

POLLYANNA PEREIRA SANTOS

**COMPONENTES QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
VENENO DE *Pachycondyla striata* F. SMITH
(FORMICIDAE: PONERINAE)**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237c
2014 Santos, Pollyanna Pereira, 1978-
Componentes químicos e atividade biológica do veneno de
Pachycondyla striata F. Smith (Formicidae Ponerinae) /
Pollyanna Pereira Santos. – Viçosa, MG, 2014.
vii, 70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.62-70.

1. Pachycondyla striata - Veneno. 2. Formiga - Veneno.
3. Espectrometria de massa. 4. Atividade antimicrobiana.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.
II. Título.

CDD 22. ed. 595.796

POLLYANNA PEREIRA SANTOS

**COMPONENTES QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
VENENO DE *Pachycondyla striata* F. SMITH
(FORMICIDAE: PONERINAE)**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Entomologia,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.**

APROVADA: 12 de março de 2014.

Helena Costa

Terezinha Maria Castro Della Lucia

Leandro Licursi de Oliveira

Edmilson Amaral de Souza

José Eduardo Serrão
(Orientador)

Aos meus pais, meu irmão, meu sobrinho, meus familiares e aos amigos pelo incentivo e apoio, em especial a minha mãe Mercedes, meu eterno porto seguro, pelo seu amor incondicional e pela incansável luta na busca de meus objetivos, os quais se tornaram os seus também, dedico.

AGRADECIMENTOS

A UFV (Universidade Federal de Viçosa) e ao Departamento de Entomologia por permitir o meu ingresso em um curso de pós-graduação.

Ao meus orientador José Eduardo Serrão e coorientadores, Maria Cristina Baracat-Pereira e Dihego Oliveira Azevedo, pelo apoio, paciência e pela orientação recebida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Senhor Manoel José Ferreira pelo auxílio e disposição nas coletas de campo.

Ao professor Jacques Hubert Charles Delabie pela identificação das formigas.

Aos professores Alessandra Mussi Ribeiro, Leandro Licursi, Humberto Ramos e Eraldo Lima, pelo apoio, paciência e parceria.

Aos amigos do Laboratório de Ultra Estrutura Celular (UFV), Luiza Carla Martins, Maria do Carmo Fialho, Patrícia Dias Games, Helen Santos, Glenda Dias, Wagner Gonzaga, Maria Aparecida Teixeira, Marilza Costa, Igor Serrão, José Luiz Monteiro, Maria Luiza Fernandes, Debora Linhares, Thaís Rocha, Marcelo Barcellos, Edson Cassinela, Douglas Elias, Alice Camargos, Aline Reis, Waléria Furtado, Milton Ronnau, Kenner Moraes, Luiz Carlos Martinez, André de Souza e Jamile Cossolin, pela amizade, carinho e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (UFV), em especial a Marcos Jorge Magalhães, Lanna Clicia Carrijo, Patrícia Fontes, Dimitrius Santiago, Tarsiane Barbosa, Pedro Furtado e Barbara Karina, pela receptividade, carinho e atenção.

Aos novos amigos do Laboratório de Estudos da Memória (LEME- UFRN), em especial a Diana Aline Nôga, Luiz Eduardo Matheus, Fernanda Cagni e Clarissa Loreiro pela receptividade, carinho e atenção.

Aos amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular (UFV), em especial a Gracielle Rodrigues e Cynthia Valiati, pelo carinho e dedicação.

Aos amigos do Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de insetos (UFV), em especial a Sandra Mara Gomes e Alexandre Fontes, pelo auxílio nos trabalhos de laboratório.

Aos amigos do Núcleo de Análises de Biomoléculas da UFV, em especial a Edvaldo Barros, Nívea Vieira, Larissa Tavares e Nubia Cardoso, por TUDO.

Aos mais que colegas da Entomologia, Luiza Carla Martins, Sabrina Almeida, Paulo Felipe Cristaldo, Carla Arce, Camila Moreira, Juliana Novelli, Matheus Ramos, Daniel Albeny, Cassiano Rosa, Silvia Menezes, Marcelo Pereira, Natalia Maria, Damares Batega e

Rodolfo Molinário, pelo carinho, pelo incentivo nos bastidores e por tornar os dias em Viçosa bem mais agradáveis.

Aos amigos Benoit Jahyny (UNIVASF), Ivan Cardoso (UESB) e Maria Aparecida Macedo (UESC) pelo incentivo constante. A Naiara Bentes, Naiane Maia, Tiago Bentes e Davi Bentes pela receptividade de sempre.

Um agradecimento mais que especial a Patrícia Dias Games, Diana Aline Nôga e Gracielle Rodrigues por abraçar o nosso trabalho com tanto empenho e determinação, meu muitíssimo obrigado.

Aos amigos de todas as gerações, pela compreensão, pelo amor e pela fidelidade.

Aos meus pais Mercedes e Reginaldo, ao meu irmão Rondinelle, ao meu sobrinho Rafael, ao companheiro e confidente Adebayo Jonathan e toda a minha família, pessoas as quais eu AMO de paixão, pelo amor, pela força e incentivo.

A cada Boa Sorte, Bom trabalho, Sucesso, Torço por você, recebidos durante todo esse tempo. Essas palavras foram mais que essenciais.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
Capítulo 1	7
Análise proteômica do veneno de operárias de <i>Pachycondyla striata</i> F. Smith (Formicidae: Ponerinae)	7
Resumo.....	8
Abstract	8
1. Introdução	9
2. Material e Métodos	10
2.1. Preparação das amostras.....	10
2.2. Eletroforese em gel bidimensional	10
2.3. Obtenção e análise das imagens.....	11
2.4. Separação por Cromatografia Líquida de Fase-reversa	11
2.5. Digestão das amostras.....	11
2.6. Análises de espectrometria de massas.....	12
2.6.1. Espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-TOF.....	12
2.7. Identificação das proteínas	13
3. Resultados	13
4. Discussão	22
5. Considerações finais	27
6. Agradecimentos.....	27
Capítulo 2	28
Atividade biológica do veneno de <i>Pachycondyla striata</i> (Formicidae: Ponerinae).....	28
Resumo.....	29

Abstract	29
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	31
2.1. <i>Insetos</i>	31
2.2. <i>Atividade antimicrobiana</i>	31
2.3. <i>Identificação dos compostos do veneno de P. striata</i>	34
2.4. <i>Ensaio neurobiológico</i>	35
3. Resultados	37
3.1. <i>Atividade antimicrobiana</i>	37
3.2. <i>Ensaio neurobiológico</i>	43
4. Discussão	46
5. Considerações finais	49
6. Agradecimentos.....	49
Capítulo 3	50
Composição química do veneno de <i>Pachycondyla striata</i> F. Smith (Formicidae: Ponerinae).....	50
Resumo.....	51
Abstract	51
1. Introdução	52
2. Material e Métodos	53
2.1. <i>Origem dos insetos e preparo dos extratos</i>	53
2.2. <i>Análises químicas</i>	53
3. Resultados	54
4. Discussão	57
5. Considerações finais	59

6. Agradecimentos.....	60
CONSIDERAÇÕES GERAIS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

SANTOS, Pollyanna Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014. **Componentes Químicos e Atividade Biológica do Veneno de *Pachycondyla striata* F. Smith (Formicidae: Ponerinae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadores: Dihego de Oliveira Azevedo e Maria Cristina Baracat-Pereira

O veneno produzido por formigas é um recurso rico em moléculas bioativas com importância farmacológica. O reservatório da glândula de veneno de *Pachycondyla striata* foi analisado quimicamente usando técnicas de eletroforese bidimensional, HPLC e GC, seguido de análises de espectrometria de massas do tipo Maldi-TOF-TOF e ESI-TOF-TOF e técnica de sequenciamento “*de novo*” assistida por software. O veneno de *P. striata* foi composto principalmente por proteínas, peptídeos e hidrocarbonetos. Trinta e oito proteínas/peptídeos e 48 compostos não-proteicos, foram encontrados compondo o veneno de *P. striata*. Entre as proteínas identificadas estão proteínas clássicas de veneno (fosfolipase A, hialuronidase e aminopeptidase N), proteínas alergênicas (diferentes alérgenos de veneno) e peptídeos com atividade biológica comprovada (buforina, dinoponeratoxina Da- 1837, U10- ctenitoxina Pn1a e sarafotoxina). Entre os compostos não-proteicos, estão principalmente os hidrocarbonetos de cadeia longa (C19-C36). A atividade antimicrobiana do veneno foi testada e para isso o veneno foi purificado em HPLC por fase-reversa e por troca iônica. Cinco frações oriundas do fracionamento por fase reversa apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, mas apenas a proteína analgesina 2, com atividade antimicrobiana comprovada, foi identificada em uma das frações. Para avaliar a atividade neurobiológica e anticonvulsivante do veneno, o veneno bruto e desnaturado de *P. striata* em diferentes concentrações (25, 100 e 250 mg/mL) foi injetado intracerebroventricular em camundongos e o comportamento dos camundongos avaliado. Diferenças significativas foram observadas nos comportamentos de imobilidade e exploração dos camundongos tratados com veneno bruto na concentração de 250 mg/mL. Entretanto o veneno de *P. striata* foi pouco eficiente como anticonvulsivo.

ABSTRACT

SANTOS, Pollyanna Pereira. D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, March, 2014. **Chemical Components and Biological Activity of Venom *Pachycondyla striata* F. Smith (Formicidae: Ponerinae)**. Adviser: José Eduardo Serrão. Co-Advisers: Dihego de Oliveira Azevedo and Maria Cristina Baracat-Pereira

The venom produced by ants has been reported as a rich source of bioactive molecules with possible pharmacological importance. The reservoir of the venom gland of *Pachycondyla striata* was chemically analyzed with two-dimensional electrophoresis, HPLC and GC, followed by mass spectrometry analyses of the type Maldi-TOF-TOF and ESI-TOF-TOF and "de novo" sequencing assisted by software. The venom was composed primarily for proteins, peptides and hydrocarbons. Thirty-eight proteins/peptides and 48 non-protein compounds were found in the venom of *P. striata*. Whithin the identified proteins there are classic proteins from venom (phospholipase A, hyaluronidase and aminopeptidase N), allergenic proteins (allergens of venom) and peptides with biological activity (buforin, dinoponeratoxin Da-1837, U10-ctenitoxin Pn1a and sarafotoxin). Mainly long chain hydrocarbons (C19 - C36) were found among non-protein compounds. The antimicrobial activity of the venom was tested from venom purified by reversed-phase and ion exchange HPLC. Five fractions derived from the fractionation by reverse phase showed high antimicrobial activity against gram-positive and gram –negative bacteria, but only analgesine 2, with reported antimicrobial activity, was identified in one of the fractions. To assess the neurobiological and anticonvulsant activity of the venom, the crude and denatured venom of *P. striata* in different concentrations (25, 100 and 250 mg / mL) was injected intracerebroventricularly in the mice and the behavior of the mice were evaluated. Significant differences were found in the immobility and exploration behaviors of the mice treated with crude venom concentration of 250 mg/mL. The venom of *P. striata* was ineffective as an anticonvulsant agent.

INTRODUÇÃO

A evolução do aparato de ferrão e das secreções venenosas, como meio de defesa ou de predação, é uma conquista biológica importante entre os animais. O veneno no reino animal pode ser amplamente definido como uma secreção produzida por glândulas especializadas que, quando injetada em um organismo alvo, é capaz de alterar ou interromper processos fisiológicos ou bioquímicos normais, de modo a facilitar a alimentação ou a defesa do animal que o produziu (Casewell et al, 2013).

No reino animal, o veneno tem várias funções, e entre as principais estão a defesa contra predadores e a captura de presas. Muitos dos venenos das mais diversas espécies animais são misturas complexas de componentes bioativos, os quais proteínas e peptídeos (comumente referidas como toxinas), sais e componentes orgânicos como aminoácidos e neurotransmissores, sendo que na maioria das espécies venenosas, os componentes proteicos são normalmente os mais abundantes (Casewell et al, 2013).

O veneno surgiu em diferentes momentos e linhagens da história evolutiva (Casewell et al, 2013), e atualmente está limitado a alguns grupos animais (Escoubas et al, 2008). Nos vertebrados, é possível ser encontrado em algumas espécies de répteis como serpentes e lagartos, e em algumas espécies de peixes e mamíferos. Nos invertebrados, estão presentes em espécies de cnidários, algumas famílias de moluscos, e em diversas espécies de artrópodes (Escoubas et al, 2008).

Entre os invertebrados, diferentes organismos apresentam aparatos de veneno tanto quanto ou até mais eficientes que os encontrados em algumas espécies de vertebrados. É o caso de aranhas, escorpiões e alguns insetos, particularmente os Hymenoptera (Escoubas et al, 2008).

Nos himenópteros, o aparato de veneno é originado a partir de modificações do ovipositor de fêmeas dos não-aculeato (Grimaldi & Engel, 2005). O aparato do ferrão e, em especial, as suas secreções venenosas estão entre as principais conquistas biológicas desse grupo de insetos.

Localizado na região terminal do abdome, o aparato de ferrão é similar entre os himenópteros (abelhas, vespas e formigas) (Figura 1). Na formiga *Pachycondyla striata*, F. Smith (1858) o aparato de ferrão é composto por: ferrão propriamente dito; um reservatório em forma de saco que armazena o veneno, uma porção secretora formada por uma glândula tubular filamentosa que se bifurca (glândula de veneno) e uma porção secretora interna ao

reservatório que representa a glândula convoluta (Ortiz e Camargo-Mathias, 2006). Associado ao aparato de ferrão dos himenópteros também está a glândula de Dufour (Figura 1).

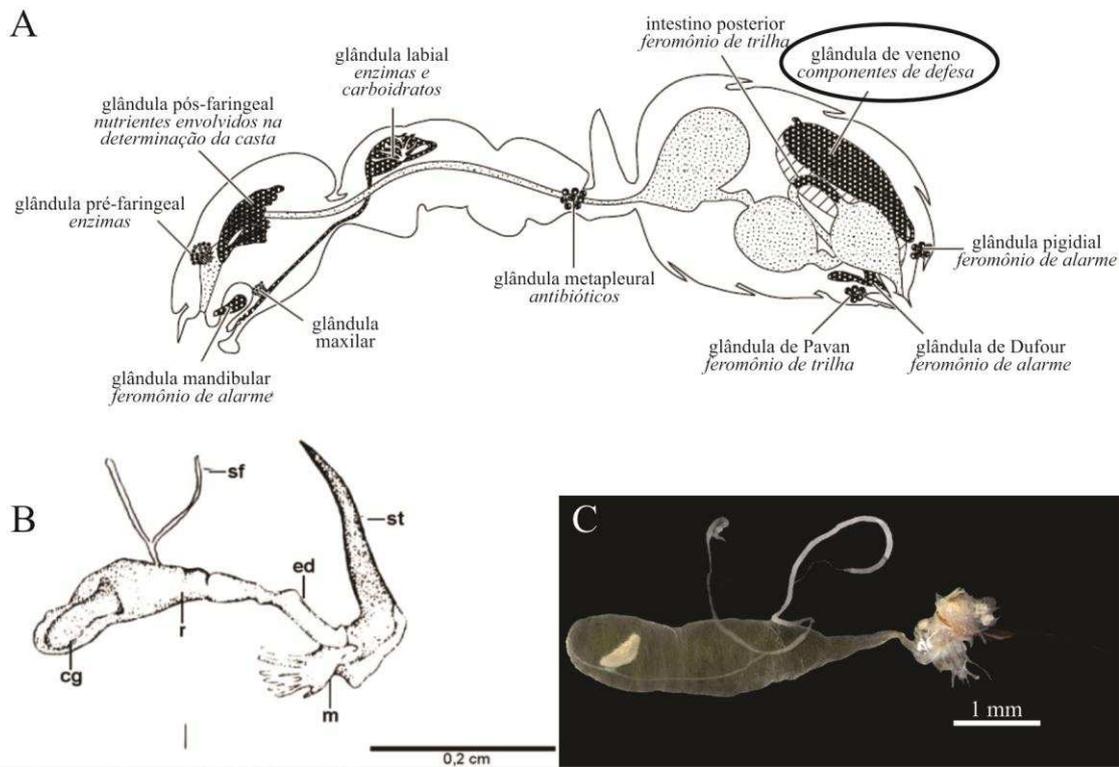


Figura 1: (A) Representação esquemática das glândulas exócrinas de operárias de formigas, em destaque a localização do aparato de ferrão. Fonte: Chapman, 2009. (B) Representação esquemática do aparato do ferrão de *Pachycondyla striata*, onde (sf) filamento secretório (glândula de veneno), (cg) glândula convoluta, (r) reservatório da glândula, (ed) ductor excretor, (st) ferrão e (m) musculatura associada. Fonte: Ortiz & Camargo-Mathias, 2006. (C) Aparato de veneno de *P. striata*. Foto: Maria Luiza Fernandes

Nas formigas em especial, o veneno tem três funções principais: a defesa contra predadores, a captura de presas e a comunicação social (Orievél & Dejean, 2001). Nas espécies de formigas mais semelhantes ao ancestral, como nos representantes de Ponerinae, o ferrão é bem desenvolvido e perfeitamente adaptado para a predação, enquanto nas formigas derivadas como Aneuretinae, Dolichoderinae e Formicinae, o ferrão sofreu vários graus de redução e em algumas espécies é atrofiado (Hölldobler e Wilson, 1990).

O veneno nas formigas, assim como nos outros Hymenoptera, é uma mistura complexa de proteínas, peptídeos policatiônicos, alcaloides e compostos de baixa massa

molecular. As proteínas com massa molecular entre 10 e 50 kDa estão entre os maiores alérgenos dos venenos dos himenópteros, com destaque para fosfolipases A e B, hialuronidase e serinoproteases. Os peptídeos presentes no veneno dos himenópteros sociais apresentam massa molecular entre 1,4 a 7 kDa e correspondem a cerca de 70% do peso seco do veneno. Além das proteínas/peptídeos, as aminas bioativas como histaminas, serotonina e octopamina estão presentes no veneno (Santos et al, 2011).

Entre os himenópteros, as formigas são os representantes que apresentam o veneno menos estudado em comparação com abelhas e vespas. As espécies de formigas com o veneno melhor caracterizado são as formigas de fogo *Solenopsis invicta* e *S. saevissima* (Santos et al, 2011).

Ponerinae está entre as subfamílias de formigas com o veneno menos estudado. As Ponerinae estão distribuídas por todo o mundo, porém, são mais abundantes nas regiões tropicais, sendo geralmente predadoras e com ferrão funcional (Mackay & Mackay, 2010).

Dentre as Ponerinae está o gênero *Pachycondyla*, um dos mais diversos entre os Formicidae, incluindo cerca de 250 espécies das 15000 espécies de formigas descritas atualmente no mundo (Antweb 2014). No Brasil, existem aproximadamente 50 espécies do gênero (Mackay & Mackay, 2010), dentre as quais *Pachycondyla striata* (Figura 2) aparece como uma espécie comum nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. *Pachycondyla striata* é endêmica da América do Sul, e além das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, também é encontrada na Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia (Mackay & Mackay, 2010).



Figura 2: Operária de *Pachycondyla striata*, Formicidae, Ponerinae, Ponerini. Foto: Alexander Wild.

Pachycondyla striata é uma formiga relativamente grande, predadora, que exibe mandíbulas e aparato do ferrão bem desenvolvidos. Apresenta hábito diurno, ninhos simples e pouco elaborados, com câmaras e túneis horizontais distribuídos próximos a superfície do

solo (Silva-Melo & Giannotti, 2010). É uma espécie poliginica, apresentando mais de uma rainha por colônia (Rodrigues et al, 2011)

Pachycondyla striata compartilha com *Pachycondyla harpax* um comportamento diferenciado em que ambas as espécies produzem uma substância espumosa a partir da região terminal da gáster, como um mecanismo de defesa das espécies (Figura 3). Essas formigas expelem veneno na forma de espuma (Mackay & Mackay, 2010), comportamento também observado por Maschwitz et al (1981) nas espécies *Pachycondyla tridentada* e *Pachycondyla insularis*. Acidentes com *P. striata* não são comumente relatados. Poucos trabalhos vêm sendo realizados atualmente com esta espécie e muito pouco se conhece acerca do veneno e das propriedades farmacológicas do veneno desta espécie.



Figura 3: Operárias de *Pachycondyla striata*, evidenciando a eliminação da secreção espumosa (veneno).

Este trabalho teve como objetivos identificar os componentes químicos e avaliar a atividade biológica do veneno de *P. striata*.

Nos capítulos 1 e 3 desta tese foram identificados, respectivamente, os compostos proteicos e não-proteicos do veneno, e a possível atividade desenvolvida pelos compostos identificados é discutida. No capítulo 2 foram avaliados a atividade biológica contra bactérias de importância médica, o efeito neurológico e a atividade anticonvulsivante do veneno.

Capítulo 1

**Análise proteômica do veneno de operárias de *Pachycondyla striata* F.
Smith (Formicidae: Ponerinae)**

Resumo

As operárias das espécies sociais usam seu veneno na captura de presas e na defesa da colônia. Este trabalho identificou as proteínas / peptídeos presentes no veneno de operárias de *Pachycondyla striata*. O veneno foi separado por eletroforese em gel bidimensional e por técnicas de HPLC, seguido por espectrometria de massa do tipo MALDI - TOF - TOF e ESI - TOF - TOF e técnicas de sequenciamento *de novo* auxiliadas pelos softwares BioTools 3.2 e Peaks 7.0 . O veneno de *P. striata* apresenta uma mistura complexa de proteínas, das quais 38 proteínas foram identificadas neste trabalho. Entre as proteínas identificadas estão proteínas clássicas de veneno (Fosfolipase A, hialuronidase e aminopeptidase N), proteínas alergênicas (diferentes alérgenos de veneno) e peptídeos com atividade biológica comprovada (Buforina , Dinoponeratoxina Da- 1837, U10- ctenitoxina Pn1a e sarafotoxina), entre outros. As possíveis funções das proteínas identificadas no veneno de *P. striata* são discutidas.

Palavras-chave: proteínas, peptídeos, MALDI-TOF-TOF, ESI-TOF-TOF

Abstract

In the social species of insects, the workers use their venom for prey capture and colony defense. This work identified the proteins / peptides present in the venom of workers of *Pachycondyla striata*. The venom was separated by two-dimensional gel electrophoresis and by HPLC, followed by mass spectrometry techniques MALDI-TOF-TOF and ESI-TOF-TOF and new sequencing techniques with BioTools and Peaks 7.0 software. The venom of *P. striata* showed a complex protein mixture of which 33 proteins were identified. Among the proteins found there are classic venom proteins (Venom phospholipase A1 2, partial, Basic phospholipase A2 (Fragment), Hyaluronidase and aminopeptidase N), allergenic proteins (allergen Venom) and peptides with proven biological activity (Buforin-EC, Dinoponeratoxin Da-1837,U10-ctenitoxin Pn1a, and Full-sarafotoxin) among others. The possible functions of the proteins identified in the venom of *P. striata* are discussed.

Keywords: Proteins; Peptides, MALDI-TOF-TOF, ESI-TOF-TOF

1. Introdução

O veneno das abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera) é uma mistura complexa de componentes que inclui hidrocarbonetos, ácido fórmico, proteínas, peptídeos e outros compostos bioativos (Santos et al, 2011).

Nas últimas décadas, substâncias que exibem uma variedade de efeitos fisiológicos, têm sido isoladas a partir do veneno de diferentes espécies de formigas. Moléculas com função neurotóxica (Piek et al, 1991; Pluzhnikov et al, 1999), peptídeos antimicrobianos (Orivel et al, 2001; Zelezetsky et al, 2004) e peptídeos envolvidos no processo de necrose celular (Pinto et al, 2012) têm sido identificados.

Apesar de alguns dos componentes do veneno das formigas terem sido isolados e caracterizados (Orivel, et al 2001; Morgan et al 2003; Szolajska et al 2004; Wiese et al 2006), ainda são escassos os conhecimentos acerca da sua composição, propriedades químicas e farmacológicas, e do envolvimento deles com o comportamento das espécies.

O veneno das formigas foi estudado em apenas alguns representantes de Myrmicinae, Ponerinae, Ectatomminae, Pseudomyrmecinae e Formicinae, mostrando que a composição química varia entre as subfamílias (Lima & Brochetto-Braga, 2003). De forma geral, representantes de Ponerinae, Myrmicinae, Pseudomyrmecinae e Ectatomminae, têm veneno rico em peptídeos e proteínas (Palma, 2006), enquanto nos Formicinae o veneno é composto principalmente por alcaloides (Santos et al, 2011).

De modo geral, as proteínas hialuronidase, fosfolipase e serinoproteases têm sido com frequência encontrada no veneno de diferentes espécies de formigas (Lewis et al, 1968; Lima & Brochetto-Braga, 2003; Pinto et al, 2012). Nas espécies com veneno predominantemente proteico, os peptídeos estão entre os principais compostos (Santos et al, 2011).

Em Ponerinae, estudos da composição proteica do veneno foram realizados em *Pachycondyla insularis* (Maschwitz et al, 1981), *Dinoponera grandis* (Leluk et al, 1989), *Odontoponera transversa* (Leluk et al, 1989), *Paraponera clavata* (Zaitseva et al, 1995) e *Dinoponera australis* (Johnson et al, 2010).

O gênero *Pachycondyla* (Formicidae: Ponerinae) é um dos mais diversos entre os Formicidae, incluindo cerca de 250 espécies das 15000 espécies de formigas descritas atualmente no mundo (Antweb 2014). No Brasil, existem aproximadamente 50 espécies (Mackay & Mackay, 2010), dentre as quais *Pachycondyla striata* F. Smith (1858) é considerada uma espécie comum nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. *Pachycondyla striata* é

endêmica da América do Sul, e além das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, também é encontrada na Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia (Mackay & Mackay, 2010).

Pachycondyla striata é uma formiga predadora, que exhibe mandíbulas e aparato do ferrão bem desenvolvido. Em relação ao aparato do ferrão de *P. striata*, Ortiz e Camargo-Mathias, (2006) descreveram a morfologia da glândula de veneno, assim como Morgan (2003) identificou os voláteis a partir das glândulas de veneno e de Dufour.

Neste trabalho, nós descrevemos pela primeira vez, o perfil proteico do veneno de *P. striata*.

2. Material e Métodos

2.1. Preparação das amostras

Três colônias de *P. striata* foram coletadas na Mata da Biologia (20°48'S 42°51'W), fragmento florestal do município de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil. Cerca de 60 operárias das diferentes colônias da espécie em estudo, foram crio-anestesiadas, dissecadas e o reservatório das glândulas de veneno extraídos e colocados em solução aquosa de coquetel de inibidores de proteases a 10% (Sigma P2714). O sobrenadante foi coletado após centrifugação à 12.000 rpm por 10 minutos. A concentração de proteínas totais presentes no veneno foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (Smith 1985), usando albumina de soro bovino como padrão.

2.2. Eletroforese bidimensional em gel

Fitas Immobiline DryStrip, 7cm, pH 3-10 (GE Healthcare) foram reidratadas por 10 h com 125 µL de solução de reidratação. A solução de reidratação foi composta de 80 µg de proteína, tampão de gradiente imobilizado de pH 3 a 10 (IPG) 2% (v/v), ditioneitol (DTT) 40mM e solução Destreak (GE-Healthcare). A focalização isoeletrica foi realizada em equipamento IPGphor Ettan III, com modo linear de voltagem (300 V por 12h; 1000 V por 30min; 5000 V por 2h; 5000 V por 1h e 200 V por 1h).

Após a focalização, as fitas Immobiline DryStrip pH 3-10 foram equilibradas em solução de equilíbrio (ureia 6M; Tris-HCl 75mM pH 8,8; glicerol 29%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,002%) contendo em tempos diferentes, DTT 1% e iodoacetamida 2,5%, sob agitação a 15min cada.

A segunda dimensão foi realizada em cuba de eletroforese vertical da Mini Protean II (Bio Rad), em gel de poliacrilamida 14%, sob corrente elétrica de 80W por 2 horas em média.

Os géis foram corados com solução de Comassie Blue coloidal por 36 h e armazenados em solução de ácido acético a 5%.

2.3. Obtenção e análise das imagens

A digitalização do gel foi realizada em equipamento Image Scanner III (GE-Healthcare) em modo de transparência 16 bit nas cores vermelha-azul e verde-azul e 600 dpi de resolução. As imagens foram analisadas utilizando o programa Image Master Platinum v.7 (GE Healthcare).

2.4. Separação por Cromatografia Líquida de Fase-reversa

Cem microlitros do veneno bruto contendo 200 µg de proteínas foram injetados em uma coluna C₁₈ de fase-reversa. A separação cromatográfica foi realizada com fluxo de 1 mL/min. A eluição dos peptídeos foi monitorada na faixa de absorvância de 220 e 280 nm em sistema HPLC. Como solvente A foi utilizado uma solução aquosa de 0,1% de ácido trifluoroacético, e como solvente B uma solução de 80% acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético. O veneno foi separado em 120 frações com gradiente linear de 5-95% de B por 65 minutos. As frações foram coletadas a cada 30 segundos entre os tempos 5-65 minutos.

2.5. Digestão das amostras

Os “spots” obtidos a partir dos géis bidimensionais foram excisados e colocados em solução de acetonitrila 100%, e incubados, sequencialmente, em solução de DTT 10 mM por 30 min a 56 °C e em solução de iodoacetamida 55 mM por 20 min, seguido de lavagem em acetonitrila.

Os fragmentos dos géis foram tratados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM contendo enzima tripsina (Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin®), numa concentração de 25 ng/µL, e incubados à 37 °C por 16 h. A extração dos peptídeos dos fragmentos dos géis foi realizada pela adição de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. O extrato obtido foi liofilizado em SpeedVac® e ressuspendido em 10 µL de ácido trifluoroacético 0,1%. As amostras foram dessalinizadas utilizando ponteiras ZipTip com resina C₁₈ (Pipette Tips for Sample Preparation- Millipore) de acordo com as instruções do fabricante, e secas a vácuo. Ao concentrado obtido foi adicionada a matriz (5mg/mL Matriz Universal MALDI- Fluka mistura 1:1 DHB e α-ciano-4-hidroxi-cinamico) preparada em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 3%, e analisadas por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization time-of-flight).

Nas análises de espectrometria de massa ESI- TOF/TOF (Electrospray ionization-time-of-flight) e na digestão das amostras oriundas do fracionamento por HPLC fase-reversa, foi realizada a digestão em solução das amostras. Uma alíquota do veneno bruto contendo 50 µg de proteínas e as frações da fase-reversa previamente secas em SpeedVac, foram solubilizadas em bicarbonato de amônio 50 mM e reduzidas em solução DDT 200 mM a 100 °C por 10 min, seguido de repouso por 1 h em temperatura ambiente. Após esse procedimento, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida a 100 mM por 30 min em temperatura ambiente, no escuro. Para neutralizar o processo de alquilação, foram adicionados 10 µL de DDT 200 mM na amostra por 45 min à temperatura ambiente, no escuro. Tripsina não-autolítica foi adicionada a amostra proteica (1:50 tripsina:proteína do veneno) por 18 h a 37 °C. A solução final foi concentrada a vácuo e dessalinizada utilizando ponteiros ZipTip com resina C₁₈. Os peptídeos foram ressuspensos em solução de ácido fórmico 0,1%.

2.6. Análises de espectrometria de massas

2.6.1. Espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-TOF

Alíquotas das amostras obtidas a partir da digestão triptica dos géis e do fracionamento por fase-reversa foram aplicadas em placa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF (Bruker Daltonics) e submetidas a análises de MALDI-TOF-TOF em aparelho ULTRAFLEX III (Bruker Daltonics).

O método de análise para MS foi LPPepMix (500 a 5.000 Da) que corresponde ao modo de detecção linear para íons com polaridade positiva, e o método de análise para MS/MS foi LIFT (40 a 1.878 Da). Os espectros obtidos foram editados com o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

2.6.2. Espectrometria de massas do tipo ESI-TOF-TOF

Alíquotas de 30 µL contendo 1µg de proteína foram separadas por cromatografia líquida de fase reversa em sistema HPLC (Shimadzu) acoplada ao espectrômetro de massas do tipo Q-TOF (Bruker Daltonics) equipado com fonte de ionização do tipo microeletrospray. O cromatógrafo teve um fluxo total de 100 µL/min, na faixa de detecção de luz UV de 200 a 280 nm, com temperatura de 35 °C na coluna. O espectro foi obtido numa faixa de detecção de 50 a 3000 m/z e em modo positivo. Nos experimentos de MS/MS, os íons com maior intensidade foram isolados como íon percussor e ativados com energia de colisão 10 eV, e o gás argônio foi utilizado como gás de colisão.

2.7. Identificação das proteínas

Os espectros de massas obtidos do MALDI-TOF-TOF foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics) para a remoção de contaminantes e obtenção da lista de massas que foi submetida a identificação pelo software de identificação de proteínas MASCOT (Matrix Science Ltd, Uk; Peptide Mass Fingerprint- PMF e MS/MS Ion Search).

Na identificação das proteínas oriundas do MALDI-TOF-TOF e ESI-TOF-TOF foram utilizadas as sequências proteicas depositadas no NCBIInr e no Swissprot, disponíveis publicamente, aos níveis de 0.5 e 0.1 kDa e 50 ppm de erro. Reações de carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina foram utilizadas como modificações fixas e variáveis, respectivamente. Metazoa (Animais) foi selecionado como táxon para entrada nos bancos de dados. Resultado significativo foi considerado quando o Score da proteína sugerida foi superior ao Score calculado pelo software MASCOT, assumindo $p < 0.05$ e $p < 0.01$.

Os espectros de MS/MS oriundos do MALDI-TOF-TOF também foram submetidos ao programa de sequenciamento *de novo* BioTools 3.2 (Bruker Daltonics), e os oriundos do ESI-TOF-TOF ao PEAKS Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc). As sequências proteicas sugeridas por estes programas foram submetidas ao banco de pesquisa MS Blast (<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>). Resultados positivos sugeridos pelo MS Blast, e oriundos do banco de dados de formigas ou de veneno animal foram aceitos como identificação positiva.

3. Resultados

O veneno de *P. striata* apresentou uma complexa mistura proteica, com massas moleculares que variaram no gel entre 3,8 a 138,7 kDa e ponto isoelétrico entre 3,27 a 9,69 (Figura 1).

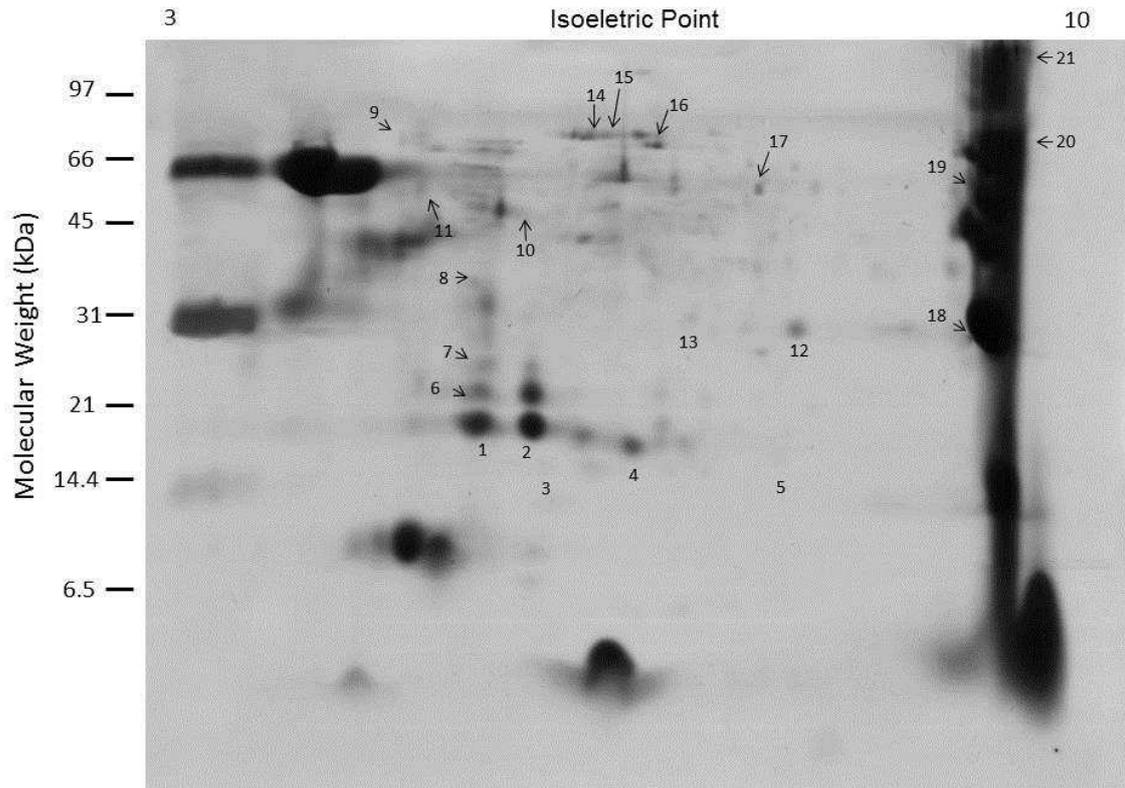


Figura 1: Gel bidimensional (14%) do veneno da formiga *Pachycondyla striata*, mostrando as proteínas identificadas em MALDI-TOF/TOF (números) apresentados na Tabela 1.

As análises do gel 2D evidenciaram a presença de 145 “spots” sendo que 21 deles foram passíveis de identificação, sendo seis por Peptide Mass Fingerprinting (PMF) (“Spots” 1, 7, 10, 11, 13, 14), quatro por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) (“Spots” 4, 15, 17, 19) e 11 por sequenciamento *de novo* (“Spots” 2,3, 5, 6, 8, 9, 12, 16, 18, 20, 21). Os resultados das identificações dos peptídeos trípticos a partir do MALDI-TOF-TOF estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Proteínas identificadas do veneno de *Pachycondyla striata* utilizando análise em MALDI-TOF-TOF.

Spot	Código de acesso	Proteína	Organismo	Linhagem taxonômica	MM/pI Esperado	MM/pI Calculado	Sequência peptídica/ Score
1	E2BW78	Citocromo P450 6d1 (a)	<i>Harpegnathos saltator</i>	Hymenoptera: Formicidae	16,7/9.5	19,6/5,5	VGYDYLSPLLLIIEPGLV K LTYAFS SMRLK VELELKSLF SR (41)
2	E2B8I3	Proteína Predita EAI_11644 (c)	<i>Harpegnathos saltator</i>	Hymenoptera: Formicidae	18,5/	19,4/ 5,88	BEDGEDEGSRBSSLEEEGSRBWLSGHTPDGEP YVRBWLSGHTPDWPYVRBGFNGRSSHZLSG WGSZSRBGADGMLYHGGETNYNPZBCASRDG PGDLTGSTLLLDGDGVSRCASRDGPGDLTG STLLLDGDGVS (83)
3	EFN73161.1	Proteína KIAA1881 (c)	<i>Camponotus floridanus</i>	Hymenoptera: Formicidae	39,4/	16,2/ 5,9	BGFNGWGSZLSGWGNTRBGFNGWGSZLS GWGZSRBGFNGWGSZLSGWGZSRBGFNG WGSZLSGWGZSRBGFNGWGSZLSGWGNTR BGTCZGWGSZLSGWGZSR (32)
4	gi307210585	Aminopeptidase N (b, d)	<i>Harpegnathos saltator</i>	Hymenoptera: Formicidae	9,6/	8,7/ 5,7	QAPEIFEALDKLLPDNTYR (22)
5	EFN85078.1	Proteína Predita EAI_14873, parcial (c)	<i>Harpegnathos saltator</i>	Hymenoptera: Formicidae	15,9/	16,8/ 7,6	BGFNGWGNTLVGWGZSRBGFNGWGNTLVGWGZSRBGFNGWGSZLVGWGZSRBGTCTZ GWGNTLVGWGZSR- BGTCZGWGNTLVGWGZSRBGTCTZGWGSZLV GWGZSR (31)
6	Q6RY98.1	Sarafotoxina (c)	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Squamata: Atractaspididae	40,3/	22,8/ 5,5	BWPDPWYSTPLPVRBZFGGWGSZLSGWGZ DZBCASAGGWGSZLSGWGZDZBCASAGGWG SZLSGWGNEZBCASAGGWGSZLSGWANDZB PVCHNLDVLWNEZFLZAGRBPVCHNLDVLW NEZFLZAGRBPVCHNLDVLWNEZFLZAGRBP VCHNLDVLWNEZFLZAGR (43)
7	gi442622576	Serpina 42Db, isoforma D (a)	<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptera: Drosophilidae	32,4/ 5.1	25,2/ 5.5	MKDEEFAQGLEQFALCLHDHLCRASAGLNII YSPLSIHISAAMLRMGTSEGSATAKEMDEGLR FGGLEAQQVAESFGVVLKSYEQCVLKMANG LYVMKGLQVDEQFGHILEQKFRSKPMEIDF GSEQAASIINKWVESQTNNLIKDIIGPRVLT KD SRLCLVNGIHFKGEWSISFNEKETREEDFFGS DRPTRVRRMMHVCENFFFAVLPMFEATALRM NYSACNLAMIILLPDEKSNLT (61)

Tabela 1 – Continuação

8	EFN77734. 1	Proteína Predita EAI_14962 9 (c)	<i>Harpegnathos saltator</i>	Hymenoptera: Formicidae	10,6/ 9.68	35,1/ 5.4	QAPPPPVLVTTSPSTRIIRQSSQPEASACCCSG CCCPLHTGAAPSAASLRQLREPGDGIAGIAAD SLRINGGIRQFRQRQFQNAGSQEARTQLSLRL R (18)
9	gi 307200884	Proteína Predita EAI_04710 (c)	<i>Harpegnathos saltator</i>	Hymenoptera: Formicidae	3,11/	75,6/4.9	RREFVEWIMEQQQVNADFSNKIIFS (32)
10	gi 41053477	Proteína transmembrana 170A (a)	<i>Danio rerio</i>	Cypriniformes: Cyprinidae	14,8/ 9.7	45,5/ 5.8	MQDVQIGFVKQILSLNLVPRVARFFPLGILLM GIIGPLFGGVLTSAIAGVYKAAGKSMFSLEA LVFGVGQSLFIFIISFLRILATL (79)
11	gi 343459187	Proteína anticongelamento Tipo IV (a)	<i>Epinephelus bruneus</i>	Perciformes: Serranidae	13,5/ 4.8	55,1/ 5.0	FSLIVAAAMLALAQAAPSPDGIQFHLKQIGDK VVEALTEITQNNNLTDAQAYTLGQGSK (82)
12	E9IV13	Proteína Predita SINV_05542 (c)	<i>Solenopsis invicta</i>	Hymenoptera: Formicidae	21,2/ 9.3	28,8/ 7.8	GVGKSSLLLRFADNTFNNGSYITTIGVDFKIQTV EVDGERVKLQIWDTAGQERFRTITSTYYRGT HGVIIVYDVTSGDTFANVKRWLHEIEQNCDV VNRVLVGNKNDAPNQKVVLTEDAQRFAQ MGIQLFETSAKDNINVEEMFMAITRQVLRTK KERKERQAIQTNETVNLKSTKQHRKKCC (44)
13	gi 291236909	Predita: 11-beta- hidroxiesteroide dehidrogenase tipo 3 (a)	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemichordata: Harrimaniidae	33,2/ 6.31	30,4/ 7.0	KCLDLGAQSAHYISLDMQVINETGKLQALMN LQALMNTKALPMLSKSNGSIVVSSGAGLFC MPAAISYCASKLELNYMEIDVHVTLILLIGAVA TDHAIDILK TPEIMHTISRDLDFVSSK (82)
14	TX35A_PHONI	U10-ctenitoxina-Pn1a (Fragmento) (a)	<i>Phoneutria nigriventer</i>	Araneae: Ctenidae	9,3/ 5.2	78,9/ 6.4	EDRNGCCRLYTCNCWYPTPGDQWCKCQLW (66)
15	WNT7A_AOTTR	Proteína Wnt-7 ^a (b)	<i>Aotus trivirgatus</i>	Primates: Aotidae	39,0/	79,6/ 6.6	CLGHLFSLGMVYLR (26)
16	gi 307179239	Proteína Predita EAG_02996 (c)	<i>Camponotus floridanus</i>	Hymenoptera: Formicidae	13,0/ 7.1	72,5/ 6.8	YDIIVEHYQNYTVLSNKPQIEGIETNDKNMTK THLHSLVKPIYLLFLANRNNFSLMRGTNESIR VNMWCRMHCEFAHQFAENITSCCLFDKWKRL NQTCEINHIALPDF (57)
17	WNT7A_AOTTR	Proteína Wnt-7 ^a (b)	<i>Aotus trivirgatus</i>	Primates: Aotidae	39,0/	54,4/ 7.5	CLGHLFSLGMVYLR (22)

Os espectros de MS/MS oriundos das frações do veneno em sistema HPLC de fase-reversa quando submetidas ao programa de sequenciamento *de novo* Biotools, permitiram a identificação de cinco proteínas (Tabela 2). Foram identificadas por esta metodologia as proteínas Cinesina, a partir da espécie *Trypanosoma brucei brucei* (Euglenozoa: Trypanosomatidae), um alérgeno de veneno a partir de outra espécie de formiga, a *Pachycondyla chinensis* (Hymenoptera: Formicidae), a proteína analgesina 2, a partir da espécie *Hyla simplex* (Anura: Hylidae), uma proteína predita pertencente a família das proteínas inibidoras dos canais de potássio, descrita a partir da espécie *Chroococcidiopsis thermalis* (Bactéria: Cyanobactéria) e uma proteína hipotética, a partir da formiga *Harpagathos saltator* (Hymenoptera: Formicidae).

Tabela 2: Proteína identificada no veneno de *Pachycondyla striata*, utilizando técnica de fracionamento por Cromatografia de fase reversa em HPLC e análises em Maldi-TOF-TOF. As proteínas foram identificadas por sequenciamento “*de novo*”, assistido pelo software Biotools, versão 3.2.

Código de acesso	Proteína	Organismo	Linhagem Taxonômica	Sequência peptídica
XP_822347	Quinesina	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Euglenozoa: Trypanosomatidae	BMLDPMALVNELAATLZRBMLD PMALVNELAATLZRBMLDPMAL VNELAATLZRBMLDPMALVNELA ATLZRBMLDPMALVNELAATLZR BMLDPMALVNELAATLZRBMLD PMALVNELAATLZRBMLDNDMAL VNELAATLZR (39)
C0ITL3	Alérgeno de veneno	<i>Pachycondyla chinensis</i>	Hymenoptera: Formicidae	BMPDLLWDNELATLAZRBMPDLL WDNELATLAZRBMPDLLWDNEL ATLAZRBMPDLLWDNELATLAZR BMPDLLWDNELATLAZR (97)
AEJ35091.1	Analgesin 2	<i>Hyla simplex</i>	Anura: Hylidae	BFLPFGRBFLPFGRBFLPFGRBFLP GFRBLPZGGHZBLPZGGHZBPLZG GHZ (36)
YP_007092 215	Proteína da família das proteínas inibidoras dos canais de potássio	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	Bactéria: Cyanobacteria	BLGLSGLLSGLALGSHZBLGLSGL LSGLALGSHZBLGLSGLLSGLALG SHZBLGLSGLLSGLALGSHZBLGL SGLLSGLALGSHZ (57)
EFN85113	Proteína hipotética	<i>Harpagathos saltator</i>	Hymenoptera: Formicidae	BZLFALSACLASLSLLZBZLFALSA CLASLSLLZBZLFALSACLASLSLL ZBZLFALSACLASLSLLZBZLFALS ACLASLSLLZBZLFALSACLASLSL LZ (32)

O fracionamento do veneno de *P. striata* por HPLC-ESI evidenciou a presença de 146 picos. Um total de 12 proteínas foi identificado a partir das análises proteicas livres de gel, das quais seis foram a partir de outras espécies de formigas (fosfolipase A1 2 de veneno;

Dinoponeratoxina Da-1837; Proteína RRP5-like; proteína predita EAG_03300; proteína predita EAI_09729; proteína predita SINV_13278) e as outras seis a partir de outras espécies de animais (fragmento de fosfolipase A2 ; hialuronidase; inibidor de protease 4 tipo Kunitz; peptídeo de veneno PPM3; Buforina-EC e proteína predita BRAFLDRAFT_98032) (tabela 3).

Adicionalmente às proteínas identificadas, o software Peaks 7.0 sugeriu 67 sequências proteicas com níveis de confiança variando de sequências confiáveis a sequências de elevada confiança (Zhang et al, 2003), e que não tiveram informações nos bancos de pesquisas utilizados nesse trabalho (Tabela 4).

Tabela 3: Proteínas identificadas no veneno de *Pachycondyla striata* utilizando ESI-TOF-TOF

Código de acesso	Proteína	Organismo	Linhagem Taxonômica	Sequência peptídica/ Íon Score
E2A992	Fosfolipase A1 de veneno (b)	<i>Camponotus floridanus</i>	Hymenoptera: Formicidae	LYETDTNNLVVLHTSALGMVAK (71)
PA2B_VIPBE	Fosfolipase A2 (Fragmento) (b)	<i>Vipera berus</i>	Squamata: Viperidae	SLLEFGMMIL EE (20)
CDC60196.1	Hialuronidase (b)	<i>Clostridium sp.</i>	Bacteria: Clostridiaceae	GVSPGLLTPLLGGGLTQVDK (72) KGPDLLTPLLGGGLTQTLK (70)
ELR55088	Inibidor de protease tipo Kunitz (b)	<i>Bos taurus</i>	Ruminantia: Bovidae	LLNTPLLGGGLTQLTK (67)
P85875.1	Peptídeo de veneno PPM3(b)	<i>Polistes major</i>	Hymenoptera: Vespidae	LLGLLKNLLYVR (24)
H2A_EUPCP	Buforina-EC (a)	<i>Euphyctis cyanophlyctis</i>	Anura: Dicroglossidae	RAGLKFPVGRVHRLLR (20)
TX37_DINAS	Dinoponeratoxina Da-1837 (a)	<i>Dinoponera australis</i>	Hymenoptera: Formicidae	FLGGLIGPLM SLIPGLLK (20)
EGI69895.1	Proteína RRP5- (b)	<i>Acromyrmex echinator</i>	Hymenoptera: Formicidae	LASALTALPVRR (27) MKEALSALTALPVRR (27)
EFN73411.1	Proteína predita EAG_03300 (b)	<i>Camponotus floridanus</i>	Hymenoptera: Formicidae	SSGALASLVTHGK (24)
gi 260815153	Proteína predita BRAFLDRAFT_98032 (a)	<i>Branchiostoma floridae</i>	Amphioxifirmes: Branchiostomidae	SGAHTTLATIVCGLVR (33)
gb EFN75727.1	Proteína predita EAI_09729 (b)	<i>Harpegnathos saltator</i>	Hymenoptera: Formicidae	KDLLGGLLDLGNK (26)
gi 322801927	Proteína predita SINV_13278 (a)	<i>Solenopsis invicta</i>	Hymenoptera: Formicidae	RLVTSQMPNTCK (37)

(a): Identificação por espectrometria em Tandem (MS/MS); (b): Identificação por sequenciamento de novo, assistido pelo software Peaks, versão 7.0.

Tabela 4: Sequência obtida pelo software Peaks 7.0 e que não foram identificadas em banco de dados. Valores superiores a 90, sequência altamente confiável; entre 80-90 sequência com elevada confiança; entre 60-80 sequência confiável.

Tempo de retenção	m/z	Sequência	Grau de confiança
39.4712	802.4118	LYETNTDNLVVKRAETEPGQK	60
39.7398	598.88074	LSALTALKSHR	61
40.075	707.8692	SM(+15.99)WVLYC(+57.02)ALKK	62
40.6115	634.40216	ALSALTALTAHAK	61
40.6787	634.401	LASALTALPGLLK	61
41.148	634.40045	LASALTALPVRR	66
41.4162	643.82306	YAADVLYC(+57.02)RR	64
42.4893	569.35095	AVLGALDPLLR	76
42.5563	569.35114	VALGALDPLLR	84
42.8917	597.86163	AVLGALDPLLGR	67
42.9588	597.8612	GLLGALDGSTYK	60
43.0258	569.35187	AVLGALDLPLR	71
43.0928	569.3516	AVLGALDPLLR	74
43.16	569.3518	VALGALDPLLR	74
43.227	658.40027	NYLLVGGNAGLPK	61
44.099	568.34564	FLGAFLGAALR	60
44.8702	828.5025	LFGAALSALTALTAHK	70
47.1842	828.5028	LFGAALSALTALGPVVR	79
47.2512	828.503	FLGAALSALTALGLPLK	81
47.3183	828.50323	FLGAALSALTALGLPLK	81
47.3853	546.67194	LLQAESALTALPGLLK	62
47.7877	828.5034	FLGAALSALTALGPLLK	82
47.7207	828.5035	FLGAALSALTALGLPLK	81
47.8548	828.5035	FLGAALSALTALGLPLK	79
48.2572	828.50134	LFGAALSALTALGLPLK	73
48.3240	828.5012	LFGAALSALTALGLPLK	75
48.3242	828.5013	LFGAALSALTALGPVVR	75
48.3912	828.501	FLGAALSALTALPGLLK	64
48.4583	842.49744	LM(+15.99)GAALDALTALPGLLK	77
48.5253	842.4983	FLGAALDALTALPGLLK	72
48.5925	842.4974	FLGAALDALTALPGLLK	72
48.7937	828.502	LM(+15.99)GAALSALTALTAHK	67
48.8607	828.5023	FLGAALSALTALPGLLK	73
48.9277	828.5024	FLGAALSALTALPVALK	67
49.0618	842.4972	FLQALSVLTAALPAVLK	61
49.129	842.4978	YQPALSALAGALLPGNK	60
49.33	828.50104	FLGAALSALTALGLPLK	68
49.3972	828.50183	FLGAALSALTALPGLLK	70
49.4642	828.5006	FLGAALSALTALPGLLK	60
49.8665	828.5002	LM(+15.99)GAALSALTALTAHK	64
50.403	661.4467	RSLGVLGGPPK	61
51.0737	678.44025	KDLLGLLDLGNK	63

Tabela 4 - continuação

51.2748	828.5019	KMGAANSALTALKSHR	60
51.8783	828.5028	LM(+15.99)KALSALTALPGLLK	63
52.6835	707.95416	LLGLLGANHGKPPK	63
52.818	707.9551	LLGLLKNPPKPPK	71
53.2203	713.9559	WNLGGLLELLGNK	68
53.4215	828.49976	YPGAALSALTALKHSR	68
53.6227	696.96436	GKDLGLLLGKGHK	62
53.891	691.73083	DPLM(+15.99)GTLKSLVGTLVLLMR	64
53.958	691.73334	VLLSSMLQSLVGSAEGLLKK	61
54.2263	828.5008	MKEALSALTALPVR	63
54.696	828.5004	LFGAALSALTALPGLLK	63
55.2325	933.0666	LAVNLLTPLLGGTLQTLK	68
55.2997	933.06586	LLGNLLTPLLGGTLQTLK	61
55.3667	622.38306	LLNLGLTPLLGGTLQTLK	67
55.4337	622.3842	LLNGLLTPLLGGTLQTLK	66
55.7698	933.066	LAVLNLTPLLGGTLQTLK	61
56.105	973.0414	VLLM(+15.99)ASLQSLVGSAEGLLK	63
56.1722	973.041142	VLLSSMLQSLVGSATVALR	61
56.7087	725.7945	LLNLNLLKPLLGVATKWR	63
56.7757	725.79333	LLGLLNLLKPLLGGTLQTLK	78
56.8428	926.53455	VLLDLLGDLAEGLGQTPK	73
56.9768	926.53375	VLLDLLGDLAEGLGNVLK	64
57.178	725.7928	LLGLLNLLKPLLGLGTQTLK	63
57.245	725.7933	LLNLLNLLKPLLGGTLQTLK	69
57.4462	679.0855	GWPLNLLTPLLGGTLQWR	65

4. Discussão

Essa é a primeira caracterização proteica do veneno de *P. striata*. Pouca informação há disponível sobre a bioquímica do veneno dessa espécie, fazendo com que a análise proteômica aqui apresentada contribua de forma substancial no conhecimento de sua biologia.

A combinação das três metodologias resultou na identificação de 38 proteínas no veneno de *P. striata*. Apenas as proteínas hialuronidase e um alérgeno de veneno foram identificados em mais de uma das metodologias utilizadas nesse trabalho. Entre as proteínas identificadas algumas já foram descritas em outras espécies de formigas (fosfolipase de veneno A1 2, Hialuronoglucosaminidase, Aminopeptidase N, Dinoponeratoxina Da-1837, alérgeno de veneno), no veneno de outros artrópodos (U10-ctenotoxina-Pn1, alérgeno de veneno, citocromo P450 6d1) e no veneno de vertebrados (Serpina 42Db, fosfolipase, Cinesina).

De modo geral, o veneno de *P. striata* apresenta certa similaridade com o veneno de outras espécies de himenóptero. As proteínas hialuronoglucosaminidase (=hialuronidase), fosfolipase e a aminopeptidase N encontradas nesse trabalho, estão entre as principais

proteínas de veneno dos himenópteros descritos até o momento (Hoffman, 2010; Santos et al, 2011). Das proteínas encontradas que já possuem função conhecida, estão a U10-ctenitoxina-Pn1a, Buforina-EC, sarafotoxina, Proteína Wnt-7A, - inibidor de protease 4 tipo Kunitz, isoforma D de Serpina 42Db e Analgesina. Porém, estas ainda não havia sido descritas compondo o veneno de outros himenópteros.

As proteínas hialuronidase, fosfolipase, aminopeptidase N, U-10 ctenitoxina e a sarafotoxina são reconhecidamente toxinas potentes, que causam danos aos tecidos da presa. (Kloog et al, 1988; El- Safory et al, 2010; Chen et al, 2012)

A hialuronidase é uma proteína comum no veneno de formigas, vespas, abelhas e vertebrados (Pinto, 2012), sendo uma enzima chave no processo de difusão das moléculas tóxicas do veneno a partir da área inoculada para a circulação da presa/vítima. A hialuronidase catalisa a hidrólise do ácido hialurônico presente na matriz extracelular do tecido conjuntivo diminuindo a viscosidade do meio, permitindo a rápida difusão das toxinas do veneno. Essa enzima, além de potencializar o efeito das toxinas, também danifica localmente o tecido e contribui no processo inflamatório da região inoculada (Kemparaju & Girish, 2006). Outras funções não são relatadas para a hialuronidase no veneno das diferentes espécies animais, por isso espera-se que ela possua esta mesma função no veneno de *P. striata*.

A enzima fosfolipase A, também proteína clássica de veneno, está entre as enzimas mais bem estudadas do veneno de Hymenoptera (Lima & Brochetto-Braga, 2003). Essa enzima cliva os fosfolipídeos, liberando lisofosfolipídeos e longas cadeias de ácidos graxos (Uniprot, 2014), acarretando lise celular, inflamação e danos aos tecidos. No presente estudo foi identificado apenas um tipo de fosfolipase, fosfolipase A que foi relatada no veneno de *Apis mellifera* (Kuchler et al, 1989), *Bombus ignitus* (Xin et al, 2009), *Vespula vulgaris* (King et al, 1996), *Solenopsis invicta* (Pinto et al, 2012), *Vespula maculifrons* (Hoffman, 1994) e é descrita também como um potente alérgeno do veneno de abelhas (Lima & Brochetto-Braga, 2003).

A aminopeptidase N (APN) é uma protease multifuncional presente no veneno de diversas espécies de serpentes (Matteo et al, 2011) e em uma ampla variedade de órgãos, tecidos e tipos de células, desde bactérias e leveduras a vertebrados como rato, porco, boi e homem (Luan & Xu, 2012). Em mamíferos, a APN está envolvida na degradação de neuropeptídeos, citocinas, angiotensinas (Ogawa et al, 2007) e proteínas (Matteo et al, 2011). Alguns trabalhos relacionam APN com o processo de dor (Chen et al, 2012). A presença da

aminopeptidase N no veneno de *P. striata* pode estar envolvida no processo de defesa da colônia causando dor e injúria nos seus predadores ou como *P. striata* possui hábito alimentar carnívoro, a presença de APN no veneno poderia ser justificada pela atividade que essa enzima teria na degradação dos tecidos de suas presas, facilitando sua digestão. As aminopeptidases estão entre as enzimas menos compreendidas no veneno de serpentes e de outros animais, sendo a sua real função ainda desconhecida (Matteo et al, 2011).

Entre as toxinas, as neurotoxinas são peptídeos presentes no veneno de artrópodes utilizados para matar ou paralisar a presa, porém, incomum no veneno de insetos sociais devido à natureza defensiva desses (Pinto et al, 2012). Entretanto, *P. striata* é uma espécie predadora que usa seu veneno tanto para defesa do ninho como para capturar suas presas. A presença de neurotoxinas no veneno de *P. striata* pode estar relacionada ao seu uso na captura de presas. As neurotoxinas U10-ctenitoxina-Pn1a (Fragmento), Dinoponeratoxina Da-1837 e proteína predita da família das proteínas inibidoras dos canais de potássio foram encontradas no veneno de *P. striata*. A U10-ctenitoxina-Pn1a (Fragmento) é um peptídeo pertencente à família proteica TX3, descrita a partir do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer*. Proteínas da família TX3 apresentam elevado efeito neurotóxico, agindo nos canais iônicos e receptores químicos do sistema neuro-muscular de insetos e mamíferos (Cardoso et al, 2003). Essa toxina interfere diretamente na concentração intracelular do íon cálcio. A U10-ctenitoxina Pn1a, também conhecida como Neurotoxina Pn3-5A, foi descrita apenas em uma espécie de aranha, a *Phoneutria nigriventer* (Cardoso et al 2003), e até o momento a sua ocorrência natural não havia sido reportada em nenhuma outra espécie animal. Apesar de apresentar homologia com a toxina TX3-5 (58%, 48 aminoácidos) dessa mesma espécie de aranha, em consulta ao banco de dados do NCBI, a sequência de aminoácidos da U10-ctenitoxina Pn1a de *P. striata* não apresenta nenhum domínio conservado com nenhuma outra toxina ou proteína, impossibilitando inferir maiores informações fisiológicas acerca dela.

A Dinoponeratoxina Da-1837 é uma toxina descrita a partir do veneno de *Dinoponera australis* (Johnson et al, 2010), uma espécie de Ponerinae assim como *P. striata*. Essa proteína apresenta elevada homologia com a Poneratoxina, um neuropeptídeo extraído do veneno da formiga *Paraponera clavata*. A Poneratoxina é uma toxina que afeta os canais dependentes de sódio e bloqueiam as transmissões sinápticas no sistema nervoso central de insetos (Palma, 2006). Acredita-se que a Dinoponeratoxina apresente função similar.

Entre as proteínas identificadas no veneno de *P. striata*, a proteína WNT-7a não é comumente encontrada em veneno animal (Uniprot, 2014), sendo relatada no veneno de

apenas duas espécies de serpentes *Crotalus horriceus* e *C. adamanteus* (Rokyta et al, 2013). No veneno de *P. striata* a proteína WNT-7a foi identificada sob duas diferentes formas: “Spot” 15, apresentando 79,6 kDa e pI 6.6, e no “Spot” 17 com 54,4 kDa e pI 7.5. A proteína WNT-7a está presente em diversos tecidos de vertebrados e invertebrados ligando-se aos receptores de membrana (Solis, 2013). Entre as vias metabólicas em que WNT participa, a via WNT/Ca²⁺ induz a liberação de cálcio intracelular (Huelsenken & Birchmeier, 2001). O acúmulo intracelular de Ca²⁺ pode levar a necrose celular, sugerindo que talvez essa seja a função desenvolvida por essa proteína no veneno. Entretanto, mais estudos são necessários para inferir as possíveis funções desta proteína no veneno da espécie aqui estudada.

No veneno de *P. striata* também estão presentes proteínas que agem como inibidores de protease, tal como inibidor de protease 4 tipo Kunitz e a isoforma D da Serpina 42Db (Uniprot, 2014) que podem atuar, prevenindo a autólise das proteínas do veneno. Neste trabalho também foi identificada a proteína Citocromo P450, que age nos processos de oxidação-redução, mediando reações reversíveis (Uniprot, 2014).

Sete das proteínas identificadas neste trabalho estimulam a produção e/ou reações com anticorpos (Uniprot, 2014). A presença das proteínas fosfolipase A1 2 de veneno, fosfolipase A2, Hialuronidase, U10-ctenitoxina e dos demais alérgenos de veneno encontrados nesse trabalho sugere que *P. striata* possui um veneno com elevado potencial alergênico.

Três proteínas com atividade antimicrobiana foram detectadas no veneno de *P. striata* (Buforina-EC, Dinoponeratoxina Da-1837 e Analgesina), as quais apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias gram positivas e gram negativas (Assodech et al, 2012; Johnson et al, 2010; Wu et al, 2011). Orivel et al (2001) justifica a presença de proteínas com função antimicrobiana no veneno de formigas predadoras, pela necessidade de minimizar o potencial de infecção por bactérias, fungos e vírus, os quais podem causar sérios danos a sobrevivência da colônia. Essas espécies de formigas levam as suas presas logo após a imobilização para seus ninhos, aumentando o potencial de infecção por microrganismos presentes nas presas. Possivelmente esta também seja a função dos peptídeos antimicrobianos presentes no veneno de *P. striata*.

Entre as proteínas identificadas neste trabalho, também estão as proteínas RRP5-like, proteína transmembrana 170A e proteína predicta 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 3-like. A primeira é proteína de membrana nuclear, e as outras duas são proteínas de membrana plasmática e provavelmente são originadas a partir das células do reservatório de

veneno e/ou da glândula convoluta presente no interior do reservatório (Schoeters e Billen, 1998); (Ortiz e Camargo-Mathias, 2006) não constituindo toxina de veneno, e dessa forma não desenvolvendo função alguma no mecanismo de envenenamento.

A proteína Cinesina foi identificada compondo o veneno de duas espécies de serpentes, *Micrurus fulvius* (Margres et al, 2013) e *Crotalus horridus* (Rokyta et al, 2013). A proteína anticongelamento tipo IV ainda não foi reportada compondo o veneno de nenhuma espécie animal. A função desenvolvida por essas proteínas no veneno de *P. striata* e de outras espécies animais ainda é desconhecida.

Doze das proteínas identificadas neste trabalho são proteínas inferidas a partir do genoma, além de diversas sequências desconhecidas para o banco de dados (Tabela 3). Isso demonstra a falta de informação disponível a respeito do veneno animal, em especial os de formigas. Problemas com banco de dados de formigas também foram reportados por Pinto et al (2012). A Figura 2 esquematiza a proposta de um mecanismo geral de ação do veneno de *P. striata*.

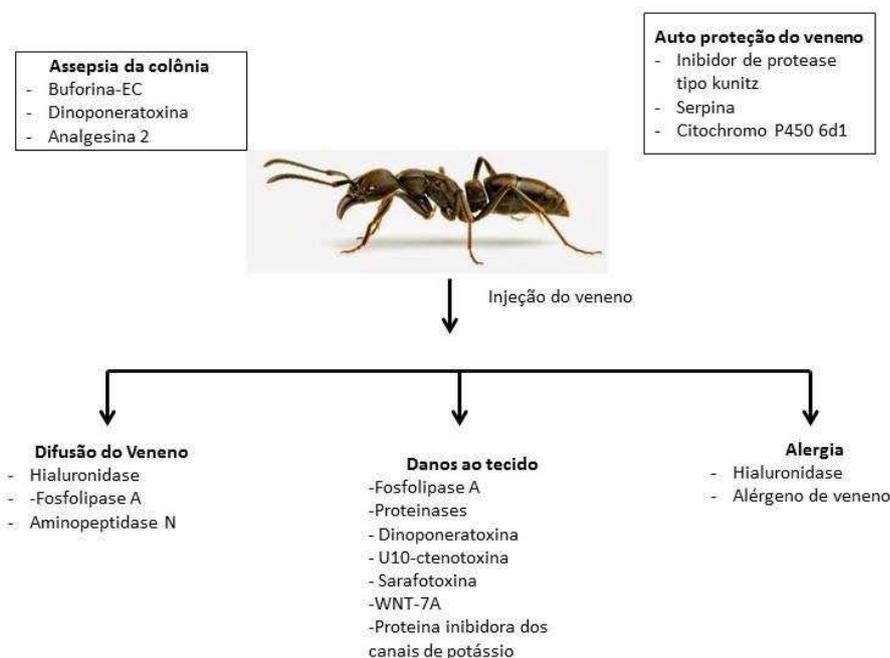


Figura 2: Representação geral do mecanismo de ação proposto para o veneno de *P. striata*, a partir das proteínas identificadas neste trabalho. Foto: Alex Wild.

5. Considerações finais

O estudo proteômico do veneno de *P. striata* possibilitou a identificação de 38 proteínas, as quais demonstraram ser de importância na compreensão da funcionalidade do veneno e de aspectos biológicos dessa formiga. Vale salientar que neste trabalho só foi possível a identificação de menos de 15% das proteínas presentes no veneno, demonstrando a carência de informações em bancos de pesquisa proteicos, sobre veneno animal. Estudos mais detalhados, que visem a caracterização bioquímica de novas moléculas, bem como a realização de testes específicos que visem elucidar a função desenvolvida por essas moléculas, são necessários para um maior entendimento do mecanismo de funcionamento do veneno, bem como o envolvimento dessas moléculas no comportamento da espécie.

6. Agradecimentos

Os autores são gratos ao Dr. Jacques Charles Hubert Delabie pela identificação da espécie *P. striata*. Ao senhor Manoel José Ferreira pelo auxílio as coletas de campo. Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da UFV, pela estrutura/suporte físico disponível. Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo convênio PRONEX SECTI-FAPESB/CNPq - PNX 0011/2009.

Capítulo 2

Atividade biológica do veneno de *Pachycondyla striata*

(Formicidae: Ponerinae)

Resumo

As atividades antimicrobiana e neurobiológica do veneno da formiga predadora *P. striata* foram avaliadas. O veneno apresentou atividade antimicrobiana em relação as bactérias gram-positivas e gram-negativas testadas. Para a bactéria *Staphylococcus aureus*, a concentração mínima inibitória do veneno foi de 62,5 µg/mL. O veneno foi purificado utilizando técnicas de HPLC por fase reversa e por troca iônica. A análise de espectrometria de massa das frações com atividade antimicrobiana permitiu a identificação de cinco proteínas, incluindo a proteína Analgesina 2, a qual apresenta atividade antimicrobiana comprovada. Para avaliar a atividade neurobiológica, cânulas foram implantadas no ventrículo lateral do cérebro de camundongos, e o veneno bruto e desnaturado de *P. striata* em diferentes concentrações (25, 100 e 250 mg/mL) foi administrado. A análise dos resultados mostrou diferenças significativas nos comportamentos de imobilidade e exploratório dos camundongos tratados com veneno bruto na concentração de 250mg/mL. Quando o veneno foi desnaturado e previamente administrado ao agente convulsivante bicuculina foi observado o surgimento de crises convulsivas do tipo tônico-clônica.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, ensaio neurobiológico, comportamento tônico-clônico, espectrometria de massas.

Abstract

The antimicrobial and neurobiological activities of the venom of predatory ant *P. striata* were evaluated. The venom showed antimicrobial activity on gram-positive and gram-negative bacteria tested. For *Staphylococcus aureus*, the minimum inhibitory concentration of the venom was 62.5 mg / mL. The venom was purified using HPLC techniques by reverse phase and ion exchange. The mass spectrometry analysis of the fractions with antimicrobial activity allowed the identification of five proteins, including Analgesina 2 protein , which has proven antimicrobial activity . To assess the neurobiological activity, cannulas were implanted into the lateral ventricle of the brain of mice , and the crude venom denatured of *P. striata* at different concentrations (25, 100 and 250 mg / mL) was administered. The results showed significant differences in immobility and exploratory behavior of mice treated with crude venom concentration of 250mg/mL . When the venom was administered to previously denatured and bicuculline convulsant agent the emergence of seizures tonic- clonic type was observed.

Keywords: antibacterial, Mass spectrometry, activity neurological, Tonic-clonic seizures.

1. Introdução

Com quase 15.000 espécies descritas atualmente, as formigas constituem um grupo diverso entre os artrópodes (Antweb, 2014). Dentre as espécies de formigas algumas são predadoras e utilizam o veneno, injetado na presa pelo aparelho do ferrão, tanto para predação quanto para defesa (Hölldobler & Wilson 1990). Apesar dessa diversidade taxonômica, o veneno das formigas tem sido pouco estudado quando comparado ao veneno de outros grupos animais (Rifflet et al, 2012).

Nas últimas décadas, o veneno de diferentes espécies animais vem sendo alvo de estudos com o objetivo de avaliar o potencial biotecnológico e terapêutico de seus compostos (Santos et al, 2011). Nesse contexto, o veneno dos himenópteros tem chamado a atenção como um recurso rico em compostos farmacologicamente ativos (Lewis & Garcia, 2003).

Entre os compostos presentes no veneno de himenópteros e que apresentam atividade biológica comprovada, estão a melitina, peptídeo isolado a partir do veneno de *Apis mellifera* e que apresenta efeito antitumoral (Ownby et al, 1997; Gawronska et al, 2002; Liu et al, 2002; Son et al 2007), anti-inflamatório e antimicrobiano (Sumikura et al, 2003); o mastoporan, um peptídeo presente no veneno de diferentes espécies de vespas do gênero *Polybia*, com atividade anti-tumoral (Souza et al, 2009), hemolítica (Wang et al, 2008) e antimicrobiana (Matsuzaki et al, 1997); a lasioglosina, peptídeo extraído do veneno da abelha *Lasioglossum laticeps* que apresenta atividade antitumoral e antimicrobiana (Cеровsky et al, 2009) e a solenopsina, um alcaloide com atividade antiangiogênica do veneno da formiga *Solenopsis invicta* (Arbiser, et al 2007) com resultados promissores no tratamento de células tumorais (Heinen & Veiga, 2011).

Peptídeos com atividade biológica têm sido identificados em algumas poucas espécies de formigas. No veneno da formiga *Pachycondyla goeldii* (Ponerinae) foram encontrados 15 peptídeos com elevada ação antimicrobiana (Orivel et al, 2001). Pilosulina, um peptídeo do veneno de espécies do subgênero *Myrmecia* (*Myrmecinae*) (Zelezetsky et al, 2005) e dinoponeratoxina, um peptídeo de *Dinoponera australis* (Johson et al, 2010) apresentam atividade antimicrobiana.

Peptídeos com atividade neurotóxica também vêm sendo identificados no veneno de diferentes espécies de formigas. Poneratoxina e ectatomina são peptídeos que afetam os canais iônicos, e foram isolados do veneno de *Paraponera clavata* (Paraponerinae) e *Ectatomma tuberculatum* (Ectatominae), respectivamente, sendo que a poneratoxina interfere

nos canais de sódio bloqueando as transmissões sinápticas no sistema nervoso de insetos (Piek et al., 1991) enquanto ectatamina é um importante inibidor dos canais de cálcio (Pluzhnikov et al., 1994). Adicionalmente, peptídeos envolvidos no processo de necrose celular como a miotoxina, foram encontrados no veneno de *S. invicta* (Pinto et al, 2012), as enzimas fosfolipases A e B em *S. invicta* (Baer et al, 1979; Pinto et al, 2012), *Pogonomyrmex badius* (Myrmicinae) (Smith & Blum, 1978) e *Myrmecia pyriformis* (Lewis et al, 1968), hialuronidase, lipases, fosfatase ácida e esterases em *P. badius* (Smith & Blum, 1978). Além disso, diferentes tipos de alergênicos já foram identificados por diferentes técnicas bioquímicas no veneno de diferentes espécies de formigas (Pinto et al, 2012).

Muitos peptídeos e poliaminas presentes no veneno de diferentes espécies animais têm sido utilizados como ferramentas para ampliar os conhecimentos acerca dos mecanismos moleculares da neurotransmissão, bem como para o desenvolvimento de fármacos potencialmente úteis para o tratamento de neuropatologias (Mortari et al, 2007).

Considerando o potencial do veneno de formigas como agentes antimicrobianos e no tratamento de neuropatologia, este estudo avaliou essas atividades do veneno da formiga *Pachycondyla striata*.

2. Material e Métodos

2.1. Insetos

Doze colônias de *P. striata* foram coletadas na Mata da Biologia (20°48' S 42°51' W), fragmento florestal do município de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil. As colônias foram transferidas para a Universidade Federal de Viçosa e mantidas em ninhos artificiais (40 x 30 cm) a 26 ± 2 °C, e com cerca de 50-70% de umidade relativa. As colônias foram tratadas com uma dieta a base de larva de tenebrio (*Tenebrio molitor*) e mel, fornecidas a cada dois dias.

2.2. Atividade antimicrobiana

2.2.1. Preparo da amostra

Um total de cem operárias, foram crio-anestesiadas, dissecadas e o reservatório das glândulas de veneno transferidos para tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 (PBS). Os reservatórios de veneno foram rompidos e as amostras centrifugadas a 13000 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado a -80 °C.

2.2.2. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas totais presentes no veneno de *P. striata* foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (Smith, 1985), usando albumina de soro bovino como padrão.

2.2.3. Veneno bruto

Uma amostra do veneno de *P. striata* foi esterilizada por filtração em filtro com poros de 0,22 µm (Millipore NY, USA) e sua atividade antimicrobiana testada contra bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*; *Bacillus cereus*; *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Enterobacter sakazakii*; *Escherichia coli*; *Moraxella catarrhalis*; *Proteus vulgaris*; *Shigella flexneri* ; *Citrobacter freundii* e *Salmonella typhimurium*) oriundas do Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Culturas de cada uma das bactérias foram inoculadas em placas contendo meio Lúria-Bertani (LB) sólido e incubadas a 37 °C por 24 h. Transcorrido esse tempo, colônias de cada espécie de bactéria foram transferidas para meio LB líquido, incubadas a 37 °C e o crescimento acompanhado por duas horas por leitura em espectrofotômetro a 600 nm de absorbância.

Duzentos microlitros da solução bactéria/meio LB foram diluídos em meio LB até volume final de 40 mL. Essas soluções contendo as bactérias foram adicionadas em microplacas (100 µL) juntamente com 50 µL do extrato bruto do veneno (3 mg/µL) e incubadas a 37 °C por 24 h, e em seguida o crescimento das colônias foi avaliado em espectrofotômetro a 600 nm de absorbância. A atividade inibitória foi determinada pela inibição do crescimento bacteriano nas placas. Como controle positivo foram utilizados meio de cultura com bactéria, e como controle negativo apenas meio de cultura. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

2.2.4. Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Um conteúdo de 2 mg de proteína do veneno bruto foi diluído em 300 µL de meio LB líquido. A solução foi esterilizada por filtração, utilizando filtro com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore NY, USA) acoplado a uma seringa de 1 mL. Uma série de diluições sucessivas do veneno (0,5 mg; 0,25 mg; 0,125 mg; 62 µg; 31 µg; 15 µg; 7 µg; 3,5 µg e 1,5 µg) foram realizadas, e a atividade testada contra a bactéria *S. aureus*.

2.2.5. *Teste com temperatura e com proteinase K*

Em 45 μL de veneno (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado meio LB líquido até o volume final de 1,5 mL, seguido de esterilização em filtro 0,22 μm de diâmetro. Trezentos microlitros dessa solução foram mantidos a temperatura ambiente e outros 300 μL aquecidos a 95 °C por 30 minutos em banho a seco.

Uma outra amostra (300 μL) da solução veneno bruto mais meio LB líquido foi incubado com 1 μL de endoproteinase K, a 40 °C por 10 minutos e posteriormente a 56 °C por 5 minutos. A atividade antimicrobiana do veneno à temperatura ambiente, do veneno aquecido a 95°C e do veneno tratado com proteinase K, foi avaliada em *S. aureus* como descrito anteriormente.

2.2.6. *HPLC em fase reversa*

Cem microlitros do veneno bruto contendo 200 μg de proteínas foram injetados em uma coluna C₁₈ de fase-reversa. A separação cromatográfica foi realizada com fluxo de 1mL/min. A eluição dos peptídeos foi monitorada na faixa de absorvância de 220 e 280 nm em sistema HPLC. Como solvente A foi utilizado uma solução aquosa de 0,1% de ácido trifluoroacético, e como solvente B uma solução de 80% acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético. O veneno foi separado em 120 frações com gradiente linear de 5-95% de B por 65 minutos. As frações foram coletadas a cada 30 segundos entre o tempo 5-65 minutos.

As frações oriundas do fracionamento foram secas em SpeedVac, seguida de duas lavagens em água, secas e ressuspendidas em 500 μL de PBS e a atividade antimicrobiana de cada fração testada para a bactéria *S. aureus*.

2.2.7. *HPLC por troca iônica*

As frações oriundas da purificação por fase-reversa e que tiveram atividade antimicrobiana foram recromatografadas em coluna de troca iônica (Mono-Q com ligante de amônio quaternário). A separação cromatográfica foi realizada num fluxo de 1 mL/min. A eluição dos peptídeos foi monitorada na faixa de absorvância de 220 nm em sistema HPLC. Como solvente A foi utilizado solução tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4, e como solvente B solução tampão fosfato de sódio 50 mM NaCl 1M. O veneno foi separado em 66 frações com um gradiente linear de 5-95% de B por 33 minutos. As frações foram secas em SpeedVac e a atividade antimicrobiana das frações testada para a bactéria *S. aureus*.

2.3. Identificação dos compostos do veneno de *P. striata*

2.3.1. Digestão das amostras

Frações oriundas do fracionamento por fase-reversa e por troca iônica com atividade antimicrobiana foram solubilizadas em bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram reduzidas em solução Dithiothreitol (DTT) 200 mM a 100 °C por 10 minutos, seguido de repouso por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse tratamento, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida a 100 mM por 30 minutos em temperatura ambiente, na ausência de luz. Para neutralizar o processo de alquilação, 10 µL de DTT a 200 mM foram adicionados a solução e esta mantida em temperatura ambiente por 45 minutos no escuro. Tripsina não-autolítica (20 µg) foi adicionada a solução de proteínas e desnaturadas a 37 °C por 18h. As soluções finais foram concentradas a vácuo e dessalinizadas com ponteiros tipo ZipTip (Pipette Tips for Sample Preparation- Millipore) e os peptídeos ressuspensos em solução de 0,1% ácido trifluoroacético.

2.3.2. Espectrometria de massas (MALDI- TOF-TOF)

Alíquotas de 1 µL das amostras obtidas a partir da digestão enzimática, juntamente com 1 µL de matriz (5mg/mL Matriz Universal MALDI- Fluka mistura 1:1 DHB e α -ciano-4-hidroxi-cinamico, preparada em acetronitrila a 50% e ácido trifluoroacético a 3%), foram aplicadas em placa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF (Bruker Daltonics), na proporção de 1:1 e submetidas a análises de MALDI-TOF-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization time-of-flight) em aparelho ULTRAFLEX III (Bruker Daltonics).

Nas análises de MS (modo de detecção linear para íons com polaridade positiva) foi utilizado o método LPepMix com 500 a 5.000 Da de detecção e nas análises de MS/MS o método LIFT com 40 a 1.878 Da de detecção.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Núcleo de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa (NUBIOMOL- UFV).

2.3.3. Identificação dos peptídeos

Os espectros de massas obtidos do MALDI-TOF-TOF foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics) para a remoção de contaminantes e obtenção da lista de massas que foi submetida a identificação pelo software de identificação de

proteínas MASCOT (Matrix Science Ltd, Uk; Peptide Mass Fingerprint- PMF e MS/MS Ion Search).

Na identificação das proteínas oriundas do MALDI-TOF-TOF foram utilizadas as sequências proteicas depositadas no NCBI e no Swissprot, disponíveis publicamente, aos níveis de 0.5 e 0.1 kDa e 50 ppm de erro. Reações de carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina foram utilizadas como modificações fixas e variáveis, respectivamente. Metazoa (Animais) foi selecionado como táxon para entrada nos bancos de dados. Resultado significativo foi considerado quando o Score da proteína sugerida foi superior ao Score calculado pelo software MASCOT, assumindo $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

Os espectros de MS/MS oriundos do MALDI-TOF-TOF também foram submetidos ao programa de sequenciamento *de novo* BioTools 3.2 (Bruker Daltonics). As sequências proteicas sugeridas por este programa foram submetidas ao banco de pesquisa MS Blast (<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>). Resultados positivos sugeridos pelo MS Blast e oriundos do banco de dados de formigas ou de veneno animal foram aceitos como identificação positiva.

2.4. Ensaio neurobiológico

2.4.1. Preparação dos extratos

Seiscentas operárias foram crio-anestesiadas e o reservatório de veneno retirado como descrito e o veneno foi centrifugado por 10 minutos a 13000 g, o sobrenadante coletado e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a realização dos ensaios. O veneno foi solubilizado em 100 μL de água destilada e posteriormente liofilizado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O extrato bruto do veneno liofilizado foi dissolvido em solução salina a 0,9% nas concentrações de 25, 100 e 250 mg/mL.

Nos testes com veneno livre de proteínas (veneno desnaturado), 100 μL de acetonitrila foram adicionados a 100 μL do extrato bruto de veneno nas concentrações de 25 mg/mL e 100 mg/mL. As soluções foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 g, o sobrenadante coletado, fervido a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e mantido em temperatura ambiente por 16 h para evaporação total da acetonitrila.

2.4.2. Animais

Camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus* raça Swiss com idades inferior a 4 meses e pesos entre 25 – 40 g, foram adquiridos a partir do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), RN, Brasil. Os animais foram mantidos sob condições

controladas de luz (ciclos de 12 h) e temperatura (25 °C). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da UFRN. Os camundongos foram tratados segundo as diretrizes da legislação brasileira para uso de animais em pesquisa (Lei nº 11.794).

2.4.3. Cirurgia dos animais

Os camundongos foram anestesiados com Ketamina (100 mg/kg) e xilazina (50 mg/kg) e fixados em suporte cirúrgico para camundongos (Insight, Brasil). Em seguida, uma segunda dose de anestésico, via percutânea, de 0,1 mL de lidocaína a 2% foi realizada. Uma cânula de aço inoxidável (diâmetro 0,25 mm e comprimento 8 mm) foi implantada no ventrículo lateral do cérebro dos camundongos. Para a implantação da cânula, foram utilizadas as coordenadas estereotáxica sugeridas por Paxinos & Watson (2009). A cânula foi fixada ao crânio com auxílio de pasta dental acrílica. Ao término da cirurgia, a cânula foi temporariamente isolada com fio de aço inoxidável para evitar a sua obstrução. Os animais permaneceram de 5-7 dias em período pós-operatório para recuperação, antes do início dos testes. Os processos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Estudos da Memória, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, Brasil.

2.4.4. Ensaio neurobiológicos

Nos ensaios com o veneno bruto e com veneno desnaturado, os camundongos (fêmeas) foram injetados com o auxílio de uma cânula de injeção acoplado a um tubo de polietileno e a uma seringa Hamilton (1mL), e o volume e tempo de administração foi controlado por uma bomba de infusão digital (Insight, Brasil). Cada animal foi microinjetado intracerebroventricular com 1 µL de solução salina ou veneno, num fluxo de 0,5 µL/min. Os camundongos foram aleatoriamente divididos em seis grupos experimentais: Grupo controle [solução salina 0,9% (n=8)], Grupo veneno bruto 25, 100 e 250 mg/mL [(n=7), (n=8) e (n=9), respectivamente] e veneno desnaturado nas concentrações de 25 mg/mL (n=8) e de 100 mg/mL (n=7).

Logo após a injeção intracerebroventricular, os camundongos foram colocados em uma arena circular (30 cm de diâmetro e 60 cm de altura) e filmados por 1200 segundos para análise dos parâmetros comportamentais.

2.4.5. Modelo de indução de crises convulsivas por bicuculina

Os camundongos foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (n=6) e grupo veneno desnaturado 25mg (n=8). No grupo controle, os camundongos receberam intracerebroventricular 1 µL de água destilada e o grupo tratamento 1µL de veneno

(25 mg/mL) como descrito anteriormente (ver 2.4.4.). Depois de Transcorrido 20 minutos da injeção, todos os camundongos receberam intracerebroventricular 1 µL de bicuculina (10 mg/mL) um antagonista de receptor GABA(ácido gama-aminobutírico) (Sigma,EUA), capaz de induzir convulsões do tipo tônico-clônico em 100% dos animais em menos de 20 minutos. Os camundongos foram colocados em uma arena circular (30 cm de diâmetro e 60 cm de altura) e filmados por 1200 segundos.

2.4.6. *Análise da área de injeção*

Após o final dos ensaios, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (50 mg/Kg) injetada intraperitonealmente. Em seguida, foi injetado na cânula guia 1 mL de azul de toluidina. Os cérebros foram removidos, congelados e cortados manualmente para verificar a colocação do sítio de injeção. Somente os animais com coloração no ventrículo lateral foram considerados para a análise.

2.4.7. *Análise comportamental*

Os vídeos de cada um dos animais foram analisados e os comportamentos de exploração (caminhar, cheirar e manter postura ereta), imobilidade (ausência de movimento), “grooming” (auto limpeza corporal), procursiva (movimentos rápidos, giros rápidos em torno do próprio eixo, contração dos membros, e pulos) e tônico-clônico (flexão do tronco seguida de extensão difusa do tronco e membros) foram cronometrados.

2.4.8. *Análises estatísticas*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5. Uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey post hoc foi utilizado para comparar os diferentes comportamentos entre as diferentes concentrações do veneno. A atividade anticonvulsivante foi avaliada utilizando um teste qui-quadrado e as diferenças entre as médias foram testadas a partir do teste U de Mann-Whitney.

3. Resultados

3.1. *Atividade antimicrobiana*

O veneno bruto de *P. striata* mostrou ação antimicrobiana contra todas as bactérias testadas. A concentração inibitória mínima do extrato bruto de veneno de *P. striata* obtida para *S. aureus* foi de 62.5 µg/mL (Figura 1A).

Nos testes realizados com o extrato bruto do veneno tratado previamente com proteínase K, não foi detectada atividade antimicrobiana (Figura 1B), enquanto nos testes com o veneno submetido à temperatura de 95 °C a atividade antimicrobiana permaneceu (Figura 1C).

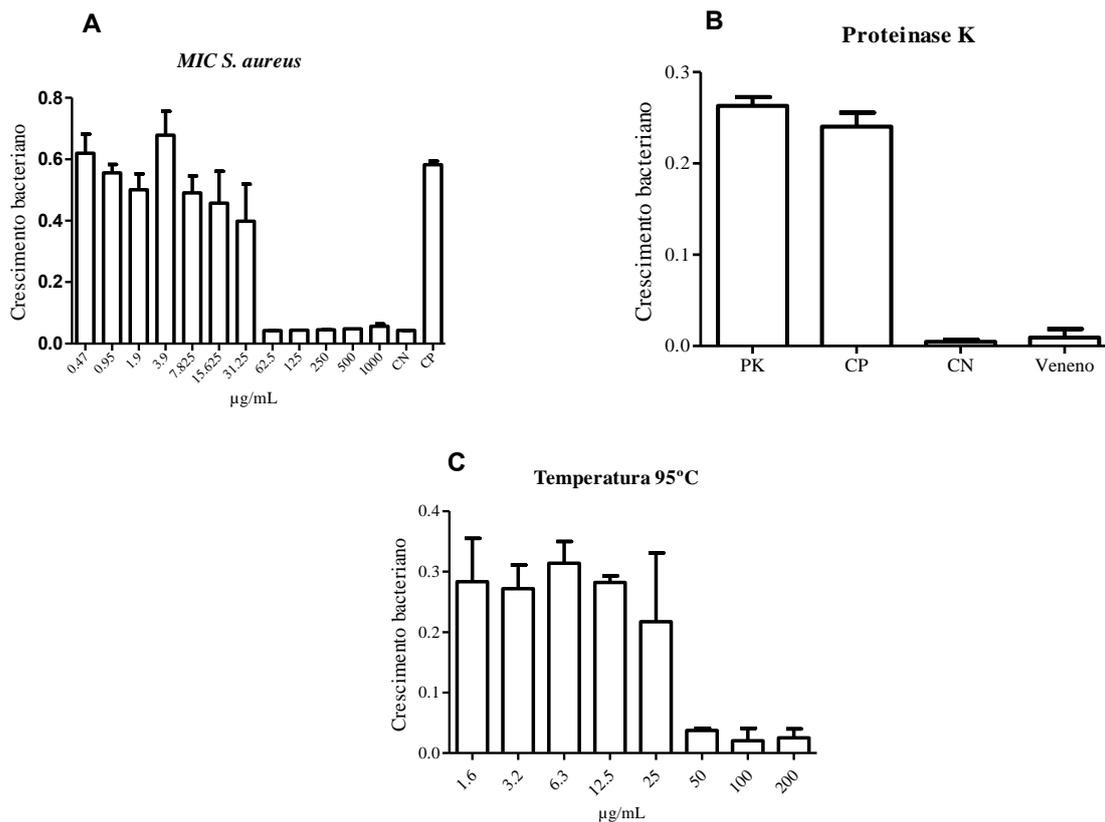


Figura 1: Atividade antimicrobiana do veneno bruto de *Pachycondyla striata*. (A) Concentração Mínima Inibitória do veneno a cerca de *S. aureus*, CP= controle positivo, meio de cultura com bactéria CN= controle negativo, apenas meio de cultura; (B) veneno tratado com proteínase K, PK= veneno tratado com proteínase K; CP= meio de cultura com bactéria; CN= apenas meio de cultura; veneno= meio de cultura com veneno e (C) Diferentes concentrações do Veneno desnaturado a 95°C.

A purificação do veneno de *P. striata* em HPLC por fase reversa permitiu a separação de 120 frações proteicas, das quais as frações A (23-26), B (28-30), C (31-32), D (35-36) e E (39-41) (Figura 2) apresentaram atividade antimicrobiana.

O sequenciamento *de novo* assistido pelo software Biotoools permitiu a identificação de cinco proteínas nas frações que mostram atividade antimicrobiana (Tabela 1). Na fração B foi identificada a proteína cinesina, a partir do protozoário *Trypanosoma brucei brucei*. Na fração C, foi identificado um alérgeno de veneno da formiga *Pachycondyla chinensis*. Na fração D, foram identificadas as proteínas analgesina, a partir do anfíbio *Hyla simplex* e uma proteína predita da família das proteínas inibidoras dos canais de potássio, a partir da cianobactéria *Chroococcidiopsis thermalis*. Na fração E foi identificada uma proteína hipotética, a partir da formiga *Harpagathos saltator*.

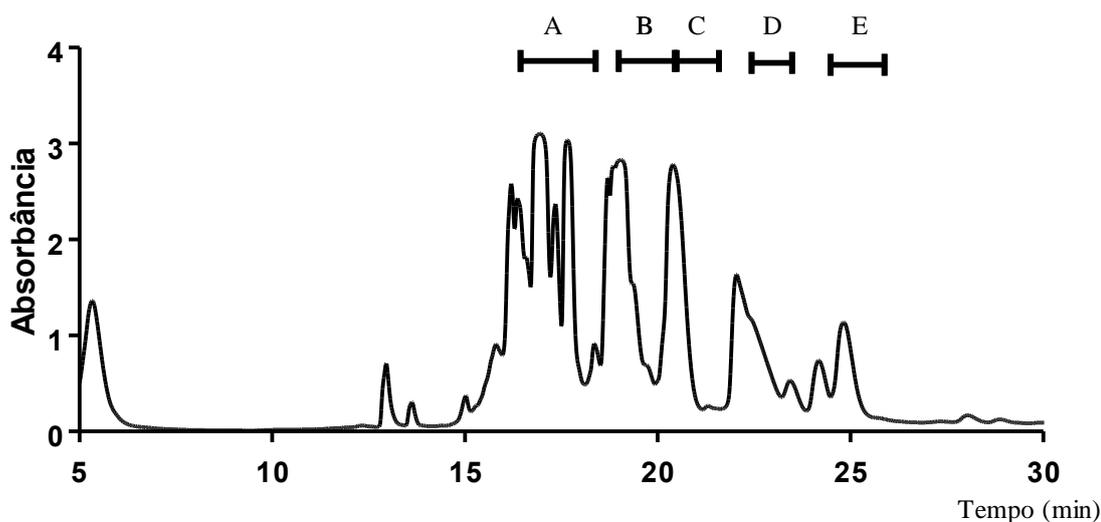


Figura 2: Frações com atividade antimicrobiana a partir do veneno bruto de *Pachycondyla striata*. Separação em sistema HPLC com coluna C₁₈ de fase reversa com 220 nm de absorbância.

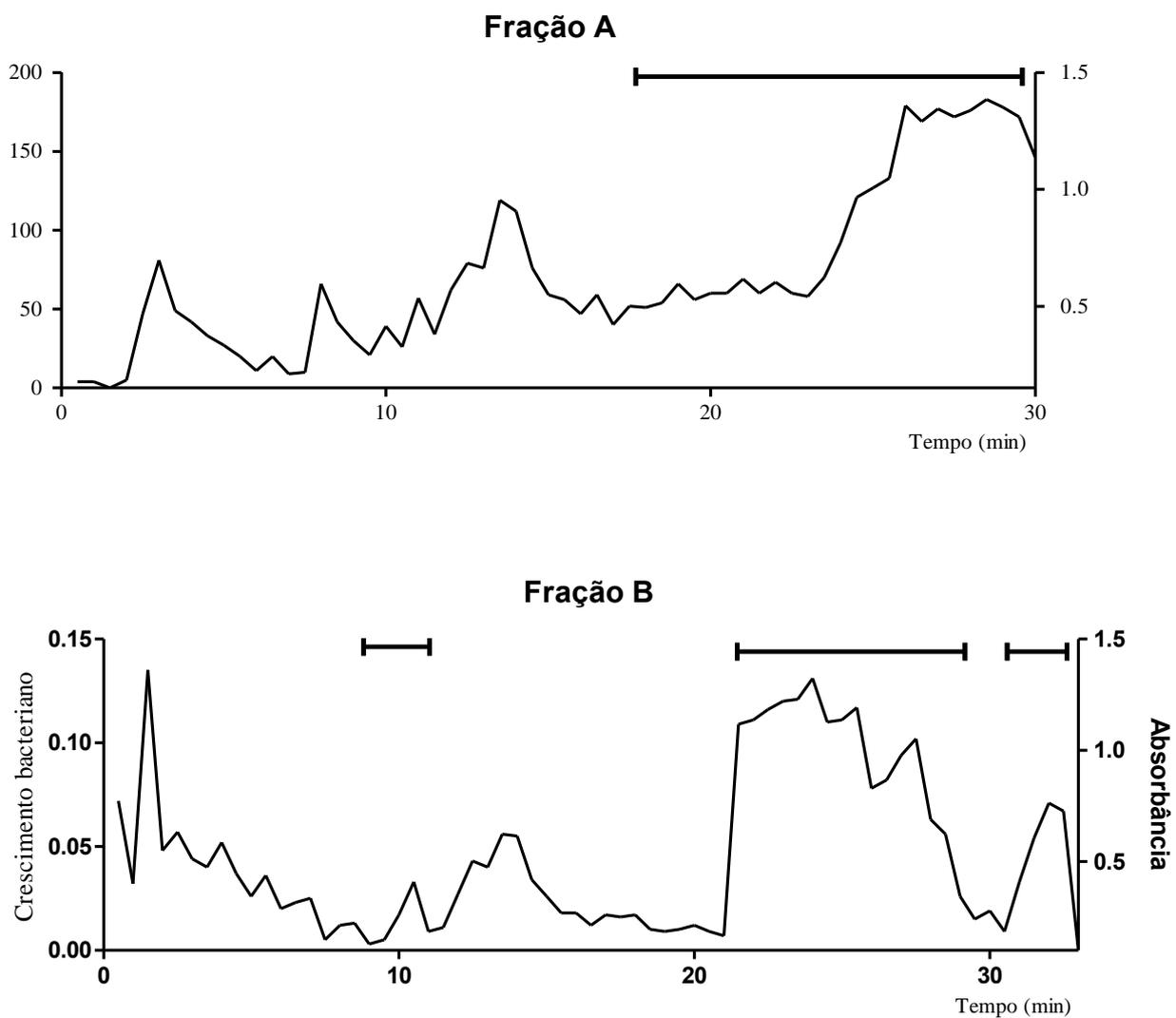


Figura 3: Subfracionamento por troca iônica das frações com atividade antimicrobiana. Barras correspondem às frações em que houve atividade biológica. Frações A e B.

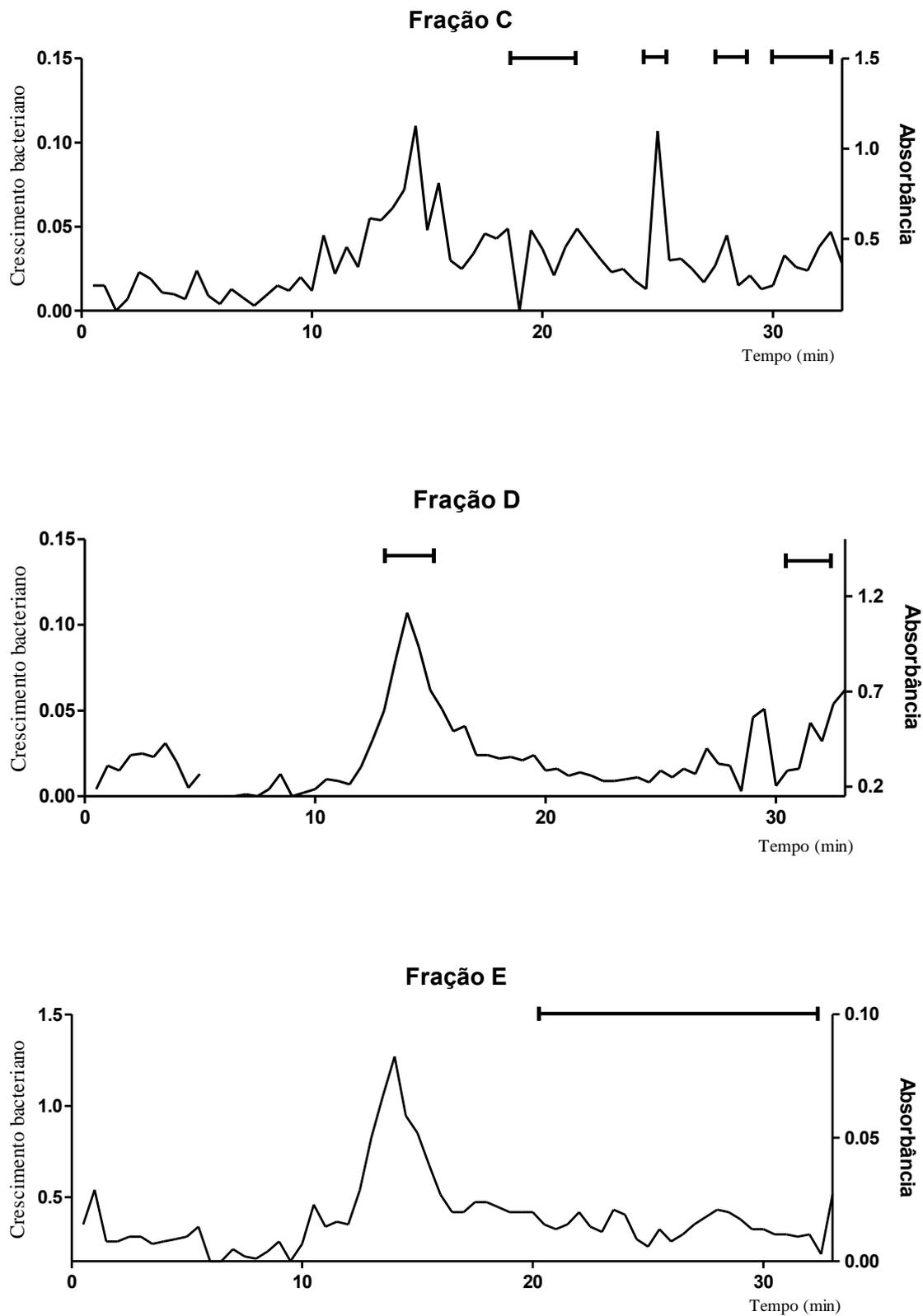


Figura 4: Subfracionamento por troca iônica das frações com atividade antimicrobiana. Barras correspondem às frações em que houve atividade biológica. Frações C,D e E

3.2. Ensaio neurobiológico

Os efeitos do veneno bruto (25, 100 e 250 mg/mL) sobre o comportamento dos camundongos estão representados na Figura 4. A análise de variância ANOVA de uma via revelou diferenças significativas entre os grupos em relação aos comportamentos de imobilidade e exploração nos camundongos tratados com veneno bruto (Figura 4A e B). Os animais que receberam veneno bruto na concentração de 250 mg/mL tiveram um aumento no tempo de imobilidade ($F_{3,27}= 2,977$; $p < 0,001$) e diminuição no tempo gasto no comportamento de exploração ($F_{3,27}= 4,386$; $p < 0,001$). Não houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle e os animais tratados com veneno bruto nas concentrações 25 e 100 mg/mL. Entretanto, pode-se observar o aparecimento de um cluster de comportamentos pro-cursivos e também de crises tônico-clônicas em animais tratados com veneno 250mg/mL (Figura 4D e 4E).

Os efeitos do veneno desnaturado (25 e 100mg/mL) sobre o comportamento dos camundongos estão representados na Figura 5. A análise de variância ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos em relação aos comportamentos de imobilidade, exploratório e “grooming” nos camundongos tratados com veneno desnaturado (5A, 5B e 5C). Os efeitos do veneno desnaturado nos ensaios anticonvulsivantes estão resumidos na tabela 1. Todos os animais tratados com bicuculina apresentaram comportamento do tipo tônico-clônico e morte durante ou logo após os experimentos. Não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos entre os animais do grupo controle e os animais tratados com o veneno desnaturado (25mg/mL), a cerca do agente convulsivante (bicuculina).

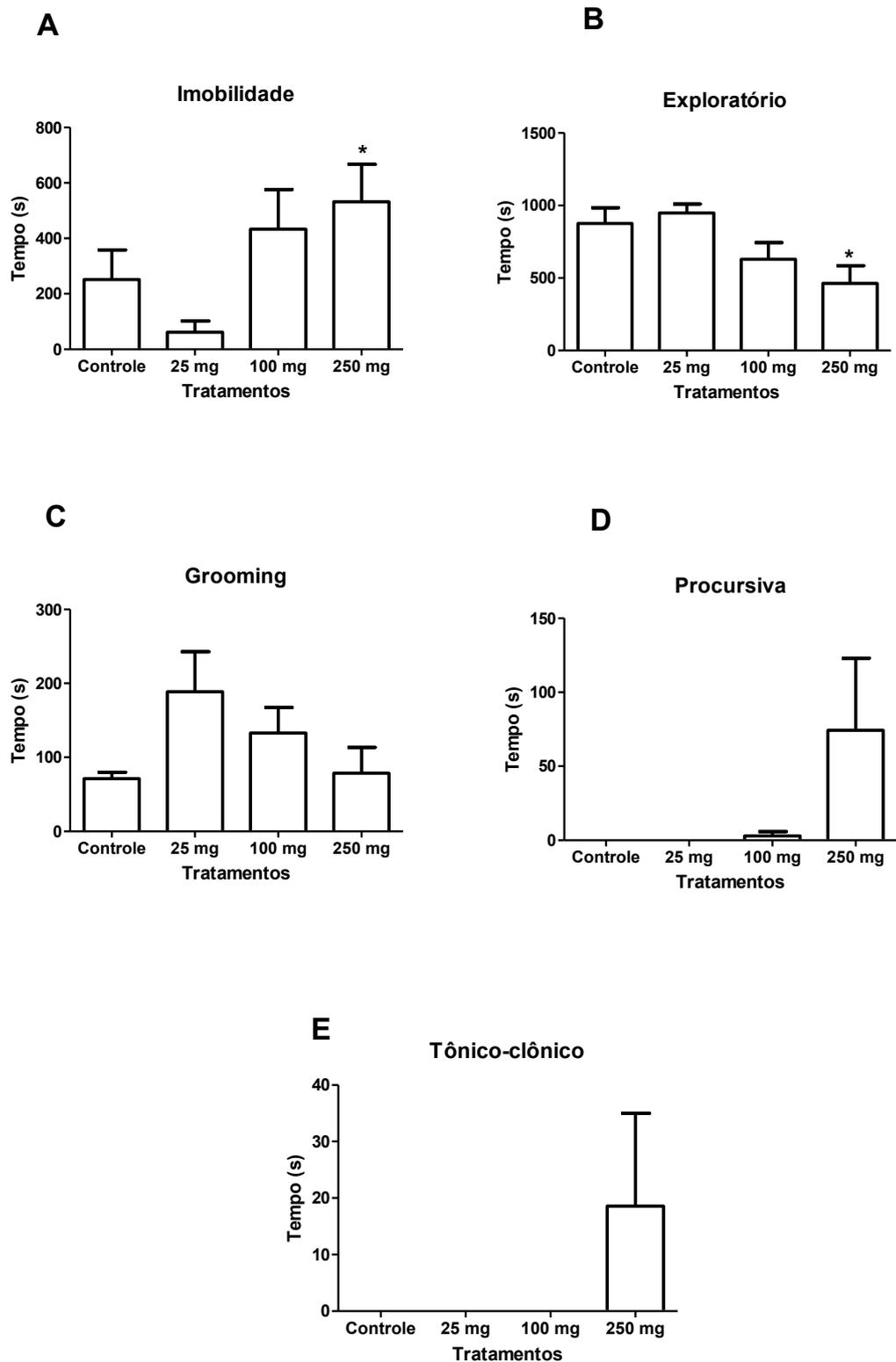


Figura 4: Tempo (s) gasto pelos camundongos em cada grupo comportamental, após microinjeção intracerebroventricular de solução salina ou diferentes concentrações (25, 100 e 250 mg/mL) do veneno bruto de *Pachycondyla striata*. Os dados são expressos em média \pm EP. (*) quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguido do pos-hoc de Tukey).

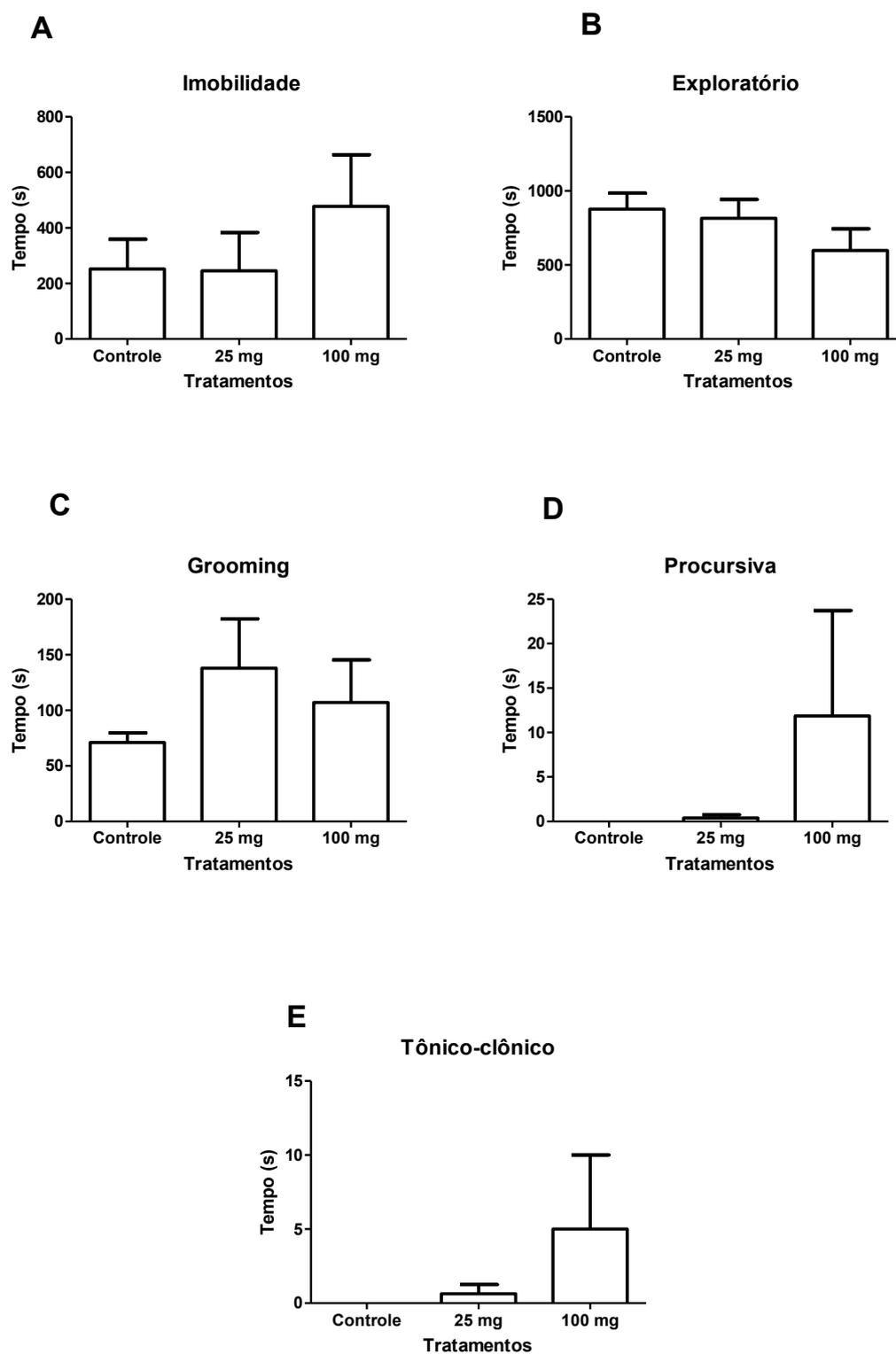


Figura 5: Tempo (s) gasto pelos camundongos em cada grupo comportamental após microinjeção intracerebroventricular de solução salina ou diferentes concentrações (25,100 e 250 mg/mL) do veneno desnaturado de *Pachycondyla striata*. Os dados são expressos em média \pm EP.

Tabela 2: Efeitos da administração intracerebroventricular do veneno desnaturado de *Pachycondyla striata* nos ensaios de convulsão induzida por bicuculina

Tratamento	Salina x Bicuculina	25mg	100mg	Veneno (25mg) x bicuculina
Número de animais	6	8	7	8
Mortalidade	6/6	1/8	3/7	5/8
Imobilidade	0/6	6/8	7/7	4/8
Exploratório	3/6	8/8	7/7	4/8
“Grooming”	0/6	7/8	5/7	4/8
Procurativa	6/6	1/8	1/7	6/8
Tônico-clônico	6/6	1/8	1/7	5/8

4. Discussão

Este trabalho é o primeiro ensaio biológico que demonstra a atividade antimicrobiana e neurobiológica do veneno de *P. striata*. A atividade antimicrobiana do veneno de formigas foi testada apenas com *P. goeldii* (Orivel et al, 2001), *Myrmecia pilosula* (Zelezetsky et al, 2005), *Solenopsis invicta* (Meer, 1995) e *Crematogaster pygmae* (Quinet et al, 2012). Em *S. invicta*, alcaloides do veneno apresentam atividade antimicrobiana, sendo que rainhas dessa formiga liberam veneno sobre seus ovos para inibir o crescimento de fungos entomopatogênicos (Vander der Meer, 1995). Peptídeos presentes nos venenos de *C. pygmae*, *P. goeldii* e *M. pilosula* apresentam amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativa, embora nenhum desses peptídeos tenham sido isolados.

Os dados aqui obtidos mostram que a atividade antimicrobiana do veneno de *P. striata* é causada por peptídeos, pois quando esse veneno foi tratado com proteinase K ou desnaturado a 95 °C a atividade antimicrobiana foi respectivamente perdida e mantida. A proteinase K hidrolisa as ligações peptídicas, inativando as proteínas, enquanto a temperatura afeta as interações fracas, e a perda da estrutura tridimensional, acarretando na perda da função proteica. Entretanto alguns peptídeos mantem sua atividade mesmo em elevadas temperaturas (Nelson & Cox, 2000).

O potencial antimicrobiano do veneno de *P. striata* é relativamente pequeno quando comparado aos antibióticos de referência como ampicilina, amoxicilina e azitromicina. O veneno de *P. striata* apresenta MIC de 62,5 µg/mL enquanto a ampicilina apresenta MIC para *S. aureus* de 0,06 mg/L, amoxicilina e azitromicina de 0,12mg/L (Andrews, 2001). No entanto, considerando que poucas frações de proteínas/peptídeos do veneno de *P. striata* apresentaram atividade antimicrobiana, é possível que essas proteínas/peptídeos quando isoladas apresentem elevado potencial antimicrobiano, com MIC próximo daqueles dos antibióticos disponíveis no mercado. Vale salientar, que as frações de proteínas/peptídeos da separação por troca iônica apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações baixas, insuficientes para serem detectados em espectrômetro de alta resolução como o utilizado neste trabalho, sugerindo que esses compostos mesmo em baixas concentrações são ativos contra bactérias.

Das cinco proteínas identificadas a partir das frações com ação antimicrobiana, apenas a Analgesina 2, peptídeo de defesa, secretado pela pele de *Hyla simplex*, apresenta atividade antimicrobiana comprovada (Uniprot, 2014).

Como observado no capítulo 1, a análise proteômica do veneno de *P. striata* evidenciou a presença dos peptídeos Buforina-EC e Dinoponeratoxina Da-1837, as quais apresentam amplo espectro de atividade contra bactérias gram positivas e gram negativas (Assodech et al, 2012; Johnson et al, 2010). Entretanto, nas análises das frações aqui realizadas, esses peptídeos não foram identificados, possivelmente devido à baixa concentração final dos peptídeos presente nas frações obtidas aqui analisadas.

Possivelmente a função da presença de peptídeos antimicrobianos no veneno de *P. striata* seria de proteção à colônia contra a infecção por bactérias. Orivel et al (2001) justificam a presença de proteínas com função antimicrobiana no veneno de formigas predadoras, pela necessidade de minimizar o potencial de infecção por bactérias, fungos e vírus, pois essas formigas transportam as suas presas, logo após a imobilização, para seus ninhos, aumentando o potencial de infecção por microrganismos presentes nas presas.

Aparentemente, as frações apresentam peptídeos antimicrobianos que são desconhecidos para a ciência. Entretanto, um maior número de trabalhos são necessários para isolar e caracterizar esses compostos.

Diferentes componentes neuroativos vêm sendo isolados a partir do veneno de diferentes espécies de himenópteros (Piek, 1991), entretanto poucos são os trabalhos que visam estudar as neurotoxinas presentes no veneno de formigas. *Pachycondyla striata* é a segunda espécie de formiga a ter o efeito neurobiológico do veneno testado em vertebrados;

trabalhos com esse objetivo foram realizados com o veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* (Lopes et al, 2013).

O veneno bruto de *P. striata* reduziu o comportamento de exploração e aumentou a imobilidade, além de promover comportamentos convulsivos caracterizados por respostas pró-cursivas seguidas de crises tônico-clônicas (Figura 4). Este tipo de efeito neurotóxico também já foi observado em venenos de outras espécies animais. Por exemplo, toxinas presentes no veneno do escorpião *Tityus bahiensis* apresentam efeitos convulsivos e induzem a degeneração de células da região do hipocampo do cérebro de ratos (Ossanai et al, 2013). Alterações comportamentais como diminuição da atividade exploratória e aumento da imobilidade também foram observados após injeção intracerebroventricular de veneno *D. quadriceps*, em camundongos (Ferreira, 2012).

Proteínas com atividade neurotóxica estão presentes no veneno de *P. striata* (Capítulo 1), como a U-10 ctenotoxina, que altera o funcionamento de canais de sódio e uma proteína não identificada da família das proteínas inibidoras dos canais de potássio. A presença de proteínas como essas, que alteram o funcionamento de canais iônicos nos neurônios, pode resultar na liberação excessiva de neurotransmissores. Essa hiperexcitabilidade das células nervosas pode explicar a presença de convulsões observada neste trabalho, quando os camundongos foram expostos à dose mais elevada de veneno bruto (250mg/mL) de *P. striata*. Entretanto, além dessas proteínas deve haver outros compostos neuroativos, pois doses de 100 mg/mL de veneno desnaturado também induziram a ocorrência de convulsões nos camundongos, evidenciadas pelos comportamentos procursivo e tônico-clônico e em doses baixas no veneno desnaturado (25 e 100 mg/ mL) de *P. striata* .

Efeitos convulsivos são a última expressão de uma variedade de fenômenos patológicos, resultantes de um desequilíbrio entre a excitação e inibição neuronal (Carvalho et al, 2000). É possível que todas as alterações comportamentais dos camundongos que receberam 250 mg/mL de veneno de *P. striata* estejam associadas a eventos pré-convulsivos.

O veneno desnaturado mostrou ser pouco eficaz contra as convulsões induzidas por bicuculina, diferentemente dos resultados obtidos em outras espécies de himenópteros, como *D. quadriceps* (Lopes et al, 2013) e em *Polybia occidentalis* (Motari et al, 2007), nos quais compostos presentes no veneno desenvolvem algum tipo de proteção ao sistema nervoso central.

5. Considerações finais

A presença de peptídeos antimicrobianos e de neurotoxinas faz do veneno de *P. striata* uma fonte importante de compostos com potencial farmacológico para estudos que visem tratamento de doenças infecciosas e na compreensão de mecanismos de neurotransmissão.

6. Agradecimentos

Os autores são gratos ao Dr. Jacques Charles Hubert Delabie pela identificação da espécie *P. striata*. Ao senhor Manoel José Ferreira pelo auxílio as coletas de campo. Ao Laboratório de Estudos da Memória da UFRN, ao Núcleo de Biomoléculas da UFV e o Laboratório de imunovirologia Molecular da UFV pela estrutura/suporte físico disponível. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo convênio PRONEX SECTI-FAPESB/CNPq - PNX 0011/2009 e pela Fundação Arthur Bernandes (FUNARBE).

Capítulo 3

Composição química do veneno de *Pachycondyla striata* F. Smith (Formicidae: Ponerinae)

Resumo

As operárias das espécies sociais usam seu veneno na captura de presas e na defesa da colônia. O veneno da formiga *P. striata* foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Quarenta e oito compostos foram identificados compondo o veneno da espécie, dos quais 35 são hidrocarbonetos de cadeia longa (C19-C36). Os compostos mais abundantes são os hidrocarbonetos lineares C22-C30, em conjunto representam aproximadamente 70% do conteúdo do veneno. Os outros compostos que não são hidrocarbonetos representam em conjunto menos do que 2% de todo o veneno. A composição do veneno variou quantitativamente entre as amostras diferentes da mesma colônia. A possível função desenvolvida pelos compostos aqui identificados é discutida.

Palavras-chave: Ponerinae, glândula de veneno, secreção exócrina, análises químicas.

Abstract

The workers in the social species use their venom for prey capture and defense of the colony. The venom of the ant *P. striata* was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Forty-eight compounds were identified in the venom of the species, of which 35 are long chain hydrocarbons (C19-C36). The most abundant compounds are the linear hydrocarbons C22-C30 together they represent about 70% of the content of the venom. Compounds other than hydrocarbons together represented less than 2% of the whole venom. The composition of the venom varied quantitatively between different samples in the same colony. The possible function developed by the compounds identified here is discussed.

Key Words: Ponerinae, venom gland, exocrine secretion, chemical analysis.

1. Introdução

A defesa coletiva é uma característica dos insetos sociais. Muitos Hymenoptera, incluindo diversas espécies de formigas, desenvolveram estruturas especializadas na captura de presas e na defesa individual e/ou da colônia (Grimaldi & Engel, 2005). Originado a partir do ovipositor dos não-aculeados, o aparato de ferrão, e em especial as suas secreções venenosas, representam um armamento morfológico e químico eficiente para a manutenção da colônia (Grimaldi & Engel, 2005).

Nas últimas décadas diversos trabalhos têm caracterizado quimicamente a secreção venenosa de diferentes espécies de formigas, descrevendo compostos pertencentes a diferentes classes químicas como ácidos graxos, mono-, sesqui-, di-terpenos, álcoois, acetato, hidrocarbonetos, piperidinas, entre outros (Cavill et al 1982; Schmidt, 1982; Morgan et al, 2003; Morgan, 2009). Esses compostos e suas misturas têm uma elevada diversidade funcional, agindo como agentes causadores de dor e irritação, agentes repelentes e agentes tóxicos (Schmidt, 1982).

Adicionalmente aos compostos com função defensiva/ predatória, a glândula de veneno de algumas espécies de formigas produz substâncias que estão envolvidas no processo de comunicação química desses insetos (Morgan, 2009). As substâncias produzidas pela glândula de veneno que agem como feromônios, usualmente, estão presentes em pequenas quantidades (Jackson & Morgan, 1993), e muito pouco de suas estruturas químicas têm sido elucidadas. Morgan (2009) identificou algumas substâncias presentes na glândula de veneno de formigas que agem como feromônio de trilha, entre eles 4-metil-3-heptanol, 6-metil-3-nonil acetato, 2-6-dimetil-3-nonil acetato e 7-metil-4-decil acetato. Além do feromônio de trilha, também já foram identificados feromônios sexual, de alarme, recrutamento e de rainha (Schmidt, 1982).

O gênero *Pachycondyla* (Formicidae: Ponerinae) é um dos mais diversos entre os Formicidae, incluindo cerca de 250 espécies das 15.000 espécies de formigas descritas no mundo (AntWeb, 2014). As espécies desse gênero apresentam pouco ou nenhum dimorfismo entre rainhas e operárias, comportamento predatório e colônias relativamente pequenas quando comparadas a outros gêneros de formigas (Mackay & Mackay, 2010).

No Brasil existem aproximadamente 50 espécies de *Pachycondyla* (Mackay & Mackay, 2010), dentre as quais *Pachycondyla striata* Fr. Smith (1858) é endêmica da América do Sul e aparece como uma espécie comum nas regiões sudeste e sul do Brasil (Mackay e Mackay, 2010). Entretanto, até o momento, poucas espécies do gênero

Pachycondyla tiveram os compostos químicos do veneno caracterizados, tais como *P. villosa* (Blum & Hermann (1978), *P. foetens* (Janssen et al, 1995), *P. apicalis* (Cruz-Lopez & Morgan, 1997), *P. insularis* e *P. tridentata* (Maschwitz et al, 1981) e *P. obscuricornis* e *P. tarsata* (Morgan et al, 2003).

Em relação aos estudos desenvolvidos com o aparato de ferrão de *P. striata*, Ortiz e Camargo-Mathias (2006) descreveram a morfologia da glândula de veneno, assim como Morgan (2003) identificou os voláteis a partir das glândulas de veneno e de Dufour. O objetivo deste estudo foi aprofundar os conhecimentos sobre a composição química de compostos não proteicos do veneno de *P. striata*.

2. Material e Métodos

2.1. Origem dos insetos e preparo dos extratos

Três colônias de *P. striata* foram coletadas na Mata da Biologia (20°48'S 42°51'W), fragmento florestal do município de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil, e mantidas em condições laboratoriais a 26 °C. Trinta operárias de três colônias foram crio-anestesiadas por cerca de três minutos e posteriormente dissecadas em microscópio estereoscópio. Três amostras de cada colônia, contendo cada uma 10 reservatórios da glândula de veneno, foram colocadas em eppendorfs com 50 µL de água destilada. A amostra foi levemente macerada para ruptura da parede do reservatório da glândula de veneno, centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para vials, e em seguida adicionados 50 µL de hexano (Grau HPLC, Mallinkrodt), seguido de leve agitação por 30 s e repouso por três minutos. O sobrenadante foi retirado, secado a vácuo e estocado à -20 °C. De cada colônia foram realizadas triplicatas, cada uma contendo 10 reservatórios da glândula de veneno.

2.2. Análises químicas

Componentes não proteicos do veneno da espécie em estudo foram analisados por cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas (GC-MS). As amostras previamente secas foram ressuspendidas em 20 µL de uma solução contendo hexano (HPLC, Mallinkrodt) e 20 ng de acetato de heptila como padrão interno. Alíquotas de 1 µL da amostra foram injetadas no cromatógrafo de fase gasosa QP-2010 Plus (Shimadzu), equipado com coluna capilar de sílica RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste num fluxo de 1mL/min. A temperatura do forno foi programada a partir de 70°C

mantida por 5 min, com incremento de 6°C/min até a temperatura de 280°C, permanecendo a essa temperatura por 10 min. O tempo total de corrida foi de 55 min. As análises foram realizadas no modo “splitless”. A temperatura do injetor foi de 250°C. Para as análises dos espectros de massas foram calculados os índices de Kovats (IK) dos picos, seguido de comparação com os espectros de massas disponíveis nas bibliotecas eletrônicas Wiley 7.0 e NIST 8.0 (NIST Mass Spectrometry, 2007).

3. Resultados

As análises de GC/MS mostraram que os compostos não proteicos do veneno de *P. striata* formam uma mistura simples de compostos, com predominância de n-alcenos (Figura 1; Tabela 1). Quarenta e oito compostos foram encontrados no veneno, dos quais 35 são hidrocarbonetos. Entre os componentes mais abundantes estão os hidrocarbonetos lineares C₂₂₋₃₀, os quais, em conjunto, totalizam 70% do volume do veneno. Os compostos que não são hidrocarbonetos compreenderam menos de 2% do volume total do veneno de *P. striata*.

Diferenças quantitativas e qualitativas na composição do veneno foram observadas entre as três colônias analisadas. Compostos como Tricosano, Tetracosano e Pentacosano são aproximadamente quatro vezes mais abundantes na colônia 2 quando comparada a colônia 3 e, aproximadamente sete vezes entre as colônias um e dois (Tabela 1).

Dos 48 compostos identificados, 22 estão ausentes nas operárias da colônia 1, 6 na colônia 2 e 5 na colônia 3 (Tabela 1), sendo que n-Hexatriacontano ocorreu exclusivamente na colônia 1, n-Pentacosano e n-Hentriacontano nas amostras da colônia 2 e n-Octacosano e mais dois compostos não identificados na colônia 3 (Tabela 1).

Diferenças na concentração dos compostos entre amostras de uma mesma colônia também foram detectadas neste trabalho (Tabela 1; Figura 2).

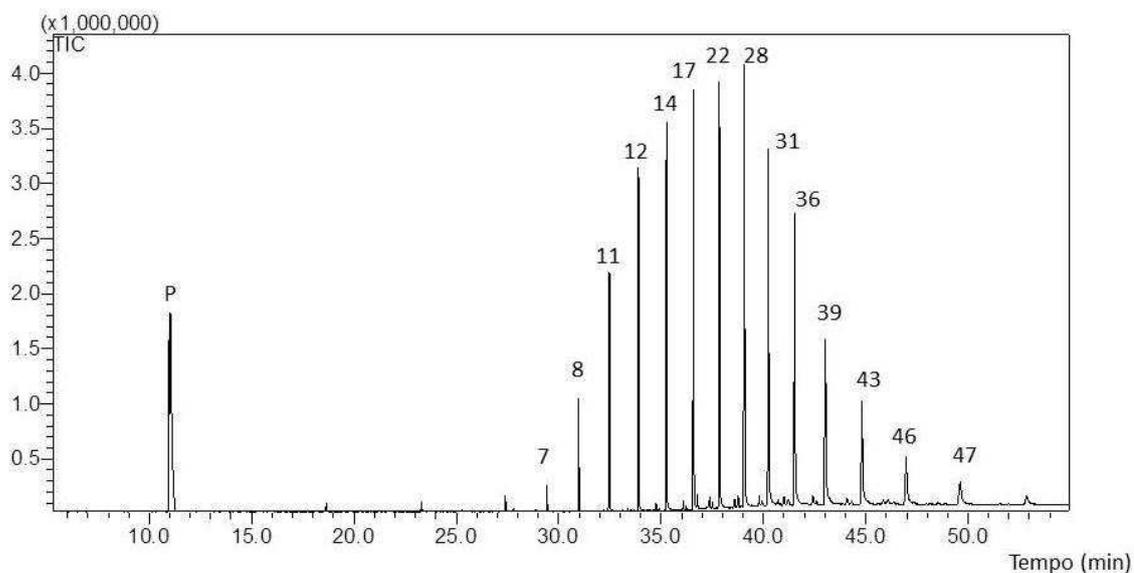


Figura 1: Espectro de massas GC-MS a partir do veneno de *Pachycondyla striata*. Os componentes mais representativos estão numerados como representados na tabela 2. (P) Padrão interno.

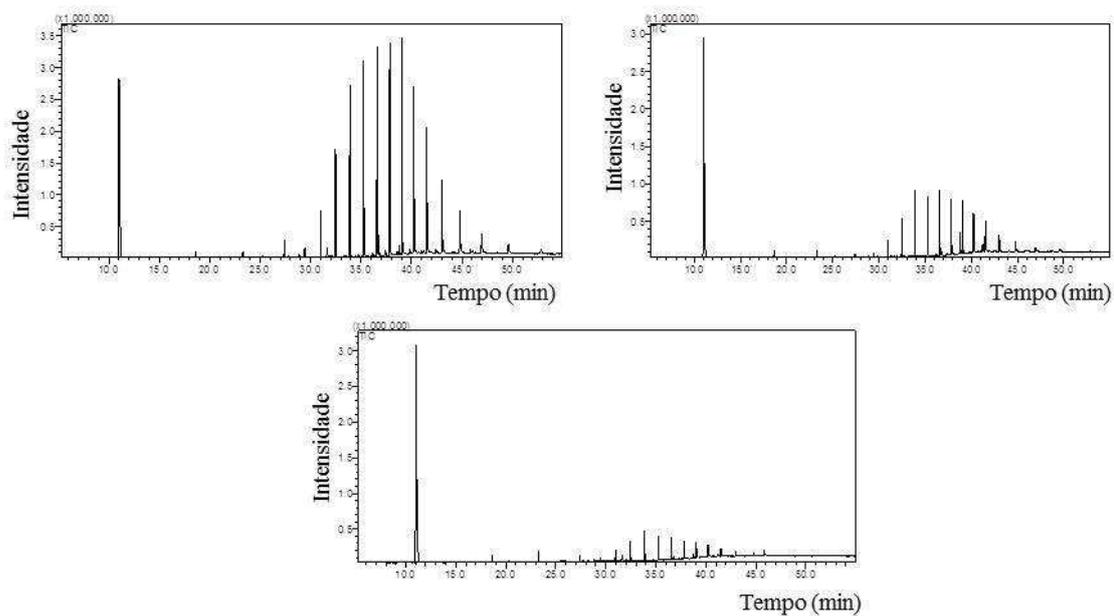


Figura 2: Espectro de Cromatografia gasosa de três amostras com 10 indivíduos cada, de uma mesma colônia, evidenciando a variação intracolony dos compostos químicos de *P. striata*. Volume injetado de veneno em cada amostra 1 μ L.

Tabela 1: Quantidade relativa dos constituintes da glândula de veneno de operárias de *P. striata* de três colônias (C1, C2 e C3) identificados por GC/MS. O número indicado no composto na primeira coluna corresponde ao composto da figura 1. n = número de réplicas contendo cada uma 10 reservatórios da glândula de veneno.

	TR	Ik	Composto	C1 (n=3)	C2 (n=3)	C3 (n=3)
1	18.641	1420	Composto não identificado	0,24 ± 0,07	0,51 ± 0,42	0,28 ± 0,04
2	23.270	1647	Composto não identificado	0,28 ± 0,11	0,49 ± 0,42	0,26 ± 0,06
3	27.376	1875	Composto não identificado	0,10 ± 0,10	0,38 ± 0,58	---
4	27.382	1875	Composto não identificado	0,36 ± 0,62	0,63 ± 1,10	0,40 ± 0,57
5	27.790	1899	Nonadecano	----	0,11 ± 0,18	0,02 ± 0,03
6	28.838	1964	Composto não identificado	----	----	0,05 ± 0,05
7	29.413	1998	Eicosano	0,12 ± 0,10	0,95 ± 1,48	0,20 ± 0,16
8	30.968	2098	Heneicosano	0,54 ± 0,42	4,08 ± 6,34	0,92 ± 0,84
9	31.634	2144	Composto não identificado	-----	----	0,20 ± 0,19
10	31.555	2138	Composto não identificado	----	----	0,06 ± 0,06
11	32.452	2198	Docosano	1,14 ± 0,96	9,04 ± 14,06	2,10 ± 2,04
12	33.880	2298	Tricosano	1,97 ± 1,38	13,42 ± 20,75	3,39 ± 3,15
13	34.736	2362	n-Tricosano	0,03 ± 0,06	0,27 ± 0,47	0,04 ± 0,07
14	35.249	2399	Tetracosano	1,78 ± 1,60	15,49 ± 24,35	3,61 ± 3,84
15	36.075	2462	n-Tetracosano	0,03 ± 0,06	0,31 ± 0,54	0,05 ± 0,09
16	36.222	2473	n-Tetracosano	---	0,17 ± 0,29	0,02 ± 0,04
17	36.564	2499	Pentacosano	1,96 ± 1,71	17,13 ± 26,99	4,12 ± 4,41
18	36.761	2515	Composto não identificado	0,46 ± 0,63	0,85 ± 0,84	0,37 ± 0,46
19	36.778	2516	n-Pentacosano	----	0,58 ± 1,01	-----
20	37.360	2562	n-Pentacosano	0,06 ± 0,05	0,37 ± 0,65	0,07 ± 0,12
21	37.504	2574	n-Pentacosano	----	0,20 ± 0,34	0,03 ± 0,06
22	37.828	2599	Hexacosano	1,84 ± 1,76	17,76 ± 28,38	4,07 ± 4,66
23	38.540	2658	n-Hexacosano	----	0,08 ± 0,13	0,01 ± 0,02
24	38.585	2662	n-Hexacosano	-----	0,34 ± 0,58	0,06 ± 0,10
25	38.753	2676	Composto não identificado	0,51 ± 0,25	0,10 ± 0,17	0,35 ± 0,45
26	38.765	2677	n-Hexacosano	----	0,69 ± 1,19	0,16 ± 0,28
27	38.878	2686	Composto não identificado	0,04 ± 0,06	-----	0,03 ± 0,06
28	39.045	2699	Heptacosano	1,90 ± 1,81	18,12 ± 28,97	4,15 ± 4,85
29	39.784	2762	n-Heptacosano	----	0,32 ± 0,55	0,05 ± 0,09
30	39.928	2774	n-Heptacosano	----	0,15 ± 0,25	0,02 ± 0,04
31	40.224	2799	Octacosano	1,53 ± 1,60	15,84 ± 25,60	3,46 ± 4,20
32	40.692	2836	Composto não identificado	0,05 ± 0,05	0,25 ± 0,25	0,01 ± 0,02
33	41.135	2871	n-Octacosano	----	----	0,06 ± 0,09
34	41.216	2877	Composto não identificado	0,15 ± 0,15	0,04 ± 0,08	0,11 ± 0,18
35	41.229	2878	n-Octacosano	-----	0,21 ± 0,36	0,05 ± 0,08
36	41.504	2899	Nonacosano	1,26 ± 1,36	14,68 ± 23,99	3,06 ± 3,77

Tabela 1 - continuação

37	42.420	2961	n-Nonacosano	----	0,59 ± 1,03	0,04 ± 0,08
38	42.600	2973	n-Nonacosano	----	0,22 ± 0,38	0,02 ± 0,03
39	43.003	3000	Triacotano	0,81 ± 0,91	0,33 ± 0,29	0,37 ± 0,48
40	43.021	3622	n-Triacotano	----	10,43 ± 18,07	1,60 ± 2,78
41	43.230	3635	n-Hentriacotano	----	0,02 ± 0,03	----
42	44.778	3821	n-Tritriacotano	0,57 ± 0,66	0,02 ± 0,03	1,40 ± 1,95
43	44.808	3823	n-Tritriacotano	----	7,59 ± 13,15	----
44	45.830	3873	Composto não identificado	0,12 ± 0,21	0,09 ± 0,16	0,17 ± 0,15
45	46.927	3908	n-Hexatriacontane	0,27 ± 0,37	----	----
46	46.964	3910	n-Hexatriacontane	----	4,05 ± 7,01	0,72 ± 1,05
47	49.607		Hidrocarboneto não identificado	----	2,53 ± 4,39	0,29 ± 0,50
48	52.852		Hidrocarboneto não identificado	----	0,36 ± 0,62	----

4. Discussão

Os hidrocarbonetos foram os principais compostos presentes no veneno de operárias de todas as colônias de *P. striata* analisadas. Estes compostos têm sido reportados na literatura como o principal componente da cutícula dos insetos (Blomquist, 2010), e a sua presença vem sendo com frequência notificada em diferentes glândulas dos insetos, como glândulas pos-faringeal e mandibular de *P. indica* (Hefetz et al, 2001; Morgan et al 1999), glândula mandibular de *P. striata* (Morgan, 1999), glândula pigidial de *Dolichoderus attelaboides* (Blum, 1982) e na glândula de Dufour de *Paratrechina longicornis* (Witte, 2007).

Os cinco principais compostos identificados neste trabalho foram tetracosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano e nonacosano. Apesar da variação entre as colônias, o heptacosano está presente em maior proporção em todas elas, seguido do hexacosano, pentacosano, octacosano, tetracosano e nonacosano, que também estão representados como os principais compostos nas três colônias avaliadas. Variação na composição do veneno entre membros de diferentes castas e diferentes idades em uma mesma colônia foi observado por Fox et al (2012) em *Solenopsis saevissima*. Zacek et al (2009) analisando as secreções da glândula labial de duas espécies de *Bombus* (*B. terrestris* e *B. lucorum*), concluiu que a produção e composição da secreção da glândula labial em machos dessas espécies varia consideravelmente com a idade. É possível que as variações encontradas neste trabalho fossem devido à seleção aleatória de indivíduos de diferentes idades e diferentes funções desenvolvidas na colônia, para compor a amostragem. *Pachycondyla*

striata possui pouca ou nenhuma variação morfológica entre os indivíduos da colônia, dificultando que parâmetros como idade e função exercida na colônia pudessem ser controlados neste trabalho.

Comparado ao veneno de outras espécies de formigas, o veneno de *P. striata* mostrou ser um recurso rico e diverso de produtos exócrinos. Mashaly et al (2010), estudando o veneno da espécie *Monomorium niloticum*, identificaram apenas cinco compostos [2-Heptyl-5-(50-hexenyl)-1-pyrroline, 2-Heptyl-5-(50hexenyl)1pyrrolidine, 2-(80-Nonenyl)-5-(50-hexenyl)-1-pyrroline, 2-(80-Nonenyl)-5-(50-hexenyl)-1-pyrrolidine, 2-(80,x-Nonadienyl)-5-(50-hexenyl)-1-pyrrolidine] na glândula de veneno. Jason et al (2003), comparando as secreções químicas do veneno de nove espécies de *Messor*, encontraram de um a treze compostos na glândula de veneno das espécies analisadas, entre eles diferentes tipos de hidrocarbonetos. Morgan et al (2003) analisaram as secreções do veneno de diferentes espécies da subfamília Ponerinae, e nenhuma delas apresentou uma diversidade de compostos superior a encontrada neste trabalho. Entre as espécies analisadas por Morgan et al (2003) estão *Pachycondyla tarsata* e *P. obscuricornis*, onde na primeira espécie foram identificados os compostos Dimetilaminoetanol, 2,6-dimetilpiperidino (dois isômeros), um tipo de amina, índole, cyclo-prolileucina e alguns outros dipeptídeos, enquanto que, na segunda encontraram benzaldeído, 2,5-dimetilpirazino, limoneno, trimetilpirazino, 2,5-dimetil-3-etilpirazino e índole. Nenhum desses compostos foi encontrado em *P. striata*.

Morgan (2003) analisando as secreções químicas da glândula mandibular de *P. striata*, também reportou uma maior complexidade de compostos nessa glândula quando comparada à glândula mandibular de outras espécies de formigas. Em relação à glândula de veneno, ele identificou apenas os compostos nonanal (C₉H₁₈O), decanal (C₁₀H₂₀O) e limoneno (C₁₀H₁₆), compostos altamente voláteis e que não estão entre os compostos encontrados neste trabalho. Isto pode ser devido ao fato de diferentes métodos de extração terem sido utilizados. Em seu trabalho, Morgan et al (2003) utilizaram capilares de vidro, inseridos diretamente no reservatório de veneno.

Entre os trabalhos com diferentes glândulas de formigas, a presença de hidrocarbonetos parece ser comum à glândula de Dufour, glândula também associada ao aparato de ferrão. Um número elevado desses compostos foi identificado nesta glândula em *Paratrechina longicornis* (Witte et al., 2007), em *Ectatomma* sp. (Morgan, 2003), em *Cataglyphis bicolor* e em *C. viaticus* (Dahbia et al, 2008).

Os hidrocarbonetos mais expressivos encontrados neste trabalho, já foram identificados na glândula de Dufour de diferentes espécies de Hymenoptera. Pentacosano foi encontrado compondo a glândula de Dufour de *Platythyrea cribinodis* e *Diacamma ceylonense* (Mogan et al, 2003); O Hexacosano na glândula de Dufour de *D. ceylonense* e *D. indicum* (Morgan et al, 2003); Heptacosano na glândula de Dufour de *Platythyrea cribinodis* (Morgan et al, 2003) e de rainhas de *Bombus terrestris* (Cahlikova et al, 2004); Octacosano e nonacosano na glândula de Dufour de *Apis mellifera ligustica* (Katzav-Gozansky et al, 2002). As funções desempenhadas por esses compostos na glândula de Dufour ainda são obscuras, entretanto, Menzel et al (2008) sugerem que a glândula de Dufour produz compostos que irão compor a cutícula dos insetos. Blomquist (2010) sugere que apenas os hidrocarbonetos com numero inferior a 20 carbonos são voláteis e podem desenvolver função como feromônio. Com exceção do nonadecano, todos os demais hidrocarbonetos encontrados no veneno de *P. striata* apresentam >20 átomos de carbono e, provavelmente, não são voláteis, podendo ser hidrocarbonetos cuticulares. Talvez essa função de produção de compostos para compor a cutícula também seja desenvolvida pela glândula de veneno de *P. striata*, entretanto trabalhos que visem responder essas perguntas ainda são necessários.

Morgan (2009) ressalta a importância da glândula de veneno na produção de compostos que agem como feromônio de trilha. Steinmetz et al (2002), estudando hidrocarbonetos cuticulares da vespa social *Vespula vulgaris*, avaliou o envolvimento de hidrocarbonetos cuticulares no comportamento de marcação de trilha dessa espécie. Entre os compostos identificados por Steinmetz et al (2002) e que agem como feromônio de trilha estão os hidrocarbonetos C₂₃-C₃₁. Talvez essa função de produção de hidrocarbonetos para agirem como feromônio de marcação de trilha possa ser outra função do veneno de *P. striata*.

É possível que alguns dos compostos presentes no veneno de *P. striata*, mas que não foram identificados funcionem como feromônio. Porém, mais estudos são necessários para identificação e/ou caracterização desses compostos.

5. Considerações finais

A presença de hidrocarbonetos no veneno de formigas não é comum. A elevada diversidade de compostos e hidrocarbonetos presente no veneno de *P. striata* confirma que a química do veneno nos Ponerinae é mais diversificada do que vem sido demonstrado nas últimas décadas. Estudos futuros que visem elucidar a função dos compostos do veneno em *P. striata* são necessários para uma melhor compreensão da espécie, e do grupo das Ponerinae de

forma geral. A realização de testes comportamentais no intuito de verificar o envolvimento dessas substâncias na comunicação química da espécie em estudo é imprescindível.

6. Agradecimentos

Os autores são gratos ao Dr. Jacques Charles Hubert Delabie pela identificação da espécie *P. striata*. Ao Dr. Alexandre F. Pereira pelo auxílio na identificação dos espectros de GC/MS. A Dr^a Sandra Cunha pela injeção das amostras. Ao senhor Manoel José Ferreira pelo auxílio as coletas de campo. Ao Laboratório de Semioquímicos da UFV, pela estrutura/suporte físico disponível. Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo convênio PRONEX SECTI-FAPESB/CNPq - PNX 0011/2009

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O veneno de *P. striata* é uma solução composta por proteínas, peptídeos e compostos não-proteicos formados principalmente por hidrocarbonetos lineares. A composição dos hidrocarbonetos varia de acordo com a colônia.

Peptídeos presentes no veneno de *P. striata* apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

O veneno de *P. striata* apresenta neurotoxinas que induzem alterações comportamentais quando injetadas no cérebro de camundongos, diminuindo comportamentos comuns como exploração e induzindo comportamentos incomuns como imobilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2001**, 48, 5-16.
- AntWeb. <http://www.antweb.org>. Disponível em 13 de janeiro de 2014.
- 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*. **2007**, 109: 560-565.
- Assodech, A.; Azam, A.G.; Chamani, J. Identification and characterization of novel antibacterial peptides from skin secretions of *Euphlyctis cyanophlyctis*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. **2012**, 18, 107-115.
- Baer, H.; Liu, T.Y.; Anderson, M.C.; Blum, M.; Schmid, W.H.; James, F.J. Protein Components of fire ant venom (*Solenopsis invicta*). *Toxicon*. **1979**, 17, 397-405.
- Blomquist, G.J. Structure and analysis of insect hydrocarbons, in Blomquist, G.J.; Bagnères, A.G. (ed) *Insect Hydrocarbons*. Cambridge University Press. New York. **2010**, 492p.
- Blum, M.S.; Herman, H.R. Venoms and venom apparatuses of the Formicidae, in S, Bettini (ed) *Arthropod venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer, Berlin. **1978**, 48.
- Blum, M.S.; Jones, T.H.; Snelling, R.R.; Overal, W.L.; Fales, H.M.; Hight, R.J. Systematic implications of the exocrine chemistry of some Hypoclinea species. *Biochemical Systematics and Ecology*. **1982**, 10:91-94.
- Cahlikova, L.; Hovorka, O.; Ptacek, V.; Valterova, I. Exocrine gland secretions of virgin queens of five bumblebee species (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Zeitschrift fur Naturforschung*. **2004**, 59:582-589.
- Cardoso, F.C.; Pacífico, L.G.; Carvalho, D.C.; Victória, J.M.; Chávez-Olortequi, C.; Gomez, M.V.; Kalapothakis, E. Molecular cloning and characterization of *Phoneutria nigriventer* toxins active on calcium channels. *Toxicon*. **2003**, 41, 755-763.
- Carvalho, F.F.; Nencioni, A.L.A.; Lebrun, I.; Dorce, V.A.C.; Sandoval, M.R.L. Convulsive effects of some isolated venom fractions of the *Tityus serrulatus* scorpion: behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. **2000**, 6, 1-6.

- Casewell, N.R.; Wuster, W.; Vonk, F.J.; Harrison, R.A.; Fry, B.G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution*. **2013**, 28(4): 219-219.
- Cavill, G.W.K.; Robertson, P.L.; Brophy, J.J.; Clark, D.V.; Duke, R.; Orton, C.J.; Plant, W.D. Defensive and other secretions of the Australian cocktail ant, *Iridomyrmex nitidiceps*. *Tetrahedron*. **1982**, 38:1931-1938.
- Cerovsky, V.; Budesinsky, M.; Hovorka, O.; Cvacka, J.; Voburka, Z.; Slaninová, J.; Borovickova, L.; Fucik, V.; Bednarová, L.; Votruba, I.; Straka, J. Lasioglossins: Three novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae). *A European Journal of Chemical Biology*. **2009**, 10, 2089-2099.
- Chapman, R.F. *The Insects: Structure and Function*, in Simpson, S.J.; Douglas, A.E. (ed.). Cambridge University Press. New York. **2013**, 961p.
- Chen, L.; Lin, Y.; Peng, G.; Li, F. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proceedings of National Academy of Science USA Early Edition*. **2012**, 1-6.
- Cruz-Lopez, L.; Morgan, E.D. Explanation of the bitter taste of the venom of the ponerine ant *Pachycondyla apicalis*. *Journal Chemical Ecology*. **1997**, 23: 705-712.
- Dahbia, A.; Hefetz, A.; Lenoir, A. Chemotaxonomy of some *Cataglyphis* ants from Morocco and Burkina Faso. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2008, 36:564-572.
- El-Safory, N. S.; Fazary, A. E.; Lee, C. K. Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers*. **2010**, 81, 165-181.
- Escoubas, P.; Quinton, L.; Nicholson, G.M. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. **2008**(43): 279-295.
- Ferreira, D.A.N.M. Efeitos pró- e anticonvulsivantes da peçonha de formiga *Dinoponera quadriceps* em camundongos. Monografia. UFRN. Natal. **2012**.
- 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*. **2012**, 1-10.
- Gawronska, B.; Leuschner, C.; Enright, F.M.; Hansel, W. Effects of a lytic peptide conjugated to beta HCG on ovarian cancer: studies in vitro and in vivo. *Gynecology and Oncology* **2002**, 85: 42-52.

- Grimald, D. & Engel, M. S. Evolution of the Insects. Cambridge University Press, New York, United States. **2005**,755p.
- Heinen, T.E.; Veiga, A.B.G. Arthropod venoms and cancer. *Toxicon*. **2011**, 57: 497-511.
- Hoffman, D.R. Allergens in hymenoptera venom XXVI: The complete amino acid sequences of two vespid venom phospholipases. *International Archives of Allergy and Immunology*. **1994**, 104(2), 184-190.
- Hoffman, D.R. Ant venoms. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. **2010**, 1-5.
- Holldobler, B.; Wilson, E.O. The ants. Cambridge, Belknap Press Harvard University Press. **1990**.
- Huelsken, J.; Birchmeier, W.; New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Genetics & Development*. **2001**, 11, 547-553.
- Jackson, B.D.; Morgan, E.D. Insect Chemical Communication: pheromones and exocrine glands of ants. *Chemoecology*. **1993**, 4: 125-144.
- Johnson, S.R.; Copello, J.A.; Evans, M.S.; Suarez, A.V. A biochemical characterization of the major peptides from the venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. *Toxicon*. **2010**, 55, 702-710.
- Katzav-Gozansky, T.; Soroker, V.; Abraham Hefetz, A. Honeybees dufour's gland – idiosyncrasy of a new queen signal. *Apidologie*. **2002**, 33:525-537.
- Kemparaju, K.; Girish, K.S. Snake venom hialuronidase: a therapeutic target. *Cell Biochemistry and Function*. **2006**, 24, 7-12.
- King, T.P.; Lu, G.; Gonzalez, M.; Qian, N.; Soldatova, L.; Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *Journal Allergy Clinics and Immunology*. **1996**, 98(3), 588-600.
- Kloog, Y.; Ambar, I.; Sokolovsky, M.; Kochva, E.; Wollberg, Z.; Bdolah, A. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: Phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*. **1988**, 242, 268-270.
- Kuchler, K.; Gmachl, M.; SippL, M.J.; Kreil, G. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *European Journal of Biochemistry*. **1989**, 184 (1), 249-254.

- Leluk, J.; Schmidt, J.O.; Jones, D. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon*. **1989**, 27, 105-114.
- Lewis, J.C.; Day, A.J.; Lande, I.S. et al. Phospholipase A in the Venom of the Australian Bulldog ant *Myrmecia pyriformis*. *Toxicon*. **1968**, 6, 109-112.
- Lewis, R.; Garcia, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature*. **2003**, (2): 790-802.
- Lima, P.R. & Brochetto-Braga, M.R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. **2003**, 9, 149-162.
- Liu, X.; Chen, D.; Xie, L.; Zhang, R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2002**, 54:1083-1089.
- Lopes, KS, Rios, VER, Lima CNC, Linhares MI, Torres AFC, Havt A, Quinet YP, Fonteles MMF, Martins AMC. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. *Neurochemistry International*. **2013**; 63 (3): 141-145.
- Ma, B.; Zhang, K.; Hendrie, C.; Liang, C.; Li, M.; Doherty-Kirby, A.; Lajoie, G.; PEAKS: Powerful Software for Peptide De Novo Sequencing by MS/MS. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2003**, 17(20), 2337-2342.
- Mackay, W.P.; Mackay, E.E. The systematic and biology of the New World ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Formicidae). Edwin Mellen Press. Lewiston, New York. **2010**, p.642.
- Margres, M.J.; Aronow, K.; Loyacano, J.; Rokyta, D.R. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics*. **2013**, 14: 531.
- Maschwitz, U.; Jassen, K.; Maschwitz, E. Foaming in *Pachycondyla*: A New Defense Mechanism in Ants. *Behavior Ecology and Sociobiology*. **1981**, 9, 79-81.
- Mashaly, A.M.A.; Ahmeda, A.M.; Al-Khalifa, M.S.; Nunes, T.M.; Morgan, E.D. Identification of the alkaloidal venoms of some *Monomorium* ants of Saudi Arabia. *Biochemical. Systematics and Ecology*. **2010**, 38:875-879.
- Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Harada, M.; Fujii, N.; Miyajima, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1997**, 1327: 119-130.

- Matteo, P. D.; Arrigoni, G.L.; Alberici, L.; Corti, A.; Gallo-Stampino, C.; Traversari, C.; Doglioni, C.; Rizzardi, GP. Enhanced Expression of CD13 in Vessels of Inflammatory and Neoplastic Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **2011**, 59, 47-49.
- Menzel, F.; Blüthgen, N.; Schmitt, T. Tropical parabiogenic ants: Highly unusual cuticular substances and low interspecific discrimination. *Frontiers in Zoology*. **2008**, 5: 1-16.
- Morgan, E.D.; Nascimento, R.R.; Keegans, S.J.; Billen, J. Comparative study of mandibular gland secretions of workers of ponerine ants. *Journal Chemical Ecology*. **1999**, 25:1395-1409.
- Morgan, E.D.; Jungnickel, H.; Keegans, S.J.; Nascimento, R.R.; Billen, J.; Gobin, B.; Ito, F. Comparative survey of abdominal gland secretions of the ant subfamily Ponerinae. *Journal of Chemical Ecology*. **2003**, 29, 95-114.
- Morgan, E.D. Trail pheromones of ants. *Physiological Entomology*. **2009**, 34: 1-17.
- Mortari, M.R.; Cunha, A.O.S.; Oliveira, L.; Vieira, E.B.; Gelfuso, E.A.; Coutinho-Netto, J.; Santos, W.F. Anticonvulsant and Behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). *Basic & clinical Pharmacology & Toxicology*. **2007**, (97): 289-295.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Principles of Biochemistry*. **2000**. Fourth Edition
- Ogawa, Y.; Murayama, N.; Fujita, Y.; Yanoshita, R. Characterization and cDNA cloning of aminopeptidase A from the venom of *Glyptotendipes blomhoffi brevicaudus*. *Toxicon*. **2007**, 49, 1172-1181.
- Orivel, J.; Redeker, V.; Caer, J.P.L.; Krier, A.M.R.J.; Longeon, A.; Chaffotte, A.; Dejean, A.; Rossier, J. Ponericins, New antibacterial and Insecticidal Peptides from the Venom of the Ant *Pachycondyla goeldii*. *The Journal of Biological Chemistry*. **2001**, 276, 17823-17829.
- Orivel, J.; Dejean, A. comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae). *Toxicon*. **2001** (39): 195-201.
- Ortiz, G.; Carmago-Mathias, M.I. Venom Gland of *Pachycondyla striata* worker ants (Hymenoptera: Ponerinae) Ultrastructural Characterization. *Micron*. **2006**, 37, 243-248.
- Ossani, L.T.T.; Lourenço, G.A.; Lebrum, I.; Nencioni, L.A.; Dorce, V.A.C. Convulsive and Neurodegenerative effects in rats of some isolated toxins from the *Tityus bahiensis* scorpion venom. *Journal of Toxins*. **2013**, 1-10.
- Ownby, C.I.; Powell, J. R.; Jiang, M.S.; Fletcher, J.E. Mellitin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. *Toxicon*. **1997**, 35: 67-80.

- Palma, M.S. Insect Venom Peptides. In *The Handbook of Biologically Active Peptides*. Kastin, A.; Ed.; Academic Press: San Diego. **2006**, 56, 409-417.
- Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier/Academic Press. **2009**. 340.
- Peiren, N.; Graaf, D.C.; Vanrobaeys, F.; Danneels, E.L.; Devreese, B.; Beeumen, J.V.; Jacobs, F.J. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*. **2008**, 52, 72-83.
- Piek, T.; Duval, A.; Hue, B.; Karst, H.; Lapied, B.; Mantel, P.; Nakajima, T.; Pelhate, M. Schmidt, J.O. Ponetatoxin, a novel peptide neurotoxin from the venom of the ant, *Paraponera clavata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **1991**, 99, 487-495.
- Pinto, J.R.A.S.; Fox, E.G.P.; Saidemberg, D.M.; Santos, L.D.; Menegasso, A.R.S.; Costa-Manso, E.; Machado, E.A.; Bueno, O.C.; Palma, M.S. Proteomic View of the Venom from the Fire Ant *Solenopsis invicta* Buren. *Journal of Proteome Research*. **2012**, 11, 4643-4653.
- Pluzhnikov, K.A.; Nolde, D.E.; Tertishnikova, S.M.; Sukhanov, S.V.; Sobol, A.G.; Torgov, M.Y.; Filippov, A.K.; Arseniev, A.S.; Grishin, E.V. Structural and functional studies of toxin principle of *Ectatomma tuberculatum* ant venom. *Bio-organic Chemistry*. **1994**, 20, 857-871.
- Pluzhnikov, K.A.; Nosyreva, E.; Shevchenko, L.; Kokoz, Y.; Schmalz, D.; Hucho, F.; Grishin, E. Analysis of ectatomin action on cell membranes. *European Journal of Biochemistry*. **1999**, 262, 501-506.
- Quinet, Y.; Vieira, R.H.S.F.; Sousa, M.R.; Evangelista-Barreto, N.S.; Carvalho, F.C.T.; Guedes, M.I.F.; Alves, C.R.; Biseau, J.C.; Heredia, A. Antibacterial properties of contact defensive secretions in neotropical *Crematogaster* ants. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. **2012**. 18, 441-445.
- Rifflet, A.; Gavalda, S.; Téné, N.; Orivel, J.; Leprince, J.; Guilhaudis, L.; Génin, E.; Vétillard, A.; Treilhou, M. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from the venom of the ant *Tetramorium bicarrinatum*. *Peptides*. **2012**, 38, 363-370.
- Rodrigues, M.S; Vilela, E.F.; Azevedo, D.O.; Hora, R.R. Multiple Queens in Founding Colonies of the Neotropical Ant *Pachycondyla striata* Smith (Formicidae: Ponerinae). *Neotropical Entomology*. **2011**, 40 (3), 293-299.

- Rokyta, D.R.; Wray, K.P.; Margres, M.J. The genesis of an exceptionally lethal venom in the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) revealed through comparative venom-gland transcriptomics. *BMC Genomics*. **2013**, 14, 373-394.
- Santos, L.D.; Pieroni, M.; Menegasso, A.R.S.; Pinto, J.R.A.S.; Palma, M.S. A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. *The Journal of Venomous animals and Toxins including Tropical Diseases*. **2011**, 17, 364-377.
- Schmidt, J.; Blum, M. The Biochemical constituents of the venom of the harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **1978**, 61: 239-247.
- Schmidt, J.O. Biochemistry of insect venoms. *Annual Review Entomology*. **1982**, 27: 339-368.
- Schoeters, E.; Billen, J. Venom gland ontogeny in Formicinae, with special reference to the pulvinate convoluted gland (Hymenoptera, Formicidae). *Zoomorphology*. **1998** (118): 245-253.
- Silva-Melo, A.; Giannotti, E. Division of labor in *Pachycondyla striata* Fr. Smith, 1858 (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Psyche*. **2012**, 1-7.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. **1985**, 150, 76-85.
- Solis, G.P.; Luchtenborg, A.M.; Katanaev, V.L. Wnt secretion and gradient formation. *International Journal of Molecular Sciences*. **2013**, 14, 5130-5145.
- Son, D.J.; Park, M.H.; Chae, S.J.; Moon, S.O.; Lee, J.W.; Song, H.S.; Moon, D.C.; Kang, S.S.; Kwon, Y.E.; Hong, J.T.; Inhibitory effect of snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* on hormone- refractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB. *Molecular Cancer Therapy*. **2007**, 6, 675-683.
- Souza, B.M.; da Silva, A.V.; Resende, V.M.; Arcuri, H.A.; Santos- Cabrera, M.P.; Ruggiero Neto, J.; Palma, M.S. Characterization of two novel polyfunctional mastoporan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. **2009**, 30: 1387-1395.
- Steinmetz, I.; Schmolz, E.; Ruther, J. Cuticular lipids as trail pheromone in a social wasp. *Proceedings Royal Society B*. **2002**, 270:385-391.
- Sumikura, H.; Andersen, O.K.; Drewes, A.M.; Arendt-Nielsen, L. A comparison of hyperalgesia and neurogenic inflammation induced by melittin and capsaicin in humans. *Neuroscience Letters*. **2003**, 337: 147- 150.

- Szolajska, E.; Poznanski, J.; Feber, M.L.; Michalik, J.; Gout, E.; Fender, P.; Bailly, I.; Dublet, B.; Chroboczek, J. Poneratoxin, a neurotoxin from ant venom Structure and expression in insect cells and construction of a bioinsecticide. *European Journal of Biochemistry*. **2004**, 271, 2127- 2136.
- Uniprot. <http://www.uniprot.org>. Disponível em 05 de janeiro de 2014.
- Van der Meer, R.K. Ant queens deposit pheromones and antimicrobial agents on eggs. *Naturwissenschaften*. **1995**, 82, 93-95.
- Wang, K.R.; Zhang, B.Z.; Zhang,W.; Yan, J.X.; Li, J.; Wang, R. Antitumor effects, cell selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. *Peptides*. **2008**, 29: 963-968.
- Wiese, M.D.; Chataway, T.K.; Davies, N.W.; Milne, R.W.; Brown, S.G.A.; Gai, W.; Heddle, R.J. Proteomic analysis of *Myrmecia pilosula* (jack jumper) ant venom. *Toxicon*. **2006**, 47, 208-217.
- Wu, J.; Liu, H.; Yang,H.; Yu, H.; You, D.; Ma, Y.; Ye, H.; Lai, R. Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. *Journal Proteome Research*. **2011**, 10, 4230-4240.
- Xin, Y.; Choo, Y.M., Z, H.; Lee, K.S.; Yoon, H.J.; Cui, Z.; Sohn, H.D.; Jin, B.R. Molecular cloning and characterization of a venom phospholipase A2 from the bumblebee *Bombus ignites*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. **2009**, 154(2), 195-202.
- Witte, V.; Abrell, L.; Attygalle, A.B.; Wu, X.; Meinwald, J. Structure and function of dufour gland pheromones from the crazy ant *Paratrechina longicornis*. *Chemoecology*. **2007**, 17:63-69.
- Žáček, P.; Kalinová, B.; Šobotník, J.; Hovorka, O.; Ptáček, V.; Coppée, A.; Verheggen, F.; Valterová, I. Comparison of age-dependent quantitative changes in the male labial gland secretion of *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum*. *Journal of Chemical Ecology*. **2009**, 35:698-705.
- Zaitseva, L.G.; zaitsev, V.G.; Fenyuk, B.A.; Pavlov, P.F.; Vilenskaya, N.D.; Ovchinnikova, T.V.; Pluzhnikov, K.A.; Grishin, E.V.; Grinkevich, V.A. Protein components of tropical ant venoms and their effect on mitochondrial H⁺ ATPase. *Bio-organic Chemistry*. **1995**, 21, 563-570.
- Zelezetsky, I.; Pag, U.; Antcheva, N.; Sahl, H.G.; Tossi, A. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2005**, 432, 358-364.

Zhang, K.; Hendrie, C.; Liang, C.; Li, M.; Doherty-Kirby, A.; Lajoie, G.; PEAKS: Powerful Software for Peptide De Novo Sequencing by MS/MS. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2003**, 17(20), 2337-2342.