população. Esse perfil indica que a peçonha pode apresentar uma grande fonte de peptídeos além do que pode ser estudado em uma única população, ou mesmo, em uma única colônia.

Os resultados também demonstraram a grande diversidade de classes e número de compostos de menor polaridade presentes na peçonha da espécie. No entanto, apesar de comuns a este material glandular, a função para maioria destes compostos, ainda não é clara, podendo estar associados a inúmeras atribuições, incluindo atuação em algumas atividades essenciais para o sucesso da eussocialidade. Também entre os compostos de menor polaridade, destaca-se os alcaloides com função conhecida na potencialização da predação e defesa, além da atuação na imunidade inata e potencial para estudos de modelos para agentes terapêuticos.

Enfim, pode-se descrever a peçonha de *E. brunneum* como um coquetel de agentes imunitários e, mais estudos de atuação terapêutica desta espécie podem levar à identificação de compostos modelo para o desenvolvimento de novas drogas.

Referencial bibliográfico

Adinolfi, B.S., Cafaro, V., D'Alessio, G., Di Donato, A., 1995. Full antitumor action of recombinant seminal ribonuclease depends on the removal of its N-terminal methionine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213, 525-32.

Aili, S.R., Touchard, A., Koh, J.M.S., Dejean, A., Orivel, J., 2016. Comparisons of Protein and Peptide Complexity in Poneroid and Formicoid Ant Venoms. *Journal of Proteome Research*, 15, 3039-3054.

Aili, S.R., Touchard, A., Petitclerc, F., Dejean, A., Orivel, J., Padula, M.P., Escoubas, P., Nicholson, G.M., 2017. Combined peptidomic and proteomic analysis of electrically stimulated and manually dissected venom from the South American bullet ant *Paraponera clavata*. *Journal of Proteome Research*, 16, 1339-1351.

Andersson, D.I., Hughes, D., Kubicek-Sutherland, J.Z., 2016. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, 26, 43-5.

Aniszewski, T., 2015. *Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology and Applications*, Elsevier: Boston - EUA.

Arbiser, J. L., Kau, T., Konar, M., Narra, K., Ramchandran, R., Summers, S.A., Vlahos, C.J., Ye, K., Perry, B.N., Matter, W., Fischl, A., Cook, J., Silver, P.A., Bain, J., Cohen, P., Whitmire, D., Furness, S., Govindarajan, B., Bowen, J.P., 2007. Solenopsin, the alkaloidal

component of the fire ant (*Solenopsis invicta*), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis. *Blood*, 109, 560-565.

Arruda, L., Daniel, O. 2007. Florística e diversidade em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Aluvial em Dourados, MS.

Baracchi, D., Tragust, S., 2017. Venom as a Component of External Immune Defense in Hymenoptera. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*, 213-233.

Bernardi, R.C., Firmino, E.L.B., Mendonça, A., Sguarizi-Antonio, D., Pereira, M.C., da Cunha Andrade, L.H., Antonialli-Junior, W.F., Lima, S.M., 2017. Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum* Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. B* 175, 200-206.

Binford, G.J. 2001. An analysis of geographic and intersexual chemical variation in venom of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). *Toxicon*, 39, 955-968.

Blomquist, G.J., Bagnères, A.G., 2010. *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology*, Cambridge University Press: Cambridge - Reino Unido.

Bonavita-Cougourdan, A., Bagnères, A.G., Provost, E., Desticier, G., And Clement, J.L., 1997. Plasticity of the cuticular hydrocarbon profile of the slave-making ant *Polyergus rufescens* depending on the social environment. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 116, 287-302.

Bouزيد, W., Klopp, C., Verdenaud, M., Ducancel, F., Vetillard, A., 2013. Profiling the venom gland transcriptome of *Tetramorium bicarinatum* (Hymenoptera: Formicidae): the first transcriptome analysis of an ant species. *Toxicon*, 70, 70-81.

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

Braga, M.V., Pinto, Z.T., Queiroz, M.M.C., Matsumoto, N., Blomquist, G.J., 2013. Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: Pupal cases from Sarcophagidae. *Acta Tropica*, 128, 479-485.

Braga, M.V., Pinto, Z.T., Queiroz, M.M.C., Blomquist, G.J., 2016. Effect of age on cuticular hydrocarbon profiles in adult *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 259, 37-47.

Brophy, J.J., Cavill, G.W.K., Davies, N.W., Gilbert, T.D., Philp, R.P., Plant, W.D., 1983. Hydrocarbon constituents of three species of dolichoderine ants. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 13, 381-389.

Brown, K.L., Hancock, R.E., 2006 Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18, 24-30.

Brown, W.V., Moore, B.P., 1979. Volatile Secretory Products Of An Australian Formicine Ant Of The Genus *Calomyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 9, 451-460.

Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G., 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Cell Press*, 28, 219-29.

Cashman, J.R., 2004. The implications of polymorphisms in mammalian flavin-containing monooxygenases in drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 9, 574-581.

- Chen, J., Cantrell, C.L., Shang, H.-W., Rojas, M.G., 2009. Piperideine Alkaloids from the Poison Gland of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3128-3133.
- Chen, J., Shang, H., Jin, X., 2010. Interspecific variation of D1,6-piperideines in imported fire ants. *Toxicon*, 55, 1181-1187.
- Co, J.E., Jones, T.H., Hefetz, A., Tinaut, A., Snelling, R.R., 2003. The comparative exocrine chemistry of nine Old World species of *Messor* (Formicidae: Myrmicinae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 367-373.
- Cologna, C.T., Cardoso, J.D.S., Jourdan, E., Degueldre, M., Upert, G., Gilles, N., Uetanabaro, A.P.T., Costa Neto, E.M., Thonart, P., Pauw, E., 2013. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. *Journal of Proteomics* 94, 413-422.
- Dekan, Z., Heady, S.J., Scanlon, M., Baldo, B.A., Lee, T.H., Aguilar, M.I., Deus, J.R., Vetter, I., Elliot, A.G., Amado, M. Cooper, M.A., 2017. Δ -Myrtoxin-Mp1a is a helical heterodimer from the venom of the Jack Jumper ant with antimicrobial, membrane disrupting and nociceptive activities. *Angewandte Chemistry*, 129, 8615-8610.
- Fox, E.G.P., Pianaro, A., Solis, D.R., Delabie, J.H.C., Vairo, B.C., Machado, E.A., Bueno, O.C., 2012. Intraspecific and intracolony variation in the profile of venom alkaloids and cuticular hydrocarbons of the fire ant *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche*, 1-10.
- Gnatzy, W., Michels, J., Volkandt, W., Goller, S., Schulz, S., 2015. Venom and Dufour's glands of the emerald cockroach wasp *Ampulex compressa* (Insecta, Hymenoptera, Sphecidae): Structural and Q10 biochemical aspects. *Arthropod Structure & Development*, 1-16.
- Görg, A., Obermaier, C., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21, 1037-1053.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S.O., Terán, L.M., 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*, 135, 1-11.
- Haight, K.L., Tschinkel, W.R., 2003. Patterns of venom synthesis and use in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Toxicon*, 42, 673-682.
- Haight, K.L., 2006. Defensiveness of the fire ant, *Solenopsis invicta*, is increased during colony rafting. *Insectes Sociaux*, 53, 32-36.
- Hancock, R.E., Scott, M.G., 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 8856-8861.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T., 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241, 42-52.
- Harder, J., Schroder, J.M., 2002. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 466779-466784.
- Hoggard S.J., Wilson, P.D., Beattie, A.J., Stow, A.J., 2011. Social complexity and nesting habits are factors in the evolution of antimicrobial defences in wasps. *PLoS One*, 6, e21763
- Holldobler, B., Wilson, E.O., 1990. *The Ants*, Springer-Verlag, Berlin - Germany.

- Howard, R.W., Pérez-Lachaud, G., Lachaud, J.-P., 2001. Cuticular hydrocarbons of *Kapala sulcifacies* (Hymenoptera: Eucharitidae) and its host, the ponerine ant *Ectatomma ruidum* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94, 707-716.
- Jansen, J., Pokorny, T., Schmitt, T., 2015. Disentangling the effect of insemination and ovary development on the cuticular hydrocarbon profile in the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 47, 101-113.
- Jones, T.H., Blum, M.S., Fales, H.M., 1982. Ant venom alkaloids from *Solenopsis* and *Monomorium* species - Recent developments. *Tetrahedron*, 38, 1949-1958.
- Jouvenaz, D.P., Blum, M.S., MacConnell, J.G., 1972. Antibacterial activity of venom alkaloids from the imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2, 291-293.
- Kaib, M., Heinze, J., Ortius, D. 1993. Cuticular hydrocarbon profiles in the slave-making ant *Harpagoxenus sublaevis* and its hosts. *Naturwissenschaften*, 80, 281-285.
- King, G.F., 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Experimental Opinion in Biology*, 11, 1469-1484.
- Koch, M., Vorwerk, S., Masur, C., Sharifi-Sirchi, G., Olivieri, N., Schlaich, N.L., 2006. A role for a flavin-containing mono-oxygenase in resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 47, 629-639.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamprou, I., Mamali, I., Dallas, K., Fertakis, V., Lampropoulou, M., Marmaras, V.J., 2007. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology*, 121, 314-327.
- Lenoir, A., Cuisset, D., Hefetz, A., 2001. Effects of social isolation on hydrocarbon pattern and nestmate recognition in the ant *Aphaenogaster senilis* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 48, 101-109.
- Li, S., Jin, X., Chen, J., 2012. Effects of piperidine and piperidine alkaloids from the venom of red imported fire ants, *Solenopsis invicta* Buren, on *Pythium ultimum* Trow growth in vitro and the application of piperidine alkaloids to control cucumber damping-off in the greenhouse. *Pest Management Science*, 68, 1546-1552.
- Lima, P.R., Brochetto-Braga, M.R., 2003. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 9, 149-162.
- Mandal, M.S.N., Fu, Y., Zhang, S., Ji, W., 2014. Proteomic Analysis of the Defense Response of Wheat to the Powdery Mildew Fungus, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *The Protein Journal*, 33, 513-524.
- Mamali, I., Tatari, M.N., Micheva, I., Lampropoulou, M., Marmaras, V.J., 2007. Apoptosis in medfly hemocytes is regulated during pupariation through FAK Src, ERK, PI-3K p85a and Akt survival signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101, 331-347.
- Mashaly, A.M.A.; Ahmed, A.M.; Al-Khalifa, M.S.; Nunes, T.M.; Morgan, E.D., 2010. Identification of the alkaloidal venoms of some *Monomorium* ants of Saudi Arabia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 875-879.
- Meskali, M., Bonavita-Cougourdan, A., Provost, E., Bagnères, A.-G., Dusticier, G., Clement, J.L., 1995. Mechanism underlying cuticular hydrocarbon homogeneity in the ant *Camponotus*

- vagus* (Scop.) (Hymenoptera: Formicidae): role of postpharyngeal glands. *Journal of Chemical Ecology*, 21, 1127-1148.
- Miranda, C.L., Chung, W., Reed, R.E., Zhao, X., Henderson, M.C., Wang, J.L., Williams, D.E., Buhler, D.R., 1991. Flavin-containing monooxygenase: a major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178, 546-552.
- Monnin, T., Malosse, C., Peeters, C., 1998 Solid-phase microextraction and cuticular hydrocarbon differences related to ovarian activity in the queenless ant *Dinoponera quadriceps*. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 473-490.
- Moore, H.E., Adam, C.D., Drijfhout, F.P., 2014. Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. *Forensic Science International*, 240, 48-53.
- Moreau, S.J., 2013. “It stings a bit but it cleans well”: Venoms of Hymenoptera and their antimicrobial potential. *Journal of Insect Physiology*, 59, 186-204.
- Morgan, D.E.; Jungnickel, H., Keegans, S.J., Nascimento, R.R., Billen, J., Gobin, B., Ito, F., 2003. Comparative survey of abdominal gland secretions of the ant subfamily Ponerinae. *Journal of Insect Physiology*, 29, 95-114.
- Myers, M.R., He, W., Hulme, C., 1997. Inhibitors of tyrosine kinases involved in inflammation and autoimmune disease. *Current Pharmaceutical Design*, 3, 473-502.
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., Vilcinskas, A., 2016. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 371, 20150290.
- Ngai, P.H., Ng, T.B., 2004. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Peptides*, 25, 11-17.
- Nôga, D.A.M.F., Brandão, L.E.M., Cagni, F.C., Silva, D., de Azevedo, D.L.O., Araújo, A., dos Santos, W.F., Miranda, A., da Silva, R.H. & Ribeiro, A.M., 2016. Anticonvulsant Effects of Fractions Isolated from *Dinoponera quadriceps* (Kempt) Ant Venom (Formicidae: Ponerinae). *Toxins*, 9, 5.
- Orivel, J., Redeker, V., Le Caer, J.P., Krier, F., Revol-Junelles, A.M., Longeon, A., Chaffotte, A., Dejean, A., Rossier, J.P., 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 17823-17829.
- Pan, J., Hink, W.F., 2000. Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon*, 38, 1403-1413.
- Pluzhnikov, K.A., Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., Vorontsova, O.V., Feofanov, A.V., Grishin, E.V., 2014. Linear antimicrobial peptides from *Ectatomma quadridens* ant venom. *Biochimie*, 107, 211-215.
- Provost, E., Rivière, G., Roux, M., Bagnères, A.G., Clément, J.L., 1994. Cuticular hydrocarbons whereby *Messor barbarus* ant workers putatively discriminate between monogynous and polygynous colonies. Are workers labeled by queens? *Journal of Chemical Ecology*, 20, 2895-3003.

- Pushpanathan, M., Gunasekaran P., Rajendhran J., 2013. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *International Journal of Peptides*.
- Rashid, T., Chen, J., McLeod, P., 2013. Toxicity of newly isolated piperidine alkaloids from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren, against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Advances in Entomology*, 1, 20-23.
- Rifflet, A., Gavalda, S., Téné, N., Orivel, J., Leprince, J., Guilhaudis, L., Génin, E., Vétillard, A., Treilhou, M., 2012. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides*, 38, 363-370.
- Roberts, S., Goetz, G., White, S., Goetz, F., 2009. Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 11, 24-44.
- Ruther, J., Sieben, S., Schricker, B., 1998. Role of cuticular lipids in nestmate recognition of the European hornet *Vespa crabro* L. (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux*, 45, 169-179.
- Ruther, J., Döring, M., Steiner, S., 2011. Cuticular hydrocarbons as contact sex pheromone in the parasitoid *Dibrachys cavus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 140, 59-68.
- Santos, L.D., Santos, K.S., Pinto, J.R.A., Dias, N.B., Souza, B.M.D., Santos, M.F., Perales, J., Domont, G.B., Castro, F.M., Kalil, J.E., Palma, M.S., 2010. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *Journal of Proteome Research* 9, 3867-3877.
- Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., Sieg, D.J., 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 71, 435-478.
- Schmidt, J.O., 1986. Chemistry, pharmacology and chemical ecology of ant venoms. In: Piek, T. (Eds.), *Venoms of the Hymenoptera, Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Ed. Academic Press, London - England, pp. 425-508.
- Serrels, B., Serrels, A., Brunton, V.G., Holt, M., McLean, G.W., Gray, C.H., Jones, G.E., Frame, M.C., 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nature Cell Biology*, 9, 1046-1056
- Shelby, K.S., 2013. Functional immunomics of the squash bug, *Anasa tristis* (De Geer)(Heteroptera: Coreidae). *Insects*, 4, 712-730.
- Silva, E R.S., Michelutti, K.B., Antonialli-Junior, W.F., Batistote, M., Cardoso, C.A.L., 2016. Chemical signatures in the developmental stages of *Protopolybia exigua*. *Genetics and Molecular Research*, 15, 1-12.
- Smith, A.A., Vanderpool, W., Millar, J.G., Hanks, L.M., Suarez, A.V., 2014. Conserved male-specific cuticular hydrocarbon patterns in the trap-jaw ant *Odontomachus brunneus*. *Chemoecology*, 24, 29-34.
- Sookrung, N., Wong-din-Dam, S., Tungtrongchitr, A., Reamtong, O., Indrawattana, N., Sakolvaree, Y., Visitsunthorn, N., Manuyakorn, W., Chaicumpa, W., 2014. Proteome and allergenome of *Asian wasp*, *Vespa affinis*, venom and IgE reactivity of the venom components. *Journal of Proteome Research*, 13, 1336-1344.
- Steinmetz, I., Schmolz, E., Ruther, J., 2003. Cuticular lipids as trail pheromone in a social wasp. *Proceedings of the Royal Society of London* 270, 385-391.

- Stow, A., Briscoe, D., Gillings, M., Holley, M., Smith, S., Leys, R., Silberbauer, T., Turnbull, C., Beattie, A., 2007. Antimicrobial defences increase with sociality in bees. *Biological Letters* 3, 422-424.
- Téné, N., Bonnafé, E., Berger, F., Rifflet, A., Guilhaudis, L., Ségalas-Milazzo, I., Pipy, B., Coste, A., Leprince, J. & Treilhou, M., 2016. Biochemical and biophysical combined study of bicarinalin, an ant venom antimicrobial peptide. *Peptides*, 79, 103-113.
- Torres, V.O., Sguarizi-Antonio, D., Lima, S.M., da Cunha Andrade, L.H., & Antonialli-Junior, W.F., 2014. Reproductive Status of the social wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology*, 61(2), 218-224.
- Touchard, A., Dejean, A., Escoubas, P., Orivel, J., 2015. Intraspecific variations in the venom peptidome of the ant *Odontomachus haematodus* (Formicidae: Ponerinae) from French Guiana. *Journal of Hymenoptera Research*, 47, 87-101.
- Touchard, A., Aili, S.R., Fox, E.G.P., Escoubas, P., Orivel, J., Nicholson, G.M., Dejean, A., 2016. The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms. *Toxins* 30, 1-28.
- Tsai, I.H., Wang, Y.M., Chen, Y., Tsai, T.S., Tu, M.C., 2004. Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. *Biochemical Society* 223, 215-223.
- Van Den Dool, H., Kratz, P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.
- Viegas Junior, C., Bolzani, V.S., Barreiro, E.J., Young, M.C.M., Furlan, M., Tomazela, D., Eberling, M.N., 2004. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia leptophylla*. *Indian Journal of Natural Products*, 67, 908-910.
- Viegas Junior, C., Bolzani, V.S., Pimentel, L.S.B., Castro, N.G., Cabral, R.F., Costa, R.S., Floyd, C., Rocha, M.S., Young, M.C.M., Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M., 2005. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 4184-4190.
- Weiss, K., Parzefall, C., Herzner, G., 2014. Multifaceted Defense against Antagonistic Microbes in Developing Offspring of the Parasitoid Wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). *PLoS One* 9, e98784.
- Zelezetsky, I., Pagb, U., Antchevaa, N., Sahlb, H.G., Tossia, A., 2005. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434, 358-364.
- Zhu, G.H., Ye, G.Y., Hu, C., Xu, X.H., Li, K., 2006. Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. *Medical and Veterinary Entomology* 20, 438-444.

5. CAPÍTULO - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados mostraram a grande variedade e funções atribuídas aos compostos presentes na peçonha de *E. brunneum*. A peçonha da espécie se mostrou particularmente rica em proteínas atuantes em processos alérgicos, além de apresentar proteínas e peptídeos com atuação sobre a imunidade inata. Aminoácidos também parecem ser comuns a este material glandular, sendo estes, possivelmente, atuantes em processos ofensivos e de defesa. Já os compostos de menor polaridade, aparentam ter atuação principal sobre a comunicação química, no entanto, os alcaloides identificados atuam na potencialização das funções primordiais da peçonha, além de já terem sido descritos como importantes antimicrobianos. A peçonha da espécie também mostrou ser um importante agente citotóxico, com ação sobre a proliferação celular, no entanto, sem atuação mutagênica ou genotóxica.

Os resultados deste estudo acrescentam o conhecimento dos constituintes da peçonha de *E. brunneum*, auxiliando no processo de entendimento da ação do envenenamento, alergenicidade e imunidade inata. A partir de comparação com a literatura, também salientamos a variação da composição da peçonha em função do ambiente.

Finalmente, destacamos o potencial farmacológico deste material glandular, considerando sua ação antimicrobiana de amplo espectro; presença de peptídeos catiônicos anfifílicos bactericidas e alcaloides já descritos na literatura como atuantes contra patógenos e células tumorais; atuação antiproliferativa e; seus resultados negativos para ação genotóxica e mutagênica. Portanto, baseado neste perfil, a peçonha da espécie, possivelmente, é uma importante candidata a fornecer compostos modelo para o desenvolvimento de produtos de atuação farmacológica.