



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERIÁRIAS**

PAULO ARAGÃO DE AZEVEDO FILHO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS CONTIDOS NAS FORMIGAS *Odontomachus bauri* (Emery, 1892)**

FORTALEZA - CEARÁ

2017

PAULO ARAGÃO DE AZEVEDO FILHO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS CONTIDOS NAS FORMIGAS *Odontomachus bauri* (Emery, 1892)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros, Herbívoros e Aves.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Selene Maia de Moraes.

FORTALEZA - CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Azevedo Filho, Paulo Aragão de.

Composição química e atividades biológicas dos extratos orgânicos contidos nas formigas *Odontomachus bauri* (Emery, 1982) [recurso eletrônico] / Paulo Aragão de Azevedo Filho. - 2017.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 62 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientação: Prof.^a Ph.D. Selene Maia de Moraes.

1. *Odontomachus bauri*. 2. Hymenoptera. 3. Formicidae. 4. Formigas. 5. Hidrocarbonetos cuticulares. I. Título.

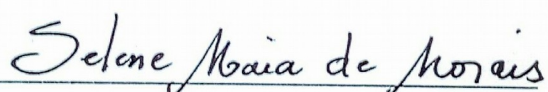
PAULO ARAGÃO DE AZEVEDO FILHO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS ORGÂNICOS
CONTIDOS NAS FORMIGAS *Odontomachus bauri* (Emery, 1892)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

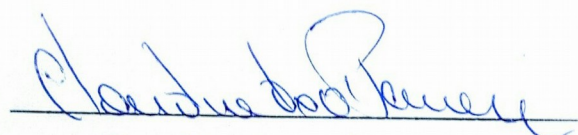
Aprovada em 21, 07, 17

BANCA EXAMINADORA



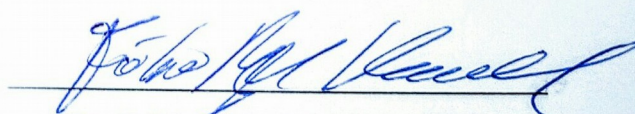
Dra. Selene Maia de Moraes

Orientadora/UECE



Dra. Claudia do Ó Pessoa

Examinadora/UFC



Dr. Fábio Roger Vasconcelos

Examinador/UFC

Dedico aos meus familiares, em especial, à minha esposa e filho, pessoas que amo e que contribuíram imensamente para essa conquista.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Selene Maia de Moraes pela orientação e confiança.

À Prof. Dra. Claudia do Ó Pessoa pela colaboração e confiança.

Ao Prof. Dr. Fábio Roger Vasconcelos pelo apoio colaboração nos experimentos.

À Ma. Daniela Ribeiro Alves pelo apoio de colaboração em várias etapas dos experimentos.

À Universidade Estadual do Ceará e ao Programa de Laboratório de Química e Produtos e Naturais pelo apoio, ensinamentos e recursos disponibilizados para a realização dos experimentos.

À Universidade Federal do Ceará e aos laboratórios Nacional de Oncologia Experimental e de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas pelos recursos disponibilizados para a realização dos experimentos.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú e ao Laboratório de Biologia Molecular pelos recursos disponibilizados para a realização dos experimentos.

RESUMO

Os extratos de formigas são conhecidos por possuírem uma ampla gama de atividades biológicas. No entanto, pouco se sabe sobre os extratos não-protéicos desses animais. A espécie *Odontomachus bauri* é conhecida por possuir um veneno com ação proteolítica, hemolítica, coagulante, antimicrobiana e antiparasitária. No presente estudo, as formigas *O. bauri* coletadas em Maranguape, Ceará, foram levadas ao laboratório para a extração de metabólitos secundários por meio da imersão das formigas em hexano durante 30 minutos e, depois, em etanol, durante o período de um semana, enfatizando a remoção de hidrocarbonetos. Após este período, os insetos foram removidos por filtração e os extratos foram obtidos após a remoção dos solventes por evaporação rotativa. As amostras de extratos hexânicos foram utilizadas para a análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e o extrato etanólico foi submetido à testes de citotoxicidade (Linhagens: PC-3, HCT-116 e SF-295), anti-helmínticos (*Caenorhabditis elegans* - cepas sensível e resistente à Ivermectina) e antimicrobianos (Cepas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883). Os resultados das análises revelaram que o extrato hexânico é composto por hidrocarbonetos saturados com cadeias longas (C15-C36), sendo formado principalmente por N-Alkanes (43,7%) e Mono-metilalcanos (37,5%). A composição das amostras revela um padrão único para as formigas *O. bauri* coletadas, uma vez que diferem em tipo, quantidade e proporção em relação aos padrões observados nas outras espécies do mesmo gênero. O principal componente do extrato foi o 6-Metil-nonacosano (23,41%), o que sugere a hipótese de este ser o feromônio sexual dessa espécie. O extrato etanólico não apresentou atividade citotóxica viável contra as cepas testadas. No entanto, observou-se um efeito positivo contra as cepas bacterianas e as linhagens de nemátodos, sugerindo a existência de funções biológicas importantes relacionadas à saúde do ninho.

Palavras-Chave: *Odontomachus bauri*. Hymenoptera. Formicidae. Hidrocarbonetos cuticulares.

ABSTRACT

Ant extracts are known to have a wide range of biological activities. However, little is known about the non-protein extracts of these animals. The species *Odontomachus bauri* is known to have a venom with proteolytic, hemolytic, coagulant, antimicrobial and antiparasitic action. In the present study, the *O. bauri* ants collected in Maranguape-Ce were taken to the laboratory for the extraction of secondary metabolites by immersing the ants in hexane for 30 minutes and then in ethanol for a period of one week, emphasizing the removal of hydrocarbons. After this time, the insects were removed by filtration and the extracts were obtained after removal of the solvents by rotary evaporation. Samples of hexane extracts were used for the analysis of gas chromatography coupled to mass spectrometry and the ethanolic extract was submitted to antitumor (Lineages: PC-3, HCT-116 and SF-295), anthelmintic (*Caenorhabditis elegans* - Strains sensitive and resistant to Ivermectin) and antimicrobial tests (Strains: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883). The results of the analyzes revealed that the hexane extract is composed of saturated hydrocarbons with long chains (C15-C36), mainly formed by N-Alkanes (43.7%) and Mono-methylalcans (37.5%). The composition of the samples reveals a unique pattern for the *O. bauri* ants collected, since they differ in type, quantity and proportion in relation to the patterns observed in the other species of the same genus. The main component of the extract was 6-methyl-nonacosane (23.41%), which suggests the hypothesis of this being the sex pheromone of this species. The ethanolic extract did not present viable antitumor activity against the tested strains. However, a positive effect was observed against bacterial and nematode strains, suggesting the existence of biological functions related to nest health.

Keywords: *Odontomachus bauri*. Hymenoptera. Formicidae. Cuticular hydrocarbons.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	REPRESENTATIVIDADE FORMICÍDEOS	12
2.1.1	Importâncias ecológica	12
2.1.2	Técnicas de coleta	14
2.2	HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE FORMICÍDEOS	17
2.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS VENENOS DE FORMIGAS	18
2.4	<i>Odontomachus bauri</i>	22
2.4.1	Classificação taxonômica	22
2.4.2	Diversidade e morfologia	22
3	JUSTIFICATIVA	25
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA	26
5	OBJETIVOS	26
5.1	GERAL	26
5.2	ESPECÍFICOS	26
6	CAPÍTULO 1	27
7	CAPÍTULO 2	40
8	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O aumento da pressão exercida pela população humana no meio ambiente tem resultado em um acelerado declínio da diversidade global em quase todos os ecossistemas do planeta (UNITED NATIONS, 1992), o que torna urgente uma avaliação da biodiversidade, sendo particularmente crítica nos ambientes onde a fauna e flora ainda são pouco conhecidas. Essa avaliação se torna ainda mais importante devido à perda de habitats ou por possuírem uma excepcional taxa de endemismo, sendo caracterizados como "hotspots".

Torna-se de fundamental importância identificar áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade dos principais ecossistemas e/ou biomas, assim como, elaborar programas de monitoramento da diversidade biológica dos ecossistemas ameaçados ou em fase de recuperação (LEWINSOHN; PRADO, 2002).

Essas metas são dificultadas por vários problemas, sejam eles de cunho logístico, técnico e/ou conceitual acerca de como medir a biodiversidade. A primeira dificuldade está relacionada com a dimensão dos ecossistemas, os quais são formados por muitos táxons interagindo de forma complexa. Por escassez de tempo e de financiamento, torna-se impossível estudar a diversidade total dos ecossistemas. Além disto, muitos táxons possuem classificação taxonômica mal definida e que necessita de revisão, sendo que, por diversas vezes, faltam dados sobre a distribuição geográfica dos mesmos (LEWINSOHN; PRADO, 2002).

As ferramentas teóricas e práticas para mensurar a biodiversidade representam uma outra dificuldade, devido a problemas que são bastante discutidos entre os profissionais da área. Um desses problemas é a representatividade da amostragem a ser realizada em uma determinada área, pois a mesma é dependente da heterogeneidade espacial e temporal da comunidade de espécies estudada (MAGURRAN, 1988). Que tamanho deve possuir a área de amostragem? Quando se deve amostrar? Estas são perguntas importantes no momento de estabelecer o desenho experimental. Os métodos de amostragem usados são um outro problema particularmente importante, já que, desses métodos, depende a representatividade da amostra obtida (MAGURRAN, 1988; DELABIE et al., 2000a).

A biodiversidade brasileira apresenta uma ampla possibilidade para bioprospecção, sendo responsável por grande parte dos medicamentos obtidos a partir de produtos naturais, movimentando bilhões de dólares anualmente (CALIXTO, 2003;

COSTA-LOTUFO et al., 2010). Contudo, o conhecimento acerca de nossa biodiversidade está muito aquém da sua real potencialidade.

Estima-se que no Brasil, que a cada dez espécies, nove sejam desconhecidas, além de existir uma grande disparidade regional no que diz respeito ao esforço realizado para a avaliação da diversidade biológica no país. As regiões Norte, Sul e Sudeste, reunidas, concentram 83% dos inventários publicados, enquanto que as regiões Nordeste e Centro-Oeste concentram 10% e 7%, respectivamente. Há, também, disparidades quanto aos táxons abordados nos estudos – insetos, nematóides, bactérias, vírus e fungos reúnem o maior nível de incerteza atual.(LEWINSOHN; PRADO, 2002).

A maioria das pesquisas para a obtenção de fármacos está voltada para análise de grupos vegetais, pois possuem uma ampla distribuição, além representarem uma rica fonte de substâncias a serem exploradas terapêuticamente (FOGLIO et al., 2006; MESQUITA, 2009). Em animais vertebrados, destacam-se os estudos realizados com anfíbios e répteis, citando, por exemplo, a utilização dos extratos da neurohipófise de anuros sobre controle da pressão sanguínea (BOYD, 2006) e o efeito antitumoral do veneno de *Bothrops pirajai* (BURIN, 2011).

Nos invertebrados, as pesquisas se concentram nas propriedades terapêuticas dos venenos de escorpiões, vespas e abelhas. Os venenos das vespas contêm uma grande variedade de substâncias bioativas, constituídas por peptídeos anfipáticos e neurotoxinas de ação anti-inflamatória e antibiótica (MOREAU, 2013), enquanto as abelhas (*Apis mellifera*) apresentam um veneno com propriedades detergentes sobre a membrana plasmática (CHEN; LARIVIERE, 2010).

Em relação aos invertebrados terrestres, observa-se uma extrema carência de trabalhos relativos à mirmecofauna, a fauna de formigas. No último levantamento publicado pelo Ministério do Meio Ambiente, em 2010, uma equipe de pesquisadores apresentou a atual situação sobre o conhecimento da biodiversidade brasileira, onde se destaca a estimativa de que apenas cinquenta por cento da fauna de formicídeos seja conhecida (BRANDÃO et al., 2000), o que evidencia a necessidade de se intensificar os estudos com esses organismos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 REPRESENTATIVIDADE DOS FORMICÍDEOS

2.1.1 Importância ecológica

Tradicionalmente, vertebrados e plantas vasculares são considerados bons indicadores de diversidade biológica (ALONSO, 2000). Entretanto, os invertebrados terrestres representam um grupo ainda pouco abordado por estudos sobre sua diversidade biológica, apesar de serem amplamente distribuídos e diversificados (BRANDÃO et al., 2000). Os insetos, em particular, são cada vez mais utilizados nos estudos de biodiversidade, devido a sua alta diversidade local, importância ecológica e maior especificidade de habitat que os vertebrados, além de responderem, mais rapidamente às mudanças ambientais (AGOSTI et al., 2000).

As formigas, em especial, destacam-se como um grupo interessante por reunirem numerosos atributos que as tornam adequadas, enquanto grupo bioindicador (ALONSO, 2000). Desses diversos atributos, pode-se destacar a presença das formigas nos ecossistemas de quase todos os habitats terrestres do planeta, com uma grande dominância numérica e de biomassa, constituindo, por exemplo, cerca de 15% da biomassa animal terrestre total de floresta tropical da Amazônia Central (AGOSTI et al., 2000).

Os formicídeos possuem alta diversidade local, a qual é comprovada em diversos estudos, por exemplo: na comparação de riqueza de espécies entre formigas e mamíferos, as formigas comportam 20% da riqueza local no sul da Flórida, enquanto que os mamíferos, englobam apenas em torno de 2% (ALLEN et al., 2001).

As formigas que vivem no solo e na serapilheira das florestas úmidas tropicais formam um importante segmento da mirmecofauna desse tipo de habitat e destacam-se como grupo particularmente promissor para os estudos de biodiversidade (DELABIE et al., 2000a,b; RYDER WILKIE, 2010; LEAL et al., 2010).

A mirmecofauna desempenha importantes funções nos ecossistemas, interagindo com outros organismos e estruturando as comunidades de invertebrados e de plantas, além de possuírem participação na dispersão de sementes, favorecendo assim, o desenvolvimento de espécies e a recolonização de áreas degradadas (PAIS; VARANDA, 2010; CHRISTIANINI; OLIVEIRA, 2010).

Formigas coletoras de sementes possuem, indiretamente, potenciais e importantes efeitos sobre as plantas através de suas funções como agentes predadores, escavadores e devido suas atividades de construção de ninhos (MEER et al., 1990).

Os formicídeos estão entre os maiores predadores de invertebrados (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) e participam de simbioses com diversas espécies, como se comprova com a formiga *Atta texana*, que desempenha relação mutualística por meio do cultivo de fungos (*Attamyces* sp.), uma relação que se originou 8 entre 12 milhões de anos atrás (MUELLER et al., 2011). Em alguns casos, as relações simbióticas se estendem, envolvendo a participação de três organismos (formiga-planta-fungo), sendo chamada de mutualística coevolutiva (DEFOSSEZ et al., 2009).

As formigas ocupam todos os estratos (subsolo, solo e vegetação) dos ecossistemas terrestres (DELABIE et al., 2000a), refletindo mais uma vez a grande e diversa gama de relações desempenhadas com outras comunidades de organismos. Os ninhos dos formicídeos são relativamente fixos, o que permite a realização de várias coletas ao longo dos anos, além de serem sensíveis às alterações ambientais, mesmo as microclimáticas, o que os torna particularmente apropriados para programas de monitoramento (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; KASPARI; MAJER, 2000).

O estudo dos fatores ambientais locais e globais, sejam eles micro ou macrofatores, responsáveis pelos padrões de diversidade e estruturação das comunidades bióticas é um assunto de grande importância nos estudos de ecologia das comunidades. As comunidades de formigas têm fornecido modelos para investigar essa problemática (ANDERSEN, 2000).

Nas formigas, os macrofatores ambientais como, por exemplo, os gradientes altitudinais, latitudinais e longitudinais têm profundas influências na riqueza e na composição das comunidades, embora ainda não se entenda muito bem como interferem na estrutura das mesmas (WARD, 2000).

A competição interespecífica é outro importante fator de estruturação das comunidades de formigas e qualquer mudança nas condições do ambiente pode afetar a teia de competição entre espécies e, desta forma, a composição das comunidades (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). De um modo geral, as formigas são extremamente sensíveis aos distúrbios dos ecossistemas (KASPARI; MAJER, 2000; ANDERSEN et al., 2004).

Devido ao seu pequeno tamanho e a estacionalidade dos ninhos, a diversidade das comunidades de formigas pode ser rapidamente alterada por variáveis ambientais

como: insolação, composição do solo, umidade e temperatura (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Mesmo pequenas variações climáticas podem eventualmente gerar desequilíbrio nas intrínsecas teias de relações existentes na comunidade (KASPARI; MAJER, 2000).

A estrutura da vegetação, por reunir a influência de micro e macrofatores ambientais, é considerada como determinante da estrutura das comunidades de formigas e, de um modo geral, considera-se que quanto maior a complexidade vegetal de uma área, mais diversa e rica será a comunidade de animais que a mesma abriga (ANDERSEN, 2000; KASPARI; MAJER, 2000).

Com relação às formigas, a estrutura da vegetação parece ser um fator importante por determinar a quantidade e variedade de microhabitats para a instalação dos ninhos e a existência de recursos diversificados (KASPARI, 2000). Uma vegetação em avançado nível sucessional, por exemplo, propicia a formação de troncos e galhos que abrigam espécies de formigas tipicamente arborícolas ou de vegetação (DELABIE et al., 2000a), além de auxiliar na formação de estratos de serapilheira de diferentes espessuras, o que contribui para a diferenciação das faunas de formigas que vivem no solo, uma hipogéica e outra epigéica, sendo caracterizadas, respectivamente, pela nidificação e forrageamento no solo/serapilheira e acima dele (DELABIE et al., 2000a).

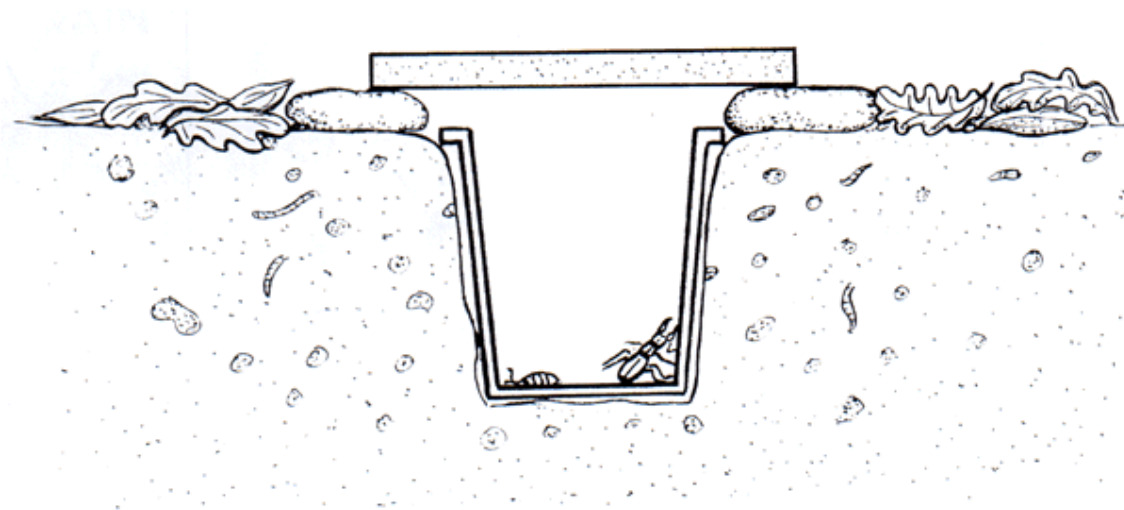
Essa grande quantidade de informações sobre as formigas rivalizam com as abelhas enquanto grupo de himenópteros mais bem conhecido, pois são organismos sociais altamente especializados e com divisões de trabalho que podem se apresentar de forma extremamente complexa na estruturação dos seus ninhos, possuindo castas que as definem, por exemplo, como coletoras de sementes, como fazendeiras, caçadoras ou construtoras (HUBER, 2009) que, ao trabalharem em unidade, formam um grande superorganismo.

2.1.2 Técnicas de coleta

Os formicídeos de solo são relativamente fáceis de coletar, possuindo um protocolo amplamente utilizado, chamado de ALL (Ants of the Leaf Litter). Esse protocolo, na sua versão mais básica, permite amostrar pelo menos 70% da fauna de formigas da serapilheira, o que representa uma importante ferramenta por permitir a obtenção de dados rigorosamente comparáveis em estudos sobre a biodiversidade (FISHER et al., 2000; DELABIE et al., 2000b).

Diversas técnicas de coleta foram desenvolvidas para a captura de formigas. Os métodos de coleta são adequados aos tipos de estratos e modos de forrageamento e alimentação desses animais. Como exemplo, podemos citar a captura por “Pitfall traps”, a extração por Winkler, a utilização de iscas de alimento e o aspirador entomológico.

Figura 1 - Armadilha do tipo pitfall.

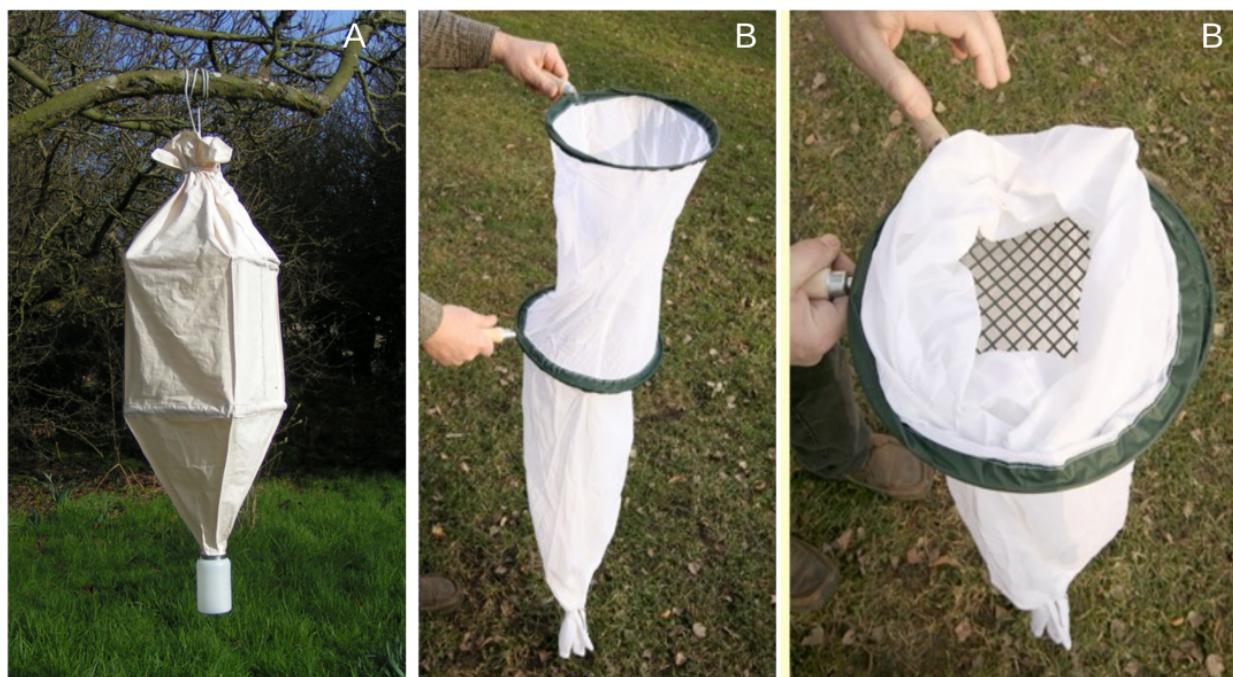


Fonte: Manchester Public Schools

A técnica “Pitfall” consiste na inserção de um recipiente no solo (Figura 1). A abertura do recipiente deve estar posicionada ao nível do solo para capturar a fauna em movimento. Dentro do recipiente é colocada uma mistura composta por solução salina, álcool e glicerol que irá atuar como conservante até a recuperação da armadilha (BESTELMEYER et al., 2000). Essa técnica permite a captura de espécimes por curtos ou longos períodos de tempo.

A técnica de extração por Winker se inicia com a coleta de 1 m² de serapilheira que, em seguida, será peneirado com um “Sifter” (Figura 2B). O material peneirado é, então, colocado em sacos de tela que ficarão suspensos dentro de um extrator de Winkler (Figura 2A). As formigas iniciam uma movimentação dentro do Winkler, separando-se do material peneirado e, como consequência, caem dentro de um recipiente com álcool que está fixado no final do extrator (BESTELMEYER et al., 2000). As iscas com alimento representam um estratégia rápida e interessante para se realizar a captura de formigas em diferente estratos e horas do dia, além de poder selecionar espécimes de acordo com suas preferências alimentares, sejam elas baseadas em carboidratos ou em proteínas.

Figura 2 - Extrator de Winkler (A) e Sifter (B).



Fonte: B&S Entomological Services (A) e Kabourek Ltd. (B).

O aspirador entomológico (Figura 3) se apresenta como uma alternativa especial para a coleta de espécimes com o mínimo de impacto ambiental. O dispositivo consiste, basicamente, de uma câmara coletora conectada à tubos plásticos ou de borracha. Os tubos são conectados às extremidades da câmara, de um lado, a extremidade que será disposta próximo ao ninho, do outro, uma mangueira que é levada à boca para realizar a sucção.

Figura 3 - Utilização de aspirador entomológico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2 HIDROCARBONETOS CUTICULARES DE FORMICÍDEOS

Os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) foram caracterizados em diversos estudos sobre formigas. A composição apresentada por cada espécie demonstra a existência de perfis químicos cuticulares nos insetos que são constituídos principalmente de alcanos de cadeia linear ou ramificada e por alcenos de 19-35 carbonos (BLOMQUIST; BAGNERES, 2010). Para insetos sociais, o perfil de HCs codifica informações que permitem identificar o sexo, o status de fertilidade e a identificação dos indivíduos no ninho (SMITH et al., 2012).

Um trabalho realizado com a formiga *Myrmecia gulosa* demonstrou que as operárias conseguem distinguir rainhas e operárias férteis ou inférteis com base na mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa presentes na cutícula ou na glândula pós-faríngea (DIETEMANN et al., 2003).

A caracterização dos produtos químicos cuticulares de três diferentes espécies de *Odontomachus* (*O. ruginodis*, *O. relictus* e *O. haematodus*) mostrou que os sinais de fertilidade não são conservados dentro dos gêneros, pois os compostos químicos que distinguem rainhas e operárias variam em número e tipo entre as espécies (SMITH et al. 2016). Observou-se, ainda, que os HCs são utilizados para um policiamento dos ninhos, com ou sem rainha, por parte das operárias de *O. brunneus*. Esse policiamento demonstrou grande agressividade contra indivíduos reprodutivos supernumerários do ninho, os quais eram sinalizados pela presença hidrocarboneto (Z)-9-nonacoseno, componente cuticular significativamente mais abundante no indivíduos reprodutivos (SMITH et al., 2012).

Uma análise de 78 espécies de formigas identificou quase 1000 HCs, sendo a maioria deles classificados como n-alcanos (97%), monometilalcanos (96%), trimetilalcanos (84%) e alcenos (73%). Os monometilalcanos estão relacionados aos sinais de comunicação, podendo estar ligados à formação de dimetilalcanos que podem ser característicos de uma espécie ou até mesmo de ninho, sendo importantes para o reconhecimento entre os indivíduos de um mesmo grupo, o que explicaria o fato desses componentes serem relativamente mais diversificados em comparação aos n-alcanos e monometilalcanos, apesar de estarem presentes em menores proporções (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009).

Um estudo de reconhecimento realizado com a formiga africana *Pachycondyla analis* foi conduzido por meio do bioensaio de verificação da abertura da mandíbula em

resposta à extratos de HCs. As formigas utilizadas no estudo tiveram suas respostas avaliadas quando foram colocadas em contato com HCs provenientes de mesmo ninho e de ninhos distintos. As formigas demonstraram agressividade contra os HCs provenientes de um ninho diferente ao qual pertenciam (YUSUF et al., 2010). O reconhecimento entre os indivíduos do ninho pode, ainda, ser realizado de acordo com a proporção de componentes voláteis em regiões específicas do corpo do animal, o que pode ser observado a partir do estudo dos componentes químicos presente na região da cabeça e do abdômen de formigas *O. bauri* (JAFFE; MARCUSE, 1982).

Os HCs estão diretamente relacionados às características físico-químicas da cutícula desses insetos. Os n-alcanos e monometilalcanos possuem pontos de fusão diferenciados e uma mistura destes componentes afeta diretamente as características físicas da cutícula, formando uma camada cuticular à prova d'água e contínua que suporta uma gama de temperaturas mais ampla. Esse fenômeno não ocorreria em uma situação em que a cutícula fosse formada apenas por hidrocarbonetos puros (GIBBS; POMONIS, 1995; GIBBS, 1995). Desta forma, os HCs possuem uma importante plasticidade que lhes fornece maior adaptabilidade às variações ambientais, característica importante que se reflete no processo evolutivo desse insetos, pois está diretamente relacionado à comunicação sexual em meio ao ambiente social (INGLEBY, 2015).

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS VENENOS DE FORMIGAS

Diversos efeitos farmacológicos foram observados a partir do estudo dos venenos de formigas. Dentre eles, observam-se estudos relativos à atividade antitumoral (BADR et al., 2012), antiparasitária e antibiótica (SILVA et al., 2015), o que reflete a capacidade desses organismos em produzir substâncias promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos.

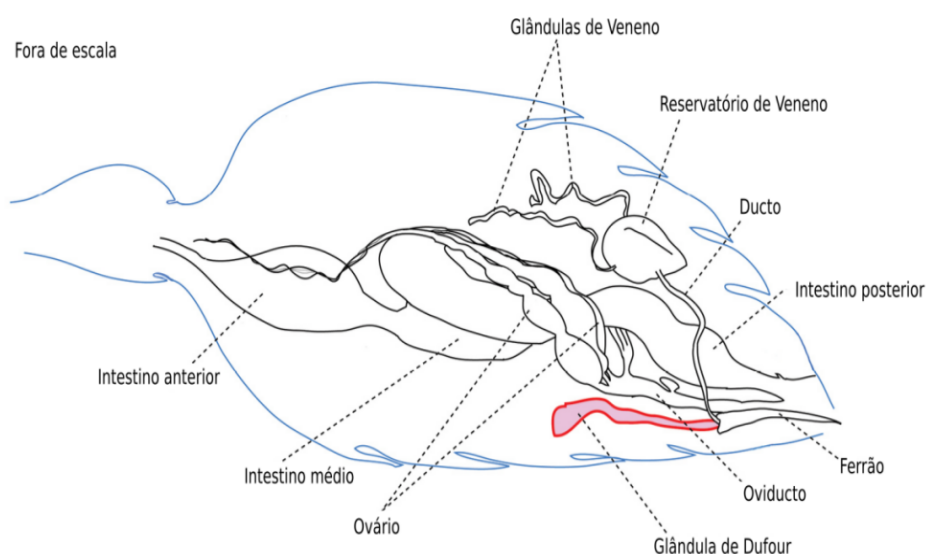
A maioria das espécies de formicídeos possui um ferrão, estrutura com aspecto tubular que permite a inoculação de veneno em suas vítimas. As formigas da subfamília Ponerinae, por exemplo, são compostas por indivíduos de hábito carnívoro que não perdem o ferrão após picarem uma presa. Essa característica demonstra a importância dessa estrutura para a sua sobrevivência, bem como a importância da glândula de veneno para a captura de suas presas (MATHIAS, 2007).

O ferrão está localizado no final do abdômen do inseto e é diretamente ligado à um ducto excretor que se conecta ao reservatório de veneno que, por sua vez, liga-se à

uma porção convoluta com aspecto filamentososo, as glândulas de veneno (ORTIZ; MATHIAS, 2006; MITRA, 2013). Diferentes tipos de células podem ser observadas na estrutura glandular das formigas, desde células epiteliais à células glandulares localizadas na região convoluta, na região do reservatório de veneno e na dos túbulos secretores (SCHOETERS; BILLEN, 1995).

A glândula de Dufour (Figura 4), localizada na porção final do abdômen dos himenópteros, possui origem ectodérmica, conectando-se diretamente ao ferrão em formigas ou possuindo seu ducto terminal conectado à porção dorsal da parede vaginal nas abelhas e vespas. Essa diferenciação na conexão da glândula demonstra o surgimento de uma característica derivada por parte das formigas, pois a conexão do ducto glandular com a porção vaginal é descrita como sendo uma característica ancestral, apesar de haver controvérsias sobre essa questão (MITRA, 2013).

Figura 4 – Anatomia das glândulas de veneno de himenópteros.



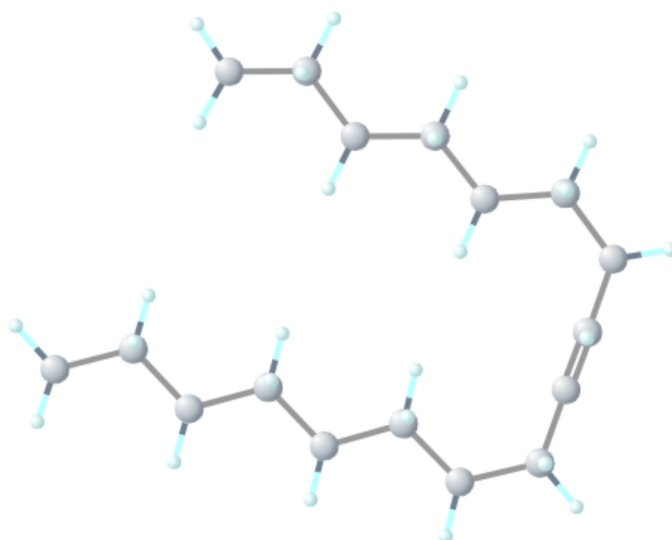
Fonte: Function of the Dufour's gland in solitary and social Hymenoptera.

A glândula de Dufour é basicamente um tubo constituído por uma única camada de células epiteliais, sendo parcialmente recoberto por tecido muscular, o que a caracteriza com uma glândula epidermal classe 1. Acredita-se que essa glândula evoluiu de ancestrais com glândulas colaterais possuindo, por isso, secreções similares compostas por glicosídeos, proteínas e enzimas. Nas secreções da glândula de Dufour podem ser encontrados hidrocarbonetos saturados e insaturados de cadeia longa, além

de compostos voláteis e não-voláteis como terpenóides, álcoois, éteres, ácidos graxos de cadeia longa, açúcares, quinonas, componentes aromáticos, colesterol e aldeídos (MITRA, 2013).

Em formicídeos, a glândula de Dufour está associada à formação das trilhas de feromônios, recrutamento e demarcação de território, além de estar envolvida na defesa das formigas, atuando como um sistema de alarme no ninho ou, até mesmo, como repelente de invasores. Esse recrutamento pode ser observado no estudo realizado com a formiga japonesa *Dyacama* sp., onde foi demonstrado que isômeros-Z de 8-heptadeceno (Figura 5) foram responsáveis por induzir os seguidores do ninho (FUJIWARA-TSUJII et al., 2012).

Figura 5 - Estrutura 3-D do 8-heptadeceno.



Fonte: PubChem

As secreções da glândula também podem influenciar diretamente no comportamento dos indivíduos da colônia. Há registros de formigas do gênero *Polygerus* que manipulam o comportamento de espécies hospedeiras, utilizando-se para isso, de uma marcação como escrava que reduziu o comportamento agressivo das operárias hospedeiras em relação à invasora usurpadora (MORI et al., 2001). Existe, portanto, uma função tipicamente de defesa nesses indivíduos, mas que também está relacionado à secreção de feromônios de alarme e recrutamento.

A família Formicidae é conhecida por possuir dois complexos de venenos distintos, um composto por ácido fórmico, atuando como spray defensivo e um outro injetável, com ação neurotóxica e citolítica (TOUCHARD et al., 2016). A maioria dos venenos das formigas é composta por peptídeos/proteínas. Em algumas espécies, esses venenos seguem o mesmo padrão geral observado em vespas e abelhas, podendo causar lise celular, neurotoxicidade, efeitos antimicrobianos (PALMA, 2006; LOPES, 2014) e inflamatórios (KOU et al., 2005; KNIGHT, BANGS, 2007).

A bioatividade dos venenos pode ser observada em várias espécies, como a *M. pilosula*, a formiga australiana detentora da Pilosulina-1, substância caracterizada pela presença de peptídeos com potente ação antimicrobiana, mesmo contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes a drogas (PALMA, 2006). Um efeito antibiótico também foi observado a partir das secreções defensivas da espécie *Crematogaster pygmaea*, que inibiu o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (QUINET, 2012).

A subfamília Paraponerinae é constituída por espécies de formigas com venenos de ação neurotóxica com potentes efeitos bloqueadores da transmissão sináptica do sistema nervoso central, além de causarem despolarizações e fibrilações de músculos esqueléticos, mesmo em concentrações micromolares (HENDRICH et al., 2002). A espécie *Paraponera clavata*, detentora de um pequeno neuropeptídeo conhecido como ponerotoxina, é possuidora de um veneno capaz de afetar o funcionamento dos canais de sódio (HENDRICH et al., 2002; HADDAD JUNIOR et al., 2005).

O veneno da subfamília Ponerinae, por outro lado, possui ação anti-inflamatória (DKHIL et al., 2010) e antitumoral (ANGELO et al., 2010). Um estudo observou que o extrato bruto da glândula de veneno da espécie *O. affinis* causou a morte de células tumorais leucêmicas (K562) de forma concentração dependente (ANGELO et al., 2010). Entretanto, não existem informações nesse estudo sobre a composição do veneno e dos mecanismos de ação citotóxica que ele possui.

A espécie *Pachycondyla sennaarensis*, conhecida por seus predadores especializados na captura de pequenos animais e pela coleta de sementes, possuem em seu veneno uma complexa mistura de hidrocarbonetos lineares e metil-ramificados, associados à alcanos e a pequenas quantidades de terpenóides, o que se reflete em diversos casos de anafilaxia registrados (NIKBAKHTZADEH, 2009).

A espécie *Dinoponera quadriceps* apresenta um veneno ação neuroprotetora e neurotóxica (LOPES et al., 2013), além de possuir efeito antinociceptivo (SOUSA et al., 2012). Foi observado que a composição desse veneno varia de acordo com a localidade em que as formigas se encontram (COLOGNA et al., 2013).

A enzimologia dos venenos de formigas revelou, ainda, a existência de um grande variedade de atividades biológicas: esterásica, lipásica, hialuronidásica, proteásica e fosfodiesterásica (SCHMIDT et al., 1986). Apesar dos diversos atributos inerentes às formigas, os estudos acerca da composição desses venenos e dos seus efeitos farmacológicos são praticamente inexistentes (SANTANA, 2008), pois apenas algumas poucas espécies foram estudadas.

2.4 *Odontomachus bauri*

2.4.1 Classificação taxonômica

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordem: Hymenoptera

Família: Formicidae

Gênero: *Odontomachus*

Espécie: *O. bauri*

2.4.2 Diversidade e morfologia

No que se refere à diversidade, o gênero *Odontomachus* está constituído por 70 espécies (BOLTON, 2017), sendo 26 da América e 15 do Brasil (FERNÁNDEZ; SENDOYA, 2004). A identificação dos espécimes pode ser realizada a partir da revisão feita por Brown (1976).

No que diz respeito aos seus habitats, as formigas do gênero *Odontomachus* vivem em lugares variados, incluindo zonas temperadas, zonas tropicais e áreas de florestas úmidas (LATTKE, 2003). A espécie *O. bauri*, em particular, está amplamente distribuídas em ambientes neotropicais, sendo mais tolerantes às condições secas ou a habitats semiáridos (BROWN, 1976).

Ambientes secos e de florestas úmidas podem ser observados na região nordeste do Brasil, no estado do Ceará, proporcionando, assim, boas condições para a disseminação da espécie.

Figura 5 - Morfologia externa de *Odontomachus bauri*. Visão frontal da cabeça (A), visão dorsal do corpo (B) e visão lateral do corpo (C).



Quanto à morfologia, as formigas do gênero *Odontomachus* possuem cabeça longa com formato levemente retangular (Figura 5A). As mandíbulas são retas e alongadas, posicionando-se paralelamente quando fechadas. A região póstero-dorsal da cabeça possui formato em “V” que se aprofunda na região dorsal cefálica. No corpo (Figura 5B,C), o propódeo (primeiro segmento do abdômen) não possui dentes, ao contrário do pecíolo que contém um longo dente em seu topo (DELABIE et al., 2015).

As formigas *O. bauri* são conhecidos por terem uma picada dolorosa com veneno responsável por causar uma reação alérgica grave que pode se transformar em choque anafilático ou urticária grave (RODRIGUEZ-ACOSTA et al., 2010). O veneno de *O. bauri* contém atividade proteolítica, hemolítica, coagulante, antiparasitária e antimicrobiana (SILVA et al., 2015), demonstrando grande potencialidade para o desenvolvimento de novos medicamentos, o que enfatiza a necessidade de se aprofundar o estudo sobre a biodiversidade da mirmecofauna brasileira.

3 JUSTIFICATIVA

o crescente aumento da resistência à antimicrobianos e antiparasitários, bem como o aumento número de casos de câncer, sejam eles humanos ou veterinários, evidenciam a necessidade de se desenvolver novas pesquisas sobre a bioprospecção de produtos naturais. Desta forma, estudos com base em invertebrados evidenciam uma alta potencialidade para o desenvolvimento de medicamentos contra doenças microbianas, parasitárias e tumorais. As formigas, em especial, se apresentam como uma alternativa promissora para o desenvolvimento desses medicamentos dada a versatilidade de atividades biológicas associadas aos seus compostos.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O veneno de *O. bauri* possui atividade citotóxica, antimicrobiana e antiparasitária.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Avaliar a composição química e as atividades biológicas dos extratos orgânicos obtidos da espécie *O. bauri* coletadas em Maranguape, Ceará.

5.2 ESPECÍFICOS

- a) Extrair e identificar os componentes orgânicos dos extrato orgânicos da espécie *O. bauri*;
- b) Avaliar a citotoxicidade antiproliferativa do extrato orgânico da espécie *O. bauri* contra linhagens cancerígenas humanas (PC-3, HCT-116 e SF-295);
- c) Avaliar o efeito antimicrobiano do extrato orgânico da espécie *O. bauri* contra as cepas bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883);
- d) Avaliar o efeito antiparasitário do extrato orgânico da espécie *O. bauri* contra as linhagens de nematódeos *Caenorhabditis elegans* sensíveis (N2) e resistentes (IVR15) à Ivermectina;

6 CAPÍTULO 1

Secondary Metabolites of *Odontomachus bauri* (Emery, 1892) obtained from the rainforest of Maranguape, Ceará, Brazil.

Metabólitos secundários de *Odontomachus bauri* (Emery, 1892) obtidos da floresta úmida de Maranguape, Ceará, Brasil.

Secondary Metabolites of *Odontomachus bauri* (Emery, 1892) obtained from the rainforest of Maranguape – Ceará, Brazil.

PAULO ARAGÃO DE AZEVEDO FILHO^a, RAYANNE CASTRO GOMES DOS SANTOS^a,
SELENE MAIA DE MORAIS^a

^a Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ce, Brasil – Faculdade de Veterinária, Laboratório de Química e Produtos Naturais. Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Campus do Itaperi, CE, 60740-000.

Corresponding author

Selene Maia de Moraes

Email: selenemaiademoraes@gmail.com

Telephone: +55 85 988.852.368

Abstract

Ants of the genus *Odontomachus* are widely distributed in neotropical environments and are known to have a painful bite that can cause allergic reactions and anaphylactic shock. The composition of cuticular hydrocarbons is directly related to communication, the division of labor and the fertility of these insects. Thus, in order to increase knowledge about the chemical components of this species, a study on the identification of secondary metabolites was performed. Three nests of the species *O. bauri* were collected in the rainforest of Maranguape-Ce, Brazil. The nests were sent to the laboratory where the extraction process of the metabolites was carried out by immersing the specimens in hexane solvent. The obtained extract was submitted to the silica gel column before being analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, providing the data relative to the composition of the samples. The similarity between the samples was evaluated by non-parametric tests. The comparison between the A1-A2 and A2-A3 samples revealed that they are statistically different, whereas the A1-A3 samples were shown to be statistically the same. Although the A2 sample was distinct from the others, a strong correlation was observed. A large amount of long chain hydrocarbons was found, being formed mainly by n-Alkanes (43.7%) and Mono-methylalkanes (37.5%). The highest abundant component was 6-Methyl-nonacosane, representing on average 23.41% of each sample. The composition of the samples reveals a unique pattern for the *O. bauri* ants collected, since they differ in type, quantity and proportion in relation to the patterns observed in the other species of the same genus, and that methyl-branched main representative could be the sex pheromone of this specie.

Keywords: *Odontomachus bauri*. Hymenoptera. Formicidae. Cuticular Hydrocarbons.

Introduction

The *Odontomachus* ants live in varied places, including temperate zones, tropics and moist forests areas. The ants of the species *Odontomachus bauri* are widely distributed in neotropical environments. They are more tolerant of dry conditions or semi arid habitats (BROWN, 1976). This dry conditions and moist forest environments may be observed in northeast area of Brazil, in the state of Ceará, providing good conditions to dissemination of the species. *O. bauri* ants are known to have a painful sting with venom responsible for causing a severe allergic reaction that can develop into anaphylactic shock or severe urticaria (RODRIGUEZ-ACOSTA et al., 2010), as well as containing a proteolytic, hemolytic, coagulant, antiparasitic and antimicrobial activity (SILVA et al., 2015).

Cuticular hydrocarbons (CHs) have been characterized in several studies on ants. The composition presented by each species demonstrates the existence of cuticular chemical profiles in the insects that are composed mainly of straight or branched chain alkanes and alkenes of 19-35 carbons (BLOMQUIST; BAGNERES, 2010). For social insects, the HCs profile encodes information that allows identifying the sex, fertility status and identification of individuals in the nest (SMITH et al., 2012, GINZEL; BLOMQUIST, 2016). An experiment with *Myrmecia gulosa* showed that the workers can distinguish fertile or infertile queens and workers based on the mixture of long-chain hydrocarbons present in the cuticle or post-pharyngeal gland (DIETEMANN et al., 2003).

The characterization of cuticular chemicals from three different species of *Odontomachus* (*O. ruginodis*, *O. relictus* and *O. haematodus*) showed that fertility signs are not conserved within genera, since the chemical compounds that distinguish queens and workers vary in number and type among species (SMITH et al., 2016). It was also observed that the CHs are used by the workers of *O. brunneus* for a policing of the nests, with or without queen. This policide demonstrated great aggression against supernumerary reproductive individuals of the nest, which were signaled by the hydrocarbon presence (Z)-9-nonacosene, a cuticle component significantly more abundant in the reproductive individuals (SMITH et al., 2012).

An analysis of 78 species of ants identified almost 1000 CHs, most of them classified as n-alkanes (97%), monomethylalkanes (96%), trimethylalkanes (84%) and alkenes (73%). Monomethylalkanes are related to the signals of communication, and may be linked to the formation of dimethylalkanes, specific chemicals, which may be

characteristic of a species or even of a nest, being important for the recognition among individuals of the same group, which would explain the. These components are relatively more diversified compared to n-alkanes and monomethylalkanes, although they are present in smaller proportions (MARTIN; DRIJFHOUT, 2009).

A reconnaissance study of the African ant *Pachycondyla analis* was conducted through bioassay check the opening of the jaw in response to CHs extracts. The ants used in the test had their responses evaluated when they were placed in contact with CHs from the same nest and from different nests. The ants demonstrated aggression against CHs from a different nest to which they belonged (YUSUF et al., 2010). The recognition among individuals of the nest can also be performed according to the proportion of volatile components in specific regions of the animal's body, which can be observed from the study of the chemical components present in the head and abdomen region of ants *O. bauri* (JAFFE; MARCUSE, 1982).

The CHs are directly related to the physico-chemical characteristics of the cuticle of these insects. The n-alkanes and monomethylalkanes have differentiated melting points and a mixture of these components directly affects the physical characteristics of the cuticle, forming a continuous and waterproof cuticular layer that supports a wider temperature range. This phenomenon would not occur in a situation in which the cuticle was formed only by pure hydrocarbons (GIBBS; POMONIS, 1995; GIBBS, 1995). In this way, CHs have an important plasticity that gives them greater adaptability to environmental variations, an important characteristic that is reflected in the evolutionary process of these insects, since it is directly related to sexual communication in the social environment (INGLEBY, 2015).

In a previous work, it was demonstrated that the Dufour gland of a Japanese species queenless (*Diacamma* sp.) has a mixture of hydrocarbons that presents the isomers (Z) of 8-heptadecene as being the compounds responsible for evoking the followers during the movement of the nest (FUJIWARA-TSUJII et al., 2012). This compound was also observed mostly in a relatively simple mixture of hydrocarbons collected from the Dufour glands of *O. bauri* in the Brazilian Northeast (MORGAN et al., 2003). This information shows us how the compositions of these metabolites in these ants are chemically distinct and of great importance for the communication between social insects. Based on this information, this work aims to characterize the secondary metabolites of *O. bauri*, observing the similarities or disparities with other species in the hydrocarbon pattern that it presents.

Methods

Catching specimens

Three *O. bauri* nests in different areas of the Maranguape, Ce, Brazil, rain forest (03°54'11.690"S, 038°42'55.298"W) were collected by aspiration (collection authorization: 58972-1). Each nest formed a set of specimens (workers and queens) for analysis, thus totaling three samples. Ant nests were collected during the rainy season of 2016. In March, on days 13 and 20 and in April, on day and 17. Total rainfall in each month was 225 mm, with temperatures ranging between 23 and 25° C. The nests were collected at an altitude of 980 to 1000m and placed in individual boxes to be transported to the laboratory.

Extraction of metabolites

In laboratory of Chemistry and Natural Products of the State University of Ceará, secondary metabolites were acquired by immersing the ants in hexane (FOX et al., 2013). The ants remained in the solvent for 30 minutes under sonication. Thereafter, the ants were removed by filtration and the solvent was removed by rotary evaporation, thereby providing the extract for analysis. After drying, the ants and the extract were weighed to yield the yield of the samples. The samples were passed through a silica gel column before being sent for GC/MS analysis.

Analysis of extracts

The hexane samples from the nests were routed for analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) in the Department of Organic Chemistry of the Federal University of Ceará. The analysis was run on a Shimadzu QP-5050 instrument with a DB-1 fused silica capillary column with dimethylpolysiloxane (30m x 0.25mm id x 0.25µm film); Drag Gas: Helium; Injection initial temperature: 25°C; Interface temperature: 230°C; Control Mode: Split; Column inlet pressure: 100kPa; Column flow: 1.7 mL/min; Liner Velocity: 47.4 cm/sec; Slipt Ratio: 27; Total Flow: 50.0 mL/min; Equilibrium Time: 1.00 min; Temperature was 35 to 180°C at 4°C /min, then 180 to 280°C at 17°C /min and 280°C for 10 min; The mass spectrum was obtained by electron impact at 70 eV. The compounds were identified by the retention times and by comparison

of the mass spectra obtained with those present in the computerized database (National Institute of Technology Standard - Version: NIST08.LIB).

Statistical analysis

Abundance data were obtained from the GC-MS of the hexanic samples. These data were organized in an array, thus enabling a comparative statistical analysis. All analyzes were performed using the WPS-Spreadsheets software (Version: 10.1.0.5672 - 2016 ©Beijing Kingsoft Office Software Co., Ltd. & Zuhuhai Kingsoft Office Software Co., Ltd.). The data of composition of the samples were evaluated in order to observe the existence of normality in their distribution. For this, each sample was submitted to the Kolmogorov-Smirnov test. In sequence, were submitted to non-parametric analyzes, the Wilcoxon signed rank test and the Spearman correlation test.

Results

Gas chromatography / Mass spectrometry analysis

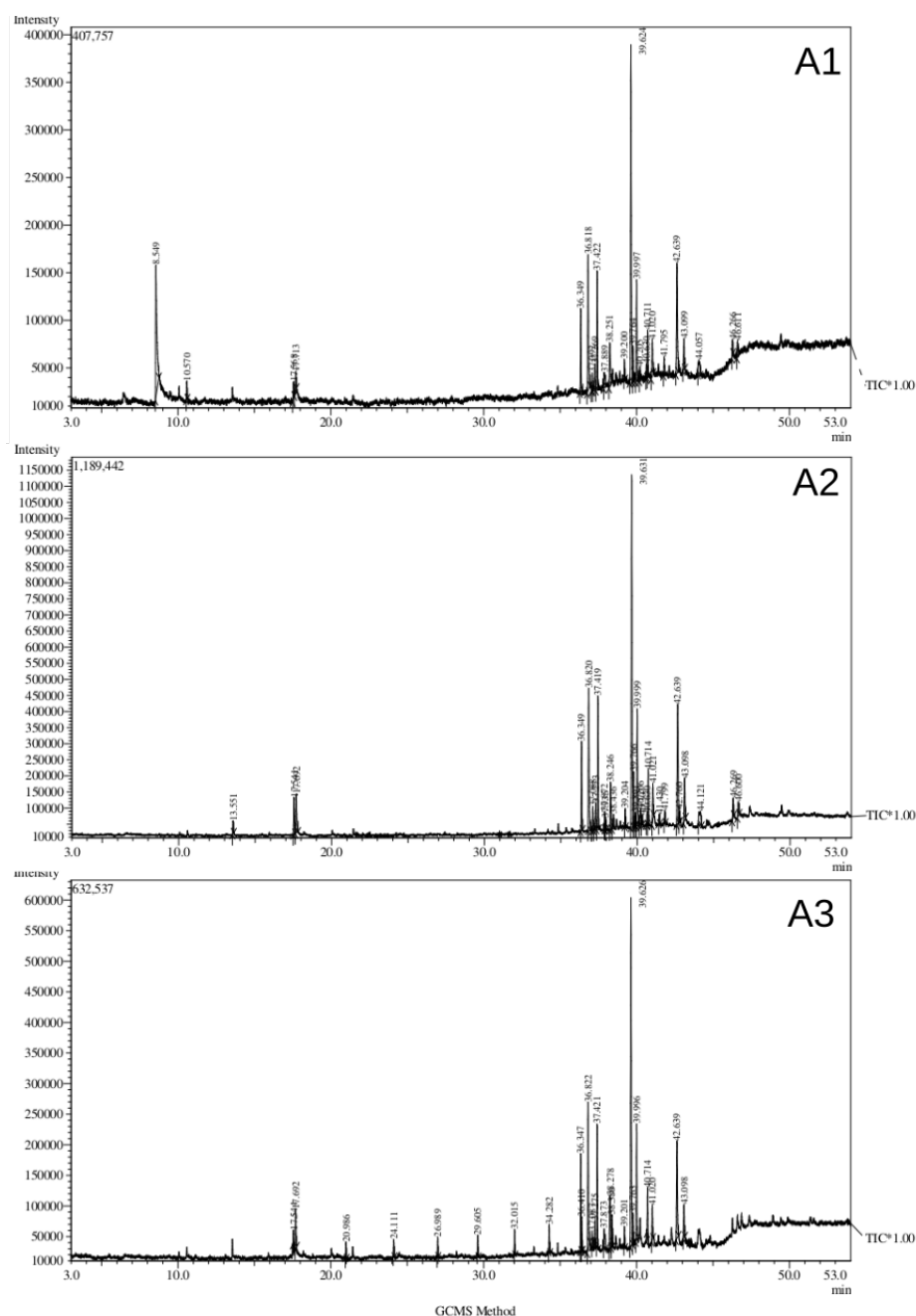
In all statistical analyzes the values obtained (0.706, 0.811, 0.655) for samples were higher than the critical values (0.333, 0.326, 0.395) at a significance level of 1%, thus rejecting the null hypothesis (H_0). Thus, there is enough statistical evidence to state that the data related to the abundance records of the hexane samples do not have normal distribution and, therefore, were submitted to non-parametric tests, Wilcoxon signed rank teste and Spearman correlation test.

Wilcoxon analysis between samples A1-A2 and A2-A3 provided lower statistical results (90 and 67, respectively) at the critical values tabled (94 and 102, respectively), thus rejecting H_0 . This results provides sufficient statistical evidence to state that the samples are distinct. However, the comparative analysis of samples A1-A3 obtained statistic result (178) higher than the critical value (63) and, therefore, does not reject H_0 , thus providing enough statistical evidence to assert that samples A1 and A3 are the same. All analyzes were performed at a significance level of 1%.

The correlation analysis between the samples was positive. All values (A1-A2: 0.917; A2-A3: 0.885 and A1-A3: 0.873) were higher than the critical value table (0.479) at the significance level of 1% and, therefore, were classified as very strong correlation.

The extraction method presented a low yield (A1 = 0.614%; A2 = 0.674%; A3 = 0.910%). Gas chromatogram of three samples showed similar pattern (Figure 1). The identification of components was confirmed by comparing the mass spectra and the Kovats Index obtained by the liner regression analysis of the retention times. A large amount of long chain hydrocarbons (C15-C36) was observed in the samples (Table 1).

Figure 1 - Chromatograms of CG/MS analysis of ants hexane extracts samples of *Odontomachus bauri*. (Samples were numbered from A1 to A3).



Source: Prepared by the author.

Table 1 - List of components found in the hexanic samples of *Odontomachus bauri*. (FM – Formula; MM – Molecular Mass; RT – Retention Time; KI – Kovats Index; SD - Standard Deviation; X – Presence)

	COMPOUNDS	FM	MM	RT	KI	PROPORTION	SAMPLES		
						(MEAN ± SD)%	1	2	3
1.	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	212	13.55	1500	0.28 ± 0.48		x	
2.	1-Hexadecyne	C ₁₆ H ₃₀	236	17.56	1664	1.57 ± 0.73	x	x	x
3.	(Z) 8-Heptadecene	C ₁₇ H ₃₄	238	17.69	1676	2.18 ± 0.75	x	x	x
4.	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	296	36.34	2100	6.13 ± 0.48	x	x	x
5.	Docosane	C ₂₂ H ₄₆	310	36.82	2200	6.25 ± 5.36	x	x	x
6.	2-Methyl-tetracosane	C ₂₅ H ₅₂	338	37.08	2465	1.31 ± 0.23	x	x	x
7.	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	352	37.27	2500	1.71 ± 0.14	x	x	x
8.	Hexacosane	C ₂₆ H ₅₄	366	37.42	2600	8.48 ± 0.23	x	x	x
9.	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	394	37.87	2700	1.18 ± 0.12	x	x	x
10.	11-Methyl-heptacosane	C ₂₈ H ₅₈	394	37.93	2733	0.25 ± 0.43		x	
11.	7-Methyl-heptacosane	C ₂₈ H ₅₈	394	38.24	2746	3.26 ± 0.32	x	x	x
12.	Octacosane	C ₂₈ H ₅₈	394	38.43	2800	0.32 ± 0.55		x	
13.	Nonacosane	C ₂₉ H ₅₈	408	39.20	2900	1.29 ± 0.10	x	x	x
14.	6-Methyl-nonacosane	C₃₀H₆₂	422	39.62	2950	23.41 ± 0.43	x	x	x
15.	2-Methyl-nonacosane	C ₃₀ H ₆₂	422	39.76	2958	2.74 ± 0.79	x	x	x
16.	3-Methyl-nonacosane	C ₃₀ H ₆₂	422	39.89	2972	0.31 ± 0.53		x	
17.	triacontane	C ₃₀ H ₆₂	422	40.00	3000	7.55 ± 0.48	x	x	x
18.	9-Methyl-triacontane	C ₃₁ H ₆₄	436	40.20	3034	0.67 ± 0.58	x	x	
19.	10-Methyl-triacontane	C ₃₁ H ₆₄	436	40.30	3035	0.22 ± 0.38		x	
20.	11,20-Dimethyl-triacontane	C ₃₂ H ₆₆	450	40.63	3068	0.22 ± 0.38	x	x	
21.	Hentriacontane	C ₃₁ H ₆₄	436	40.71	3100	3.47 ± 0.21	x	x	x
22.	Dotriacontane	C ₃₂ H ₆₆	450	41.02	3200	2.48 ± 0.09	x	x	x
23.	6-Methyl-dotriacontane	C ₃₃ H ₆₈	464	41.43	3245	0.21 ± 0.37		x	
24.	8,20-dimethyl-dotriacontane	C ₃₄ H ₇₀	478	41.79	3265	0.70 ± 0.66	x	x	
25.	Trtriacontane	C ₃₃ H ₆₈	464	42.63	3300	7.37 ± 0.60	x	x	x
26.	3-Methyl-tritriacontane	C ₃₄ H ₇₀	478	42.76	3376	0.28 ± 0.48		x	
27.	Tetratriacontane	C ₃₄ H ₇₀	478	43.09	3400	2.40 ± 0.34	x	x	x
28.	8-Methyl-tetratriacontane	C ₃₅ H ₇₂	492	44.12	3440	0.64 ± 0.56		x	
29.	7-Methyl-pentatriacontane	C ₃₆ H ₇₄	506	46.26	3540	0.82 ± 0.71	x	x	
30.	Hexatriacontane	C ₃₆ H ₇₄	506	46.60	3600	0.71 ± 0.63	x	x	

Source: Prepared by the author.

The compounds 1-Hexadecyne, (Z)-8-Heptadecene, Heneicosene, Docosane, 2-Methyl-tetracosane, Pentacosane, Hexacosane, Heptacosane, 7-Methyl-heptacosane, Nonacosane, 2-Methyl-nonacosane, 6-Methyl-nonacosane, Triacontane, Hentriacontane, Dotriacontane, Tritriacontane and Tetratriacontane were similar to the three samples (56%), whereas the compounds 9-Methyl-triacontane, 11,20-Dimethyl-triacontane, 8,20-Dimethyl-dotriacontane, 7-Methyl-pentatriacontane and Hexatriacontane were observed in two of the three samples (16%). 7 components were observed in a single sample (26%). On the average, the 6-Methyl-nonacosane component presented the highest proportion in the samples ($23.41\% \pm 0.43$), followed by Triacontane (7.55 ± 0.48), Tritriacontane ($7.37\% \pm 0.60$), Docosane ($6.25\% \pm 5.36$) and Heneicosane ($6.13\% \pm 0.48$).

Discussion

The comparative analysis of the obtained compounds revealed the existence of a great quantity of HCs. These hydrocarbons are known in the literature as being related to the recognition among individuals and chemical fertility signaling of the nest members, a pattern that differs between workers, males and queens (LIEBIG, 2010). Of the registered components, 14 are n-Alkanes, which represents 43.7% of the sample, followed by 12 (37.5%) Monomethylalkanes.

These results corroborate the patterns of hydrocarbon predominance observed in ants. The components Pentacosane, Hexacosane, Heptacosane, 7-Methyl-Heptacosane, Octacosane, Nonacosane, Triacontane and Hentriacontane found in *O. bauri*, were also recorded in reproductive and non-reproductive individuals of *O. brunneus* (SMITH et al., 2012). The species *O. brunneus* presented the component (Z)-9-Nonacosene as majority (36.75%), in addition to being identified as a fertility sign in the species (SMITH et al., 2012). However, the proportion of the compounds between the two species is not the same, indicating a clear distinction of the CHs profile.

The *O. bauri* species presented 6-Methyl-nonacosane as the major component (23.41%), which could be an indicator of fertility in the species to be evaluated. NELSON (1993) reported about methyl-branched lipids in insects and 2-methyl-heptadecane was shown to be a sex volatile pheromone of several species of tiger moths and 13-methyl-triacontane for *Heliothis virescens* larvae. Then, we hypothesized that among methyl-branched hydrocarbons 6-methyl-nonacosane is the most relevant representative in the samples and could be the pheromone of *O. bauri*.

The comparative study of the CH patterns of three *Odontomachus* species was carried out, demonstrating similarities with the compounds found in this study. The Heneicosane, Docosane, Pentacosane, Hexacosane and Nonacosane components found in *O. bauri* were also observed in the species *O. ruginodis*, *O. haematodus* and *O. relictus*. However, the species *O. ruginodis* presented 2,5-Dialkyltetrahydrofuran as the major component. The major component of the species *O. relictus* was (Z)-9-Nonacosane, while 5,19-Dimethylheptacosane was the major compound in the *O. haematodus* species (SMITH et al., 2016).

The Pentadecane and Heneicosane components observed in this study were found in the secretions of the Dufour gland of several species of ants of the subfamily Ponerinae (*Platythyrea cribinodis*, *Diacamma ceylonense* and *D. indicum*, *Odontoponera transverse*, *Pachycondyla satriata* and *P. indica*), including *O. bauri* ants collected in Maceió-AL, Brazil (MORGAN et al., 2003). Despite the similarities with individuals of the same genus or of different genera, the components recorded in this study constituted a unique standardization for the species *O. bauri*, either by the types and quantities of component, or by the relative abundance that they present in the species, confirming the observation by SMITH et al. (2016) that the cuticular components are not conserved within the genus.

Conclusion

The composition of the samples reveals a unique pattern for the *O. bauri* ants collected, since they differ in type, quantity and proportion in relation to the patterns observed in the other species of the same genus and since 6-methyl-nonacosane was the most relevant compound in the samples, we suggest the hypothesis of being the pheromone of this specie.

Acknowledgments

The authors thank the Federal University of Ceará and Organic and Inorganic Chemistry Department for GC/MS of ant's extracts.

References

- BLOMQUIST, Gary J.; BAGNÈRES, Anne-Geneviève. Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. In: BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A-G. (Eds.). **Insect hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press. 2010. ch. 1, p. 3-18.
- BROWN Jr., William L. Contributions toward a reclassification of the Formicidae. Part VI - Ponerinae, tribe Ponerini, subtribe Odontomachiti. Section A - Introduction, subtribal characters. genus *Odontomachus*. **Studia Entomologica**, Editora Vozes Ltda, Petrópolis, RJ, v. 19, n. 1-4, p. 67-171, dez. 1976.
- DIETEMANN, Vincent *et al.* Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10341–6, 2003.
- FOX, Eduardo G. P. *et al.* A simple, rapid method for the extraction of whole fire ant venom (Insecta: Formicidae: Solenopsis). **Toxicon**, v. 65, p. 5-8, apr. 2013.
- FUJIWARA-TSUJII, Nao *et al.* Identification of the tandem running pheromone in *Diacamma sp.* from Japan (Hymenoptera, Formicidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 4, p. 1281-1295, 2012.
- GIBBS, Allen. Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: Model mixtures and lipid interactions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, n. 4, p. 667–672, 1995.
- GIBBS, Allen; POMONIS, James G. Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, n. 2, p. 243–249, 1995.
- GINZEL, Matthew D.; BLOMQUIST, Garry J. Insect hydrocarbons: Biochemistry and chemical ecology. In: COHEN, Ephraim; MOUSSIAN, Bernard (Eds.). **Extracellular Composite Matrices in Arthropods**, Springer International Publishing, ch. 7, p. 221–252, set. 2016.
- INGLEBY, Fiona C. Insect cuticular hydrocarbons as dynamic traits in sexual communication. **Insects**, v. 6, n. 3, p. 732–742, 2015.
- JAFFE, Klaus.; MARCUSE, M. Nestmate recognition and territorial behaviour in the ant *Odontomachus bauri* Emery (Formicidae: Ponerinae). **Insectes Sociaux**, v. 30, n. 4, p. 466–481, 1983.
- LIEBIG, Jürgen. Hydrocarbon profiles indicate fertility and dominance status in ant, bee, and wasp colonies. In: BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A-G. (Eds.). **Insect Hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010, p. 254–281.

MARTIN, Stephen; DRIJFHOUT, Falko. A review of ant cuticular hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 10, p. 1151–1161, 2009.

MORGAN, E. David *et al.* Comparative survey of abdominal gland secretions of the ant subfamily ponerinae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 1, p. 95–114, 2003.

NELSON, Dennis R. Methyl-branched lipids in insects. In: STANLEY-SAMUELSON, David W.; NELSON, Dennis R. (Eds.). **Insect lipids: Chemistry, biochemistry and biology**. London: University of Nebraska Press, 1993, p. 271-302.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, Alexis; SÁNCHEZ, Elda E.; NAVARRETE, Luís F. Intensa reacción alérgica en paciente mordido por la hormiga negra (*Odontomachus bauri*). **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 62, n. 1, p. 117-124, 2010.

SILVA, Mariana F. *et al.* Biological and enzymatic characterization of proteases from crude venom of the ant *Odontomachus bauri*. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5114–5128, 2015.

SMITH, Adrian A. *et al.* Experimental evidence that workers recognize reproductives through cuticular hydrocarbons in the ant *Odontomachus brunneus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 66, p. 1267–1276, 2012.

SMITH, Adrian A.; MILLAR, Jocelyn G.; SUAREZ, Andrew V. Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* trap-jaw ants. **The Journal of experimental biology**, v. 219, n. 3, p. 419–30, 2016.

YUSUF, Abdullahi A. *et al.* Nestmate recognition and the role of cuticular hydrocarbons in the African termite raiding ant *Pachycondyla analis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 4, p. 441–448, 2010.

7 CAPÍTULO 2

Biotechnological potential of secondary metabolites obtained from *Odontomachus bauri* (Emery, 1892) ants collected in Maranguape, Ceará, Brazil.

Potencial biotecnológico dos metabólitos secundários obtidos da formiga *Odontomachus bauri* (Emery, 1892) coletadas em Maranguape, Ceará, Brasil.

Periódico: *Toxicon*
(Submetido em junho de 2017)
Qualis A2

Biotechnological potential of secondary metabolites obtained from *Odontomachus bauri* (Emery, 1892) ants collected in Maranguape, Ceará, Brazil.

PAULO ARAGÃO DE AZEVEDO FILHO¹, CLAUDIA PESSOA², MANOEL ODORICO DE MORAES², JOSÉ DE BRITO VIEIRA NETO², FÁBIO ROGER VASCONCELOS³, RODRIGO RODRIGUES CAMBRAIA DE MIRANDA⁴, DAUANA MESQUITA SOUSA⁴, DEISIANNE RODRIGUES DA SILVA⁴, SELENE MAIA DE MORAIS¹

¹ *Universidade Estadual do Ceará - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Química e Produtos Naturais. Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Campus do Itaperi, 60714-903, Fortaleza-CE, Brasil .*

² *Universidade Federal do Ceará - Laboratório de Oncologia Experimental - Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Campus do Pici, 60.430-275, Fortaleza-CE, Brasil.*

³ *Laboratório de Fitopatologia - CNPAT/EMBRAPA, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 - Campus do Pici, 60020-181, Fortaleza-CE, Brasil.*

⁴ *Universidade Estadual Vale do Acaraú - Núcleo de Biotecnologia de Sobral, Laboratório de Biologia Molecular - Avenida Comandante Murocelio Rocha Pontes, 100 - Campus Derby Sobral, 62042-280, Sobral-CE, Brasil.*

Corresponding author

Paulo Aragão de Azevedo Filho

Email: prof.pauloaragao@gmail.com

Telephone: +55 85 988.131.842

Abstract

Extracts from ants are known to possess a wide range of biological activities, among them, antimicrobial, anti-tumoral, anti-inflammatory and antiparasitic. The species *Odontomachus bauri*, widely distributed in neotropical environments, is known to present a painful sting and to possess a venom with proteolytic, hemolytic, coagulant, antimicrobial and antiparasitic action. In the present study, the *O. bauri* ants collected in Maranguape-Ce were taken to the laboratory where the extraction of secondary metabolites was carried out by means of immersion of the ants in ethanol during the period of one week, prioritizing the removal of hydrocarbons present in the cuticle and in the venom of the ants. After this period, the insects were separated and the extract was obtained after removal of the solvent by rotary evaporation. The extract was then submitted to antitumor (PC-3, HCT-116 and SF-295), anti-helminthic (*Caenorhabditis elegans* - sensitive and Ivermectin resistant strains) and antimicrobial (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) tests. The results revealed that the ethanol extract does not have viable antitumor activity against the tested strains. However, the extract had positive effects against bacterial strains and nematode strains. The results demonstrate important biological activities from a non-protein ant extract, which suggests the existence of biological functions related to nest health, thus avoiding contamination by external pathogens.

Keywords: *Odontomachus bauri*. Hymenoptera. Formicidae. Antimicrobial. Antiparasitic.

Highlights

- Antitumor ineffectiveness against lineages PC-3, HCT-116 and SF-295.
- Antimicrobial effectiveness against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Klebsiella pneumoniae*.
- Effectiveness against antineoplastic strains of *Caenorhabditis elegans* sensitive and resistant to Ivermectin.

Introduction

Several pharmacological effects were observed from the ant studies. These effects are generally related to the extracts obtained from the venom glands of these animals. Among them, for example, anti-inflammatory, antibiotic and hemolytic activities were observed (HOFFMAN, 2010), which demonstrates the ability of these organisms to develop new treatments.

The enzymology of ants's venom revealed the existence of a wide variety of biological functions, as esterase, lipase, hyaluronidase, protease and phosphodiesterase (SCHMIDT et al., 1986). Despite the many attributes inherent to ants, studies on the composition of these poisons and their pharmacological effects are practically non-existent, since only a few species have been extensively studied.

The Formicidae family is known to have two distinct venom complexes, one composed of formic acid, acting as a defensive spray and another injectable, with neurotoxic and cytolytic action (TOUCHARD et al., 2016). Most ant poisons are composed of peptides or proteins. In some species, these venoms follow the same general pattern observed in wasps and bees, and may cause cell lysis, neurotoxicity, antimicrobial (PALMA, 2006) and inflammatory effects (KOU et al., 2005; KNIGHT; BANGS, 2007).

The bioactivity of the venom can be observed in several species, such as *Mirmecia pilosula*, the Australian ant that has Pilosulin-1, a substance characterized by the presence of peptides with potent antimicrobial action, even against Gram-positive and Gram-negative multiresistant strains (PALMA, 2006). An antibiotic effect was also observed from the defensive secretions of the species *Crematogaster pygmaea* which inhibited the growth of Gram-positive (*Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria (QUINET, 2012).

The subfamily Paraponerinae consists of ant species with neurotoxic venoms with potent central nervous system synaptic transmission blocking effects, as well as causing depolarizations and fibrillation of skeletal muscles, even at submicromolar concentrations (HENDRICH et al., 2002). The species *Paraponera clavata*, which possesses a small neuropeptide known as poneratoxin, possesses a poison capable of affecting the functioning of sodium channels (HENDRICH et al., 2002; HADDAD JUNIOR et al., 2005).

The subfamily Ponerinae, on the other hand, has anti-inflammatory action, immunological stimulus and inhibition of tumor growth (DKHIL et al., 2010; BADR et al.,

2012). The species *Dinoponera quadriceps* presents a neuroprotective and neurotoxic action poison (LOPES et al., 2013), besides having antinociceptive effect (SOUSA et al., 2012). It was observed that the composition of these poisons varies according to the location in which the ants meet (COLOGNA et al., 2013).

The species *Pachycondyla sennaarensis*, characterized by predators specialized in the capture of small animals and the collection of seeds, have in their venom a complex mixture of linear and methyl-branched hydrocarbons, associated with alkanes and small amounts of terpenoids, causing several cases of anaphylaxis (NIKBAKHTZADEH, 2009).

As regards the *Odontomachus bauri* species, the focus of this study, important biological activities were observed, demonstrating that the venom of this species has proteolytic, hemolytic, coagulant, antimicrobial and antiparasitic properties (SILVA et al., 2015). This species is also known to have a painful bite, with a poison responsible for causing a severe allergic reaction that may develop in anaphylactic shock or urticaria (RODRIGUEZ-ACOSTA et al., 2010).

O. bauri ants are widely distributed in neotropical environments. They are more tolerant of dry conditions or semiarid habitats (BROWN, 1976). This dry conditions and moist forest environments may be observed in northeast area of Brazil, in the state of Ceará, providing good conditions to dissemination of the species, which will favor the collection process. Thus, this study aims to broaden the scientific knowledge about the biological properties related to the secondary metabolites extracted from the *O. bauri* species, evaluating their anthelmintic, antibiotic and antitumor efficacy.

Material and methods

Catching specimens and extraction of metabolites

O. bauri ants were collected by aspiration in the Maranguape-Ce rainforest (03°54'11.690'S, 038°42'55.298"W), at an altitude of approximately 1000m (collection authorization: 58972-1). All the ants obtained formed a sample for analysis. The ants were collected during the rainy season with total precipitation of the month was 225 mm and temperatures varying between 23 and 25°C. Then the ants were transported to the laboratory where the extraction process of the metabolites was started. In the laboratory, secondary metabolites were acquired by immersing the ants in ethanol, an adaptation of the methodology used by FOX et al. (2013). After one week, the ants were removed by filtration and the solvent was removed by rotary evaporation, thereby providing the extract for analysis. The extract and the ants were dried and then weighed.

Cytotoxicity analysis

The human cancer cell lines used, HCT-116 (colon carcinoma), PC-3 (prostate adenocarcinoma) and SF-295 (glioblastoma). The lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics, and kept in an oven at 37°C and 5% CO₂. The ethalonic extract was dissolved in DMSO at a stock concentration of 10 mg/mL. Stocks were kept under refrigeration (-20°C) until use. The sample was tested in two independent experiments in quadruplicate at a single concentration (50 µg/mL).

An intensity scale was used to evaluate the cytotoxic potential of the tested samples, based on the percentage of cell viability reduction (CVR%) determined: Sample without activity (CVR < 1%); Sample with little activity (1% < CVR < 50%); Sample with moderate activity (50% < CVR < 75%) and Sample with lots of activity (CVR > 75%). The cytotoxicity of the samples was assessed by the MTT method (MOSMAN, 1983). Neoplastic cells were plated in 96-well plates (1 x 10⁵ cells/mL) and samples were added after 24h. The plates were then incubated for 72h in a 5% CO₂ and 37°C oven. The negative control received the same amount of DMSO and the absorbances were obtained with the aid of a plate spectrophotometer at 595 nm.

Anthelmintic analysis

In this study, two lineages of *Caenorhabditis elegans* was used, one sensitive and another resistant to Ivermectin. Monoxenic cultures of Bristol N2 wild sensitive strains were maintained in NGM-Agar medium (Nematode Growth Media) seeded with *E. coli* bacteria (NA22) in incubator for BOD (Biochemical Oxygen Demand) at 22°C as described by (WOOD, 1988). Selection of the resistant strain (line IVR15) was performed using the N2 line in successive in vitro passages in the presence of increasing under dosages of ivermectin, as described in the literature (JAMES; DAVEY, 2009). This lineage was selected, being resistant to 15µg/mL Ivermectin.

The process of separation of the nematodes for the test followed the standard used by KATIKI et al. (2011), which consists of several steps: 1 - Washing; 2 - The wash water goes to the first sieve (38µm); 3 - What was retained (adults and young adults alive and dead) in the first sieve is transferred to the second sieve (53µm) to separate living nematodes from the dead; 4 - The filtrate (adults and young adults alive) is again shifted in the first sieve to remove the nematodes in stages that will not be used (L1, L2 and L3); 5 - The retentive is transferred to the second sieve to complete the separation; 6 - The filtrate is collected in a tube and set aside until the nematodes precipitate.

The distilled water is withdrawn until the volume is reduced to 4 to 3ml. Finally, it is analyzed in the optical microscope for the confirmation of the insulation. The incubation test of nematodes was performed in a 96-well plate, with the concentrations tested in triplicate and with positive (Ivermectin) and negative controls (nematodes in M9). The isolated nematodes was be centrifuged, the water supernatant removed and then resuspended in M9 in a volume sufficient for all wells. 1- Place 100µl of M9 in all wells, except for the first three; 2- In the first three wells put 200µl of the compound with twice the concentration tested, because this concentration will decrease by half.

Antimicrobial analysis

Strains of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 were used in the tests. The preliminary antibacterial tests were conducted on concentrations of 25 and 250 mg/mL (BAUER et al., 1966). Disks containing Streptomycin (1mg/mL) and Chloramphenicol (4mg/mL) were used as positive control (PAREDES et al., 2016).

To determine the MIC (Minimum Inhibitory Concentration), was used a dilution technique in microplates of 96 wells, where the wells were filled with 100 μ L of Müller-Hinton broth plus 100 μ L of the extracts solutions (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2006). Then they performed a serial dilution of 2,500 at 4.88 μ g/mL.

Bacterial strains were previously inoculated in agar Brain Heart Infusion (BHI) at 35°C for 18 h standardized at a scale of 0.5, McFarland, in saline solution 0.85%, followed by 1 : 20 dilution, obtaining values of 10⁵ to 10⁶ cells/mL (SILVA et al, 2009), and added in each orifice of the microplates (10 v:v). Chloramphenicol (4 mg/mL) was used as positive control.

The microplates were incubated in an incubator (Q316M4, Quimis[®]), at 37 \pm 2°C for 24 hours. A spectrophotometer was used (Varian Cary[®] 50, Agilent[®]) after incubation, for reading of absorbance with a wavelength of 595 nm. After the MIC test, 10 μ L of all wells without bacterial growth were collected and the material was transferred to a Petri dish containing antibiotic-free Müller-Hinton agar to verify cell viability (PAREDES et al., 2016).

Statistical analysis

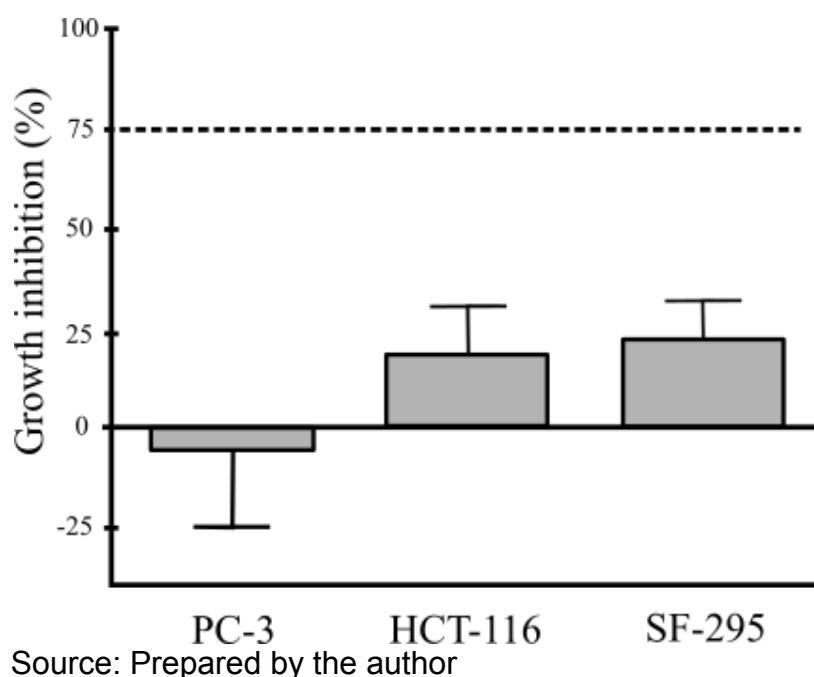
The program GraphPad Prism version 6.0 analyzed the percentage data of the averages obtained in the antitumor and anthelmintic tests. Tukey's test was conducted to compare means obtained in the anthelmintic test. The software SPSS Statistics 22 obtained the calculation of the concentration.

Results

Cytotoxic analysis

Analysis of the ethanolic extract revealed the existence of little or no antitumor activity against the tested strains (Figure 1). The values are presented in CVR% with standard error of the mean (SEM). The extract showed no antitumor activity against lineage PC 3 (CVR $< 1\% \pm 7.9$). However, weak inhibition of the growth of the HCT 116 (CVR = $17\% \pm 3.6$) and SF 295 (CVR = $22\% \pm 4.5$) was observed.

Figure 1 - Inhibition of tumor growth caused by ethanolic extract of *Odontomachus bauri*.



Anti-helminthic analysis

The analysis of ethanol extract on *C. elegans* strains showed a strong anthelmintic effect (Table 1). The data are presented in mean of mortality with SEM. The N2 line presented mortality values that were statistically identical to the positive control at concentrations equal to or greater than 0.25 mg/mL. In the same line, concentrations equal to or less than 0.125 mg/mL obtained values statistically equal to the negative control.

Line IVR15 obtained values that were statistically equal to the positive control with concentrations equal to or greater than 1 mg/mL, while the concentrations equal to or less than 0.125 mg/mL were statistically the same as the negative control. The minimum

inhibitory concentration relative to 50% (MIC₅₀) was calculated on the basis of the data, providing for the N2 and IVR15 lineages the concentrations 0.213 and 0.528 mg/mL, respectively.

Table 1 - Anti-helminthic effect of the ethanol extract of *Odontomachus bauri*.

Concentration (mg/mL)	Effect (%) ± SEM	
	N2	IVR15
2	100 ^a	100 ^a
1	96.3 ± 1.4 ^a	89.5 ± 3.9 ^a
0.5	95.3 ± 4.7 ^a	72.37 ± 7.9 ^b
0.25	91.4 ± 1.4 ^a	23.9 ± 4.8 ^c
0.125	19.5 ± 1.5 ^b	7.2 ± 1.8 ^d
0.0625	20.4 ± 3.1 ^b	3.3 ± 1.8 ^d
Negative Control (M9)	0 ^b	0 ^d
Positive Control (Ivermectin)	100 ^a	100 ± 0 ^a
MIC₅₀	0.213	0.528

Different lowercase letters (a, b, c, d) indicate comparisons of averages in columns. Different letters indicate significantly different values ($p < 0.05$). (SEM - Standard error of mean; N2 - Sensitive lineage; IVR15 - Ivermectin resistant lineage; MIC₅₀ - Minimum Inhibitory Concentration of 50%).

Antimicrobial Analysis

All strains submitted to the test presented growth inhibition, demonstrating the antimicrobial effectiveness of the ethanol extract. Three of the four strains had minimal inhibitory concentration (MIC) equal to the minimum bactericidal concentration (MBC), except for the *S. epidermidis* ATCC 12228 strain that presented MIC (15.63) 1.99 times smaller than the MBC (31.25).

Table 2 - Antimicrobial effect of the ethanolic extract of *Odontomachus bauri*.

Microorganisms	Disk diffusion	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	+	15.63	15.63
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	+	7.81	7.81
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	+	15.63	31.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	+	7.81	7.81

ATCC: American Type Culture Collection; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MBC: Minimum Bactericidal Concentration; +: inhibition in plate.

Discussion

The biological activities in the scientific literature of compounds obtained from ants are strongly related to the use of extracts coming from the poison glands of these insects, which in general is a material rich in bioactive peptides. The evaluation of the biological activity of an extract rich in secondary metabolites is presented as a new alternative in the search for non-protein bioactive compounds from ants. For this, the technique of secondary metabolite extraction in the present study was adapted in relation to the methodology used by FOX et al. (2013), where it was used hexane as solvent. The extraction based in ethanol proved to be more efficient in obtaining a hydrocarbon rich extract, given the greater polarity of the solvent and the immersion time at which ants were subjected.

The extract showed a weak antitumor cytotoxic activity which seems to be directly related to the non-protein composition of the extract. However, the efficacy of the extract in relation to its antimicrobial and antiparasitic activity demonstrates its potential, which represents a promising alternative for the development of new treatments, in view of the great worldwide concern with the increase of drug resistance. The antimicrobial and antiparasitic activities have already been observed from the crude extract of the venom gland of *O. Bauri*.

The crude venom extract was used in tests against strains of *E. coli*, *S. aureus* and *Toxoplasma gondii* (SILVA et al., 2015). Using the disk diffusion technique, SILVA et al. (2015) observed that 15 µg/disc of crude venom extract was able to inhibit the growth of *E. coli* (62.5%) and *S. aureus* (72.7%). On the other hand, in the present study, we observed that a concentration of 7.81 µg/mL was responsible for reducing the bacterial viability ($\geq 99.9\%$) of *E. coli*, beside increasing the scientific antimicrobial knowledge regarding the use of extracts of the species *O. bauri*, demonstrating the activity against *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* and *K. pneumoniae*.

The antiparasitic action of the ethanol extract against adults of *C. elegans* has been shown to be promising, because the resistance to an anthelmintic considered when it is not able to eliminate at least 95% of the parasites (FORTES; MOLENTO, 2013). The susceptible line (N2) reached the acceptable level of mortality (95%) with 0.5 mg/mL, while the resistant strain (IVR15) required double that concentration to eliminate 89.5% of the nematodes. However high these concentrations may be, it should be noted that the observed anthelmintic effect is the result of the use of a crude extract obtained from the *O.*

bauri ants and consequently further complementary studies must be performed in order to isolate and identify the active component of extract that anthelmintic action. The identification of this bioactive component will certainly bring new insight into its anthelmintic efficacy.

Antimicrobial effects have already been reported in the ant way of life as a way to contribute to the health of the nest, avoiding the action of external pathogens. WANG et al. (2015) reported the existence of antimicrobial properties of volatile products of ants of the species *Solenopsis invicta* as a way of reducing the germination of fungus spruces *Beauveria bassiana*. This defensive characteristic evolved in a particularly special way with ants from the Attini tribe. HUGHES et al. (2008) suggested the existence of a close relationship between leaf-cutting ants and their parasites and that it varies with other ants of the same tribe, thus improving resistance against diseases.

Conclusion

The ethanol extract of *O. bauri* did not show antitumor efficacy. However, it proved to be effective in its antimicrobial and antiparasitic action, suggesting the hypothesis of a protective action used to maintain the health of the nest. In this way, more specific studies on these bioactive compounds can bring important information about the ecology of the species, as well as provide alternatives for the development of anthelmintic and antibiotics for human or veterinary use.

Acknowledgments

The authors thank all the institutions involved. The Federal University of Ceará and the National Cancer Institute (USA) for human cancer strains. The University of Vale do Acaraú and the Department of Parasitology (ICB / USP) for the nematode strains and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ / RJ) and EMBRAPA for the bacterial strains.

References

- BADR, Gamal *et al.* Human breast carcinoma cells are induced to apoptosis by samsu ant venom through an IGF-1-dependant pathway, PI3K/AKT and ERK signaling. **Cellular Immunology**, v. 273, n. 1, p. 10–16, 2012.
- BAUER, Aw *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, p. 493, 1966.
- BROWN Jr., William L. Contributions toward a reclassification of the Formicidae. Part VI - Ponerinae, tribe Ponerini, subtribe Odontomachiti. Section A - Introduction, subtribal characters. Genus *Odontomachus*. **Studia Entomologica**, v. 19, n. 1-4, p. 67-171, 1976.
- COLOGNA, Camila T. *et al.* Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 413–422, 2013.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. NCCLS document M7-A6. Pennsylvania: NCCLS, 2006, 53 p.
- DKHIL, Mohamed A.; *et al.* M. Anti-inflammatory activity of the venom from samsu ants *Pachycondyla sennaarensis*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 115–118, 2010.
- FORTES, Fernanda S.; MOLENTO, Marcelo B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: Avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391–1402, 2013.
- FOX, Eduardo G. P. *et al.* A simple, rapid method for the extraction of whole fire ant venom (Insecta: Formicidae: Solenopsis). **Toxicon**, v. 65, p. 5-8, apr. 2013.
- HADDAD JUNIOR, Vidal; CARDOSO, João L. C.; MORAES, Roberto H. P. Description of an injury in a human caused by a false tocandira (*Dinoponera gigantea*, Perty, 1833) with a revision on folkloric, pharmacological and clinical aspects of the giant ants of the genera *Paraponera* and *Dinoponera* (sub-family Ponerinae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 235-238, 2005.
- HENDRICH, Andrzej B.; *et al.* The effect of poneratoxin on neuromuscular transmission in the rat diaphragm. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7, n. 2, p. 195–202, 2002.
- HOFFMAN, Donald R. Ant venoms. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 10, n. 4, p. 1-5, 2010.
- HUGHES, William O. H. *et al.* Antimicrobial defense shows an abrupt evolutionary transition in the fungus-growing ants. **Evolution**, v. 62, n. 5, p. 1252–1257, 2008.

JAMES, Catherine E.; DAVEY, Mary W. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 213–220, 2009.

KATIKI, Luciana M. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2–4, p. 264–268, 2011.

KNIGHT, David; BANGS, Michael J. Cutaneous allergic vasculitis due to *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) envenomation in Indonesia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 38, n. 5, p. 808–813, 2007.

KOU, Junping *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 1, p. 176–180, 2005.

LOPES, Kamila S. *et al.* The effects of the brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 3, p. 141–145, 2013.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NIKBAKHTZADEH, Mohamed R.; AKBARZADEH, Kamran; TIRGARI, Siavosh. Bioecology and chemical diversity of abdominal glands in the Iranian samsun ant *Pachycondyla sennaarensis* (Formicidae: Ponerinae). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 509–526, 2009.

PALMA, Mario S. Insect Venom Peptides. In: **The Handbook of Biologically Active Peptides**. Academic Press Inc., p. 409–416, 2006.

PAREDES, Paulo F. *et al.* Screening of bioactivities and toxicity of *Cnidoscopus quercifolius* Pohl. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

QUINET, Yves P. *et al.* Antibacterial properties of contact defensive secretions in neotropical *Crematogaster* ants. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 18, n. 4, p. 441–445, 2012.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, Alexis; SÁNCHEZ, Elda E.; NAVARRETE, Luís F. Intensa reacción alérgica en paciente mordido por la hormiga negra (*Odontomachus bauri*). **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 62, n. 1, p. 117–124, 2010.

SCHMIDT, Justin O.; BLUM, Murray S.; OVERAL, William L. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 907–921, 1986.

SILVA, Marcos T. N. *et al.* A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 257–262, 2009.

SILVA, Mariana F. *et al.* Biological and enzymatic characterization of proteases from crude venom of the ant *Odontomachus bauri*. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5114-28, 2015.

SOUSA, Paloma. L.; *et al.* Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadricaps*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 213–216, 2012.

TOUCHARD, Axel *et al.* The biochemical toxin arsenal from ant venoms. **Toxins**, v. 8, n. 1, 2016.

WOOD, Willim B (Ed.). **The nematode *Caenorhabditis elegans***. New York: Cold Spring Harbor Press, 1988, 667 p.

WANG, Lei *et al.* Antimicrobial properties of nest volatiles in red imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). **Die Naturwissenschaften**, v. 102, n. 11–12, p. 66, 2015.

8 CONCLUSÃO

Os metabólitos secundários obtidos das formigas *O. bauri* coletadas em Maranguape são essencialmente constituídos por hidrocarbonetos saturados de cadeia longa provenientes da cutícula e, possivelmente do veneno desses insetos, dado o método de extração utilizado. A utilização de etanol como solvente para a extração potencializou consideravelmente a extração de metabólitos secundários. Esses metabólitos apresentaram importantes atividades biológicas, antimicrobianas e antiparasitárias, que podem ser melhor exploradas para se compreender a ecologia da espécie e, possivelmente, contribuir para o desenvolvimento de tratamentos antibacterianos e anti-helmínticos de uso humano e veterinário.

REFERÊNCIAS

AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. **Ants**: standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000. 280 p.

ALLEN, Craig R. et al. The spatial distribution of diversity between disparate taxa: Spatial correspondence between mammals and ants across south florida, usa. **Landscape Ecology**, v. 16, n. 5, p. 453–464, 2001.

ALONSO, L. E. Ants as Indicators of diversity. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants**: standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 80-88.

ANDERSEN, A. N. A global ecology of rainforest ants: Functional groups in relation to environmental stress and disturbance. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants**: standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 25-34.

ANDERSEN, A. N. et al. Use of terrestrial invertebrates for biodiversity monitoring in Australian rangelands, with particular reference to ants. **Austral Ecology**, n. 29, p. 87-92, 2004.

ANGELO, T. R. C. S.; MORINI, M. S. C.; RODRIGUES, T.. Avaliação da atividade citotóxica do veneno das glândulas de formigas *Odontomachus affinis*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES, 13, 2010, Mogi das Cruzes, **Anais...** São Paulo, Organização Mogiana de Educação e Cultura S/S Ltda, 2010. p. 66.

BADR, G. et al. Human breast carcinoma cells are induced to apoptosis by samsun ant venom through an IGF-1-dependant pathway, PI3K/AKT and ERK signaling. **Cellular Immunology**, v. 273, n. 1, p. 10–16, 2012.

BAUER, A. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.

BESTELMEYER, B. T. *et al.* Fields techniques for the study of ground-dwelling ants. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants**: standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 122-144.

BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A-G. Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. In: BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A-G. (Eds.). **Insect hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p. 3-18.

BOLTON, Barry. **An online catalog of the ants of the world**. 2017. Disponível em: <<http://antcat.org/catalog/430098>>. Acesso em: 05 de ago. 2017.

BOYD, S. K. Amphibian neurohypophysial peptides. In: KASTIN, A. J. (Ed.). **The handbook of biologically active peptides**. Academic Press Inc., 2006. p. 327-332.

BRANDÃO, C. R. F.; CANCELLO, E. M.; YAMAMOTO, C. I. Invertebrados terrestres. In: BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2000. 38 p.

BROWN Jr., W. L. Contributions toward a reclassification of the Formicidae. Part VI - Ponerinae, tribe Ponerini, subtribe Odontomachiti. Section A - Introduction, subtribal characters. genus *Odontomachus*. **Studia Entomologica**, v. 19, n. 1-4, p. 67-171, 1976.

BURIN, S. M. **Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* em células BCR-ABL positiva**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

COLOGNA, C. T. et al. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four different areas of Brazil. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 413–422, 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

CHEN, J.; LARIVIERE, W. R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 2, p. 151–183, 2010.

CHRISTIANINI, A. V.; OLIVEIRA, P. S. Birds and ants provide complementary seed dispersal in a neotropical savanna. **Journal of Ecology**, v. 98, n. 3, p. 573–582, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. NCCLS document M7-A6. Pennsylvania: CLSI, 2006. 53 p.

DEFOSSEZ, E. et al. Ant-plants and fungi: A new threeway symbiosis. **New Phytologist**, v. 182, n. 4, p. 942–949, 2009.

DELABIE, J. C. H. et al. Sampling Effort and Choice of Methods. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000a. p.145-154.

DELABIE, J. C. H.; AGOSTI, D.; NASCIMENTO, I. C. Litter ant communities of the Brazilian Atlantic rain Forest region. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Sampling ground-dwelling ants: case studies from world's rain forests**. Perth: Curtin University School of Environmental Biology bulletin, 2000b. n.18, p. 1-17.

DELABIE, J. H. C. et al. **As Formigas Poneromorfas do Brasil**. Ilhéus: Editus, 2015. 477 p.

DIETEMANN, V. et al. Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10341–10346, 2003.

DKHIL, M. A. et al. M. Anti-inflammatory activity of the venom from samsum ants *Pachycondyla sennaarensis*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 115–118, 2010.

FERNÁNDEZ, F.; SENDOYA, Sebastián. Synonymic list of neotropical ants (Hymenoptera: Formicidae). **Biota Colombiana**, v. 5, n. 1, p. 3–93, 2004.

FISHER, B. L. et al. Applying the ALL protocol: Selected case studies. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 207-214.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos : Um Modelo Multidisciplinar. **MultiCiências**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2006.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: Avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391–1402, 2013.

FOX, E. G. P. et al. A simple, rapid method for the extraction of whole fire ant venom (Insecta: Formicidae: Solenopsis). **Toxicon**, v. 65, p. 5-8, apr. 2013.

FUJIWARA-TSUJII, N. et al. Identification of the tandem running pheromone in *Diacamma* sp. from Japan (Hymenoptera, Formicidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 4, p. 1281-1295, 2012.

GIBBS, A. Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: Model mixtures and lipid interactions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, n. 4, p. 667–672, 1995.

GIBBS, A.; POMONIS, J. G. Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 112, n. 2, p. 243–249, 1995.

GINZEL, M. D.; BLOMQUIST, G. J. Insect hydrocarbons: Biochemistry and chemical ecology. In: COHEN, E.; MOUSSIAN, B. (Eds.). **Extracellular Composite Matrices in Arthropods**, [S.l.]: Springer International Publishing, 2016 , p. 221–252.

HADDAD JUNIOR, V.; CARDOSO, J. L. C.; MORAES, R. H. P. Description of an injury in a human caused by a false tocadira (*Dinoponera gigantea*, Perty, 1833) with a revision on folkloric, pharmacological and clinical aspects of the giant ants of the genera *Paraponera*

and *Dinoponera* (sub-family Ponerinae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 235-238, 2005.

HENDRICH, A. B. et al. The effect of poneratoxin on neuromuscular transmission in the rat diaphragm. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 7, n. 2, p. 195–202, 2002.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732 p.

HUBER, J. T. Biodiversity of Hymenoptera. In: FOOTIT, R. G.; ADLER, P. H. (Eds.). **Insect Biodiversity: Science and Society**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. p. 303-323.

INGLEBY, F. C. Insect cuticular hydrocarbons as dynamic traits in sexual communication. **Insects**, v. 6, n. 3, p. 732–742, 2015.

JAFFE, K.; MARCUSE, M. Nestmate recognition and territorial behaviour in the ant *Odontomachus bauri* Emery (Formicidae: Ponerinae). **Insectes Sociaux**, v. 30, n. 4, p. 466–481, 1983.

JAMES, C. E.; DAVEY, M. W. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 213–220, 2009.

KASPARI, M. A Primer on Ant Ecology. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 9-24.

KASPARI, M.; MAJER, J. D. Using Ants to Monitor Environmental Change In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 89-98.

KNIGHT, D.; BANGS, M. J. Cutaneous allergic vasculitis due to *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) envenomation in Indonesia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 38, n. 5, p. 808-813, 2007.

KOU, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 1, p. 176–180, 2005.

LATTKE, J. E. Subfamilia Ponerinae. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003. p. 261-276.

LIEBIG, J. Hydrocarbon profiles indicate fertility and dominance status in ant, bee, and wasp colonies. In: BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A-G. (Eds.). **Insect Hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p. 254–281.

- LOPES, K. S. **Estudo do potencial terapêutico do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre modelos de convulsão *in vivo* e sobre astrócitos *in vitro***. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- LOPES, K. S. et al. The effects of the brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 3, p. 141–145, 2013.
- LEAL, I. R. Biodiversity surrogacy: Indicator taxa as predictors of total species richness in Brazilian Atlantic forest and Caatinga. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, n. 12, p. 3347–3360, 2010.
- LEWINSOHN, T. M.; PRADO, Paulo I. **Biodiversidade Brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento**. São Paulo: Contexto, 2002. 176p.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurements**. New Jersey: Princeton University Press, 1988. 177 p.
- MARTIN, S.; DRIJFHOUT, F. A review of ant cuticular hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 10, p. 1151–1161, 2009.
- MATHIAS, M. I. C. Glândulas de veneno em formigas. **Biológico**, v. 69, p. 229-235, 2007. Suplemento 2.
- MEER, R. K. V.; KLAUS, J.; ARAGUA, C. **Applied myrmecology: a world perspective**. Boulder: Westview Press Inc., 1990. p.34-39.
- MESQUITA, M. L. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: Estudos preliminares do mecanismo de ação e da atividade citotóxica**. 2009. 223 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, 2009.
- MITRA, A. Function of the Dufour's gland in solitary and social Hymenoptera. **Journal of Hymenoptera Research**, v. 35, p. 33–58, 2013.
- MORI, A. et al. Comparison of reproductive strategies and raiding behaviour in facultative and obligatory slave-making ants: the case of *Formica sanguinea* and *Polyergus rufescens*. **Insectes Sociaux**, v. 48, n. 4, p. 302–314, 2001.
- MOREAU, S. J. M. It stings a bit but it cleans well: Venoms of Hymenoptera and their antimicrobial potential. **Journal of Insect Physiology**, v. 59, n. 2, p. 186–204, 2013.
- MORGAN, E. D. et al. Comparative survey of abdominal gland secretions of the ant subfamily ponerinae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 1, p. 95–114, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

- MUELLER, U. G. et al. Evolution of cold-tolerant fungal symbionts permits winter fungiculture by leafcutter ants at the northern frontier of a tropical ant-fungus symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 10, p. 4053–4056, 2011.
- NELSON, D. R. Methyl-branched lipids in insects. In: STANLEY-SAMUELSON, D. W.; NELSON, D. R. (Eds.). **Insect lipids: Chemistry, biochemistry and biology**. London: University of Nebraska Press, 1993. p. 271-302.
- NIKBAKHTZADEH, M. R.; AKBARZADEH, K.; TIRGARI, S. Bioecology and chemical diversity of abdominal glands in the Iranian samsum ant *Pachycondyla sennaarensis* (Formicidae: Ponerinae). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 509–526, 2009.
- ORTIZ, G.; MATHIAS, M. I. C. Venom gland of *Pachycondyla striata* worker ants (Hymenoptera: Ponerinae). Ultrastructural characterization. **Micron**, v. 37, n. 3, p. 243–248, 2006.
- PAIS, M. P.; VARANDA, E. M. Arthropod recolonization in the restoration of a semideciduous forest in southeastern Brazil. **Neotropical entomology**, v. 39, n. 2, p. 198–206, 2010.
- PALMA, M. S. Insect Venom Peptides. In: KASTIN, A. J. (Ed.). **The Handbook of Biologically Active Peptides**. Academic Press Inc., 2006. p. 409-416.
- PAREDES, P. F. et al. Screening of bioactivities and toxicity of *Cnidocolus quercifolius* Pohl. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-9, 2016.
- QUINET, Y. P. et al. Antibacterial properties of contact defensive secretions in neotropical *Crematogaster* ants. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 18, n. 4, p. 441–445, 2012.
- RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; SÁNCHEZ, E. E.; NAVARRETE, L. F. Intensa reacción alérgica en paciente mordido por la hormiga negra (*Odontomachus bauri*). **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 62, n. 1, p. 117-124, 2010.
- SANTANA, F. A. **Imunogenicidade do veneno de *Dinoponera australis* (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae)**. 2008. 78 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- SCHMIDT, J. O.; BLUM, M. S.; OVERAL, W. L. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 907–921, 1986.
- SCHOETERS, E.; BILLEN, J. Morphology and ultrastructure of the convoluted gland in the ant *Dinoponera australis* (Hymenoptera: Formicidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 24, n. 3, p. 323–332, 1995.
- SILVA, M. T. N. et al. A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 257–262, 2009.

- SILVA, M. F. et al. Biological and enzymatic characterization of proteases from crude venom of the ant *Odontomachus bauri*. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5114–5128, 2015.
- SMITH, A. A. et al. Experimental evidence that workers recognize reproductives through cuticular hydrocarbons in the ant *Odontomachus brunneus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 66, p. 1267–1276, 2012.
- SMITH, A. A.; MILLAR, Jocelyn G.; SUAREZ, Andrew V. Comparative analysis of fertility signals and sex-specific cuticular chemical profiles of *Odontomachus* trap-jaw ants. **The Journal of experimental biology**, v. 219, n. 3, p. 419–30, 2016.
- SOUSA, P. L. et al. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadriceps*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 213–216, 2012.
- TOUCHARD, A. et al. The biochemical toxin arsenal from ant venoms. **Toxins**, v. 8, n. 1, p. 1-28, 2016.
- UNITED NATIONS. **Convention on biological diversity**. <Disponível em: <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2017.
- WARD, P. S. Broad-scale patterns of diversity in leaf litter ant communities. In: AGOSTI, D.; MAJER, J. D.; ALONSO, L. E.; SCHULTZ, T. R. (Eds.). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 2000. p. 99-121.
- RYDER WILKIE, K. T.; MERTL, A. L.; TRANIELLO, J. F. A. Species diversity and distribution patterns of the ants of Amazonian Ecuador. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. 1-12, 2010.
- WOOD, W. B. **The nematode *Caenorhabditis elegans***. New York: Cold Spring Harbor Press, 1988. 667 p.
- YUSUF, A. A. et al. Nestmate recognition and the role of cuticular hydrocarbons in the African termite raiding ant *Pachycondyla analis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 4, p. 441–448, 2010.