

Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CUTÍCULA E DO  
VENENO DE DUAS VESPAS SOCIAIS (HYMENOPTERA:  
VESPIDAE) POR CG-EM E MALDI-TOF/TOF**

Angélica Mendonça

Dourados-MS  
Dezembro/2017

Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Angélica Mendonça

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CUTÍCULA E DO  
VENENO DE DUAS VESPAS SOCIAIS (HYMENOPTERA:  
VESPIDAE) POR CG-EM E MALDI-TOF/TOF**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientador: Dr. William Fernando Antonialli Junior  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Cláudia Andrea Lima Cardoso

Dourados-MS  
Dezembro/2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

M539a Mendonca, Angelica

Análise da composição química da cutícula e do veneno de duas vespas sociais (Hymenoptera: Vespidae) por CG-EM e MALDI-TOF/TOF / Angelica Mendonca – Dourados: UFGD, 2017.

71f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior

Co-orientadora: Profª Drª Claudia Andrea Lima Cardoso

Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Insetos. 2. Vespidae. 3. Veneno de Hymenoptera. 4. Proteínas. 5. Hidrocarbonetos cuticulares. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

“ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CUTÍCULA E DO VENENO DE  
DUAS VESPAS SOCIAIS (HYMENOPTERA: VESPIDAE) POR CG-EM E  
MALDI-TOF/TOF”

Por

ANGÉLICA MENDONÇA

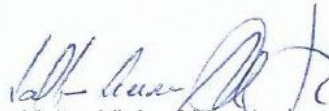
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
DOUTORA EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE  
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Dr. William Fernando Antonialli Junior  
Orientador/Presidente – UEMS



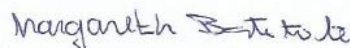
Dr.ª Erika Fernandes Neves  
Membro Titular – IFMS



Dr. Valter Vieira Alves Junior  
Membro Titular – UFGD



Dr.ª Jaqueline Ferreira Campos  
Membro Titular - UFGD



Dr.ª Margareth Batistote  
Membro Titular – UEMS

Aprovada em: 14 de dezembro de 2017.

## **Biografia do Acadêmico**

Angélica Mendonça, natural de Mundo Novo – Mato Grosso do Sul nascida aos 05 de outubro de 1990, filha de Sonia de Oliveira Mendonça e José Paulo Mendonça. Coursou todo o Ensino Fundamental (1997 a 2004) e o Ensino Médio (2005 a 2007) na Escola Estadual Marechal Rondon no município de Mundo Novo/MS.

Graduada em Ciências Biológicas – Licenciatura pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, Unidade de Mundo Novo de 2008 a 2011, na qual foi bolsista de iniciação científica pelo período de um ano (ago/2010 a jul/2011) desenvolvendo trabalho relacionado a ecologia de peixes, especificamente estrutura populacional de *Phalloceros harpagos*.

No mestrado desenvolveu projeto relacionado a composição de veneno de Hymenoptera utilizando a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR-PAS. Ao longo da pós-graduação também participou de trabalhos com veneno de formiga e com entomologia forense.

No doutorado teve a oportunidade de firmar parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV), na qual desenvolveu parte da tese de doutorado. Na tese continuou com a linha de veneno de vespa, porém com enfoque as proteínas pela técnica de MALDI-TOF/TOF e de compostos apolares da cutícula e do veneno de vespas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que tem feito em minha vida.

Agradeço aos meus pais, que mesmo não tendo a oportunidade de estudar sempre me ensinaram a importância do estudo em nossas vidas. Obrigada mesmo longe pela força que me deram nesses anos e por compreenderem minha ausência em muitos momentos, principalmente neste último ano que foi o mais difícil. Obrigada por acreditarem que eu seria capaz, fiz o máximo que pude para não decepcioná-los.

Obrigada as minhas irmãs Ana Paula e Aline por sempre se preocuparam comigo e por aguentarem meus desabafos quando precisei. Obrigada a toda minha família pela torcida em cada momento e cada conquista, não conseguiria chegar aqui sem a força de vocês.

Obrigada as minhas grandes amigas Rafaella e Ellen, pelas aventuras que vivemos nas coletas e em Viçosa-MG, e por todo aprendizado compartilhado. Obrigada pelo conselhos quando precisei e pelos momentos de descontração também.

Obrigada a minha irmãzinha científica Kamylla, por ter me socorrido nos últimos meses de correria e pela nossa parceria, aprendi muito com você.

Obrigada a mansão das garotinhas (Denise, Eva e Kamylla) por me acolherem de braços abertos, irei sentir muita falta de tudo, das nossas reuniõezinhas, nossos momentos de descontração, das nossas saidinhas sem planejar, e das nossas loucuras de vez enquanto rrsrsrs.

Obrigada a todos do LABECO, meus irmãos científicos, da até uma dorzinha no coração saber que não estarei mais com vocês para tomar aquele cafezinho na salinha, dos nossos almoços regados a muita risada, dos nossos momentos tensos nas reuniões e das nossas festinhas. Cada um tem um lugarzinho especial no meu coração, todos sem exceção jamais serão esquecidos, fazem parte agora da minha história.

Obrigada a minha prima Viviana por ter me incentivado a prestar a prova do mestrado e que conseqüentemente contribuiu para seguir no doutorado, por ter me acolhido quando vim para Dourados e por toda a ajuda e incentivo nestes anos.

Obrigada a minha grande amiga Ana Carla, pelo companheirismo, pelos conselhos, por aguentar meus desabafos e por acreditar em mim, sei que sempre posso contar com você e você sempre pode contar comigo.

Obrigada ao seu Vitinho, pela ajuda na coleta de *Apoica* e por sempre estar disposto a nos ajudar. O mundo precisa de mais pessoas assim.

Obrigada a Pollyanna por ter nos recebido de braços abertos em Viçosa-MG, e por tudo que nos ensinou. Sem você Polly este trabalho não seria possível.

Obrigada também ao prof Dr. José Eduardo Serrão por abrir as portas do seu laboratório e nos receber tão bem. Obrigada por ter aceitado esta parceria.

Obrigada ao meu orientador Dr William Fernando Antonialli-Junior por aceitar me orientar e por todos os ensinamentos, sei que posso ter te decepcionado em vários sentidos com o que esperava da minha tese, mas busquei fazer o que estava ao meu alcance.

Obrigada também a minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Claudia, por todos os ensinamentos.

Obrigada a UEMS pelo suporte técnico.

Obrigada a Pós graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da UFGD pela oportunidade de fazer parte deste programa.

Obrigada a FUNDECT pela concessão da bolsa de doutorado do Edital nº03/2014.

E obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram com esta tese.

Muito obrigada a todos!!!

“Ando devagar porque já tive pressa  
Levo esse sorriso porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei  
Eu nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs,  
O sabor das massas e das maçãs,  
É preciso amor pra poder pulsar,  
É preciso paz pra poder sorrir,  
É preciso a chuva para florir.

Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
Compreender a marcha e ir tocando em frente  
Como um velho boiadeiro levando a boiada  
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou  
Estrada eu sou.

Todo mundo ama um dia todo mundo chora,  
Um dia a gente chega, no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
De ser feliz.

Conhecer as manhas e as manhãs  
O sabor das massas e das maçãs  
É preciso amor pra poder pulsar,  
É preciso paz pra poder sorrir,  
É preciso a chuva para florir.

Ando devagar porque já tive pressa  
E levo esse sorriso porque já chorei demais  
Cada um de nós compõe a sua história,  
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
de ser feliz”

**Tocando em frente**  
(Renato Teixeira e Almir Sater)



## **Dedicatória**

Dedico esta tese aos meus pais  
Sonia e José Paulo, e as minhas  
irmãs Ana Paula e Aline.

## Sumário

Análise da composição química da cutícula e do veneno de duas vespas sociais (Hymenoptera: Vespidae) por CG-EM e MALDI-TOF/TOF .....	1
Resumo geral.....	1
Palavras-chave.....	1
General abstract.....	2
Keywords. ....	2
Introdução geral.....	2
Revisão bibliográfica.....	5
<i>Vespas sociais</i> .....	5
<i>Hidrocarbonetos cuticulares - HCs</i> .....	7
<i>Veneno de Hymenoptera sociais</i> .....	10
Objetivo geral.....	12
Hipóteses.....	12
Referências Bibliográficas .....	13
Capítulo I: Variação na composição química de compostos não-polares do veneno e cutícula de <i>Apoica pallens</i> e <i>Polistes versicolor</i> .....	23
Resumo. ....	24
Palavras-chave.....	24
Abstract.....	24
Keywords .....	25
Introdução .....	25
Material e métodos .....	26
<i>Coleta das amostras e extração dos compostos cuticulares e compostos não-polares do veneno</i> .....	26
<i>Análise das amostras por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)</i> .....	28
Resultados .....	28
Discussão .....	33
Conclusão.....	36
Agradecimentos.....	36
Contribuição dos autores .....	36
Conflitos de interesses .....	36
Referências.....	37
Capítulo II: Proteômica do veneno de <i>Apoica pallens</i> (Hymenoptera: Vespidae) .....	44

Resumo .....	45
Palavras chave .....	45
Abstract .....	46
Keywords .....	46
1. Introdução .....	46
2. Material e métodos .....	48
2.1. <i>Coleta e preparação das amostras</i> .....	48
2.2. <i>Eletroforese bidimensional em gel</i> .....	49
2.3. <i>Obtenção e análise das imagens</i> .....	51
2.4. <i>Digestão das amostras</i> .....	51
2.5. <i>Análises de espectrometria de massas maldi-tof/tof</i> .....	51
2.6. <i>Identificação das proteínas</i> .....	52
3. Resultados .....	53
4. Discussão .....	60
5. Conclusão .....	64
6. Referências .....	65
Considerações finais .....	71

# ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CUTÍCULA E DO VENENO DE DUAS VESPAS SOCIAIS (HYMENOPTERA: VESPIDAE) POR CG-EM E MALDI-TOF/TOF

\* Formatação nas normas da ABNT 6023.

## Resumo Geral

A coesão das colônias de insetos sociais é mantida por interações entre seus membros mediadas por compostos químicos, sobretudo, por aqueles presentes em sua cutícula. Estes compostos são denominados de hidrocarbonetos cuticulares e atuam primariamente como um revestimento protetor evitando a perda de água, contudo, também atuam como sinais trocados durante as interações entre companheiros de ninhos. Estes compostos então, funcionam como uma assinatura química colonial, podendo até mesmo variar entre indivíduos em função das tarefas que executam em suas colônias. Insetos sociais também produzem outros compostos químicos que têm como função a manutenção de suas colônias agindo na captura de presas e defesa. O veneno produzido pelo aparelho ferroador que é composto por amins biologicamente ativas (serotonina e histamina), proteínas, peptídeos, lipídeos, enzimas (fosfolipases, hialuronidases e fosfatases) e alérgenos. Além de compostos voláteis que basicamente são alcanos, alcanos ramificados, alcenos e álcoois, os quais também podem desempenhar papel importante como sinais trocados durante as interações entre companheiras de ninho. Evolutivamente estes compostos surgiram para possibilitar a captura de presas e depois foram aproveitados para o uso em repelir ataques à colônia. Nossos resultados de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) revelam que tanto o perfil químico cuticular quanto a porção apolar do veneno das espécies *Apoica pallens* e *Polistes versicolor* variam qualitativamente e quantitativamente entre cutícula e veneno, com predominância em abundância e número dos alcanos ramificados. Na cutícula ocorre maior concentração (em teor e número) de compostos pesados que possivelmente atuam como feromônios de superfície. No veneno os compostos mais leves foram os mais abundantes tanto em teor quanto em número de compostos, sugerindo que no veneno, nestas espécies, ao menos a parte apolar possa estar envolvida na sinalização durante as interações entre companheiras de ninhos. Pela análise da proteômica do veneno da vespa *A. pallens* foram identificadas 30 proteínas pelo método MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization time-of-flight) que de acordo com suas respectivas funções foram divididas em 8 categorias: alergênicas, enzimáticas, metabólicas, estruturais, de resposta ambiental, atuantes no DNA e RNA, proteoglicana e com função desconhecida. A identificação destes compostos é um primeiro passo para o estudo deles para o uso farmacológico aplicado.

**Palavras-chave:** aparelho ferroador, comunicação química, himenópteros sociais, hidrocarbonetos cuticulares, compostos apolares, proteínas.

# ANALYSIS OF CHEMICAL COMPOSITION OF CUTICLE AND VENOM OF TWO SOCIAL WASPS (HYMENOPTERA: VESPIDAE) BY GC/MS AND MALDI-TOF/TOF

**General Abstract:** The cohesion of social insect colonies is maintained by interactions between their members mediated by chemical compounds, especially those present on their cuticle. These compounds are called cuticular hydrocarbons and act primarily as a protective coating preventing water loss, however, also act as signals exchanged during interactions between nestmates. Thus, these compounds act as a chemical signature, and can even vary between individuals depending on the tasks they perform in their colonies. Social insects also produce other chemical compounds that contribute to colony maintenance by acting in prey capture and defense. Venoms produced by the sting apparatus that consist of biologically active amines (serotonin and histamine), proteins, peptides, lipids, enzymes (phospholipases, hyaluronidases and phosphatases) and allergens. In addition to volatile compounds that are basically alkanes, branched alkanes, alkenes and alcohols, which can also play an important role as signals exchanged during interactions between nestmates. Evolutionarily, these compounds have arisen to enable prey capture and later were used for repelling attacks on the colony. Our results assessed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) show that both the chemical profile of the cuticle and the nonpolar portion of venom of the species *Apoica pallens* and *Polistes versicolor* vary qualitatively and quantitatively between cuticle and venom, with predominance in abundance and number of branched alkanes. In the cuticle, there is higher concentration (in content and number) of heavy compounds that might act as superficial pheromones. In the venom lighter compounds were the most abundant both in content and in number of compounds, suggesting that the venom, in these species, at least the nonpolar portion might be involved in signaling during interactions between nestmates. By proteomic analysis of the venom of *A. pallens*, 30 proteins were identified by MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight), which according to their respective functions were divided into 8 categories: allergenic, enzymatic, metabolic, structural, environmental response, active in DNA and RNA, proteoglycan and with unknown function. The identification of these compounds is a first step towards their study for applied pharmacological use.

**Keywords:** sting apparatus, chemical communication, social Hymenoptera, cuticular hydrocarbons, nonpolar compounds, proteins.

## INTRODUÇÃO GERAL

A coesão das colônias de insetos sociais são mantidas por interações entre seus membros (GORDON, 1996; O'DONNELL & BULOVA, 2007), de forma que, em colônias de insetos sociais há uma organização, na qual ocorre divisão de trabalho bem estabelecida (SMITH et al., 2008), formada por casta reprodutora e operárias estéreis (GORDON, 1996).

Para que a divisão de trabalho dentro da colônia seja eficiente, estes insetos desenvolveram ao longo da evolução um complexo sistema de comunicação, sendo capazes de sintetizar substâncias químicas, chamadas de ferômonios que permitem mediar as interações entre companheiras da colônia (IZZO et al., 2010; KHIDR et al., 2013).

Dentre os feromônios destacam-se: o feromônio sexual utilizado para atrair parceiros durante a cópula; o feromônio de alarme, que informa a aproximação de um potencial inimigo; feromônio de defesa que serve para avisar as companheiras de ninho que devem atacar o intruso; feromônio de agregação que atrai os membros da colônia para uma fonte de alimento ou novo local para nidificação e o feromônio de trilha para demarcar o caminho até uma fonte de alimento (BILLEN & MORGAN, 1998).

Nas colônias o reconhecimento das castas ocorre por meio de um complexo feromonal denominado hidrocarbonetos cuticulares. Os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) como a própria denominação sugere, estão presentes na cutícula dos insetos, sendo sua função primária evitar a perda de água e atuar como um revestimento protetor para os insetos (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010).

Outra função importante destes compostos é atuar como feromônio de contato ou de superfície (ABDALLA et al., 2003; GINZEL, 2010; NEVES et al., 2012; OLANIRAN et al., 2013; BELLO et al., 2015). Esses feromônios de superfície são compostos formados basicamente por hidrocarbonetos, especialmente alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos (DEVIGNE & BISEAU, 2012; OLANIRAN et al., 2013).

De acordo com Blomquist & Bagnères (2010) compostos abaixo de C<sub>20</sub> são voláteis e portanto, podem atuar como sinais emitidos e recebidos a certa distância; enquanto que aqueles com peso molecular acima disto podem atuar como feromônio de superfície (LORENZI et al., 1996).

Os alcanos ramificados parecem estar mais envolvidos com a sinalização durante as interações intraespecíficas (LOMMELEN et al., 2006). Dani et al. (2001) e Lorenzi et al. (2011) destacam em seus estudos a função comunicativa destes compostos, já que esta classe apresenta uma alta complexidade molecular, exibindo um elevado potencial para codificar informações (LECONTE & HEFETZ, 2008; BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010). Desta forma, os alcanos ramificados são considerados por muitos autores a principal classe mediadora das interações químicas entre companheiros de ninho (DANI et al., 1996; LORENZI et al., 1997; MURAKAMI et al., 2015).

Os alcenos, apesar de ocorrerem em menores proporções que os outros compostos, também parecem estar relacionados com a troca de sinais durante a comunicação química (GIBBS, 2002; MENZEL et al., 2017).

Em contrapartida, os alcanos lineares parecem estar envolvidos na construção de uma barreira para evitar a perda de água (ARMOLD & REGNIER, 1975; MENZEL et al., 2017), ou seja, a impermeabilidade da cutícula. Contudo, Tannure-Nascimento et al. (2007) em seu estudo com *Polistes satan* (Bequaert, 1940) identificaram maior abundância de alcanos

lineares na cutícula desta vespa, sugerindo que estes compostos também tenham importância como sinais para mediar interações entre as companheiras de ninho.

As funções desempenhadas por estas diferentes classes de compostos também podem estar relacionadas com o comprimento e viscosidade da cadeia, como foi relatado por Menzel et al. (2017) que quanto maior a viscosidade, maior a impermeabilidade propiciada a cutícula, limitando a função do hidrocarboneto como sinal de comunicação. Deste modo, os HCs são moldados por restrições fisiológicas e pressões de seleção devido à sua dupla função: impermeabilização e mediadores de comunicação intra e interespecífica (MENZEL et al., 2017).

Outros compostos sintetizados pelos Hymenoptera e também importante para manutenção das colônias são os venenos, uma vez que o aparelho opositor dos Aculeata foi modificado para injetar veneno, com a função primária de imobilizar presas e posteriormente se tornou um meio para defesa de suas colônias (GRIMALDI & ENGEL, 2005).

Em espécies solitárias e parasitárias, o veneno é usado para imobilizar ou matar presas e preservá-las como alimento armazenado para os imaturo. Em espécies sociais, o veneno é frequentemente utilizado como parte de uma defesa imune externa tanto na cutícula quanto na superfície do ninho (BARACCHI & TRAGUST, 2017).

Além disto, Bruschini et al. (2006a) encontraram feromônios na porção volátil do veneno de *Polistes dominula* que desempenham papel comunicativo ao induzir o comportamento de alarme nas colônias desta espécie. Estudos comportamentais com extratos de veneno também revelaram que as vespas *P. dominula* são estimuladas com maior intensidade pelo veneno das operárias do que das fundadoras (BRUSCHINI et al., 2008). Além disso, Post & Jeanne (1984) avaliaram o potencial de ação sexual, como atrativo de machos, no componente volátil do veneno de fêmeas de *Polistes*. Desta forma, o estudo dos componentes voláteis do veneno também são importantes para se compreender melhor que tipo de compostos são utilizados durante as trocas de sinais entre coespecíficos em colônias de vespas sociais.

No veneno é possível distinguir pelo menos três grupos diferentes de substâncias químicas de acordo com seu peso molecular. O primeiro grupo dos compostos são relativamente mais pesados (superior a 10 kDa) e consistem em proteínas, incluindo várias enzimas, como fosfolipases (responsáveis pela clivagem dos fosfolípidios da membrana), as hialuronidases (que degradam o componente da matriz do ácido hialurônico), as fosfatases ácidas (atuando sobre fosfatos orgânicos) e esfingomielinases (envolvidas nas reações do metabolismo dos esfingolipídeos). O segundo grupo de peso molecular intermediário (em torno e inferior a 10 kDa), é representado por uma fração peptídica, incluindo vários

compostos citolíticos e neurotóxicos. O terceiro grupo é composto por substâncias de baixa massa molecular, como íons, aminoácidos livres, aminas biogênicas (comumente histamina, serotonina, dopamina e noradrenalina), neurotransmissores, poliaminas, compostos heterocíclicos e alcaloides (PIEK, 1986; KUHN-NENTWIG, 2003).

Entretanto, apesar do exposto acima, são necessários mais estudos para compreender a relação dos compostos químicos produzidos pelas vespas sociais como sinais trocados durante as interações e identificar os compostos do veneno para futuras aplicações farmacológicas. Assim, é importante destacar que o estudo da subfamília Polistinae, a qual pertence *Apoica pallens* (Fabricius, 1804) e *Polistes versicolor* (Olivier, 1791), se faz relevante, pois abrange espécies de extrema importância para o entendimento da evolução do comportamento social em vespas, uma vez que essa subfamília é considerada um marco entre a transição de espécies solitárias e altamente eussociais (PARDI, 1996). Portanto este estudo irá contribuir para enriquecer o conhecimento sobre aspectos biológicos ou até mesmo evolutivos da subfamília, visto a importância do veneno nesse processo.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### ***Vespas sociais***

Os Hymenoptera se destacam pela grande riqueza de espécies, extraordinária diversidade de modos de vida como a fitofagia, predação, parasitismo e indução de galhas, e desde o comportamento solitário até a eussocialidade verdadeira, com formação de sociedades complexas nas quais há distinção morfológica entre as castas e divisão de trabalho reprodutivo (NIEVES-ALDREY & FONTAL-CAZALLA, 1999).

A ordem Hymenoptera é dividida em duas subordens: Symphyta e Apocrita, o Symphyta têm abdome sésil, trocanter dítroco, asas com nervação complexa, ovipositor serreado, larvas eruciformes e fitófagas; enquanto que os Apocrita possuem abdome livre ou pedunculado, trocanter simples ou dítroco, nervação simples, ovipositor estiliforme e larvas ápodas (GALLO et al., 2002; TRIPLEHORN & JONNISON, 2011; RAFAEL et al., 2012). Além disso, a subordem Apocrita é dividida em dois grupos Parasítica e Aculeata (GRIMALDI & ENGEL, 2005; SHARKEY, 2007; RAFAEL et al., 2012).

Os Aculeata são um grupo cuja principal característica que os difere dos demais Hymenoptera é a modificação do ovipositor das fêmeas em um aparelho que injeta veneno (MACLINTAL & STARR, 1996). O aparelho ferroador é formado por duas partes funcionalmente diferentes: a porção glandular, onde o veneno e outras substâncias são produzidos, e a porção motora, onde estruturas quitinosas e musculares atuam conjuntamente



na protrusão/extrusão do ferrão, ejetando o veneno (SILVA & NOLL, 2006). Sua função primitiva é a captura da presa, porém se tornou um eficiente meio de intimidação para inimigos grandes adquirindo importante função de defesa, principalmente nas espécies sociais (GRIMALDI & ENGEL, 2005).

Dentro de Aculeata temos a família Vespidae que é dividida em seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Vespinae e Polistinae, sendo que as três primeiras são compostas por espécies solitárias e apenas nas três últimas encontram-se as espécies eussociais (RAFAEL et al., 2012).

As vespas sociais Polistinae podem estabelecer suas colônias por fundação independente como as Polistini, Mischocyttarini e alguns Ropalidiini ou por enxameamento, como é a maioria dos Ropalidiini e Epiponini (WENZEL, 1998; CARPENTER & MARQUES, 2001).

Vespas da subfamília Polistinae constroem seus ninhos de maneiras diversas, variando desde um único favo descoberto, com cerca de 5 cm de diâmetro e poucas dezenas de células, até ninhos com mais de 50 cm de comprimento. Suas colônias podem permanecer ativas por muitos anos, com várias camadas de células de cria sobrepostas abrigando milhões de células e envoltos por um invólucro (CARPENTER & MARQUES, 2001; SOUZA & ZANUNCIO, 2012).

Os ninhos podem ser constituídos com fibras vegetais e tricomas de plantas, que são macerados e misturados com água e, em alguns casos, com secreção glandular e barro (JEANNE, 1975; WENZEL, 1998). Por este motivo essas vespas também são conhecidas popularmente como vespas papel.

*Polistes versicolor* (Olivier, 1791) é uma espécie de fundação independente apresentando hábito diurno. Constroem seus ninhos com um único favo fixado ao substrato por um pedúnculo, formando sociedades com um baixo número de indivíduos, os quais são subordinados a uma rainha (Figura 1). Estas vespas são muito comuns em áreas urbanas, sendo abundantes na América do Sul, estando presentes desde a Costa Rica até o sul do Brasil e Argentina (RICHARDS, 1978).

*Apoica pallens* (Fabricius, 1804) é uma espécie enxameante de hábito noturno e por conta disto, apresentam grandes olhos e ocelos, indicando uma adaptação específica para a visão no escuro (SCHREMMER, 1972). Alguns autores defendem a hipótese de que o hábito noturno evoluiu para reduzir a competição por recurso com as outras espécies diurnas; assim como também a predação, devido a ausência de envelope protetor no ninho (RICHARDS, 1978; PICKETT & WENZEL, 2007).

Esta espécie é encontrada desde o México até o nordeste da Argentina (RICHARDS, 1978) e contém centenas a milhares de indivíduos. Estes insetos são conhecidos popularmente como “marimbondo chapéu” ou “vespa chuvaireiro” pelo formato do seu ninho (Figura 2), os quais são de um único favo descoberto e construído diretamente no substrato com ausência de pedúnculo (WENZEL, 1998).



Fonte: Batista, N. R.



Fonte: Batista, N. R.

**Figura 1.** Colônias de *Polistes versicolor* mostrando o aspecto do ninho destas vespas.



Fonte: Júnior, D.



Fonte: [https://www.com/hymenoptera\\_apoica\\_pallens](https://www.com/hymenoptera_apoica_pallens)

**Figura 2.** Colônias de *Apoica pallens* mostrando o aspecto de “chuveiro ou chapéu” que os ninhos possuem, do qual surgiu o seu nome popular.

### ***Hidrocarbonetos cuticulares - HCs***

Wigglesworth (1933) descreveu uma substância cerosa nas camadas superiores da cutícula dos insetos que ele chamou de "cuticulina". Chibnall et al. (1934) e Blount et al.

(1937) sugeriram a presença de hidrocarbonetos nesta camada cerosa e, posteriormente Baker et al. (1963) avaliaram que os hidrocarbonetos desta camada, poderia estar atrelada a evitar a dessecação, característica fundamental para o sucesso evolutivo deste grupo.

A primeira análise química relativamente completa dos hidrocarbonetos da cutícula foi da barata americana *Periplaneta americana* (BAKER et al., 1963) que ocorreu após o desenvolvimento da cromatografia gás-líquido (CGL). Os três principais componentes dos hidrocarbonetos deste inseto (n-pentacosano, 3-metilpentacosano e (Z, Z) -6,9-heptacosadieno) e representam as três principais classes de hidrocarbonetos em insetos, alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos.

Em geral, a composição de hidrocarbonetos dos insetos é muito complexa sendo que o desenvolvimento e aplicação combinada de cromatografia gás-líquido e espectrometria de massa foi fundamental para a análise rápida e eficiente destes compostos (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010). No final da década de 1960 foi estabelecida a análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) de hidrocarbonetos de insetos (NELSON & SUKKESTAD, 1970; MARTIN & MACCONNELL, 1970) e, posteriormente, analisaram-se os hidrocarbonetos de centenas de espécies de insetos, primeiro em colunas embaladas e, em seguida, muito mais eficientemente em colunas capilares.

Blomquist & Bagnères (2010) relatam que para muitas espécies de insetos, existem misturas muito complexas de componentes normais (de cadeia linear), metil ramificados e insaturados, com comprimentos de cadeia variando de 21 a 50 ou mais carbonos. Devido a ocorrência de misturas extremamente complexas de componentes sugeriu-se que hidrocarbonetos poderiam desempenhar papéis importantes na comunicação química, mas somente após o reconhecimento do número e da variedade de papéis que eles desempenham (BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010).

Carlson et al. (1971) demonstraram pela primeira vez o papel dos hidrocarbonetos na comunicação química quando mostraram que um componente (Z-9-tricoseno) dos hidrocarbonetos da fêmea da mosca doméstica *Musca domestica* atraiu os machos a um curto alcance.

No final da década de 1990, a noção que os hidrocarbonetos cuticulares atuam como sinais de reconhecimento foi apoiado por alguns estudos (SINGER, 1998; VANDER MEER & MOREL, 1998; LENOIR et al., 1999).

Desta forma, a mistura de hidrocarbonetos presentes na cutícula parece constituir os compostos essenciais que servem como sinais de reconhecimento destes insetos (HOWARD & BLOMQUIST, 2005). Portanto, essa capacidade de reconhecimento das companheiras de

ninho é de extrema importância para o sucesso dos insetos sociais, prevenindo a exploração por indivíduos de outras colônias (HEFETZ, 2007).

A importância diferencial das classes estruturais de alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos também pode diferir entre as espécies, como evidenciado nos estudos de Dani et al., (1996) e Lorenzi et al., (2014) que dentre os compostos químicos cuticulares, os alcanos ramificados são os principais responsáveis por sinalizar as interações intraespecíficas. Contudo, embora têm se atribuído aos alcanos lineares maior envolvimento na função de evitar dessecação (ARMOLD & REGNIER, 1975; MENZEL et al., 2017) e menor envolvimento na sinalização para reconhecimento de coespecíficos (VAN ZWEDEN & D'ETTORRE, 2010), há alguns estudos que mostram que estes compostos podem também estarem envolvidos nesta função (TANNURE-NASCIMENTO et al., 2007; BRITO et al. 2017). Isto pode ser atribuído em parte ao fato de que os alcanos lineares possuem apenas o comprimento da cadeia de átomos de carbono como característica discriminativa, enquanto que os hidrocarbonetos metil-ramificados e insaturados também possuem a posição do grupo metilo ou a ligação dupla (CHÂLINE et al., 2005).

Independentemente da função destes compostos, foi demonstrado em vários estudos que eles variam por conta de fatores genéticos (KLAHN & GAMBOA, 1983; DAPPORTO et al., 2004a; DAPPORTO et al., 2004b; HOWARD & BLOMQUIST, 2005) e também ambientais (DAPPORTO et al., 2004a; DAPPORTO et al., 2004b; COTONESCHI et al., 2007), podendo por estes motivos variar de acordo com a espécie (BUTTS et al., 1991; ANTONIALLI-JUNIOR et al., 2008; FERREIRA et al., 2012; SANTOS & NASCIMENTO, 2015), castas (NUNES et al., 2009; FERREIRA-CALIMAN et al., 2013), sexo (TRABALON et al., 1992; CARLSON et al., 2001; FERREIRA-CALIMAN et al., 2013) e mesmo a idade do indivíduo (BLOMQUIST et al., 1998; LENOIR et al., 1999; ABDALLA et al., 2003; BISEAU et al., 2004; ANTONIALLI-JUNIOR et al., 2007; NUNES et al., 2009, ZHU et al., 2006; XU et al., 2014). Portanto, estes compostos, em conjunto, formam uma espécie de assinatura química específica da colônia em insetos sociais.

Além disto, por serem considerados estáveis, por conta de sua estrutura química, os HCs podem ser usados como ferramenta complementar para traçar relações taxonomicas entre espécies e mesmo estabelecer relações entre populações da mesma espécie (ROUX et al., 2006; BAGNERES & WICKER-THOMAS, 2010; KATHER & MARTIN, 2012).

Apesar dos HCs de insetos sociais serem investigados a um bom tempo, há relativamente poucos estudos que já avaliaram a composição destes compostos em vespas sociais neotropicais.

### *Veneno de Hymenoptera sociais*

O veneno é definido como uma secreção produzida por glândulas especializadas que quando injetada num organismo alvo, é capaz de alterar ou interromper processos biológicos ou fisiológicos normais (CASEWELL et al., 2013).

Vários organismos venenosos, como répteis, peixes, anfíbios, mamíferos, estrelas-do-mar, ouriços-do-mar, caracóis de cone, nemertines, aracnídeos, insetos, miriápodes e alguns cnidários são alvo de numerosos estudos em toxinologia para avaliação de seu potencial biotecnológico e terapêutico (CALVETE et al., 2009).

Logo após os estudos com veneno da serpente *Bothrops jararaca* e a identificação do peptídeo potenciador da bradicinina, utilizado para desenvolver o primeiro inibidor comercial para o tratamento da hipertensão renovascular, outros compostos de veneno foram investigados como fontes naturais de produtos farmacêuticos mais específicos/eficientes (CHARPIN et al., 1992; VETTER et al., 1999).

No caso da ordem Hymenoptera, estes insetos tiveram uma evolução do ovipositor em aparelho ferroador, o qual é capaz de injetar o veneno em organismos alvos. Baek & Lee (2010) avaliaram que no veneno das vespas solitárias *Eumenes pomiformis* e *Orancistrocerus drewseni* há várias proteínas e antioxidantes relacionados à resposta imune, e estes autores sugerem que as vespas solitárias usam o veneno para manter suas presas frescas e protegê-las da invasão de microorganismos e estresses fisiológicos.

Já no caso dos himenópteros sociais, o desenvolvimento de um mecanismo que auxiliasse na captura de presas e também na capacidade de defender suas colônias, foi uma peça chave para o sucesso evolutivo destes insetos (WILSON, 1971). Desta forma, o veneno dos Hymenoptera sociais (vespas, abelhas e formigas) é uma importante arma defensiva, de forma que a caracterização bioquímica do veneno de Hymenoptera tornou-se o foco de muitas pesquisas na área de alergia e imunologia, em que a abordagem proteômica tem sido uma excelente alternativa para auxiliar o desenvolvimento de extratos mais específicos para diagnóstico e tratamento de pacientes hipersensíveis (SANTOS et al., 2011).

No veneno dos Hymenoptera sociais há uma complexa mistura de diversos componentes. As aminas biologicamente ativas, principalmente serotonina e histamina, são responsáveis pela dor, vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos, facilitando a penetração das toxinas no tecido (OLIVEIRA et al., 1999; BANKS & SHIPOLINI, 2017), além de possuir compostos voláteis, pequenos peptídeos, proteínas de alto peso molecular, toxinas, lipídios, enzimas (fosfolipases, hialuronidases e fosfatases) e alérgenos (LIMA & BROCHETTO-BRAGA, 2003; MONTEIRO et al., 2009; CZAIKOSKI et al., 2010).

Quando comparamos as composições dos venenos dos himenópteros sociais observamos que os venenos de abelhas e vespas sociais são compostos principalmente por proteínas e enzimas, já as formigas possuem maior quantidade de componentes alcalóides em seu veneno (FITZGERALD & FLOOD, 2006). No entanto, em geral, os venenos da vespa de papel contêm fosfolipases, antígeno 5, hialuronidase e serinoproteinases (SANTOS et al., 2011).

De acordo com a revisão de Santos et al. (2011), um dos primeiros estudos envolvendo técnicas mais sofisticadas para o estudo do veneno de Hymenoptera foi realizado no início dos anos 80. Este estudo mostrou a complexidade de muitos venenos de Hymenoptera sociais como de *Apis mellifera*, *Polistes fuscatus*, *P. apachus*, *P. metricus*, *P. exclamans*, *P. annularis*, *Vespula flavopilosa*, *V. Squamosa*, *V. sulphurea*, *Dolichovespula maculata* e *Vespa cabro* (WOOD & HOFFMAN, 1983). Essas descobertas pioneiras caracterizaram o primeiro perfil de proteína de veneno de Hymenoptera por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio bidimensional (2D SDS-PAGE) na literatura global (SANTOS et al., 2011).

A proteômica envolve a identificação de proteínas expressas por um genoma, também a determinação do seus papéis nas funções fisiológicas e fisiopatológicas. Os estudos proteômicos representam apenas um subconjunto de todos os produtos genéticos possíveis, uma vez que a máquina genética de organismos produz diferentes moléculas dependendo dos genes que serão ativados ou inibidos em um determinado momento da vida de um organismo (APWEILER et al., 2009).

O veneno do inseto melhor caracterizado é o de *Apis mellifera* (WOOD & HOFFMAN, 1983; LIMA & BROCHETTO-BRAGA, 2003; PEIREN et al., 2005; FRANCESE et al., 2009; GEORGIEVA et al., 2010; SCIANI et al., 2010; BRIGATTE et al., 2011), entretanto, outras pesquisas importantes envolveram a análise proteômica, por exemplo, do veneno da vespa *Polybia paulista* (SANTOS et al., 2010) que contribuiu como passo inicial para o estudo recente de Leite et al. (2015), no qual avaliaram que o peptídeo do veneno desta espécie, após isolado, apresentou atividade anticarcinogênica. Assim, a caracterização bioquímica de venenos de vespa com base na identificação de proteína pode fornecer uma base extensiva para entender seus mecanismos biológicos, que é um pré-requisito importante para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Por outro lado, alguns estudos também já avaliaram os compostos voláteis do veneno de vespas (*Polybioides raphigastra*, *Polistes dominula*, *Polybia occidentalis*, *P. sericea*, *Protopolybia exigua*) e detectaram alcanos lineares, alcanos ramificados, alcenos e álcoois (SLEDGE et al., 1999; DANI et al., 2000; BRUSCHINI et al., 2006a, SILVA et al., 2016)

que poderiam estar envolvidos na troca de sinais químicos durante as interações entre companheiras de ninho. De fato, experimentos comportamentais demonstram que a secreção de glândulas de veneno em *Polybioides raphigastra* provoca respostas de alarme e ataque nos indivíduos da colônia (SLEDGE et al., 1999).

Dessa forma, os compostos voláteis podem exercer um papel importante quanto à sinalização e resposta de defesa da colônia, sendo uma resposta coletiva que conseqüentemente atua como feromônios de alarme desencadeando ataques e recrutando as companheiras do ninho (ISHAY et al., 1965; JEANNE, 1981; POST et al., 1984; VEITH et al., 1984; KOJIMA, 1994; SLEDGE et al., 1999; DANI et al., 2000; BRUSCHINI et al., 2006a, 2006b, 2008).

Além disso, vários estudos, considerando também outros organismos, mostram que a composição do veneno pode variar de acordo com fatores genéticos e ambientais (DALTRY et al., 1997; BADHE et al., 2006; ABDEL-RAHMAN et al., 2009). Neste sentido, dentro de um mesmo grupo a composição pode variar de acordo com a espécie (ORIVEL & DEJEAN, 2001; MENDONÇA et al., 2017), entre populações da mesma espécie e entre indivíduos da mesma espécie (ABDEL-RAHMAN, 2008; ABDEL-RAHMAN et al., 2009; BERNARDI et al., 2017; MENDONÇA et al., 2017), e mesmo de acordo com as castas e a idade (DALTRY et al., 1997; BADHE et al., 2006; ABDEL-RAHAMAN et al., 2009).

Assim, os componentes voláteis do veneno são semelhantes quimicamente e podem variar entre as espécies apenas nas suas proporções relativas (POST & JEANNE, 1984), de forma que ao menos parte dos compostos apolares possam estar envolvida em algum tipo de sinalização química.

## **OBJETIVO GERAL**

Investigar os compostos químicos do veneno e da cutícula de duas espécies de vespas Polistinae.

## **HIPÓTESES**

- Há uma variação qualitativa e quantitativa na composição do perfil químico cuticular e da porção apolar do veneno das vespas *Apoica pallens* e *Polistes versicolor*.

- Como cada espécie possui especificidade em seu veneno, provavelmente *Apoica pallens* também possuirá um perfil do veneno específico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F. C.; JONES, G. R.; MORGAN, E. D.; CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier. 1836 (Hymenoptera. Meliponini) workers and queens. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p. 191-199, 2003.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.. Intraspecific diversity of scorpions venom and its implication in the pathophysiological effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 191-192, 2008.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; OMRAN, M. A. A.; ABDEL-NABI, I. M.; UEDA, H.; MCVEAN, A. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. **Toxicon**, v.53, p. 349–359, 2009.
- ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens. workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera. Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 3, p. 492-499, 2007.
- ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; SÚAREZ, Y. R.; IZIDA, T.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M. Intra-and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 559-566, 2008.
- APWEILER, R.; ASLANIDIS, C.; DEUFEL, T.; GERSTNER, A.; HANSEN, J; HOCHSTRASSER, D; et al.,. Approaching clinical proteomics: current state and future fields of application in cellular proteomics. **Cytometry A**, v. 75, n. 10, p. 816-32, 2009.
- ARMOLD. M. T., REGNIER. F. E. Stimulation of hydrocarbon biosynthesis by ecdysterone in the flesh fly *Sarcophaga bullata*. **Journal of insect physiology**, v. 21, n. 9, p. 1581-1586, 1975.
- BADHE, R. V.; THOMAS, A. B.; HARER, S. L.; DESHPANDE, A. D.; SALVI, N., WAGHMARE, A. Intraspecific variation in protein of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, Coconsis, Pocock) venoms from Western and Southern India. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.4, p. 612–619, 2006.
- BAEK, J. H.; LEE, S. H. Identification and characterization of venom proteins of two solitary wasps, *Eumenes pomiformis* and *Orancistrocerus drewseni*. **Toxicon**, v. 56, n. 4, p. 554-62, 2010.
- BAGNERES, A.G.; WICKER-THOMAS, C. Site of synthesis, mechanism of trans- port and selective deposition of hydrocarbons. In: Blomquist, G.J., Bagneres,A.G. (Eds.), **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology**. Cambridge University Press, New York, pp. 75–99, 2010.
- BAKER, G. L.; VROMAN, H. E.; PADMORE, J. Hydrocarbons of the American cockroach. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 13, 360–365, 1963.
- BANKS, B. E. C.; SHIPOLINI, R. A. Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. In Piek, T (ed.) **Venoms of the Hymenoptera**, Academic Press; London; pp 330-416, 1986.



BARACCHI, D.; TRAGUST, S. Venom as a component of external immune defense in Hymenoptera. In: Gopalakrishnakone, P. e Malhotra, A. (Eds.), **Evolution of venomous animals and their toxins**, Springer. Cap 11, pp.213-233, 2017.

BELLO, J. E.; MCELFFRESH, J. S.; MILLAR, J. G. Isolation and determination of absolute configurations of insect-produced methyl-branched hydrocarbons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 4, p. 1077-1082, 2015.

BERNARDI, R. C.; FIRMINO, E. L. B.; MENDONÇA, A.; SGUARIZI-ANTONIO, D.; PEREIRA, M. C.; ANDRADE, L. H. C.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum* Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology** 175: 200–206, 2017.

BILLEN, J.; MORGAN, E. DPheromone communication in social insects: sources and secretions. Cap. 1, 3-33. In: Meer, R. K. V.; Breed, M. D.; Espelie, K. E.; Winston, M. L. **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Westview Press, 388p., 1998.

BISEAU, J.C.; PASSERA, L.; DALOZE, D.; ARON, S. Ovarian activity correlates with extreme changes in cuticular hydrocarbon profile in the highly polygynous ant. *Linepithema humile*. **Journal of insect physiology**, v. 50, p. 585-593, 2004.

BLOMQUIST, G. J.; TILLMAN, J. A.; MPURU, S.; SEYBOLD, S. J. The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure. function. and biochemistry. VANDER MEER, R. K.; BREED, M. D.; WINSTON, M. L.; ESPELIE. K. E. (Eds.). In: **Pheromone communication in social insect** Westview Press. Boulder, pp. 35-54. 1998.

BLOMQUIST, G. J. & BAGNÈRES, A.G. 2010. Introduction: history and overview of insect hydrocarbons. In: *Insect hydrocarbons: biology. biochemistry and chemical ecology* (BLOMQUIST. G. & BAGNÈRES. A.G.) Cambridge: Cambridge University Press. Cap.1, 3-18.

BLOUNT, B. K.; CHIBNALL, A. C.; EL MANGOURI, H. A. The wax of the white pine chermes. **Biochemical Journal**, v. 31, p. 1375–1378, 1937.

BRIGATTE, P.; CURY, Y.; SOUZA, B. M.; BAPTISTA-SAIDEMBERG, N. B.; SAIDEMBERG, D. M.; GUTIERREZ, V. P.; et al. Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of the *Apis mellifera* and neotropical social wasps *Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae*. **Amino Acids**, v. 40, n.1, p. 101-111, 2011.

BRITO, J. H.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; MONTAGNA, T. S.; MENDONÇA, A.; SGUARIZI-ANTONIO, D.; SÚAREZ, Y. R.; CARDOSO, C. A. Linear alkanes and reproductive status of *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae) females in winter aggregates. **Sociobiology**, v. 64, n. 3, 2017.

BRUSCHINI, C.; CERVO, R.; TURILLAZZI, S. Evidence of alarm pheromones in the venom of *Polistes dominulus* workers (Hymenoptera: Vespidae). **Physiological Entomology**, v. 31, n. 3, p. 286-293, 2006a.

BRUSCHINI, C.; DANI, F. R.; PIERACCINI, G.; GUARNA, F.; TURILLAZZI, S. Volatiles from the venom of five species of paper wasps (*Polistes dominulus*, *P. gallicus*, *P. nimphus*, *P. sulcifer* and *P. olivaceus*). **Toxicon**, v. 47, n. 7, p. 812-825, 2006b.

BRUSCHINI, C.; CERVO, R.; PROTTI, I.; TURILLAZZI, S. Caste differences in venom volatiles and their effect on alarm behaviour in the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ). **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 15, p. 2442-2449, 2008.

BUTTS, D. P.; ESPELIE, K. E. & HERMANN, H. R. Cuticular hydrocarbons of four species of social wasps in the subfamily Vespinae: *Vespa crabro* L. *Dolichovespula maculata* (L.). *Vespula squamosa* (Drury). and *Vespula maculifrons* (Buysson). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, 99(1). 87-91, 1991.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736-43. 2009.

CARLSON, D. A.; MAYER, M. S.; SILHACEK, D. L.; JAMES, J. D.; BEROZA, M.; BIERL, B. A. Sex attractant pheromone of the housefly: Isolation, identification and synthesis. *Science*, v. 174, p. 76-77, 1971.

CARLSON, D. A.; BERNIER, U. R.; HOGSETTE, J. A.; SUTTON, B. D. Distinctive Hydrocarbons of the Black Dump Fly, *Hydrotaea aenescens* (Diptera: Muscidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 48, p.167-178, 2001.

CARPENTER, J. M.; MARQUES, O. M. **Contribuição ao Estudo dos Vespídeos do Brasil**. Cruz das Almas, Universidade Federal da Bahia, Série Publicações Digitais, v. 3, 2001.

CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Cell Press**, v. 28, p. 219-229, 2013.

CHÂLINE, N.; SANDOZ, J. C.; MARTIN, S. J.; RATNIEKS, F. L. W; JONES, G. R. Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (*Apis mellifera*). **Chem. Senses**, v. 30, p. 327-335, 2005.

CHARPIN, D.; BIRNBAUM, J.; LANTEAUME, A.; VERVLOET, D. Prevalence of allergy to Hymenoptera stings in different samples of the general population. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 90, n. 3, p.331-334, 1992.

CHIBNALL, A. C.; PIPER, S. H.; POLLARD, A.; WILLIAMS, E. F.; SAHAI, P. N. The constitution of the priary alcohols, fatty acids and paraffins present in plant and insect waxes. **Biochemical Journal**, v. 28, p. 2189-2208, 1934.

COTONESCHI, C.; DANI, F. R.; CERVO, R.; SLEDGE, M. F.; TURILLAZZI, S. *Polistes dominula* (Hymenoptera: Vespidae) larvae possess their own chemical signatures. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 9, p. 954-963, 2007.

CZAIKOSKI, P. G.; MENALDO, D. L.; MARCUSSI, S.; BASEGGIO, A. L. C.; FULY, A. L.; PAULA, R. C.; QUADROS, A. U.; ROMÃO, P. R. T.; BUSCHINI, M. L. T.; CUNHA, F. Q.; SOARES, A. M.; MONTEIRO, M. C. Anticoagulant and fibrinolytic properties of

the venom of *Polybia occidentalis* social wasp. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 21, p. 653-659, 2010.

DALTRY, C. J.; WUSTER, W.; THORPE, S. R. The role of ecology in determining venom variation in the Malayan pitviper, *Calloselasma rhodostoma*. **Symposium of the Zoological Society of London**, v.70, p. 155–171, 1997.

DANI, F. R.; MORGAN, E. D.; TURILLAZZI, S. Dufour gland secretion of *Polistes* wasp: chemical composition and possible involvement in nestmate recognition (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Insect Physiology**, 42: 541-548, 1996.

DANI, F. R.; JEANNE, R. L.; CLARKE, S. R.; JONES, G. R.; MORGAN, E. D.; FRANCKE, W.; TURILLAZZI, S. Chemical characterization of the alarm pheromone in the venom of *Polybia occidentalis* and of volatiles from the venom of *P. sericea*. **Physiological Entomology**, v. 25, n. 4, p. 363-369, 2000.

DANI, F. R.; JONES, G. R.; DESTRI, S.; SPENCER, S. H.; TURILLAZZI, S. Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. **Animal Behaviour**, v. 62, n. 1, p. 165-171, 2001.

DAPPORTO, L.; PALAGI, E.; TURILLAZZI, S. Cuticular hydrocarbons of *Polistes dominula* as a biogeographic tool: a study of populations from the Tuscan Archipelago and surrounding areas. **Journal of chemical ecology**, v. 30, n. 11, p. 2139-2151, 2004b.

DAPPORTO, L.; THEODORA, P.; SPACCHINI, C.; PIERACCINI, G. & TURILLAZZI, S. Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominula* (Christ) (Hymenoptera. Vespidae). **Insectes Sociaux**, v. 51, n. 3, p. 279-286, 2004a.

DEVIGNE, C.; BISEAU, J. C. The differential response of workers and queens of the ant *Lasius niger* to an environment marked by workers: Ants dislike the unknown. **Behavioural Processes**, v. 91, p. 275-281, 2012.

FERREIRA, A. C.; CARDOSO, C. A. L.; NEVES, E. F.; SÚAREZ, Y. R.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Distinct linear hydrocarbon profiles and chemical strategy of facultative parasitism among *Mischocyttarus* wasps. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4351-4359. 2012.

FERREIRA-CALIMAN, M. J.; FALCÓN, T.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; NASCIMENTO, F. S. Chemical identity of recently emerged workers, males, and queens in the stingless bee *Melipona marginata*. **Apidologie**, v. 44, n. 6, p. 657-665, 2013.

FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A. Hymenoptera Stings. Clinical Techniques in Small **Animal Practice**, v. 21, p. 194-204, 2006.

FRANCESE, S.; LAMBARDI, D.; MASTROBUONI, G. I. A.; MARCA, G.; MONETI, G.; TURILLAZZI, S. Detection of honeybee venom in envenomed tissues by direct MALDI MSI. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 1, p. 112-23, 2009.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ. 920pp., 2002.

GEORGIEVA, D.; GREUNKE, K.; BETZEL, C. Three-dimensional model of the honeybee venom allergen Api m 7: structural and functional insights. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 6, p. 1056-1060, 2010.

GIBBS, A. G. Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, n. 4, p. 391-400, 2002.

GINZEL, M. D. Hydrocarbons as contact pheromones of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). In: *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology* (BLOMQUIST, G.; BAGNÈRES, A.G.). Cambridge University Press, New York, p. 375-389, 2010.

GORDON, D. M. The organization of work in social insect colonies. **Nature**, v. 380, p. 121–124, 1996.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the insects**. Cambridge: New Jersey. 788pp, 2005.

HEFETZ, A. The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae) – interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy. **Myrmecological News**, v. 10, p. 59-68, 2007.

HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 371–393, 2005.

ISHAY, I.; IKAN, R.; BERGMANN, E. D. The presence of pheromones in the Oriental hornet. *Vespa orientalis* F. **Journal of Insect Physiology**, v. 11, n. 9, p. 1307-1309, 1965.

IZZO, A.; WELLS, M.; HUANG, Z.; TIBBETTS, E. Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 64, p. 857–864, 2010.

JEANNE, R. L. The adaptivness of social wasps nest architecture. **Quarterly Review of Biology**, v. 50, p. 267–287. 1975.

JEANNE, R. L. Alarm recruitment. attack behavior. and the role of the alarm pheromone in *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 9, n. 2, p. 143-148, 1981.

KATHER, R.; MARTIN, S. J. Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. **Physiological Entomology**, v. 37, n. 1, p. 25–32, 2012.

KHIDR, S. K.; LINFORTH, R. S. T.; HARDY, I. C. W. Genetic and environmental influences on the cuticular hydrocarbon profiles of *Goniozus* wasps. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 147, p. 175–185, 2013.

KLAHN, J. E.; GAMBOA, G. J. Social wasps: discrimination between kin and nonkin brood. **Science**, v. 221, p. 482-484, 1983.

- KOJIMA, J. Evidence for an alarm pheromone in *Ropalidia romandi* (Le Guillou) (Hymenoptera: Vespidae). **Austral Entomology**, v. 33, n. 1, p. 45-47, 1994.
- KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 2651–2668, 2003.
- LECONTE, Y. L. & HEFETZ, A. Primer pheromones in social hymenoptera. **Annual Review Entomology**, v. 53, p. 523-542, 2008.
- LEITE, N. B.; AUFDERHORST-ROBERTS, A.; PALMA, M. S.; CONNELL, S. D.; NETO, J. R.; BEALES, P. A. PE and PS lipids synergistically enhance membrane poration by a peptide with anticancer properties. **Biophys Journal**, v. 109, p. 936–947, 2015.
- LENOIR, A.; FRESNEAU, D.; ERRARD, C.; HEFETZ, A. Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. Detrain, C.; Deneubourg, J. L.; Pasteels, J. M. (eds). In: **Information Processing in Social Insects**, Basel: Birkhäuser, pp. 219–237, 1999.
- LIMA, P. R. M.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venmous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.9, p.149-162, 2003.
- LOMMELEN, E.; JOHNSON, C. A.; DRIJFHOUT, F. P.; BILLEN, J.; WENSELEERS, T.; GOBIN, B. Cuticular hydrocarbons provide reliable cues of fertility in the ant *Gnamptogenys striatula*. **Journal of chemical ecology**, v. 32, n. 9, p. 2023-2034, 2006.
- LORENZI, M. C.; CERVO, R.; BAGNÈRES, A. G. Changes in behaviour. individual odour and reproductive status in the social parasite *Polistes atrimandibularis* (Hymenoptera Vespidae). **Insect Social Life**, v. 1, p. 107–108, 1996.
- LORENZI, M. C.; BAGNÈRES, A. G.; CLÉMENT, J. L.; TURILLAZZI, S. *Polistes biglumis bimaculatus* epicuticular hydrocarbons and nestmate recognition (Hymenoptera. Vespidae). **Insectes Sociaux**, v. 44, n. 2, p. 123-138, 1997.
- LORENZI, M. C.; CERVO, R.; BAGNÈRES, A. G. Facultative social parasites mark host nests with branched hydrocarbons. **Animal behavior**, v. 82, n. 5, p. 1143-1149, 2011.
- LORENZI, M. C.; AZZANI, L.; BAGNÈRES, A. G. Evolutionary consequences of deception: Complexity and informational content of colony signature are favored by social parasitism. **Current Zoology**, v. 60, p. 137-148, 2014.
- MACLINTAL, E. A.; STARR, C. K. Comparative morphology of the stinger in the social wasp genus *Ropalidia* (Hymenoptera: Vespidae). **Memoirs of the Entomological Society of Washington**, v. 17, p. 108-150, 1996.
- MARTIN, M. M.; MACCONNELL, J. G. The alkanes of the ant, *Atta colombica*. **Tetrahedron**, v. 26, p. 307–319, 1970.
- MENDONÇA, A.; PAULA, M. C.; FERNANDES, W. D.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Variation in venoms of *Polybia paulista* Von Ihering and *Polybia occidentalis* Olivier (Hymenoptera: Vespidae) assessed by the FTIR-PAS technique. **Neotropical Entomology**, v. 46, p. 8–17, 2017.

- MENZEL, F.; BLAIMER, B. B.; SCHMITT, T. How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. **Proceedings Biological Sciences**, v. 284, n. 1850, p. 1-10, 2017.
- MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; SOARES, A. M. Pharmacological perspectives of wasp venom. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, p. 944-952, 2009.
- MURAKAMI, A. S. N.; NUNES, T. M.; DESUÓ, I. C.; SHIMA, S. N.; MATEUS, S. The cuticular hydrocarbons profiles in the colonial recognition of the neotropical eusocial wasp. *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera: Vespidae). **Sociobiology**, v. 62, n. 1, p. 109-115, 2015.
- NELSON, D. R.; SUKKESTAD, D. R. Normal and branched aliphatic hydrocarbons from the eggs of the tobacco hornworm. **Biochemistry**, v. 9, p. 4601-4611, 1970.
- NEVES, E. F.; ANDRADE, L. H. C.; SÚAREZ, Y. R.; LIMA, S. M.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 1891-1898, 2012.
- NIEVES-ALDREY, J. L.; FONTAL-CAZALLA, F. M. Filogenia y evolución del orden Hymenoptera. **Boletín de la SEA.**, v. 26, p. 459-474, 1999.
- NUNES, T. M.; TURATTI, I. C. C.; MATEUS, S.; NASCIMENTO, F. S.; LOPES, N. P. & ZUCCHI, R. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera. Apidae. Meliponini): differences between colonies, castes and age. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 589-595, 2009.
- O'DONNELL, S.; BULOVA, S. J. Worker connectivity: a review of the design of worker communication systems and their effects on task performance in insect societies. **Insect Societies**, v. 54, p. 203-210, 2007.
- OLANIRAN, A. O.; SUDHAKAR, A. V. S.; DRIJFHOUT, F. P.; DUBLON, I. A. N.; HALL, D. R.; HAMILTON, J. G. C.; KIRK, W. D. J. A male-predominant cuticular hydrocarbon. 7-methyltricosane. is used as a contact pheromone in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. **Journal Chemical Ecology**, v. 39, p. 559-568, 2013.
- OLIVEIRA, M. R. P.; SCHEIDT, A. C.; PALMA, M. S.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Venenos de Hymenoptera sociais: coleta, composição, bioquímica e mecanismo de ação. In Barraviera, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**, Rio de Janeiro: Editora de publicações biomédicas – EPUB, p. 251-258, 1999.
- ORIVEL, J.; DEJEAN, A. Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae). **Toxicon**, v. 39, p. 195-201, 2001.
- PARDI, L. *Polistes*: analysis of a society. In: TURILLAZZI, S.; WEST-EBERHARD, M. J. (eds.). **Natural History and Evolution of Paper-Wasps**, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo. xiv +, p. 1-17, 1996.

PEIREN, N.; VANROBAEYS, F.; GRAAF, D. C.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMENB, J.; JACOBS, F. J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1752, n. 1, p. 1-5, 2005.

PICKETT, K. M.; WENZEL, J. W. Revision and cladistic analysis of the nocturnal social wasp genus *Apoica* Lepeletier (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae. Epiponini). **American Museum Novitates**, p. 1-30, 2007.

PIEK, T. **Venoms of the Hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioural aspects**. San Diego: Academic, 1986.

POST, D. C.; JEANNE. R. L. Venom as an interspecific sex pheromone and species recognition by a cuticular pheromone in paper wasps (*Polistes*, Hymenoptera: Vespidae). **Physiological entomology**, v. 9, n. 1, p. 65-75, 1984.

POST, D. C.; DOWNING. H. A.; JEANNE. R. L. Alarm response to venom by social wasps *Polistes exclamans* and *P. fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of chemical ecology**, v. 10, n. 10, p. 1425-1433, 1984.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, A. S.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 810pp, 2012.

RICHARDS, O. W. **The social wasps of the Americas (excluding the Vespinae)**. London, British Museum of Natural History, vii+580 p., 1978.

ROUX, O.; GERS, C.; LEGAL, L. When, during ontogeny, waxes in the blowfly (Calliphoridae) cuticle can act as phylogenetic markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 406–416, 2006.

SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; PINTO, J. R.; DIAS, N. B.; SOUZA, B. M.; SANTOS, M. F.; et al. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 8, p. 3867-3877, 2010.

SANTOS, L. D.; PIERONI, M.; MENEGASSO, A. R. S.; PINTO, J. R. A. S.; PALMA, M. S. A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, p. 364-377, 2011.

SANTOS, A. B.; NASCIMENTO, F. S. Cuticular hydrocarbons of orchid bees males: interspecific and chemotaxonomy variation. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. 1-11, 2015.

SCHREMMER, F. Beobachtungen zur Biologie von *Apoica pallida* (Olivier. 1791). Einer Neotropischen Sozialen Faltenwespe (Hymenoptera. Vespidae). **Insectes Sociaux**, v. 19, n. 4, p. 343-357, 1972.

SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO JUNIOR, A.; ORSI, R. O.; FERREIRA JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1473-1479, 2010.

- SHARKEY, M. J. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. **Zootaxa** **1668**, p. 521-548. 2007.
- SILVA, M.; NOLL, F. B. O uso do aparelho de ferrão em reconstruções filogenéticas nos Epiponini (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). FAPESP. **Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas**, 2006.
- SILVA, E. R. S.; MICHELUTTI, K. B.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F.; BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L. Chemical signatures in the developmental stages of *Protopolybia exigua*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, 2016.
- SINGER, T. L. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. **American Zoologist**, 38, 394–405. 1998.
- SLEDGE, M. F.; DANI, F. R.; FORTUNATO, A.; MASCHWITZ, U.; CLARKE, S. R.; FRANCESCATO, E.; TURILLAZZI, S. Venom induces alarm behaviour in the social wasp *Polybioides raphigastra* (Hymenoptera: Vespidae): an investigation of alarm behaviour. venom volatiles and sting autotomy. **Physiological entomology**, v. 24, n. 3, p. 234-239, 1999.
- SMITH, C. R.; ANDERSON, R. T.; TILLBERG, C. V.; GADAU, J.; SUAREZ, A. V. Caste determination in a polymorphic social insect: nutritional, social, and genetic factors. **American Naturalist**, v. 172, p. 497–507, 2008.
- SOUZA, M. M.; ZANUNCIO, J. C. **Marimbondos: vespas sociais (Hymenoptera: Vespidae)**. Editora UFV, 79 p., 2012.
- TANNURE-NASCIMENTO, I. C.; NASCIMENTO, F. S.; TURATTI, I. C.; LOPES, N. P.; TRIGO, J. R.; ZUCCHI, R. Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 2, p. 390–396, 2007.
- TRABALON, M.; CAMPAN, M.; CLEMENT, J. L.; LANGE, C.; MIQUEL, M.T. Cuticular hydrocarbons of *Calliphora vomitoria* (Diptera): Relation to age and sex. **General and Comparative Endocrinology**, v. 85, p. 208–216, 1992.
- TRIPLEHORN, C. A.; JONNISON, N. F. **Estudo dos insetos**. Cenage Learning, São Paulo. 809pp., 2011.
- VAN ZWEDEN, J. S.; D’ETTORRE, P. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. BLOMQUIST, G.; BAGNÈRES, A.G. (Eds) In: **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology** (Cambridge: Cambridge University Press. Cap 11, p.222-243, 2010.
- VANDER MEER, R. K.; MOREL, L. Nestmate recognition in ants. VANDER MEER, R. K.; BREED, M. D.; WINSTON, M. L.; ESPELIE, K. E. (Eds) In: **Pheromone Communication in Social Insects**. Boulder, CO: Westview Press, pp. 79–103, 1998.
- VEITH, H. J.; KOENIGER, N.; MASCHWITZ, U. 2-Methyl-3-butene-2-ol. a major component of the alarm pheromone of the hornet *Vespa crabro*. **Naturwissenschaften**, v. 71, n. 6, 328-329, 1984.



VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K.; CAMAZINE, S. Mass envenomations by honey bees and wasps. **The Western Journal of Medicine**, v. 170, n. 4, p. 223-227, 1999.

WENZEL, J. W. A generic key to the nests of hornets, yellowjackets, and paper wasps worldwide (Vespidae: Vespinae, Polistinae). **American Museum Novitates** 3224, p.1-39, 1998.

WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae, Hemiptera); with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 76, p. 269-318, 1933.

WILSON, E. O. **The insects societies**. Cambridge, Belknap Press of Harvard University Press.,548p., 1971.

WOOD, C. L.; HOFFMAN, D. R. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of hymenoptera venom and venom sac extrats. **Toxicon**, v. 21, n. 2, p. 291-99, 1983.

XU, H.; YE, G-Y; XU, YING, HUB, C., ZHU, G-H. Age-dependent changes in cuticular hydrocarbons of larvae in *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International**, v. 242, p. 236-241, 2014.

ZHU, G. H.; YE, G. Y.; HU, C.; XU, X. H.; LI, K. Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, p. 438-444, 2006.

## **Capítulo I**

### **Variação na composição química de compostos não-polares do veneno e cutícula de *Apoica pallens* e *Polistes versicolor***

\* Formatado nas normas da revista *Insects* ISSN 2075-4450, qualis para biodiversidade: A2. Recebemos em outubro a primeira correção com as sugestões dos revisores e agora estamos aguardando a decisão da revista.

# Variação na composição química de compostos não-polares do veneno e cutícula de *Apoica pallens* e *Polistes versicolor*

Angélica Mendonça<sup>1,3</sup>, Kamylla Balbuena Michelutti<sup>2,3</sup>, Claudia Andrea Lima Cardoso<sup>2</sup>, William Fernando Antonialli Junior<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

<sup>3</sup>Laboratório de Ecologia Comportamental, LABECO.

Autor correspondente: angel\_biol@yahoo.com.br

**Resumo:** Ainda que hidrocarbonetos cuticulares e veneno sejam compostos importantes para o sucesso evolutivo do comportamento social, são raros os estudos que investigaram hidrocarbonetos da cutícula e do veneno de vespas sociais tropicais. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar a composição química da cutícula e da parte apolar do veneno de *Apoica pallens*, vespa de fundação enxameante e *Polistes versicolor* vespa de fundação independente. cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foi a técnica utilizada. Nas amostras de *A. pallens*, 66 compostos foram identificados na cutícula e 87 no veneno, 13 são únicos da cutícula e 26 do veneno. Nas amostras de *P. versicolor* 85 compostos foram identificados na cutícula e 60 no veneno, 10 são exclusivos da cutícula e 5 do veneno. Os resultados mostram que, embora sejam vespas de tipos de fundação diferentes e que se organizam em colônias com número populacional significativamente diferente, a variação do tamanho da cadeia dos compostos é relativamente similar. Também nos dois tipos de amostras de ambas as espécies, a classe de compostos mais representativa em teor e número são os alcanos ramificados que são reconhecidamente os mais efetivos durante as interações entre companheiras de ninhos. Contudo, há maior similaridade de teores dos compostos compartilhados entre as amostras da cutícula e veneno de *A. pallens*, sugerindo que por ser uma espécie que se organiza em colônias mais populosas pode ter um sistema mais elaborado de sinalização baseado nos compostos voláteis de seu veneno.

**Palavras-chave:** Hidrocarboneto cuticular; veneno; vespa; CG-EM.

## Variation in chemical composition of cuticular and nonpolar compounds of venom of *Apoica pallens* and *Polistes versicolor*

**Abstract:** Although cuticular hydrocarbons and venom are important to the evolutionary success of social behavior, studies that investigated these compounds in tropical social wasps are rare. Thus, the aim of this study was to compare the cuticular chemical composition and the nonpolar portion of venom of *Apoica pallens*, a swarm-founding wasp and *Polistes versicolor* an independent-founding wasp. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) technique was used. In the samples of *A. pallens*, 66 compounds were identified on the cuticle and 87 in venom, 13 are unique of the cuticle and 26 of venom. In the samples of *P. versicolor*, 85 compounds were identified on the cuticle and 60 in venom, 10 are exclusive of the cuticle and 5 of venom. The results show that, although they present different

foundation types and organize in colonies with significantly different population number, the variation in chain length of compounds is relatively similar. In addition, in both types of samples of both species, the most representative class of compounds in content and number are the branched alkanes, which are recognized as the most effective during interactions between nestmates. However, there is greater similarity in content of shared compounds between samples of cuticle and poison of *A. pallens*, suggesting that because it is a species that is organized in more populous colonies, it may have a more elaborate signaling system based on volatile compounds of venom.

**Keywords:** Cuticular hydrocarbons; venom; wasp; GC-MS

## INTRODUÇÃO

Os Hymenoptera constituem umas das maiores ordens de insetos, a qual é composta por vespas, abelhas e formigas. Nas sociedades destes insetos foi necessário evoluir um mecanismo que mantivesse a coesão entre seus membros, principalmente na forma de compostos químicos usados como sinais trocados durante suas interações, denominados semioquímicos. Dentre estes compostos, destacam-se os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) que são parte constituinte da camada lipídica da cutícula [1].

Os HCs atuam como feromônios de contato ou de superfície, como já relatados em alguns estudos [2-6], e funcionam como sinais ou pistas para as companheiras de ninhos, permitindo a identificação de coespecíficos, auxiliando na manutenção da estrutura das colônias, distinguindo os indivíduos de acordo com sua função, seu status fisiológico e seu ranque hierárquico [7] atuando como uma assinatura química específica do indivíduo.

Esses feromônios de superfície são compostos basicamente por hidrocarbonetos, especialmente alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos [5-8]. As funções primárias destes HCs são de evitar a perda de água e atuar como um revestimento protetor para os insetos [9]. Além disso, atuam mediando as interações intra e interespecífica entre estes insetos [10]. Sabe-se que os HCs variam significativamente entre espécies [11-14]; castas [15,16] e companheiras de ninho [17-19], além de sinalizar dominância e fertilidade [20-22], podendo ainda variar de acordo com a idade do inseto [2,15,23-26].

Os insetos sociais também são capazes de sintetizar compostos para a produção de veneno que representam parte de um mecanismo para capturar presas e defender suas colônias, e além destas funções também podem atuar na comunicação, como já foi descrito por Mateus [27], o qual avaliou que a vespa *Parachartergus fraternus* utiliza o veneno para marcar um novo local para a fundação da colônia, antes do início da migração. Portanto, pode-se inferir que há na composição do veneno elementos que devem funcionar como sinais

usados durante interações entre coespecíficos, provavelmente aqueles mais leves e voláteis dentre todos os compostos encontrados no veneno.

Bruschini et al [28] encontraram feromônios na porção volátil do veneno de *Polistes dominula* que desempenham papel comunicativo ao induzir o comportamento de alarme. Estudos comportamentais com extratos de veneno [29] também revelaram que as vespas *P. dominula* são estimuladas pelo veneno das operárias do que de fundadoras. Além disso, Post e Jeanne [30] avaliaram o potencial de ação sexual, como atrativo de machos, no componente volátil do veneno de fêmeas de *Polistes*. Desta forma, o estudo dos componentes voláteis do veneno também são importantes para se compreender melhor que tipo de compostos são utilizados durante as trocas de sinais entre coespecíficos em colônias de vespas sociais.

*Apoica pallens* (Fabricius, 1804) é uma vespa social enxameante de hábito noturno e por isto apresenta grandes olhos compostos e ocelos que são adaptações para a visão no escuro [31]. Esta espécie é encontrada desde o México até o nordeste da Argentina [32] e suas colônias contém desde centenas a milhares de indivíduos. *Polistes versicolor* (Olivier, 1791) é uma vespa de fundação independente de hábito diurno, possui ninhos com um único favo descoberto fixado ao substrato por um pedúnculo. Suas colônias são relativamente pequenas em número e são muito comuns em áreas urbanas, abundantes na América do Sul, estando presente desde a Costa Rica até o sul do Brasil e Argentina [32].

Ainda que os HCs e o veneno sejam compostos reconhecidamente importantes para o sucesso evolutivo do comportamento social e, a literatura tenha um número relativamente significativo de estudos sobre eles, ainda são raros aqueles que investigaram a composição da cutícula e da parte apolar do veneno [29,33-36] de espécies de vespas sociais tropicais. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar a composição química da cutícula e da parte apolar do veneno de *Apoica pallens*, vespas de fundação enxameante e *Polistes versicolor* vespas de fundação independente.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Coleta das amostras e extração dos compostos cuticulares e compostos apolares do veneno***

Foram utilizadas no total 110 fêmeas de *A. pallens* de uma única colônia todas operárias de idade aproximada (mais velhas), determinada pelo método conforme coloração do apódema [37,38] e 310 fêmeas de *P. versicolor* de 3 colônias, todas também com a mesma idade aproximada.

As colônias de ambas as espécies foram coletadas em área rurais e de mata nos arredores do município de Dourados-MS (Brasil) (22°14'38.8"S, 54°49'36.6"W) em fevereiro de 2015 e abril de 2016 respectivamente. As coletas foram realizadas com auxílio de sacos plásticos e algodão embebido em éter, na qual o plástico foi envolto ao ninho para tentar coletar o maior número possível de indivíduos da colônia. Logo após a coleta, o algodão com éter foi retirado o mais rápido possível para não interferir na composição química dos indivíduos. Em seguida, as vespas foram conduzidas ao laboratório, na qual foram anestesiadas sob a ação de baixa temperatura para posterior extração.

Para a extração dos HCs foram utilizadas 10 operárias de cada espécie, totalizando 10 amostras de cada espécie. A extração de HCs foi feita do indivíduo inteiro sem qualquer tipo de fixação. Cada amostra foi imersa em um recipiente de vidro com 2mL de hexano durante 2 minutos. Após a retirada do soluto, as amostras foram secas em capela de exaustão e congeladas por no máximo 30 dias. Para as análises cromatográficas, cada extrato foi solubilizado em 200 µL de hexano (Tedia, grau HPLC).

Para a caracterização da porção apolar do veneno de *A. pallens* foram realizadas 10 leituras cada uma com o conteúdo de 10 reservatórios de veneno. Das amostras de veneno de *P. versicolor* foi realizada uma triplicata, cada uma com o conteúdo de 100 reservatórios. Este número variou entre as duas espécies em função do tamanho de seus corpos e, conseqüentemente de seu reservatório de veneno. A definição do número de reservatórios foi definida em função de testes preliminares realizados com amostras de cada espécie.

A extração do reservatório de veneno ocorreu por dissecação, em água ultra pura a fim de evitar que os compostos de membrana fossem extraídos, com auxílio de pinça e microscópio estereoscópio, e, posterior remoção dos filamentos glandulares e do ferrão. Para extrair o veneno o reservatório foi levemente pressionado dentro de um frasco de vidro (vial), até a liberação do seu conteúdo. Durante todo o procedimento, todas as amostras foram mantidas em gelo para evitar a volatilização e degradação dos compostos mais leves.

Na seqüência as amostras foram submetidas a extração em hexano seguido de acetato de etila. Foram adicionados a cada uma das amostras, 200 µL de água ultra pura e 200 µL de hexano (Grau HPLC), seguido de agitação durante 30 segundos e repouso por três minutos. Em seguida, as fases formadas foram separadas. Na fração aquosa foram adicionados, 500 µL de acetato de etila (Grau HPLC), seguido de agitação durante 30 segundos e repouso de 10 horas. Após a separação de fases a fração de acetato de etila foi unida a fração hexanica de cada amostra, que foram secas em capela de exaustão e ressuspensas em 200 µL de hexano.

### ***Análise das amostras por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)***

As amostras foram analisadas empregando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS Ultra 2010, Shimadzu, Kyoto, Japan), usando uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W, Folsom, California, USA) com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura. As condições de análise da programação de temperatura da coluna e os parâmetros de varredura foram as mesmas já descritas no estudo de Paula et al. [39].

As identificações dos compostos foram realizadas empregando o índice de retenção calculado [40], usando uma mistura de alcanos lineares (C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub>, Sigma Aldrich com pureza ≥ 90%) que foram utilizados como padrão para identificação de compostos. Estes índices calculados são comparados em relação ao índice de retenção da literatura [36,41-45], e associado à interpretação dos espectros de massas obtidos com as amostras e comparados com as bases de dados (NIST21 e WILEY229). Com base na metodologia já descrita por Dapporto et al [46,47], a área de cada pico do cromatograma de cada amostra foi transformada em porcentagem, além disso, os compostos com menos de 0,5% não foram apresentados na tabela. Os compostos majoritários foram considerados aqueles que apresentaram pelo menos 4% de área relativa.

Para avaliar a relação entre compostos da cutícula e do veneno destas duas espécies foi empregada uma análise de função discriminante (DFA) utilizando apenas os compostos compartilhados pelos 4 grupos, na qual o Wilk's lambda próximo a 0 revela que os grupos não se sobrepõem, ou seja, são diferentes, e valores próximo a 1 revelam sobreposição.

## **RESULTADOS**

Nas amostras da cutícula de *A. pallens* foram detectados 74 picos, destes 66 foram identificados (89,2%) com cadeia carbônica variando do C<sub>16</sub> ao C<sub>37</sub>. Os cinco compostos considerados majoritários nestas amostras foram os 13-metilheptacosano (15,56%); heptacosano (13,09%); x-metilheptacosano (10,83%); 13-metilhentriacontano (8,32%); 13-metilpentacosano (7,17%) (Tabela 1). As classes de compostos mais numerosas e abundantes foram os alcanos ramificados representando 74,5% dos compostos, os alcanos lineares 23,5% e alcenos 1,6%.

Nas amostras do perfil químico do veneno desta espécie foram detectados 97 picos, destes 87 foram identificados (89,7%) que variaram do C<sub>15</sub> ao C<sub>37</sub>. Os cinco compostos majoritários foram os 13-metilheptacosano (9,73%), 13-metilpentacosano (7,65%), 11,15-

dimetilpentacosano (5,24%), 6-metiloctacosano (4,67%), x-metilheptacosano (4,95%) (Tabela 1). Os alcanos ramificados foram os mais significativos em relação ao número de compostos e abundância, perfazendo 77,5% dos compostos, seguido de alcanos lineares com 8% e alcenos 7,5% (Figuras 1B e 2B). A cutícula apresentou 13 compostos exclusivos e o veneno 26 (Tabela 1), sendo que estes dois grupos compartilham 43 compostos.

**Tabela 1.** Área percentual de compostos não polares (> 0.5%) presentes na cutícula e veneno das vespas eussociais *Apoica pallens* and *Polistes versicolor*.

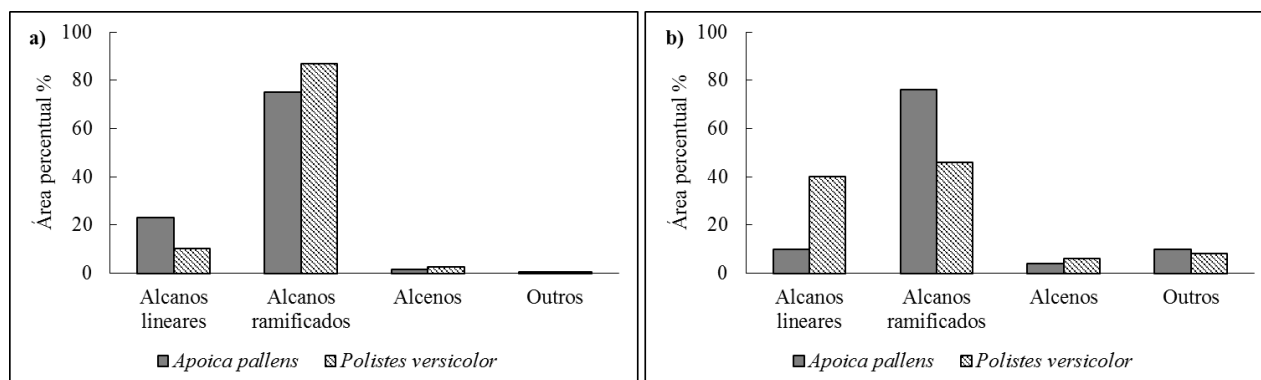
Índice calculado (kraftz)	Compostos	<i>Apoica pallens</i>	<i>Apoica pallens</i>	<i>Polistes versicolor</i>	<i>Polistes versicolor</i>
		Cutícula	Vanono	Cutícula	Vanono
Porcentagem (%) desvio padrão(±)					
1500	Pentadecano	ND	0,36±0,61	0,04±0,02	4,91±4,53*
1568	(R)-(-)-Mellein	ND	0,63±1,48	ND	ND
1600	Hexadecano§	0,02±0,02	0,19±0,60	0,02±0,01	4,74±2,08*
1658	x-Methylhexadecano	ND	3,52±4,31	ND	ND
1662	Heptadecadiano	ND	0,29±0,69	0,04±0,05	2,36±2,18
1699	Heptadecano	ND	0,34±0,60	0,01±0,01	2,49±0,81
1734	4- Hidroximellein	ND	0,58±1,64	ND	ND
1744	x-Methylheptadecano	ND	0,65±1,47	ND	ND
1774	3-Methylheptadecano	ND	0,58±1,45	ND	ND
1793	Octadecano	ND	0,32±0,99	0,03±0,02	ND
1800	Octadecano	ND	0,06±0,09	0,11±0,03	11,75±1,48*
1822	2-Methyl-6-undecenyl piperidine	ND	3,60±3,51	ND	ND
1826	x-Methyloctadecano	ND	1,05±2,70	0,03±0,05	4,11±1,93
1874	Nonadecano	0,07±0,11	0,67±0,70	ND	1,33±0,17
1900	Nonadecano	ND	ND	0,01±0,00	0,72±0,20
1918	x-Methylnonadecano	TR	0,56±0,71	ND	ND
1926	x-Methylnonadecano	TR	0,01±0,04	ND	0,59±0,18
1952	x-Methylnonadecano	ND	2,39±4,50	ND	ND
1967	2-Methylnonadecano	ND	2,91±5,63	ND	3,39±0,44
1978	3-Methylnonadecano	ND	3,58±3,12	ND	ND
1982	Eicosano	ND	0,05±0,08	0,02±0,04	4,33±1,91*
2001	Eicosano	ND	0,16±0,29	0,02±0,00	1,00±0,30
2116	x-Methylhanoicosano	ND	ND	0,01±0,01	0,56±0,23
2131	7-;9-;11-Methylhanoicosano	ND	2,24±2,60	0,02±0,03	0,64±1,11
2172	x-Methylhanoicosano	ND	ND	0,58±1,00	1,34±0,29
2273	Tricosadiano§	0,02±0,06	0,63±1,99	0,09±0,17	1,04±0,69
2278	Tricosano§	0,01±0,04	2,46±2,50	0,02±0,03	0,44±0,76
2300	Tricosano§	0,08±0,10	0,19±0,27	0,10±0,16	1,95±0,43
2394	x-Tetracosano	ND	ND	0,01±0,00	0,56±0,32
2399	Tetracosano§	0,06±0,03	0,27±0,38	0,01±0,00	0,52±0,17
2426	x-Methyltetracosano	ND	3,73±3,03	0,02±0,04	1,77±2,30



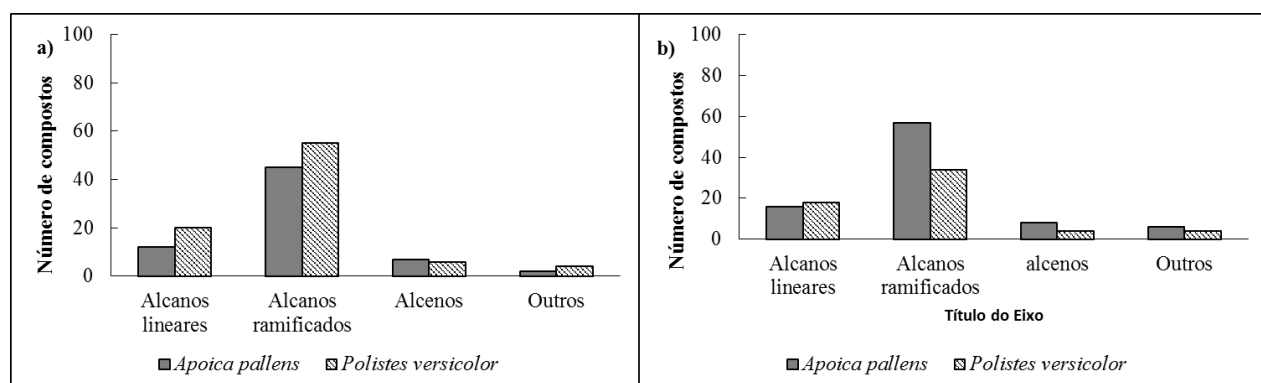
2500	Pentacosano§	6,33±0,72	3,31±3,39	0,07±0,04	1,14±0,10
2534	13-Methylpentacosano	7,17±3,4*	7,65±6,99*	0,03±0,01	ND
2539	7-Methylpentacosano	1,05±0,54	0,91±0,91	ND	ND
2552	5-Methylpentacosano§	0,55±0,65	2,57±4,68	0,23±0,03	2,91±0,94
2562	11,15-Dimethylpentacosano	0,65±0,38	5,24±3,37*	ND	ND
2570	3-Methylpentacosano§	2,87±1,25	2,40±2,30	0,03±0,05	1,39±1,55
2599	Hexacosano§	1,12±0,26	0,12±0,11	0,02±0,01	0,89±0,50
2633	12-Methylhexacosano	0,76±0,35	0,43±0,39	0,01±0,00	ND
2680	Heptacosano	0,56±0,46	0,15±0,21	0,01±0,01	ND
2692	Heptacosano	0,44±1,07	1,94±2,09	ND	ND
2700	Heptacosano§	13,09±3,63*	ND	1,12±0,27	2,29±1,02
2711	x-Methylheptacosano	ND	4,95±4,38*	0,02±0,04	1,1±0,69
2732	13-Methylheptacosano§	15,56±5,81*	9,74±9,41*	0,19±0,03	0,11±0,19
2742	7-Methylheptacosano	5,3±6,71	1,42±1,43	0,04±0,01	ND
2763	x-Methylheptacosano	1,41±0,79	0,47±0,89	ND	ND
2765	x-Methylheptacosano	0,77±1,03	0,74±1,48	ND	ND
2770	3-Methylheptacosano§	10,83±1,99*	3,13±3,06	2,43±0,52	4,27±2,14*
2800	Octacosano§	0,48±0,08	0,13±0,16	0,3±0,06	1,66±1,60
2830	14-, 13-, 10-Methyloctacosano§	0,78±0,20	0,28±0,24	0,17±0,05	3,58±2,35
2845	6-Methyloctacosano	ND	4,67±4,84*	0,01±0,01	ND
2850	x-Methyloctacosano	ND	ND	0,03±0,04	0,57±0,51
2901	Nonacosano§	1,70±0,54	0,15±0,18	5,37±0,92*	3,04±2,10
2928	13-Methylnonacosano §	3,03±0,55	0,77±0,80	2,34±0,58	2,26±1,10
2933	15-Methylnonacosano	1,17±0,23	0,10±0,22	3,73±0,85*	ND
2936	13-Methylnonacosano	0,60±0,15	ND	0,22±0,04	ND
2941	7-Methylnonacosano	ND	0,03±0,07	0,61±0,17	0,10±0,18
2951	5-Methylnonacosano	ND	ND	0,55±0,08	0,18±0,31
2966	9,13-Dimethylnonacosano	ND	ND	0,98±0,33	0,04±0,08
2975	3-Methylnonacosano§	1,74±0,41	0,05±0,11	12,23±1,34*	4,16±2,23
2984	5,x-Dimethylnonacosano	ND	3,44±4,33	ND	0,15±0,26
3000	Triacosano§	0,11±0,10	0,07±0,17	0,19±0,04	1,81±1,67
3028	10-Methyltriacontano	0,22±0,05	ND	1,03±0,21	ND
3100	Hentriacontano§	0,08±0,03	1,17±2,51	1,17±0,34	1,07±0,95
3119	11-, 13-Methylhentriacontano	ND	ND	0,04±0,05	3,60±0,91
3128	13-Methylhentriacontano§	8,32±1,79*	0,80±0,84	26,07±3,45*	3,85±2,55
3137	9+13-Methylhentriacontano	ND	ND	1,05±0,25	ND
3153	x-Methylhentriacontano	ND	ND	0,82±0,20	ND
3155	13,17-Dimethylhentriacontano	ND	ND	2,86±0,81	0,87±1,51
3165	7,15-Dimethylhentriacontano	ND	ND	0,87±0,24	ND
3160	11,19-Dimethylhentriacontano	2,22±0,52	ND	ND	ND
3174	5,15-Dimethylhentriacontano	ND	ND	1,56±0,7	ND
3202	Dotriacontano	0,10±0,06	ND	0,92±0,47	0,76±0,74
3228	16-, 14-Methyldocotriacontano	0,15±0,07	ND	1,85±0,32	ND
3240	x-Methyldotriacontano	ND	1,11±1,83	ND	ND
3284	x,y-Dimethyldotriacontano	0,84±1,18	ND	ND	ND
3329	15-Methyltritriacontano§	2,57±0,7	0,06±0,19	23,49±6,37*	2,23±0,17
3334	x-Methyltritriacontano	ND	ND	0,81±0,22	ND
3356	11,21-Dimethyltritriacontano	2,71±0,68	ND	ND	ND

3365	11,15-Dimethyltrtriacontano (11,15-diMeC33)	ND	0,55±0,99	0,43±0,12	ND
3401	Tetratriacontano	ND	ND	0,68±0,31	ND
3523	17-, 13-Methylpentatriacontano	ND	ND	0,75±0,11	ND
3745	13,23 Dimethylheptatriacontano	0,91±0,3	0,07±0,14	ND	ND

\*= Compostos majoritários; §= Compostos presentes em todas as amostras; TR: traço (<0,005%); ND: não detectado



**Figura 1.** Média percentual das diferentes classes de compostos de *Apoica pallens* e *Polistes versicolor*: A) perfil químico cuticular e B) perfil químico do veneno.



**Figura 2.** Número de compostos de diferentes classes de *Apoica pallens* e *Polistes versicolor*: A) perfil químico cuticular e B) perfil químico do veneno de

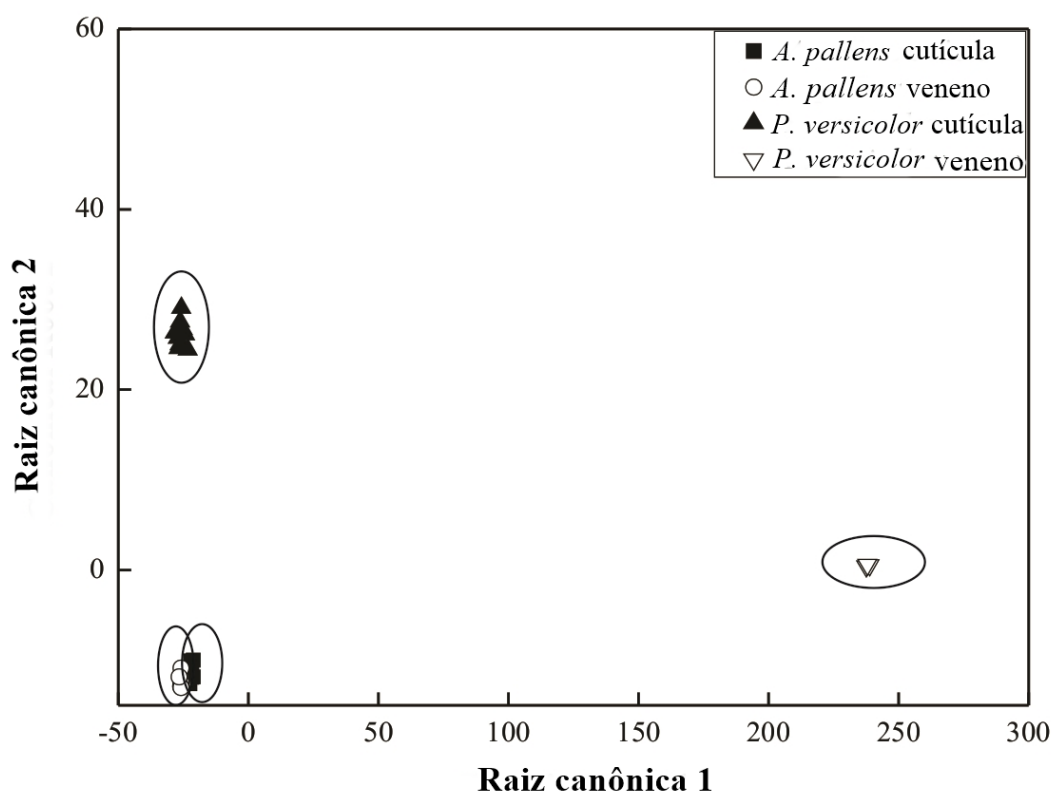
Nas amostras da cutícula de *P. versicolor* foram detectados 93 picos, destes, 85 foram identificados (91,4%), variando seu comprimento de cadeia do C<sub>15</sub> ao C<sub>37</sub>. Os cinco compostos majoritários foram os nonacosano (5,37%), 15-metilnonacosano (3,73%), 3-metilnonacosano (12,23%), 13-metilhentriacontano (26,07%) e o 15-metiltrtriacontano (23,49%) (Tabela 1). Os alcanos ramificados são os mais significativos em número de

compostos e abundância, representando 89% dos compostos, os alcanos lineares 10,4%, os alcenos 0,4% (Figuras 1A e 2A).

No veneno desta espécie foram detectados 64 picos e identificados 60 (93,8%) que variaram do C<sub>15</sub> ao C<sub>33</sub>. Os compostos majoritários (Tabela 1) foram o pentadecano (4,91%), hexadecano (4,74%), octadecano (11,75%), eicoseno (4,33%) e 3-metiheptacosano (4,27%). Os alcanos ramificados foram os mais significativos em termos de número e abundância, representando 46,3% dos compostos, seguidos dos alcanos lineares com 42,3% e alcenos 7,5% (Figuras 1B e 2B). Destas amostras, 10 compostos são exclusivos da cutícula e 5 do veneno (Tabela1), e ambos compartilham 49 compostos.

Entre as amostras da cutícula das duas espécies 41 compostos são compartilhados, 25 são exclusivos de *A. pallens* e 44 de *P. versicolor*. Entre as amostras de veneno, 43 compostos são compartilhados, 44 são exclusivos de *A. pallens* e 17 exclusivos de *P. versicolor*.

A análise discriminante demonstra que há diferenças significativas entre a composição química da cutícula e do veneno das duas espécies (Figura 3) com Wilk's Lambda= 0,001,  $p < 0,001$  e  $F = 205,12$ . Nesta análise a primeira raiz canônica explica 95% dos resultados.



**Figura 3.** Gráfico de dispersão mostrando as diferenças do perfil químico cuticular e do perfil químico de compostos apolares do veneno das vespas *Apoica pallens* e *Polistes versicolor*. Wilk's Lambda= 0.001.  $p < 0.001$  e  $F = 205.12$ .

## DISCUSSÃO

A cutícula e o veneno das duas espécies diferem em número e teor de compostos, o que já era esperado [13,35,48,49] por serem espécies diferentes. *P. versicolor* apresentou mais compostos na cutícula e menos compostos no veneno. No entanto, em ambas as espécies tanto na cutícula, quanto no veneno, os compostos mais importantes em termos de abundância foram os alcanos ramificados, além disso, a cutícula e o veneno de *P. versicolor* compartilham mais compostos do que *A. pallens*.

No perfil químico cuticular de *A. pallens* ocorrem compostos que variam de C16 ao C37, sendo que a variação do comprimento de cadeia dos compostos provenientes da cutícula, são similares aos encontrados para outras espécies de Epiponini, como *Polybia paulista* variando de C19 a C36 [50] e *Protopolybia exigua* variando de C14 a C36 [36]. No perfil cuticular de *P. versicolor* os compostos identificados variam do C15 ao C37, diferindo da vespa *P. dominula*, cujos compostos variam de C21 ao C35 [17] e de *P. fuscatus* que variam de C21 a C33 [51]. No entanto, Brito et al [52] identificaram no perfil cuticular de *P. versicolor* compostos que variam de C8 a C30, mas neste estudo os autores avaliaram também os compostos cuticulares de estágios imaturos.

A variação do número de cadeias encontradas em ambas as espécies é relativamente similar, então, sem levar em conta as classes de compostos, o fato de uma espécie possuir colônias populosas e a outra colônias pequenas, parece não ter influência sobre este aspecto.

No perfil químico do veneno de *A. pallens* foram encontrados 87 compostos apolares que variam do C15 a C37. No veneno de *P. exigua*, no entanto, ocorre uma variação de comprimento do C19 ao C30 [36]. Os compostos apolares do veneno de *Polybioides raphigastra* variam de C11 e C18 [53]. No veneno de *P. versicolor* foram identificados 60 compostos que variam do C15 ao C37. Bruschini et al. [29] estudando os voláteis do veneno de diferentes castas de *P. dominula* encontraram 42 compostos, mas não descrevem a variação do tamanho de cadeia.

As amostras da cutícula de *P. versicolor* possui 85 compostos e a de *A. pallens* possui 66. Portanto, apesar de *P. versicolor* ser uma espécie de fundação independente que constitui colônias relativamente pequenas, sua composição química cuticular parece ser mais complexa. Maior diversidade no perfil de uma espécie de vespa *Polistes* já foi descrita por Lorenzi et al [54], que associa a complexidade no perfil cuticular de indivíduos de diferentes colônias de *Polistes biglumis* à presença ou não de parasitas. O aumento da complexidade no perfil cuticular dificulta a quebra do código intracolônial das vespas pelos parasitas. Este fato comprova a plasticidade adaptativa dos HCs de vespas do gênero *Polistes* frente às influências no ambiente social [54]. Provavelmente, *P. versicolor* possui maior

susceptibilidade de parasitismo em suas colônias pois, a ocorrência de parasitismo para este gênero já foi relatada em diversos estudos [54-58].

Em ambas as espécies estudadas os alcanos ramificados são aqueles que ocorrem em maior abundância e número de compostos na cutícula e no veneno, seguido dos alcanos lineares e por último os alcenos (Figuras 1 e 2). Da mesma forma, Bonavita-Cougourdan et al. [16] estudando *Polistes dominula* também identificaram na mesma ordem de abundância os compostos presentes na cutícula destas vespas. Sabe-se que os alcanos ramificados parecem estar mais envolvidos com a sinalização durante as interações intraespecíficas [17]. Dani et al. [18] e Lorenzi et al. [19] destacam em seus estudos a função comunicativa destes compostos, já que esta classe apresenta uma alta complexidade molecular, exibindo um elevado potencial para codificar informações [10,20]. Desta forma, os alcanos ramificados realmente são considerados por muitos autores a principal classe mediadora das interações químicas entre companheiros de ninho [21-23].

Os alcenos, apesar de ocorrerem em menores proporções nas amostras das duas espécies comparado aos outros compostos, também parecem estar mais relacionados com a troca de sinais durante a comunicação química [68,69]. Em contrapartida, os alcanos lineares parecem estar mais envolvidos na construção de uma barreira para evitar a perda de água [69,70], ou seja, a impermeabilidade da cutícula. Contudo, Tannure-Nascimento et al [71] em seu estudo com *Polistes satan* identificaram maior abundância de alcanos lineares na cutícula desta vespa, sugerindo que estes compostos também tenham importância como sinais para mediar interações entre as companheiras de ninho. A função destes compostos, no veneno, portanto, precisa ser avaliada.

Tanto nas amostras de *A. pallens* como em *P. versicolor* houve maior concentração na cutícula de compostos pesados e no veneno de compostos leves, variando de forma significativa, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. De acordo com Blomquist e Bagnères [10] compostos abaixo do C20 são voláteis e, portanto, podem atuar como sinais emitidos e recebidos a certa distância; enquanto que os com peso molecular acima disto podem atuar como feromônio de superfície [63].

Os compostos relativamente mais leves, de acordo com Blomquist e Bagnères [10] são os mais voláteis, e alguns estudos com vespas sociais [28,29, 33-35, 63-67] demonstraram que a defesa da colônia é realizada por uma resposta coletiva dos componentes voláteis do veneno, que conseqüentemente atuam como feromônios de alarme desencadeando ataques e recrutando as companheiras do ninho. Assim, a presença de um número significativo de compostos apolares no veneno das duas espécies sugere que ao menos parte deles possa estar envolvida em algum tipo de sinalização química. De fato, Post & Jeanne [30] avaliaram que

elementos voláteis do veneno de três espécies de vespas são responsáveis por atrair e estimular o comportamento de machos, sendo que machos de *P. fuscatus* respondem ao veneno de *Polistes exclamans* e *Vespula maculifrons*, embora a intensidade da resposta seja menor quando comparado ao da própria espécie, sugerindo que pelo menos alguns dos componentes voláteis do veneno são semelhantes quimicamente e que os componentes podem variar entre as espécies apenas nas suas proporções relativas.

Nas amostras de *A. pallens* foram identificados mais compostos no veneno do que nas de *P. versicolor*. Parece provável que *A. pallens* utilize os compostos presentes no veneno de forma mais efetiva para intermediar a comunicação entre os companheiros de ninho, sobretudo para a defesa da colônia, já que por terem populações grandes estas vespas, provavelmente, utilizam os compostos voláteis do veneno para alertar as companheiras de ninho, uma vez que a própria estrutura do ninho é maior. Já *P. versicolor* como as colônias contém poucos indivíduos, talvez elas não utilizem de maneira tão efetiva os compostos do veneno para este fim, ou ao menos estes compostos não precisam agir a distâncias relativamente longas. Desse modo, maior complexidade no perfil do veneno pode indicar maior ação durante as interações possibilitando à informação atingir um maior número de operárias.

*Polistes versicolor* compartilha qualitativamente mais compostos entre as amostras de veneno e cutícula do que *A. pallens*, entretanto, na figura 3, os resultados mostram maior sobreposição dos dados de *A. pallens*. Neste caso, a maior sobreposição é explicada porque as amostras de *A. pallens*, exibem maior similaridade dos teores dos compostos que são compartilhados. Neste sentido, tanto para uma espécie, quanto para outra, os compostos compartilhados sugerem que eles possam ser aqueles mais efetivos como sinais trocados durante as interações entre companheiras de ninho. De fato, a literatura tem demonstrado a importância da variação no teor dos compostos para a comunicação química intraespecífica de vespas [59-61].

A maior sobreposição dos dados de *A. pallens* (Figura 3), sugerem que os mesmos compostos usados para mediar interações na cutícula também podem ser utilizados no veneno. Portanto, por ser uma espécie mais derivada, que se organiza em colônias mais populosas, podem ter um sistema mais elaborado de sinalização. *Polistes versicolor* é uma espécie menos derivada, cujas colônias são relativamente pouco populosas e podem ter em função disto, um sistema de alarme mais rudimentar [62].

## CONCLUSÃO

Os resultados mostram que, embora sejam vespas de tipos de fundação diferentes e que se organizam em colônias com número populacional significativamente diferente, a variação do tamanho da cadeia de compostos é relativamente similar. Também nos dois tipos de amostras de ambas as espécies, os compostos mais importantes são os alcanos ramificados que são reconhecidamente os mais efetivos durante as interações entre companheiras de ninhos. Contudo, há significativamente maior similaridade de teores dos compostos compartilhados entre as amostras da cutícula e veneno de *A. pallens*, sugerindo que os mesmos compostos usados para mediar interações na cutícula também são utilizados no veneno. Portanto, por ser uma espécie que se organiza em colônias mais populosas podem ter um sistema mais elaborado de sinalização, baseado nos compostos voláteis de seu veneno, embora, de fato, sejam necessários testes comportamentais para se comprovar isto.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) pela bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor (Chamada FUNDECT/CAPES n° 03/2014). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). e os autores também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de produtividade (WFAJ Número de concessão 307998/2014-2). (CALC Número de concessão 310801/2015-0). SISBIO pela autorização de coleta e do transporte de espécimes (SISBIO licença No.1748-1).

### **Contribuição dos autores:**

A ideia original da pesquisa foi concebida por Angelica Mendonça e William Fernando Antonialli Junior. Angelica Mendonça, Kamylla Balbuena Michelutti e Claudia Andrea Lima Cardoso realizaram os experimentos e analisaram os dados. Angelica Mendonça redigiu o manuscrito. Todos os autores revisaram e aprovaram o manuscrito final.

**Conflitos de interesses:** os autores declaram não haver conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. Lockey, K.H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **1988**, 89(4), 595-645, DOI 10.1016/0305-0491(88)90305-7
2. Abdalla, F.C.; Jones, G.R.; Morgan, E.D.; Cruz-Landim, C. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Meliponini) workers and queens. *Genet. Mol. Res.* **2003**, 2, 191-199.
3. Ginzel, M.D. Hydrocarbons as contact pheromones of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). In *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*, Blomquist, G.J.; Bagnères, A.G, Eds; Cambridge: Cambridge University Press, New York, **2010**; pp. 375-389.
4. Neves, E.F. Andrade, L.H.C. Suárez, Y.R. Lima, S.M. Antonialli-Junior, W.F. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genet. Mol. Res.* **2012**, 11(3), 1891-1898, DOI doi.org/10.4238/2012.July.19.8.
5. Olaniran, A.O.; Sudhakar, A.V.S.; Drijfhout, F.P.; Dublon, I.A.N.; Hall, D.R.; Hamilton, J.G.C.; Kirk, W.D.J. A male-predominant cuticular hydrocarbon, 7-methyltricosano, is used as a contact pheromone in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. *J. Chem. Ecol.* **2013**, 39, 559-568, DOI 10.1007/s10886-013-0272-5
6. Bello, J.E.; McElfresh, J.S.; Millar, J.G. Isolation and determination of absolute configurations of insect-produced methyl-branched hydrocarbons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2015**, 112(4), 1077-1082, DOI 10.1073/pnas.1417605112
7. Provost, E.; Blight, O.; Tirard, A.; Renucci, M. Hydrocarbons and insects' social physiology. In *Insect Physiology: new research*, Maes, R.P., Eds.; Nova Science Publishers. New York, **2008**; pp. 19-72.
8. Devigne, C.; Biseau, J.C. The differential response of workers and queens of the ant *Lasius niger* to an environment marked by workers: Ants dislike the unknown. *Behav. Processes.* **2012**, 91, 275-281, DOI doi.org/10.1016/j.beproc.2012.09.008.
9. Gibbs, A. G. Water-proofing properties of cuticular lipids. *Amer. Zool.* **1998**, 38, 471-482.
10. Blomquist, G.; Bagnères, A.G. *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology*; Cambridge: Cambridge University Press, UK, **2010**.
11. Butts, D. P.; Espelie, K. E.; Hermann, H. R. Cuticular hydrocarbons of four species of social wasps in the subfamily Vespinae: *Vespa crabro* L.. *Dolichovespula maculata*



- (L.). *Vespula squamosa* (Drury). and *Vespula maculifrons* (Buysson). *Comp. Biochem. Physiol. B.* **1991**, *99(1)*, 87-91.
12. Antonialli-Junior, W.F.; Suárez, Y.R.; Izida, T.; Andrade, L.H.C.; Lima, S.M. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.* **2008**, *7(2)*, 559-566.
  13. Ferreira, A.C.; Cardoso, C.A.L.; Neves, E.F.; Suárez, Y. R.; Antonialli-Junior, W.F. Distinct linear hydrocarbon profiles and chemical strategy of facultative parasitism among *Mischocyttarus* wasps. *Genet. Mol. Res.* **2012**, *11(4)*, 4351-4359, DOI 10.4238/2012.September.25.3.
  14. Santos, A.B.; Nascimento, F.S. Cuticular Hydrocarbons of Orchid Bees Males: Interspecific and Chemotaxonomy Variation. *PloS one* **2015**, *10(12)*, e0145070, DOI 10.1371/journal.pone.0145070.
  15. Nunes, T.M.; Turatti, I.C.C.; Mateus, S.; Nascimento, F.S.; Lopes, N.P.; Zucchi, R. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera. Apidae. Meliponini): differences between colonies, castes and age. *Genet. Mol. Res.* **2009**, *8(2)*, 589-595.
  16. Ferreira-Caliman, M.J.; Falcón, T.; Mateus, S.; Zucchi, R.; Nascimento, F.S. Chemical identity of recently emerged workers, males, and queens in the stingless bee *Melipona marginata*. *Apidologie* **2013**, *44(6)*, 657-665, DOI 10.1007/s13592-013-0214-9.
  17. Lorenzi, M.C.; Sledge, M.F.; Laiolo, P.; Sturlini, E.; Turillazzi, S. Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominula* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. *J. Insect Physiol.* **2004**, *50*, 935-941.
  18. Bos, N.; Dreier, S.; Jorgensen, C.G.; Nielsen, J.; Guerrieri, F.J.; D'ettore, P. Learning and perceptual similarity among cuticular hydrocarbons in ants. *J. Insect. Physiol.* **2012**, *58*, 138-146 DOI10.1016/j.jinsphys. 2011.10.010.
  19. Costanzi, E.; Bagnères, A.G.; Lorenzi, M.C. Changes in the hydrocarbon proportions of colony odor and their consequences on nestmate recognition in social wasps. *Plos One.* **2013**, *8(5)*, e65107 DOI 10.1371/journal.pone.0065107.
  20. Cuvillier-Hot, V.; Cobb, M.; Malosse, C.; Peeters, C. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J. Insect. Physiol.* **2001**, *47*, 485-493.

21. Sledge, M.F.; Boscaro, F.; Turillazzi, S. Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2001**, *49*(5), 401-409 DOI 10.1007/s002650000311.
22. Van Oystaeyen, A.; Oliveira, R.C.; Holman, L.; Van Zweden, J.S.; Romero, C. O.C.A.; Millar, J.G. Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. *Science.* **2014**, *343*(6168), 287-290 DOI 10.1126/science.1244899.
23. Blomquist, G.J.; Tillman, J.A.; Mpuru, S.; Seybold, S.J. The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure. function. and biochemistry. In *Pheromone communication in social insect*, Vander Meer, R.K.; Breed, M.D.; Winston, M.L.; Espelie, K.E., Eds.; Westview Press, Boulder, **1998**; pp. 35-54.
24. Lenoir, A.; Fresneau, D.; Errard, C.; Hefetz, A. Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. In *Information Processing in Social Insects*, Detrain, C.; Deneubourg, J.L.; Pasteels, J.M., Eds.; Basel: Birkhäuser Verlag, **1999**; pp. 219-237.
25. Biseau, J.C.; Passera, L.; Daloz, D.; Aron, S. Ovarian activity correlates with extreme changes in cuticular hydrocarbon profile in the highly polygynous ant. *Linepithema humile*. *J. Insect. Physiol.* **2004**, *50*, 585-593.
26. Antonialli-Junior, W.F.; Lima, S.M.; Andrade, L.H.C.; Suárez, Y.R. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.* **2007**, *6*(3), 492-499.
27. Mateus, S. Observations on forced colony emigration in *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini): New nest site marked with sprayed venom. *Psyche: A Journal of Entomology (Cambridge)*. **2011**, 1-8.
28. Bruschini, C.; Cervo, R.; Turillazzi, S. Evidence of alarm pheromones in the venom of *Polistes dominulus* workers (Hymenoptera: Vespidae)." *Physiol. Entomol.* **2006a**, *31*(3), 286-293.
29. Bruschini, C.; Cervo, R.; Protti, I.; Turillazzi, S. Caste differences in venom volatiles and their effect on alarm behaviour in the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ). *J. Exp Biol.* **2008**, *211*(15), 2442-2449.
30. Post, D.C.; Jeanne, R.L. Venom as an interspecific sex pheromone. and species recognition by a cuticular pheromone in paper wasps (*Polistes*, Hymenoptera: Vespidae). *Physiol Entomol.* **1984**, *9*(1), 65-75.

31. Schremmer, F. Beobachtungen zur Biologie von *Apoica pallida* (Olivier. 1791). Einer Neotropischen Sozialen Faltenwespe (Hymenoptera. Vespidae). *Insectes Soc.* **1972**, *19*(4), 343-357.
32. Richards, O.W. *The social wasps of America excluding the Vespinae*. British Museum (Natural History), London, **1978**; 580 p.
33. Sledge, M.F.; Dani, F.R.; Fortunato, A.; Maschwitz, U.; Clarke, S.R.; Francescato, E.; Turillazzi, S. Venom induces alarm behaviour in the social wasp *Polybioides raphigastra* (Hymenoptera: Vespidae): an investigation of alarm behavior, venom volatiles and sting autotomy. *Physiol. Entomol.* **1999**, *24*(3), 234-239 DOI 10.1046/j.1365-3032.1999.00137.x.
34. Dani, F.R.; Jeanne, R.L.; Clarke, S.R.; Jones, G.R.; Morgan, E.D.; Francke, W.; Turillazzi, S. Chemical characterization of the alarm pheromone in the venom of *Polybia occidentalis* and of volatiles from the venom of *P. sericea*. *Physiol. Entomol.* **2000**, *25*(4), 363-369.
35. Bruschini, C.; Dani, F.R.; Pieraccini, G.; Guarna, F.; Turillazzi, S. Volatiles from the venom of five species of paper wasps (*Polistes dominulus*. *P. gallicus*. *P. nimphus*. *P. sulcifer* and *P. olivaceus*). *Toxicon.* **2006b**, *47*(7), 812-825 DOI 10.1016/j.toxicon.2006.03.002.
36. Silva, E.R.S; Michelutti, K.B.; Antonialli-Junior, W.F.; Batistote, M.; Cardoso, C.A.L. Chemical signatures in the developmental stages of *Protopolybia exigua*. *Genet. Mol. Res.* **2016**, *15*(1), 1-12 DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017586>.
37. Richards, O.W. The biology of the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). *Biol. Rev.* **1971**, *46*, 483–528.
38. West-Eberhard, M.J. *Monogyny in “polygynous” social wasps*. Proc. 7th Cong. I.U.S.S.I. London, **1973**; pp. 396–403
39. Paula, M.C.; Antonialli-Junior, W.F.; Mendonça, A.; Michelutti, K.B.; Eulalio, A.D.M.M.; Cardoso, C.A.; Lima, T. Von Zuben, C.J. Chemotaxonomic profile and intraspecific variation in the blow fly of forensic interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* **2017**, *54*, 14-23 DOI [doi.org/10.1093/jme/tjw142](http://doi.org/10.1093/jme/tjw142).
40. Van den Dool, H.; Kratz, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463-471.

41. Brown, W.V.; Spradbery, J.P.; Lacey, M.J. Changes in the cuticular hydrocarbon composition during development of the social wasp. *Vespula germanica* (F.)(Hymenoptera: Vespidae). *Comp. Biochem. Physiol. B.* **1991**, *99*(3), 553-562.
42. Howard, R.W.; Pérez-Lachaud, G.; Lachaud, J.P. Cuticular hydrocarbons of *Kapala sulcifacies* (Hymenoptera: Eucharitidae) and its host the ponerine ant *Ectatomma ruidum* (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2001**, *94*(5), 707-716.
43. Zhu, G.H.; Ye, G.Y.; Hu, C.; Xu, X.H.; Li, K. Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. *Med. Vet. Entomol.* **2006**, *20*(4), 438-444.
44. Moore, H.E.; Adam, C.D.; Drijfhout, F.P. Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. *Forensic Sci. Int.* **2014**, *240*, 48-53 DOI 10.1016/j.forsciint.2014.04.002.
45. Weiss, K.; Parzefall, C.; Herzner, G. Multifaceted defense against antagonistic microbes in developing offspring of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera. Ampulicidae). *PloS One* **2014**, *9*(6), e98784 DOI 10.1371/journal.pone.0098784.
46. Dapporto, L.; Theodora, P.; Spacchini, C.; Pieraccini, G.; Turillazzi, S. Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominula* (Christ) (Hymenoptera. Vespidae). *Insectes Soc.* **2004a**, *51*(3), 279-286 DOI 10.1007/s00040-004-0738-0.
47. Dapporto, L.; Sledgeb, F.M.; Turillazzi, S. Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphanod nests (Hymenoptera, Vespidae). *J. Insect Physiol.* **2005**, *51*, 969-973.
48. Khidr, S.K.; Linforth, R.S.; Hardy, I.C. Genetic and environmental influences on the cuticular hydrocarbon profiles of *Goniozus* wasps. *Entomol. Exp. Appl.* **2013**, *147*(2), 175-185. DOI 10.1111/eea.12058.
49. Soares, E.R.P.; Batista, N.R.; da Silva, R.S.; Torres, V.O.; Cardoso, C.A.L.; Nascimento, F.S.; Antonialli-Junior, W.F. Variation of cuticular chemical compounds in three species of *Mischocyttarus* (Hymenoptera: Vespidae) eusocial wasps. *Ver. Bras. Entomol.* **2017**, *61*(3), 224-231 DOI <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.05.001>.
50. Kudô, K.; Oliveira, L.A.; Mateus, S.; Zucchi, R.; Nascimento, F.S. Nestmate larval discrimination by workers in the swarm-founding wasp *Polybia paulista*. *Ethol. Ecol. Evol.* **2016**, 1-11 DOI 10.1080/03949370.2015.1129363.

51. Espelie, K.E.; Gamboa, G.J.; Grudzien, T.A.; Bura, E.A. Cuticular hydrocarbons of the paper wasp *Polistes fuscatus*: a search for recognition pheromones. *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*(7), 1677-1687 DOI 10.1007/BF02059889.
52. Brito, J.H. S.; Montagna, T.S.; Maia, F.S.; Antonialli-Junior, W.F.; Cardoso, C.A.L. Cuticular signature in the development of *Polistes versicolor*. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14* (4):12520-12528.
53. Sledge, M.F.; Dani, F.R.; Fortunato, A.; Maschwitz, U.; Clarke, S.R.; Francescato, E.; Turillazzi, S. Venom induces alarm behaviour in the social wasp *Polybioides raphigastra* (Hymenoptera: Vespidae): an investigation of alarm behavior, venom volatiles and sting autotomy. *Physiol. Entomol.* **1999**, *24*(3), 234-239 DOI 10.1046/j.1365-3032.1999.00137.x.
54. Lorenzi, M.C.; Azzani, L.; Bagnères, A-G. Evolutionary consequences of deception: Complexity and informational content of colony signature are favored by social parasitism. *Current Zoology* **2014**, *60*(1), 137-148.
55. Beani, L. Crazy wasps: when parasites manipulate the *Polistes* phenotype. *Ann. Zool. Fenn.* **2006**, *43*, 564-574.
56. Dapporto, L.; Cini, A.; Palagi, E.; Morelli, M.; Simonti, A.; Turillazzi, S. Behaviour and chemical signature of pre-hibernating females of *Polistes dominulus* infected by the strepsipteran *Xenos vesparum*. *Parasitology* **2007**, *134*, 545-552.
57. Kudô, K.; Komatsu, K.; Mateus, S.; Zucchi, R.; Nascimento, F.S. Presence of Strepsiptera parasites in the independent-founding wasp, *Polistes satan*. *Sociobiology* **2014**, *61*, 237-238.
58. Torres, VO; Soares, ERP; Lima, LD; Lima, SM, Andrade, LHC; Antonialli-Junior, WF. Morphophysiological and cuticular chemical alterations caused by *Xenos* entomophagus endoparasites in the social wasp *Polistes ferreri* (Hymenoptera, Vespidae). *Parasitology* **2016**, 1-6 DOI 10.1017/S0031182016001529
59. Panok, L.M.; Gamboa, G.J. Queens of the Paper Wasp *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae) Discriminate among Larvae on the Basis of Relatedness. *Ethology* **2000** *106*, 159-170.
60. Cotoneschi, C.; Dani, F.R.; Cervo, R.; Scala, C.; Strassmann, J.E.; Queller, D.C.; Turillazzi, S. *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) Larvae Show Different Cuticular Patterns According to their Sex: Workers Seem Not Use This Chemical Information. *Chem. Senses* **2007** *34*, 195–202, 2009. DOI 10.1093/chemse/bjn079.

61. Bonelli, M.E.; Lorenzi M.C.; Christidès, J.P.; Dupont, S.; Bagnères, A-G. Population Diversity in Cuticular Hydrocarbons and mtDNA in a Mountain Social Wasp. *J. Chem. Ecol.* **2015**, *41*, 22-31 DOI 10.1007/s10886-014-0531-0
62. Jeanne, R.L. Evidence for an alarm substance in *Polistes canadensis*. *Cell. Mol. Life Sci.* **1982**, *38(3)*, 329-330.
63. Ishay, I.; Ikan, R.; Bergmann, E.D. The presence of pheromones in the Oriental hornet. *Vespa orientalis* F. *Journal of Insect Physiology.* **1965**, *11(9)*. 1307-1309.
64. Jeanne, R.L. Alarm recruitment. attack behavior and the role of the alarm pheromone in *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* **1981**, *9(2)*, 143-148.
65. Post, D.C.; Downing, H.A.; Jeanne, R.L. Alarm response to venom by social wasps *Polistes exclamans* and *P. fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). *J. Chem. Ecol.* **1984**, *10(10)*, 1425-1433.
66. Veith, H.J.; Koeniger, N.; Maschwitz, U. 2-Methyl-3-butene-2-ol. a major component of the alarm pheromone of the hornet *Vespa crabro*. *Naturwissenschaften.* **1984**, *71(6)*, 328-329.
67. Kojima, J. Evidence for an alarm pheromone in *Ropalidia romandi* (Le Guillou) (Hymenoptera: Vespidae). *Austral Entomology.* **1994**, *33(1)*, 45-47.
68. Gibbs, A.G. Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *J. Insect. Physiol.* **2002**, *48(4)*, 391-400.
69. Menzel, F.; Blaimer, B.B.; Schmitt, T. How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. *Proc. Biol. Sci.* **2017**, *284(1850)*, 20161727 DOI 10.1098/rspb.2016.1727.
70. Arnold, M.T.; Regnier, F.E. Stimulation of hydrocarbon biosynthesis by ecdysterone in the flesh fly *Sarcophaga bullata*. *J. Insect Physiol.* **1975**, *21(9)*, 1581-1586.
71. Tannure-Nascimento, I.C.; Nascimento, F.S.; Turatti, I.C; Lopes, N.P.; Trigo, J.R.; Zucchi, R. Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a Neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae). *Genet. Mol. Res.* **2007**, *6(2)*, 390–396.

## **CAPÍTULO II**

### **Proteômica do veneno de *Apoica pallens* (Hymenoptera: Vespidae)**

\* Formatado nas normas da revista Journal of Proteomics ISSN 1874-3919, qualis para biodiversidade: B1.  
Ainda não foi enviado a revista.

## Proteômica do veneno de *Apoica pallens* (Hymenoptera: Vespidae)

Angélica Mendonça<sup>a</sup>; Rafaella Caroline Bernardi<sup>b</sup>; Ellen Liciano Barbosa Firmino<sup>b</sup>; Pollyanna Pereira Santos<sup>c</sup>; Denise Sguarizi Antonio<sup>b</sup> José Eduardo Serrão<sup>d</sup>; Claudia Andrea Lima Cardoso<sup>b</sup>; William Fernando Antonialli Junior<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

<sup>b</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais.

<sup>c</sup>Universidade Federal do Maranhão, Campus de Bacabal.

<sup>d</sup>Universidade Federal de Viçosa, Campus de Viçosa.

Autor correspondente: angel\_biol@yahoo.com.br

### RESUMO

A ordem Hymenoptera representa um grupo diversificado de insetos com o desenvolvimento de um aparato ferroador e glândulas de produção de veneno, usadas como mecanismo de auxílio na captura de presas e/ou defesa da colônia. O veneno é definido como uma secreção produzida por glândulas especializadas capaz de alterar ou interromper processos biológicos ou fisiológicos normais do organismo alvo, sendo que o veneno é resultado de um processo evolutivo de milhões de anos, o qual permitiu o desenvolvimento e incorporação de uma grande quantidade de diferentes conjuntos de compostos. A caracterização bioquímica do veneno de Hymenoptera tornou-se o foco de pesquisas na área de alergia e imunologia, nas quais a abordagem proteômica tem sido uma excelente alternativa para auxiliar o desenvolvimento de extratos mais específicos, como aqueles com potencial farmacêutico. Assim, dada ainda a escassez de estudos sobre o veneno de vespas e as ferramentas disponíveis para o estudo deste material glandular, o objetivo deste estudo foi identificar as proteínas presentes no veneno da vespa eussocial *Apoica pallens*, como primeiro passo para posterior análise aplicada de seus constituintes proteicos. Os constituintes do veneno foram separados por eletroforese em um gel bidimensional (2D), e posteriormente após digestão, analisados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. Foram detectados 259 *spots* com massas moleculares que variaram no gel entre 4,9 a 141 kDa, e foram excisados 180 *spots*, destes, 30 foram passíveis de identificação, divididos em 8 categorias com base em suas funções: alergênicas (1 proteína), enzimáticas (7 proteínas), metabólicas (9 proteínas), estruturais (4 proteínas), resposta ambiental (3 proteínas), proteoglicana (1 proteína), atuantes no DNA e RNA (3 proteínas) e com função desconhecida (2 proteínas). Devido ao número reduzido de dados proteômicos para o veneno de vespas, há um grande número de proteínas que não possuem funções conhecidas em banco de dados, e que conseqüentemente, não são passíveis de identificação, fato que torna ainda mais importante estudos com análise proteômica do veneno de Hymenoptera.

**Palavras chave:** Espectrometria de massas, MALDI-TOF/TOF, proteínas, vespas.



## **Proteomic of *Apoica pallens* (Hymenoptera: Vespidae) venom**

**Abstract:** The order Hymenoptera represents a diverse group of insects with the development of a sting apparatus and glands for venom production, used as a mechanism to help in prey capture and/or colony defense. The venom is defined as a secretion produced by specialized glands capable of change or disrupt normal physiological or biological processes of the target organism, and is the result of an evolutionary process of millions of years, which has enabled the development and incorporation of many different sets of compounds. Biochemical characterization of Hymenoptera venom became the focus of researches in the areas of Allergy and Immunology, in which proteomic approach has been an excellent alternative to assist in the development of more specific extracts, such as those with pharmacological potential. Thus given the still scarcity of studies on venom of wasps and the tools available for the study of this glandular material, the aim of this study was to identify the proteins present in the venom of the eusocial wasp *Apoica pallens*, as a first step for further applied analysis of their protein constituents. Venom constituents were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2D), and later after digestion, analyzed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. 259 spots were detected with molecular weights ranging from 4.9 to 141 kDa, and 180 spots were excised, 30 of these were identified and divided into 8 categories based on their function: allergenic (1 protein), enzymatic (7 proteins), metabolic (9 proteins), structural (4 proteins), environmental response (3 proteins), proteoglycan (1 protein), active in DNA and RNA (3 proteins) and with unknown function (2 proteins). Due to the small number of proteomic data regarding the venom of wasps, there is a large number of proteins whose function is not described in the database, and consequently are not identified, which makes studies with proteomic analysis of venom of Hymenoptera even more important.

**Keywords:** Mass spectrometry, MALDI-TOF/TOF, proteins, wasps.

### **1. Introdução**

A ordem Hymenoptera representa um grupo diversificado de insetos, com uma estimativa de cerca de 120 mil espécies existentes distribuídas entre vespas, abelhas e formigas [1]. Dentro do grupo, o desenvolvimento de um aparato ferroador e glândulas de produção de veneno, usadas como mecanismo de auxílio na captura de presas e, ou, defesa da colônia, foi uma das peças chave para o sucesso evolutivo destes insetos [2,3].

O veneno é definido como uma secreção produzida por glândulas especializadas capaz de alterar ou interromper processos biológicos ou fisiológicos normais do organismo alvo [4]. Além da função ofensiva e defensiva, este material glandular também pode atuar como ferômonio de alarme a partir dos compostos de maior volatilidade presentes no veneno atua como inseticida [5,6] e agir como antisséptico, atuando sobre bactérias, fungos, protozoários e vírus [6,7].

A função antisséptica do veneno faz parte da imunidade inata destes animais e tem seu valor evolutivo inicial associado à necessidade de minimizar o potencial de contaminação

pela presa [6,7]. Especificamente nos insetos eussociais, onde há homogeneidade genética acentuada e proximidade física entre os indivíduos da colônia, um ambiente ideal para a disseminação de doenças infecciosas, o veneno passou a ser usado, além da assepsia da presa para predadores, também como medida profilática na higienização dos indivíduos da colônia e de estruturas do ninho, sendo que a evolução da socialidade foi acompanhada pela evolução dos agentes associados à imunidade social em Hymenoptera [8,9].

Deste modo, a característica antisséptica do veneno, acresceu ainda mais o interesse sobre os compostos presentes neste material glandular, tanto para o conhecimento da evolução destes compostos associados à contribuição na imunidade inata e na eussocialidade [8,9], como o interesse no uso destes compostos como modelos para o desenvolvimento de novos produtos com atuação terapêutica [10], o que tem sido bastante explorado nas últimas décadas [11-14].

A composição do veneno de Hymenoptera é resultado de um processo evolutivo de milhões de anos, no qual ocorreu o desenvolvimento e incorporação de uma grande quantidade de diferentes conjuntos de compostos [4]. Apesar dos padrões encontrados no veneno, sua composição pode variar mesmo dentro de uma única espécie [15-17]. Nas vespas, o veneno é composto especificamente por amins biologicamente ativas, principalmente serotonina e histamina que são responsáveis pela dor, vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos, facilitando a penetração das toxinas no tecido [18,19], além de possuir compostos de maior volatilidade, lipídios, pequenos peptídeos e proteínas de baixo e alto peso molecular, que atuam como toxinas, enzimas (fosfolipases, hialuronidases e fosfatases) e alérgenos [20-22].

Nos humanos, uma única ferroadada pode causar inflamação local caracterizada por dor, vermelhidão e inchaço [23]. Estudos mostram [24, 25] que a população geral apresenta reação de hipersensibilidade tipo 1, que promove uma série de problemas clínicos, como urticária, mal-estar, angioedema, constrição torácica, diarreia, dor abdominal, fraqueza, edema, fadiga, tonturas, náuseas, febre e inconsciência, bem como queda na pressão sanguínea, colapso, cianose, sintomas cardiovasculares até choque anafilático sistêmico. As múltiplas ferroadadas podem ser fatais como resultado de ação tóxica quando injetados em grandes quantidades [26], sendo que a reação sistêmica ocorre em 5% da população em geral [27].

Assim, a caracterização bioquímica do veneno de Hymenoptera tornou-se o foco de pesquisas na área de alergia e imunologia, em que a abordagem proteômica tem sido uma excelente alternativa para auxiliar o desenvolvimento de extratos mais específicos para diagnóstico e tratamento de pessoas hipersensíveis. Estes estudos podem contribuir para aumentar o conhecimento sobre bioquímica dos venenos e oferecer bases científicas para o

desenvolvimento futuro de alérgenos recombinantes para uso diagnóstico e terapêutico contra alergias ao veneno de Hymenoptera [28].

Além disso, o estudo sobre o potencial farmacológico dos compostos do veneno são de suma importância, como mostrou um estudo recente de Leite et al. [29] sobre as propriedades do veneno da vespa *Polybia paulista*, no qual o peptídeo isolado desta espécie apresentou atividade de formação de poros nas membranas de células cancerígenas, ocasionando a morte celular sem danificar as células saudáveis. Contudo, ainda pouco se sabe sobre a ação efetiva de compostos encontrados no veneno de himenópteros sociais, resultado, sobretudo, da quantidade limitada que pode ser obtida a partir de um único indivíduo [15, 20], além das dificuldades de dissecções e extração deste material glandular [30]. No entanto, as novas ferramentas de isolamento e os avanços em espectrometria de massas e banco de dados de compostos, se tornaram importantes aliados para o progresso em pesquisas com o veneno do grupo, permitindo que mesmo pequenas quantidades de amostra possam ser estudadas [15,31].

Assim, apesar do interesse sobre o veneno destes insetos, ainda pouco se sabe sobre a composição química deste material glandular de vespas sociais. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar as proteínas presentes no veneno da vespa eussocial *Apoica pallens*, primeiro passo para investigar o uso aplicado do veneno bruto e/ou compostos isolados.

*Apoica pallens* é uma espécie de vespa social de hábito noturno [32], conhecida popularmente no Brasil como “vespa chapéu” ou “vespa chuva”. Aspectos de sua biologia e ecologia são pouco conhecidos.

## **2. Material e métodos**

### ***2.1. Coleta e preparação das amostras***

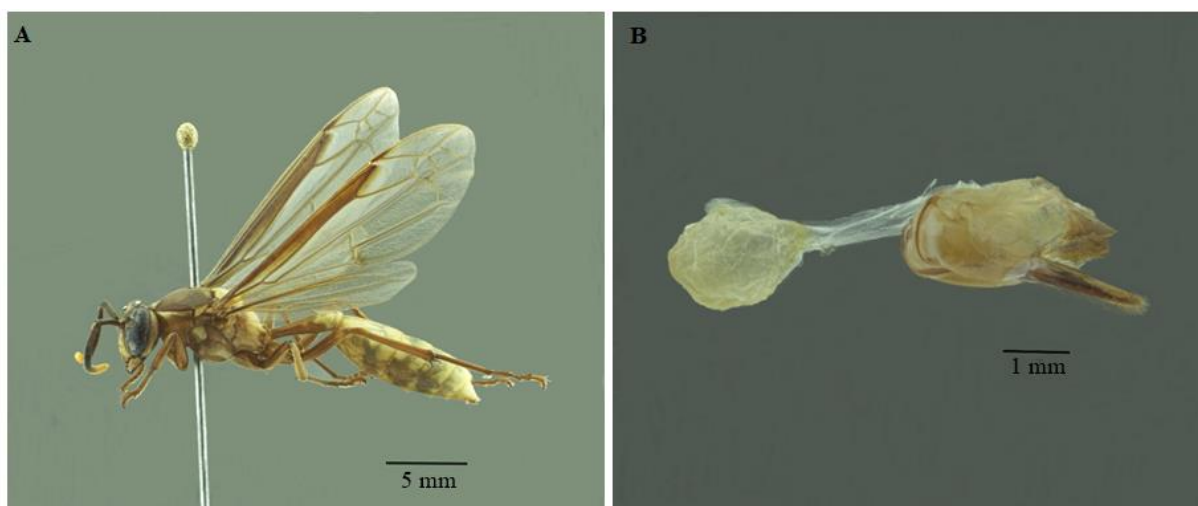
Foram utilizados 1.600 fêmeas de *A. pallens* (Fig. 1 A), de uma única colônia, coletados em Dourados-MS, Brasil (22°14'38.8"S, 54°49'36.6"W) em fevereiro de 2015. A coleta foi realizada com auxílio de sacos plásticos e algodão embebido em éter. O saco plástico foi envolto ao ninho para tentar coletar o maior número possível de indivíduos da colônia. Logo após a coleta, o algodão com éter foi retirado o mais rápido possível para não interferir na composição química dos indivíduos. Em seguida, as vespas foram conduzidas ao laboratório, onde foram anestesiadas sob a ação de baixa temperatura para posterior extração do reservatório de veneno.

A extração do reservatório de veneno ocorreu por dissecação, em água ultra pura a fim de evitar que os compostos de membrana fossem extraídos, com auxílio de pinça e

microscópio estereoscópio, e, com a posterior remoção dos filamentos glandulares e do ferrão (Fig 1 B). Para retirar o veneno, o reservatório foi levemente pressionado dentro de um microtubo, até a liberação do seu conteúdo. Na sequência, as amostras foram centrifugadas à 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C para separação da membrana do invólucro, dos compostos veneníferos. O sobrenadante foi separado e congelado a -20 °C para posterior análise.

A concentração de proteínas totais presentes no veneno foi determinada pelo método de Bradford [33], usando albumina de soro bovino como padrão. Durante todo o procedimento, todas as amostras foram mantidas em gelo para evitar a volatilização e degradação dos compostos presentes no veneno.

Para executar a análise proteômica do veneno, foram realizadas triplicatas metodológicas, por se tratar de amostras de uma única colônia. Os reagentes utilizados foram de grau analítico, Sigma-Aldrich (EUA), Bio-Rad (EUA), Dinâmica (Brasil), Labsynth (Brasil), Merk (Alemanha) ou Oxoid (Brasil). Os tampões utilizados foram todos preparados com água Milli-Q (ultra purificador Master All 2000, Gehaka, Brasil).



**Fig. 1.** **A** – Operária adulta de *Apoica pallens*; **B** –Aparelho ferroador de *Apoica pallens* mostrando o reservatório de veneno, os filamentos e o ferrão. (Mendonça, A.)

## 2.2. Eletroforese bidimensional em gel

Foram utilizadas fitas Immobiline DryStrip 7 cm, pH 3-10 (GE Healthcare) as quais foram reidratadas por 10 horas com 125  $\mu$ L de solução de reidratação. A solução de reidratação foi composta de 100  $\mu$ g de proteína do veneno de *A. pallens* (20,9  $\mu$ L de amostra), 2,5  $\mu$ L do tampão de gradiente imobilizado de pH 3 a 10 (IPG) 2% (v/v) que auxilia na condutividade elétrica durante a focalização, 5  $\mu$ L de Ditiotretitol (DTT) 40 mM para quebrar a conformação espacial da proteína e 96,6  $\mu$ L de solução Destreak (GE-Healthcare) utilizado

para diminuir o arrasto na segunda fase da separação, diminuindo a oxidação dos grupos Tioi da proteína.

A focalização isoeétrica, que separa as proteínas por seu ponto isoeétrico, foi realizada em equipamento IPGphor Ettan III, com modo linear de voltagem (300 V por 12 h; 1000 V por 30 min; 5000 V por 2 h; 5000 V por 1 h e 200 V por 1 h), na qual, em suas canaletas foram colocadas as fitas reidratadas e 10 mL de óleo mineral DryStrip Cover fluid (GE-Healthcare) que auxilia na condutividade elétrica durante a focalização.

Após a focalização as fitas com gradiente de pH imobilizado foram equilibradas em solução tampão de equilíbrio (ureia 6 M; 75 mM Hidroximetil Aminometano Cloridrato – Tris-HCl pH 8,8; 29% (v/v) de glicerol; 2% (w/v) Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e 0,002% de azul de bromofenol). As três fitas (triplicata) foram colocadas em duas soluções de equilíbrio, primeiro em 1% DTT e depois em 2,5% de iodacetamida (IAA). Em cada uma das soluções as fitas permaneceram em agitação por 15 minutos. Esta etapa foi aplicada para redução (equilíbrio com DTT) e alquilação (equilíbrio com IAA), de modo a equilibrar as fitas, ou seja, quebrar as pontes para “esticar” a proteína e possibilitar sua análise.

Em seguida, as 3 fitas reidratadas foram utilizadas para realizar a segunda dimensão do gel (2D), que separa as proteínas em duas dimensões, de acordo com o peso molecular e o peso isoeétrico. A segunda dimensão do gel foi realizada em cuba de eletroforese vertical da Mini Protean II (Bio Rad), em gel de poli(acrilamida) 14%, de acordo com a metodologia proposta por Laemmli [34] SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), no qual foi adicionado 50 µL de APS (Persulfato de amônia) 10% e 10 µL de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine), que são catalizadores da polimerização da acrilamida.

O sistema para a separação por massa molecular das proteínas foi montado e a solução de poli(acrilamida) foi aplicada entre as placas de vidro, que ficam montadas nos dois lados do gel. Após a polimerização da solução, as fitas equilibradas foram aplicadas no topo do gel, juntamente com o padrão de massa molecular (aplicado em um quadrado de papel filtro de 4cm por 4cm), em uma das extremidades no topo do gel. O topo do gel foi selado com agarose.

Para o processo de separação das proteínas por massa molecular (MM), foi usado sob o gel um tampão de amostra (Tris/HCl pH 6,8, 100mM SDS 4,0%, Azul de bromofenol 0,2%, Glicerol 20,0%, usado na proporção 1:10) e dentro da cuba de eletroforese foi utilizado um tampão de corrida (Tris 250mM, glicina pH 8,3 2,5M, SDS 1%), importante para manter constante o estado de ionização das moléculas que estão sendo separadas, já que qualquer variação no pH pode afetar a carga líquida e portanto, a mobilidade da partícula. Os eletrodos

da cuba foram conectados em uma fonte de alta tensão sob corrente elétrica de 80 W por 100 minuto.

Após a separação proteica, os géis passaram por solução fixadora de ácido acético 10% e etanol 40%, durante 30 minutos e, em seguida foram corados por 24 h em solução de Azul Brilhante de Comassie G-250, de acordo com Görg et al [35]. Na sequência, foram armazenados a 21°C em solução de 5% (v/v) de ácido acético até a obtenção das imagens e excisão dos *spots* (possíveis proteínas).

### **2.3. Obtenção e análise das imagens**

Os 3 géis obtidos por eletroforese foram digitalizados no equipamento Image Scanner III (GE-Healthcare) em modo de transparência, 16 bit, nas cores vermelha-azul e verde-azul, devido ao uso do corante Comassie Blue coloidal e 600 dpi (*dots per inch*) de resolução. As imagens foram analisadas pelo programa Image Master Platinum v.7 (GE Healthcare).

### **2.4. Digestão das amostras**

Seguindo o protocolo de Shevchenko et al. [36] para digestão de amostras, os “*spots*” obtidos do gel bidimensional foram excisados e adicionados em um microtubo contendo solução de acetonitrila 100%, e incubados. Posteriormente, em solução de DTT 10 mM por 30 min a 56 °C e em solução de iodoacetamida 55 mM por 20 min, seguido de lavagem em acetonitrila. Os fragmentos dos géis foram tratados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM contendo enzima tripsina (Promega, Sequencing Grade Modified Trypsin®), em concentração de 25 ng/μL, e incubados à 37 °C por 16 h. A extração dos compostos purificados nos fragmentos dos géis foi realizada pela adição de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. O extrato obtido foi liofilizado em SpeedVac® e ressuspendido em 10 μL de ácido trifluoroacético 0,1%. As amostras foram dessalinizadas utilizando ponteiras ZipTip com resina C18 (Pipette Tips for Sample Preparation- Millipore), secas a vácuo e preparadas para análise por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization time-of-flight).

### **2.5. Análises de espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF**

As amostras obtidas a partir da digestão em gel foram solubilizadas em 10 μL de solução de 0,1% (v/v) de TFA e misturados a matriz (2,5 mg/mL Matriz α-ciano-4-hidroxicinamico) preparada em 50% (v/v) de ACN e 0,1% (v/v) de TFA, na proporção de 1:1 (amostra: matriz). As alíquotas dessas amostras foram aplicadas em placa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF (Bruker Daltonics) e posteriormente submetidas a análises por

espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF em aparelho ULTRAFLEX III (Bruker Daltonics).

Na primeira fragmentação peptídica (MS), os espectros foram adquiridos por modo refletor (LPPepMix) com a faixa de detecção de 500 a 5.000 Da, que corresponde ao modo de detecção linear para íons com polaridade positiva, já para a segunda fragmentação peptídica (MS/MS), o método de análise foi o LIFT com faixa de 40 a 1.878 Da.

## **2.6. Identificação das proteínas**

Todos os espectros de massas obtidos por MALDI-TOF/TOF foram processados utilizando o software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics) para remover contaminantes e obter a lista de massas que, em seguida foram submetidas a dois software de pesquisa: MASCOT (Matrix Science Ltd, Reino Unido; Peptide Mass Fingerprint- PMF e MS/MS Ion Search) e Peaks DB 7.0 (Bioinformatic Solutions Inc., Canadá) para identificação das proteínas. As identificações do software MASCOT foram validadas pelo software Scaffold 4.0 (Proteome Software Inc., EUA), e as identificações oriundas do Peaks 7.0 foram validadas assumindo o FDR (*False Discovery Rate*) igual a 0,0%.

Para identificação das proteínas no MASCOT foram utilizadas as sequências proteicas depositadas no NCBI e no Swissprot, disponíveis publicamente, aos níveis de 0,5 e 0,1 kDa e 50 ppm de erro. Reações de carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina foram utilizadas como modificações fixas e variáveis, respectivamente. Metazoa (animais), Insecta e “proteínas a partir de veneno animal” (moluscos, serpentes, insetos, aracnídeos, anfíbios) foi selecionado como táxon para entrada nos bancos de dados. Resultados significativos foram considerados quando o Score da proteína sugerida foi superior ao Score calculado pelo software MASCOT, assumindo  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ .

Após análise pelo MASCOT os espectros de MS/MS também foram submetidos ao programa PEAKS Studio 7.0. As sequências proteicas sugeridas por este programa foram submetidas aos bancos de pesquisa UniProt Database, 2017 (<http://www.uniprot.org/>) [37] e as que tiveram ALC (*Average Local Confidence*) igual ou superior a 70%, foram submetidas ao MS Blast (<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/>). Resultados positivos sugeridos pelos bancos de pesquisa, e oriundos do banco de dados de veneno animal, foram aceitos como identificação positiva.

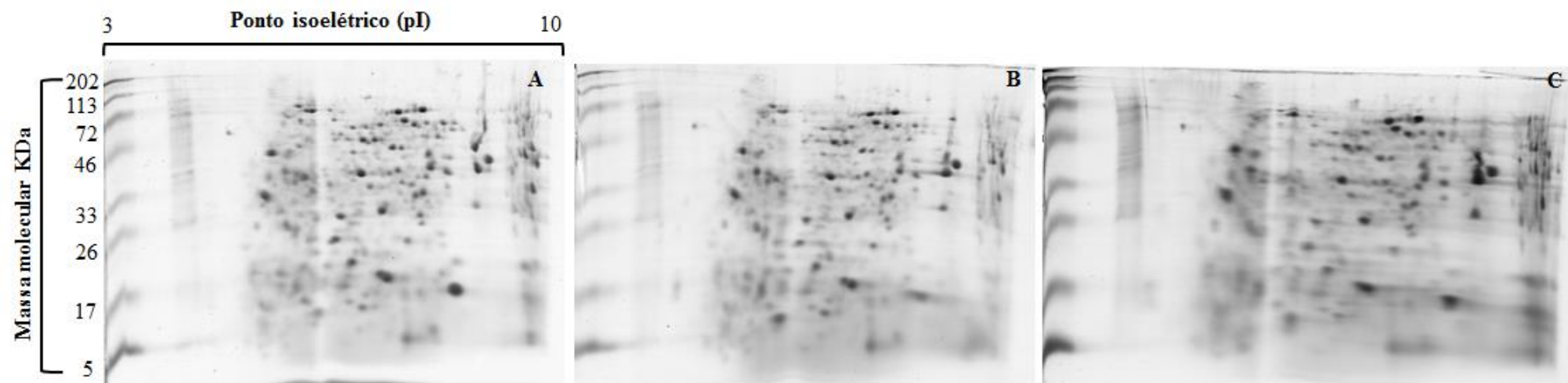
### 3. Resultados

A concentração de proteínas totais presentes no veneno bruto de *A. pallens* é de 19,79 µg/µL ( $\pm 5,88$ ). Os três géis da triplicata metodológica (Fig. 2) obtidos por eletroforese apresentam 92% de similaridade.

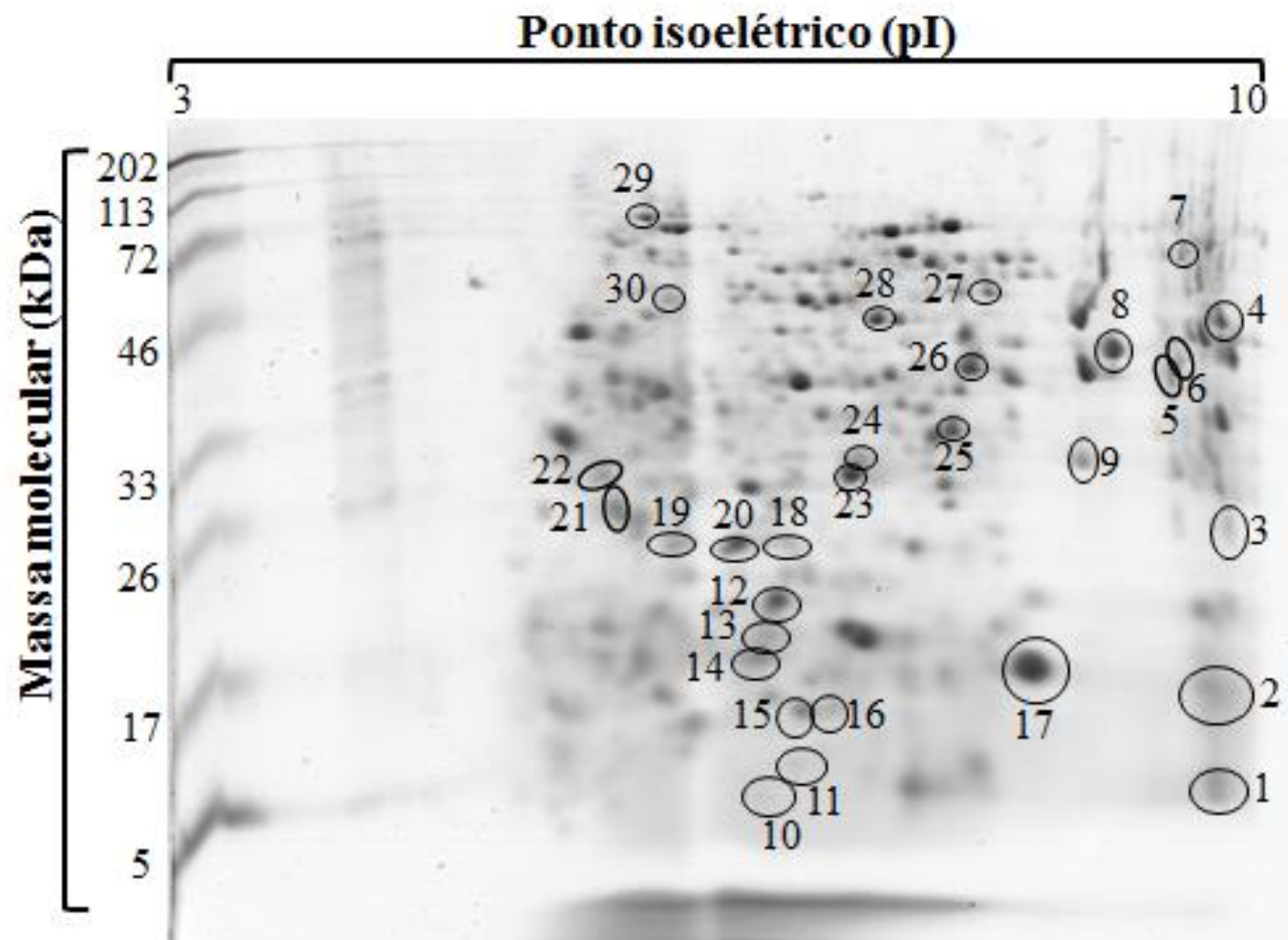
Pela análise do gel bidimensional (2-D) (Fig. 3) foi possível detectar 259 “spots”, com massas moleculares que variaram entre 4,9 a 141 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 3,81 a 9,75 (Figs. 2 e 3). De todos os spots detectados, 50,65% do volume destes spots possuem pI entre 3 e 6,9; 20,82% do volume com pI 7 a 7,9 e 28,53% do volume dos spots com pI entre 8 a 9,75. A partir destes dados podemos inferir que o veneno da vespa *A. pallens* apresenta um carácter relativamente ácido com 50,65% do volume (pI entre 3 e 6,9) de todas as proteínas detectadas no gel.

Do gel foram excisados 180 spots mais preponderantes que representam 69,5% do geral e estão presentes em todos os três géis do perfil de veneno. Destes 180 excisados, 30 deles foram passíveis de identificação positiva dentro dos padrões estabelecidos (Tabela 1), totalizando 16,7% de proteínas identificadas no veneno de *A. pallens*. Estas proteínas identificadas correspondem a um volume total de 24,2% de todos os spots encontrados na análise de eletroforese bidimensional (2-D).





**Fig. 2.** Gel bidimensional (14%) em triplicata (A, B e C) do veneno da vespa *Apoica pallens*.



**Fig. 3.** Gel bidimensional de referência (14%) do veneno da vespa social *Apoica pallens*, mostrando as proteínas identificadas pela análise de MALDI-TOF/TOF.

**Tabela 1.** Proteínas identificadas no veneno da vespa *Apoica pallens*, após fracionamento por gel 2D e análise por MALDI-TOF/TOF.

Spot	pI	MM	Proteína	Número de acesso	Sequencia peptídica	Confiança dos resultados	Organismo
1+ ¢	9,42	8596	Nucleoside diphosphate kinase	U3T755_PROFL		33 Mascot score	<i>Protobothrops flavoviridis</i>
2+ ¢	9,38	18206	Alpha-neurotoxin homolog 1	NXAH1_MICCO		41 Mascot score	<i>Micrurus corallinus</i>
3+ ¢	9,51	28637	C-type lectin 6	SL6_CROAD		46 Mascot score	<i>Crotalus adamanteus</i>
4+ ¢\$	9,46	52734	Hyaluronidase	ADL09135.1		36 Mascot score	<i>Polybia paulista</i>
5+ ¢	9,18	44947	rRNA processing protein RRP7	A9QQ88_LYCSI		47 Mascot score	<i>Lycosa singoriensis</i>
6*#\$	9,12	42739	Putative uncharacterized protein	E9INY0_SOLIN	LISWYDNEFGYSSR	113.1 (-10lgP) 2% coverage	<i>Solenopsis invicta</i>
7*#	8,92	94274	Myomesin-2	G5AYM2_HETGA	APTDVHASEISR	20.30 (-10lgP) 1% coverage	<i>Heterocephalus glaber</i>
8*#\$	8,72	46238	Fructose-bisphosphate aldolase	A0A026WWN8_CE RBI	IVPIVEPEILPDGDHDLA RGVVPLFGTDNEC(+57.0 2)TTQGLDDLQAR	118.8 (-10lgP) 11% coverage	<i>Cerapachys biroi</i>
9*#	8,50	33759	Phosphoglycerate mutase 2	K7IV97_NASVI	YAAEPKPEEFPK YGEEQVQIWR	93.68 (-10lgP) 7% coverage	<i>Nasonia vitripennis</i>
10+ ¢	6,28	7014	Proteasome subunit beta type U2 small nuclear	T1DLR5_CROHD		61 Mascot score	<i>Crotalus horridus</i>
11+ ¢	6,52	10035	ribonucleoprotein B"-like protein	J3S0P4_CROAD		58 Mascot score	<i>Crotalus adamanteus</i>

---

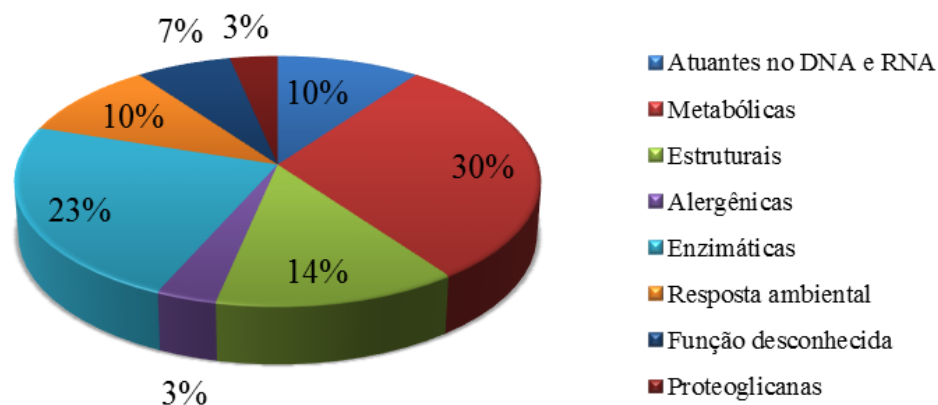
					Q(-17.03)IDVEVIGPR YGLFDFEYTHQ			
12*#	\$	6,39	23313	Cofilin/actin-depolymerizing factor-like protein	E2BL16_HARSA	QIDVEVIGPR ATDLSEASEEAVEEK DAAAYDAFLQ(sub E)DLQK	110.5 (-10lgP) 27% coverage	<i>Harpegnathos saltator</i>
13*#	\$	6,33	21157	Transgelin	A0A087ZNF1_API ME	KFPPGELFEDVIK	60.80 (-10lgP) 11% coverage	<i>Apis mellifera</i>
14*#		6,26	19811	Activated CDC42 kinase 1	G7YVQ7_CLOSI	TPSPTHGHHR	40.70 (-10lgP) 1% coverage	<i>Clonorchis sinensis</i>
15+	¢	6,56	16442	Glypican-6	V8P0M2_OPHHA		55 Mascot score	<i>Ophiophagus hannah</i>
16+	¢	6,77	16602	CD40 ligand	V8NPR9_OPHHA		27 Mascot score	<i>Ophiophagus hannah</i>
17+	¢	8,15	19201	DNA repair protein XRCC3	V8NR38_OPHHA		61 Mascot score	<i>Ophiophagus hannah</i>
18*#		6,41	27162	Uncharacterized protein	A0A087ZUB8_API ME	TGFLIDGYPR	52.19 (-10lgP) 1% coverage	<i>Apis mellifera</i>
19*#		5,69	27242	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	Q28943	C(+57.02)PIIDC(+57.02)IR	26.48 (-10lgP) 1% coverage	<i>Sus scrofa</i>
20*#	\$	6,10	27162	Probable adenylate kinase isoenzyme F38B2.4	E2BMB4	TGFLIDGYPR	103.12 (-10lgP) 5% coverage	<i>Harpegnathos saltator</i>
21*#		5,28	29752	Peroxiredoxin 1	G0T332_SPAAU	GLFIIDDKGILR	48.86 (-10lgP) 6% coverage	<i>Sparus aurata</i>
22*#	\$	5,18	32589	Rho GDP dissociation inhibitor	G9C5F3_SCHGR	TIEELLEADKEDESLR	28.76 (-10lgP) 8% coverage	<i>Schistocerca gregaria</i>

---

23*#	6,91	32781	Metalloendopeptidase	Q2ABP1_DANRE	LLFDVFETEGNDVSTRF LPLR	29.95 (-10lgP) 2% coverage	<i>Danio rerio</i>
24+ ¢	6,91	32781	Calcium-binding protein 1	ETE67223.1	GSTYEPVGEIFLR	54 Mascot score	<i>Ophiophagus hannah</i>
25*#	7,60	36861	Calcium-transporting ATPase	V9IA48_APICE	C(+57.02)N(- 17.03)DSAIDFNEFK EFTLEFSR TYEPVGEIFLR	106.12 (-10lgP) 3% coverage	<i>Apis cerana</i>
26*#	7,72	43829	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F4WH18_ACREC	LISWYDNEFGYSSR	-77.6 (-10lgP) 7% de coverage	<i>Acromyrmex echinator</i>
27*#	7,85	60913	Calcium-binding protein 4	A0A093HYS1_STR CA	LKIAFREFDVNGDGEISS AEMR	24.27 (-10lgP) 16% coverage	<i>Struthio camelus australis</i>
28*#	7,08	53322	Heat shock cognate 70	Q0QWE4_FUNHE	VEIANDQGNR DVHEIVLVGGSTRVTHA VVTVPAYFNDAQRAKF	32.11 (-10lgP) 4% coverage	<i>Fundulus heteroclitus macrolepidotus</i>
29*#	5,49	10312 6	Heat shock 70 kDa protein cognate 3	A0A034VDA3_BAC DO	EELNM(+15.99)DLFRN(+. 98)GDTHLGGEDFDQRA TN(+.98)GDTHLGGEDFD QRAKFEELNMDLFR	163.87 (-10lgP) 9% coverage	<i>Bactrocera dorsalis</i>
30+ ¢	5,64	59247	Serum response factor- binding protein 1	V8NNP4_OPHHA		46 Mascot score	<i>Ophiophagus hannah</i>

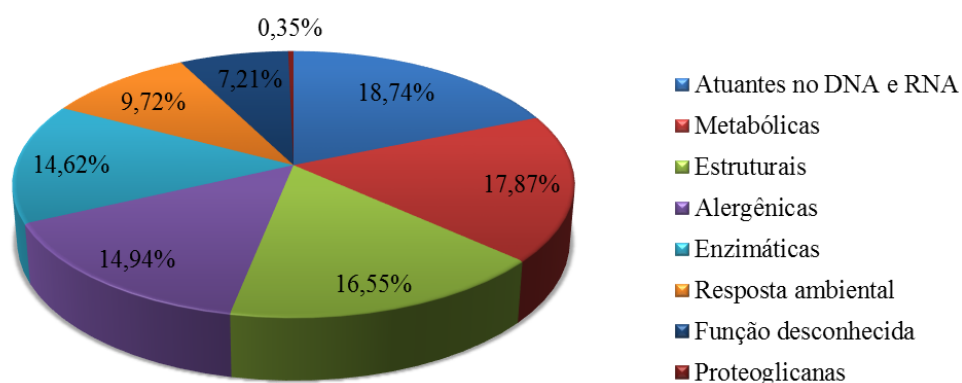
+ Identified by Mascot software; ¢ Validated by Scaffold 4.0; \* Identified by Peak DB 7.0 software; Taxon for database entry: # Metazoa, \$ Insecta.

As proteínas identificadas por homologia neste estudo podem ser divididas em 8 categorias com base em suas funções: alergênicas (*spot* 4), enzimáticas (*spots* 1, 2, 3, 10, 14, 20, 23), metabólicas (*spots* 8, 9, 16, 19, 24, 25, 26, 27, 30), estruturais (*spots* 7, 12, 13, 22), resposta ambiental (*spots* 21, 28, 29), proteoglicana (*spot* 15), atuantes no DNA e RNA (*spots* 5, 11, 17) e com função desconhecida (*spots* 6, 18) (Fig. 4).



**Fig. 4.** Classe de proteínas de acordo com a maior representatividade em número de proteínas identificadas no veneno de *Apoica pallens*.

Para o volume destas proteínas detectadas, a classe das atuantes no DNA e RNA (18,74%) apresentaram maior volume, seguidas das proteínas metabólicas (17,87%), estruturais (16,55%), alergênicas (14,94%), enzimáticas (14,62%), de resposta ambiental (9,72%), as proteínas com função desconhecida (7,25%) e as proteoglicanas (0,35%) (Fig. 5). Entretanto, cabe destacar que a proteína hyaluronidase (*spot* 4), única alergênica identificada é a que apresenta maior volume dentre todas as identificadas com 14,94%.



**Fig. 5.** Volume relativo das classes de proteínas identificadas no veneno de *Apoica pallens*.

#### 4. Discussão

As proteínas detectadas no veneno desta espécie variam em peso molecular de 4,9 a 141 kDa, a variação do peso molecular das proteínas de *Polybia paulista* é menor, entre 8 a 96 kDa [38]. Além disso, Santos et al [38] detectaram 237 *spots* nos géis do veneno de *P. paulista*, comparado aos 259 detectados nas amostras de *A. pallens*, sugere que cada espécie pode sintetizar número e/ou concentrações de proteínas diferentes em seus venenos.

A caracterização bioquímica de venenos de vespa com base na identificação de proteína, pode fornecer uma base extensiva para entender seus mecanismos biológicos, o que é um pré-requisito importante para o desenvolvimento de novos medicamentos [28]. Liska e Shevchenko [39] relatam que não há informação genômica disponível nos bancos de dados para vespas sociais, entretanto, as proteínas de veneno de vespa ainda podem ser identificadas pelos dados de espécies cruzadas.

A classe de maior representatividade em número de proteínas identificadas, com função no veneno foram as proteínas metabólicas, destas, três são proteínas metabólicas de energia: a fructose-bisphosphate aldolase (*spot* 8); phosphoglycerate mutase 2 (*spot* 9) e o glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*spot* 26) (Fig. 2 e Tabela 1). A fructose-bisphosphate aldolase catalisa a clivagem de fructose 1,6-bisfosfato em fosfato de dihidroxiacetona, e 3-fosfato de gliceraldeído durante a glicólise [40]. Já phosphoglycerate mutase converte 3-fosfogliceratos em 2-fosfogliceratos na gluconeogênese, e o glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase converte 3-fosfato de gliceraldeído em fosfato de 3-fosfoglicerol [41,42]. Todas elas estão envolvidas na oxidação da glicose[43], a qual é o principal substrato de energia para os tecidos [44].

Elias-Santos et al [45] também encontraram essas três proteínas nas glândulas salivares da cabeça da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* e duas (glyceraldehyde e phosphoglycerate) nas glândulas salivares do tórax, e Teixeira et al [46] identificaram o phosphoglycerate mutase na glândula de Dufour's de *Apis mellifera*, ambos atribuíram a presença destas proteínas ao alto metabolismo destas glândulas, atuando em processos celulares com alto consumo de energia. Portanto, a presença destas proteínas no veneno de *A. pallens* sugere que a glândula de veneno pode ter uma alta taxa metabólica.

Já a dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)] (*spot* 19) está envolvida na biossíntese de aminoácidos [37], e a CD40 ligand (*spot* 16) tem como função a ligação ao receptor do fator de necrose tumoral e processos biológicos de resposta imune [37]. A serum response factor-binding protein 1 (*spot* 3), calcium-binding protein 1(*spot* 24), calcium-transporting ATPase (*spot* 25) e calcium-binding protein4 (*spot* 27) também são proteínas metabólicas que provavelmente se originam das células secretoras de veneno, entretanto, não

constituem toxinas verdadeiras do veneno. Desempenham funções metabólicas em células secretoras do veneno, porém nenhum papel funcional no processo de envenenamento [38].

A segunda classe com maior número de proteínas foram as enzimáticas, na qual temos a nucleoside diphosphate kinase (NDPKs) (*spot 1*), activated CDC42 kinase 1 (*spot 14*) e probable adenylate kinase isoenzyme F38B2.4 (*spot 20*) que pertencem a família das quinases que atuam na atividade alergênica, inflamatória e imunidade nata. As enzimas quinases catalisam a transferência de fosfato entre seus substratos [47]. No caso das NDPKs elas atuam na síntese de macromoléculas [48], além de apresentar atividade para proliferação celular, diferenciação e desenvolvimento, transdução de sinal, receptor acoplado a proteína G, endocitose e expressão gênica. O principal papel das enzimas de NDPKs é manter o conjunto de nucleótídeos diferentes dentro da célula catalisando a transferência reversível do grupo fosforil terminal de um trifosfato de nucleósido para um difosfato de nucleósido [49].

Outra proteína enzimática, a alpha-neurotoxin homolog 1 (*spot 2*) pode ser classificada tanto como alpha neurotoxina do tipo I como II e age ligando-se ao receptor nicotínico de acetilcolina para bloqueio pós-sináptico na transmissão da junção neuromuscular [50], sendo responsável por ocasionar paralisia nas vítimas e presas, e potencialmente culminando na insuficiência respiratória e morte dos indivíduos [51,52]. Lauridsen et al. [53] avaliaram a ação do veneno da serpente *Naja melanoleuca* e observaram que a maioria das frações com alpha neurotoxina I e II induziam a letalidade dentro de 24 horas. Assim, a alpha neurotoxina I análoga encontrada nas amostras desta vespa provavelmente está atuando neste sentido, entretanto, pode se sugerir que na vespa a concentração desta proteína no veneno seja menor, quando comparada, por exemplo, as serpentes, já que estas reações não são facilmente notadas em indivíduos que são ferroados.

A C-type lectin 6 (*spot 3*) também tem função enzimática e é uma lectina do tipo C que são proteínas que reconhecem os carboidratos, e são encontradas em fontes variadas de plantas e animais [54]. As lectinas atuam na proteção de plantas e invertebrados contra patógenos, indução ou inibição da coagulação do sangue, estimulação da resposta imune, adesão célula-célula, citotoxicidade, terapia do câncer e diagnóstico [55-57].

Alguns estudos com venenos de cobra demonstram os efeitos das lectinas em diferentes linhagens de células tumorais [58,59], inibindo a adesão, proliferação e migração de células endoteliais, constituindo ferramentas anti-angiogênicas promissoras [60,61]. Assim, o veneno de *A. pallens* que apresentou uma lectina do tipo C pode também ter ação contra patógenos e ter atuação contra células tumorais, entretanto, testes antimicrobianos e antitumorais precisam ser realizados a fim de verificar se esta proteína atua neste sentido. Já a proteasome subunit beta type (*spot 10*) está envolvida na degradação proteolítica da maioria



das proteínas intracelulares, desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase proteica pela remoção de proteínas danificadas que podem prejudicar as funções celulares e remover proteínas cujas funções não são mais necessárias [37].

A metalloendopeptidase (*spot 23*), outra proteína enzimática é uma protease (metalloproteinase) responsável pela necrose moderada em alguns tecidos [10]. As metalloproteinases já foram encontradas no veneno da vespa *P. paulista* [38], como também no das formigas *Solenopsis invicta* [62] e *Tetramorium bicarinatum* [63]. No caso das vespas, as metalloproteinases foram associadas a inflamação, necrose, edema e danos à pele após ataques [62], já nas formigas a presença de metalloproteinase no veneno pode estar envolvido na interrupção da cascata de coagulação do hospedeiro, como na geração de uma presa mais digerível [63].

A transgelin (*spot 13*), apesar de ser reconhecida como proteína estrutural [37] (Fig. 2 e Tabela 1) não apresenta função completamente esclarecida. A princípio está associada a funções já apresentadas por sua família, a calponina, que atua no citoesqueleto [64]. Segundo Assinder et al. [65] a transgelin pode ter ação na contração muscular, portanto, talvez a presença dessa proteína esteja associada a contração dos músculos do aparelho ferroador e não ao veneno propriamente dito. No aparelho ferroador de *P. paulista*, a proteína calponina, da mesma família da transgelin tem função de estruturar a musculatura do aparelho ferroador [38]. As outras proteínas estruturais identificadas como a myomesin-2 (*spot 7*) que são proteínas citoesqueléticas e contráteis [66], bem como a cofilin/actin-depolymerizing factor-like protein (*spot 12*) e a rho GDP dissociation inhibitor (*spot 22*), também não são componentes do veneno e, assim como, provavelmente a transgelin também podem estar associados ao músculo do aparelho ferroador.

Também foram identificadas as proteínas de choque térmico, heat shock cognate 70 (*spot 28*) e heat shock 70 kDa protein cognate 3 (*spot 29*). Essas proteínas de choque também ocorrem nas glândulas de veneno de abelhas [67] e da vespa *P. paulista* [38] agindo como chaperonas facilitando o dobramento de outras proteínas. Proteínas de choque térmico também já foram identificadas na glândula de Dufour's da abelha *A. mellifera* [46]. Estas proteínas desempenham um papel na proteção celular, anti-apoptose, desenvolvimento, regulação e transdução de sinal [67]. Segundo Snutch et al.[68], as proteínas de choque podem ser expressas conforme as diferentes fontes de estresse, como o oxidativo, de modo a proteger células e proteínas contra danos moleculares. Santos et al. [38] discutem em seu estudo que as toxinas do veneno são expostas a altas temperaturas, principalmente nas regiões tropicais, de forma que podem sofrer algum tipo de desnaturação térmica, perdendo sua atividade biológica. Desta forma, estes autores sugerem que a presença de proteínas de

choque no veneno de *P. paulista* podem atuar como uma autoproteção do veneno para preservar sua atividade.

Outra proteína identificada, envolvida na resposta ambiental que atua conforme as flutuações nas condições oxidativas e osmóticas, choque térmico e nas variações de pH, é a peroxiredoxin 1 (*spot 21*) que preserva a estrutura celular e portanto, está envolvida na proteção do veneno contra o estresse oxidativo, já identificada também no veneno de *Apis mellifera* [67]. Esta proteína também catalisa a redução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e hidroperóxidos orgânicos em água e álcoois e pode participar das cascatas de sinalização dos fatores de crescimento e do fator de necrose tumoral alfa, regulando as concentrações intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [69].

Na classe das proteínas alergênicas encontramos a hyaluronidase (*spot 4*) (Fig. 2 e Tabela 1) que é uma enzima da família das glicosil hidrolases, uma endo-N-acetilhexosaminidase já descrita no veneno de *P. paulista* [38]. De acordo com Hoffmam [70] esta proteína atua na dispersão do veneno que resulta no aumento da permeabilidade dos tecidos e facilita a difusão das substâncias tóxicas. Santos et al [38] discutem que esta proteína é comumente encontrada nos venenos de vespas e abelhas, e que além de potencializar o efeito das toxinas, causa inflamação no local da ferroadada [71]. Além disso, atua como um importante alérgeno que as vezes causa reatividade cruzada [72]. Os alérgenos são substâncias que causam algum tipo de alergia e podem resultar em choque anafilático, que pode desenvolver várias outras reações.

A atividade da hyaluronidase também já foi descrita nos venenos de formigas como o de *Paraponera clavata*, *Ectatomma tuberculatum* [73], *Myrmecia pyriformis* [74], *Pseudomyrmex triplarinus* [75] e *Solenopsis invicta* [76]. No entanto, Touchard et al [10] avaliaram que a atividade desta proteína do veneno de vespas é maior do que do veneno de formigas.

O glipican-6 (*spot 15*) é um proteoglicano de superfície celular que possui sulfato de heparano que atua como uma proteína correceptora e interage seletivamente com as glicosaminoglicanas com sulfato de heparano como unidade de carboidrato sendo proteínas bloqueadoras potentes da ação citolítica do veneno [77].

Algumas proteínas identificadas são atuantes no DNA e RNA, como as proteínas rRNA processing protein RRP7 (*spot 5*) ligação do ácido nucléico relacionado ao RNA; U2 small nuclear ribonucleoprotein B like protein (*spot 11*) e DNA repair protein (*spot 17*) que são proteínas de reparação. Essas proteínas atuantes no DNA e RNA não possuem uma ação direta no veneno, mas são comuns as células, havendo também a possibilidade desta proteína

ser proveniente de algum tipo de contaminação durante a extração, apesar de todos os cuidados tomados.

Aili et al [78] relatam em seu estudo que o método de extração do veneno deixa a possibilidade de que algumas proteínas celulares possam ser misturadas com os verdadeiros componentes do veneno. Desta forma, não é possível ter certeza de que as proteínas semelhantes a venenos de cobras por exemplo, bem como as identificadas por homologia com espécies cruzadas, representam proteínas verdadeiras de veneno de vespa ou se são proteínas celulares do compartimento do reservatório e/ ou do tecido da glândula.

Duas proteínas não tiveram sua função caracterizada, a putative uncharacterized protein (*spot 6*) e uncharacterized protein (*spot 18*). Os spots restantes não apresentaram semelhanças com quaisquer sequência conhecida, já que a dificuldade de identificação das proteínas de veneno das vespas por homologia, se deve ao fato de não haver um banco de dados para vespas.

Esta é a primeira caracterização proteica do veneno da vespa eussocial *A. pallens*, e uma vez que há pouca informação sobre a bioquímica do seu veneno, a análise proteômica aqui apresentada contribui de forma significativa para o conhecimento de sua biologia e fisiologia.

## **5. Conclusão**

Dos 180 *spots* excisados 30 foram passíveis de identificação. Estas 30 proteínas são divididas em 8 categorias com base em suas funções: alergênicas, enzimáticas, metabólicas, estruturais, resposta ambiental, proteoglicana, atuantes no DNA e RNA e com função desconhecida.

Devido a falta de dados proteômicos para o veneno de vespas, há um grande número de proteínas que não possuem funções conhecidas em banco de dados, e conseqüentemente, não são passíveis de identificação, fato que torna ainda mais importante estudos com análise proteômica do veneno, principalmente em Hymenoptera, e os últimos anos de estudos com insetos desta ordem mostram que seus venenos apresentam potencial antimicrobiano, importantes para estudos farmacológicos.

## 6. Referências

- [1] H.F. Van Emden. Subclass Pterygota, division Endopterygota, order Hymenoptera (Sawflies, Ants, Bees and Wasps) 120.000 described species. In Handbook of Agricultural Entomology; John Wiley & Sons: Oxford, UK, (2013); pp. 193–220.
- [2] E.O. Wilson. The insect societies. Belknap, Cambridge, 1971.
- [3] E.A. Macalintal, C.K. Starr. Comparative morphology of the stinger in the social wasp genus *Ropalidia* (Hymenoptera: Vespidae). Mem. Entomol. Soc. Wash. 17(1996)108-150.
- [4] N.R. Casewell, W. Wüster, F.J. Vonk, R.A. Harrison, B.G. Fry. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. Cell. Press. 28 (2013) 219–29.
- [5] J.O. Schmidt. Biochemistry of insect venoms. Ann. Rev. Entomol. 27, (1982) 339-368.
- [6] J. Orivel, V. Redeker, J.P. Le Caer F. Krier, A.M. Revol-Junelles, A. Longeon, A. Chaffotte, A. Dejean, J.P. Rossier. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. J. Biol. Chem. 276 (2001) 17823-17829.
- [7] D. Baracchi, S. Tragust. Venom as a Component of External Immune Defense in Hymenoptera. Evol. Venom. Anim. Toxins (2017) 213-233.
- [8] A. Stow, D. Briscoe, M. Gillings, M. Holley, S. Smith, R. Leys, T. Silberbauer, C. Turnbull, A. Beattie. Antimicrobial defences increase with sociality in bees. Bio. Lett. 3 (2007) 422-424.
- [9] S.J. Hoggard, P.D. Wilson, A.J. Beattie, A.J. Stow. Social complexity and nesting habits are factors in the evolution of antimicrobial defences in wasps. PLoS One 6 (2011) e21763
- [10] A. Touchard, S.R. Aili, E.G.P. Fox, P. Escoubas, J. Orivel, G.M. Nicholson, A. Dejean. The biochemical toxin arsenal from ant venoms. Toxins, 8(1) (2016) 30.
- [11] K. Wang, J. Yan, X. Liu, J. Zhang, R. Chen, B. Zhang, W. Dang, W.; Zhang, M. Kai, J. Song, R. Wang. Novel cytotoxicity exhibition mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. Toxicology, 288(1) (2011), 27-33.
- [12] X. Yang, Y. Wang, W.H. Lee, Y. Zhang. Antimicrobial peptides from the venom gland of the social wasp *Vespa tropica*. Toxicon, 74 (2013) 151-157.
- [13] V. Čeřovský, R. Jeřek, V. Fučík, J. Slaninová. Antimicrobial peptides from the venom of Vespidae. Collect. Czechoslovak Chem. Commun. 9 (2015) 25-28.
- [14] J.C. Silva, L.M. Neto, R.C. Neves, J.C. Gonçalves, M.M. Trentini, R. Mucury-Filho, K.S. Smidt, I.C. Fenterseifer, O.N. Silva, L. Lima, P.B. Clissa, N. Vilela, F.

- Guilhelmelli, L.P. Silva, M. Rangel, A. Kipnis, I. Silva-Pereira, O.L. Franco, M.R. Mortari. Evaluation of the antimicrobial activity of the mastoparan Polybia-MPII isolated from venom of the social wasp *Pseudopolybia vespiceps testacea* (Vespidae, Hymenoptera). *Int. J. Antim. Agents* 49(2) 2017, 167-175.
- [15] S.R. Aili, A. Touchard, F. Petitclerc, A. Dejean, J. Orivel, M.P. Padula, P. Escoubas, G.M. Nicholson. Combined peptidomic and proteomic analysis of electrically stimulated and manually dissected venom from the South American bullet ant *Paraponera clavata*. *J. Proteome Res.* 16 (2017) 1339-1351.
- [16] R.C. Bernardi, E.L.B. Firmino, A. Mendonça, D. Sguarizi-Antonio, M.C. Pereira, L.H.C. Andrade, W.F. Antonialli-Junior, S.M. Lima. Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum* Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol. B* 175 (2017) 200-206.
- [17] A. Mendonça, M.C. Paula, W.D. Fernandes, L.H.C. Andrade, S.M. Lima, W.F. Antonialli-Junior. Variation in venoms of *Polybia paulista* Von Ihering and *Polybia occidentalis* Olivier (Hymenoptera: Vespidae), assessed by the FTIR-PAS technique. *Neotrop. Entomol.* 46 (2017) 8–17. 7405, <http://dx.doi.org/10.1007/s13744-016-0426-6>.
- [18] B.E.C. Banks, R.A. Shipolini. Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. In Piek, T (Ed.) *Venoms of the Hymenoptera*, Academic Press; London; 1986, pp 330-416.
- [19] M.R.P. Oliveira, A.C. Scheidt, M.S. Palma, M.R. Brochetto-Braga. Venenos de “Hymenoptera” sociais: coleta, composição, bioquímica e mecanismo de ação. In Barraviera, B. *Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos*, Rio de Janeiro: Editora de publicações biomédicas – EPUB, p251-258. (1999).
- [20] P.R. Lima, M.R. Brochetto-Braga. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *J. Venom. Anim. Toxins* 9 (2003) 149–162.
- [21] M.C. Monteiro, P.R.T. Romão, A.M. Soares. Pharmacological perspectives of wasp venom. *Protein Pept. Lett.* 16 (2009) 944-952.
- [22] P.G. Czaikoski, D.L. Menaldo, S. Marcussi, A.L.C. Baseggio, A.L. Fuly, R.C. Paula, A.U. Quadros, P.R.T. Romão, M.L.T. Buschini, F.Q. Cunha, A.M. Soares, M.C. Monteiro. Anticoagulant and fibrinolytic properties of the venom of *Polybia occidentalis* social wasp. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 21 (2010) 653-659.

- [23] D.C. Graaf, M. Aerts, E. Danneels, B. Devreese, B. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *J. Proteomics* 72 (2009) 145–154.
- [24] M. Nittner-Marszalska, J. Liebhart, E. Liebhart, A. Dor, R. Dobek, A. Obojski, W. Medrala. Prevalence of Hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland. *Med. Sci. Monit.* 10 (2004) 324–329.
- [25] B.M. Bilo, F. Rueff, H. Mosbech, F. Bonifazi, J.N.G. Oude-Elberink. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 60 (2005) 1339–1349.
- [26] R.S. Vetter, P.K. Visscher, S. Camazine. Mass envenomations by honey bees and wasps. *West J. Med.* 170 (1999) 223–227.
- [27] D. Charpin, J. Birnbaum, A. Lanteaume, D. Vervloet. Prevalence of allergy to hymenoptera stings in different samples of the general population. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992;90(3 Pt 1):331-4.
- [28] L.D. Santos, M. Pieroni, A.R.S. Menegasso, J.R.A.S. Pinto, M.S.; Palma. A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. *J. Venom. Anim. Toxins Tropic. Dis.* 17(4) (2011), 364-377
- [29] N.B. Leite, A. Aufderhorst-Roberts, M.S. Palma, S.D. Connell, J.R. Neto, P.A. Beales. PE and PS lipids synergistically enhance membrano poration by a peptide with anticancer properties. *Biophys. J.* 109 (2015) 936-947.
- [30] E.G.P. Fox, D.R. Solis, L.D. dos Santos, J.R.A.S. Pinto, A.R.S. Menegasso, R.C.M.C Silva, M.S. Palma, O.C. Bueno, E.A. Machado. A simple, rapid method for the extraction of whole fire ant venom (Insecta: Formicidae: *Solenopsis*). *Toxicon* 65 (2015) 5-8.
- [31] S.R. Aili, A. Touchard, P. Escoubas, M.P. Padula, J. Orivel, A. Dejean, G.M. Nicholson. Diversity of peptide toxins from stinging ant venoms. *Toxicon* 92, (2014) 166-178.
- [32] J.M. Carpenter. Phylogenetic relationships and the origino f social behavior in the Vespidae. In: Ross, K. G. & Matthews, R. W. eds. *The social biology of wasps*, Ithaca, Cornell University, 1991, p. 7-32.
- [33] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [34] U.K. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.

- [35] A. Görg, C. Obermaier, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, W. Weiss. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21 (2000) 1037-1053.
- [36] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68 (1996) 850-858.
- [37] UniProt Database, 2017. <http://www.uniprot.org/>. (acesso 17.07.17).
- [38] L.D. Santos, K.S. Santos, J.R.A. Pinto, N.B. Dias, B.M.D. Souza, M.F. Santos, J. Perales, G.B. Domont, F.M. Castro, J.E. Kalil, M.S. Palma. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *J. Proteome Res.* 9(8) (2010), 3867-3877.
- [39] A.J. Liska, A. Shevchenko. Expanding the organismal scope of proteomics: Cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications. *Proteomics* 3(1) 2003, 19-28.
- [40] C.F. Midelfort, R.K. Gupta, I.A. Rose. Fructose-1,6-bisphosphate:isomeric composition, kinetics, and substrate specificity for the aldolases. *Biochem.* 15 (1976) 2178–2185.
- [41] A. Boiteux, B. Hess. Kinetics of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from yeast. In Abstracts, 9th FEB S Meeting, Budapest, 1974 (Vol. 36).
- [42] A. Boiteux, B. Hess. Design of glycolysis. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 293 (1981) 5–22.
- [43] D.L. Nelson, M.M. Cox. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora. 2014.
- [44] R. Gmeinbauer, K. Crailsheim. Glucose utilization during flight of honeybee (*Apis mellifera*) workers, drones and queens. *J. Insect. Physiol.* 39(11) 1993, 959-967.
- [45] D. Elias-Santos, Q. F. Maria do Carmo, R. Vitorino, L.L. Oliveira, J.C. Zanuncio, J.E. Serrão. Proteome of the head and thorax salivary glands in the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Apidologie*, 44(6) 2013, 684-698.
- [46] A.D. Teixeira, P.D. Games, B.B. Katz, J.M. Tomich, J.C. Zanuncio, J.E. Serrão. Proteomic analysis in the Dufour's gland of Africanized *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apidae). *PloS one*, 12(5) 2017, e0177415.
- [47] H.C. Cheng, R. Z. Qi, H. Paudel, H.J. Zhu. Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme. Res.* 2011.
- [48] L. Francois-Moutal, O. Maniti, O. Marcillat, T. Granjon. New insights into lipid-Nucleoside Diphosphate Kinase-D interaction mechanism: Protein structural changes and membrano reorganisation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembr.* 1828(2) 2013, 906-915.
- [49] I. Lascu, P. Gonin. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32(3) 2000, 237-246.

- [50] J.S. Oliveira, A.R.B.P. Silva, M.B. Soares, M.A. Stephano, W.O. Dias, I. Raw, P.L. Ho. Cloning and characterization of an  $\alpha$ -neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 267 (2000) 887–891.
- [51] C.I.A. Wang, T. Reeks, I. Vetter, I. Vergara, O. Kovtun, R.J. Lewis, P.F. Alewood, T. Durek. Isolation and structural and pharmacological characterization of  $\alpha$ -Elapitoxin-Dpp2d, an amidated three finger toxin from black mamba venom. *Biochemistry*, 53(23), 2014, 3758-3766.
- [52] S. Nirthanan, M.C. Gwee. Three-finger  $\alpha$ -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J. Pharmacol. Sci.* 94(1) 2004, 1-17.
- [53] L.P. Lauridsen, A.H. Laustsen, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez. Exploring the venom of the forest cobra snake: Toxic venomics and antivenom profiling of *Naja melanoleuca*. *J. Proteomics* 150 (2017) 98-108.
- [54] L.E. Castanheira, D.S. Lopes, S.N.C. Gimenes, S.R. Deconte, B.A. Ferreira, P.T. Alves, L.R. Goulart Filho, T.C. Tomiosso, R.S. Rodrigues, K.A.G. Yoneyama, F.A. Araújo, V.M. Rodrigues, F. Assis Araújo. Angiogenic effects of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 153-161.
- [55] W.J. Peumans, E.J. Van Damme. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109(2) 1995, 347.
- [56] M.A. Sartim, S.V. Sampaio. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 21(1) 2015, 35.
- [57] T. Yau, X. Dan, C.C.W. Ng, T.B. Ng. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules*, 20(3) 2015, 3791-3810.
- [58] L.A. Calderon, J.C. Sobrinho, K.D. Zaqueo, A.A. Moura, A.N. Grabner, M.V. Mazzi, S. Marcussi, A. Nomizo, C.F.C. Fernandes, J.P. Zuliani, B.M.A. Carvalho, S.L. Silva, R.G. Stábeli, A.M. Soares. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. *Bio. Med. Res. Int.* 2014.
- [59] B. L. Dhananjaya, P.R. Sivashankari. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. *Curr. Top. Med. Chem.* 15(7) 2015, 649-657.
- [60] A. Pilorget, M. Conesa, S. Sarray, J. Michaud-Levesque, S. Daoud, K.S. Kim, M. Demeule, J. Marvaldi, M. El Ayeb, N. Marrakchi, R. Béliveau, J. Luis. Lebectin, a *Macrovipera lebetina* venom-derived C-type lectin, inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* 211(2) 2007, 307-315.



- [61] T. Momic, G. Cohen, R. Reich, F.T. Arlinghaus, J.A. Eble, C. Marcinkiewicz, P. Lazarovici. Vixapatin (VP12), a c-type lectin-protein from *Vipera xantinapalestinae* venom: characterization as a novel anti-angiogenic compound. *Toxins*, 4(10) 2012, 862-877.
- [62] J.R.A.S. Pinto, E.G.P. Fox, D.M. Saidemberg, L.D. Santos, A.R.S. Menegasso, E. Costa-Manso, E.A. Machado, O.C. Bueno, M.S. Palma. A proteomic view of the venom from the fire ant *Solenopsis invicta* Buren. *J. Proteome Res.* 11(9) 2012, 4643–4653. [http://doi: 10.1021/pr300451g](http://doi:10.1021/pr300451g).
- [63] W. Bouzid, C. Klopp, M. Verdenaud, F. Ducancel, A. Vétillard. Profiling the venom gland transcriptome of *Tetramorium bicarinatum* (Hymenoptera: Formicidae): The first transcriptome analysis of an ant species. *Toxicon* 70 (2013) 70–81.
- [64] D. Lawson, M. Harris, C. Shapland. Fibroblast transgelin and smooth muscle SM22 are the same protein, the expression of which is down regulated in many cell lines. *Cell Motil. Cytoskel.* 38 (1997) 250–257.
- [65] S.J. Assinder, J.A.L. Stanton, P.D. Prasad. Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41(3) (2009) 482-486.
- [66] A. Viganò, M. Vasso, A. Caretti, V. Bravata, L. Terrano, C. Fania, D. Capitanio, M. Samaja, C. Gelfi. Protein modulation in mouse heart under acute and chronic hypoxia. *Proteomics*, 11 (2011) 4202–4217. [http://doi 10.1002/pmic.201000804](http://doi:10.1002/pmic.201000804)
- [67] N. Peiren, D.C. Graaf, F. Vanrobaeys, B. Danneels, B. Devreese, J.V. Beeumen, F.J. Jacobs. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon* 52 (2008) 72–83.
- [68] P. Snutch, M.F.P. Heschl, D.L. Baillie. The *Caenorhabditis elegans* Hsp70 gene family - a molecular genetic characterization. *Gene* 64 (1988) 241–255.
- [69] S.W. Kang, H.Z. Chae, M.S. Seo, K. Kim, I.C. Baines, S.G. Rhee. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogenperoxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 273(11) 1998, 6297–6302.
- [70] D.R. Hoffman. Hymenoptera venom allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 30(2) 2006, 109-128.
- [71] K. Kemparaju, K.S. Girish. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell. Biochem. Funct.* 24(1) 2006, 7-12.
- [72] G. Lu, L. Kochoumian, T.P. King. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergy, also a hyaluronidase with other proteins. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 4457–4465.

- [73] J.O. Schmidt, M.S. Blum, W.L. Overall. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. *Toxicon* 24 (1986) 907–921.
- [74] J.C. Wanstall, De La Lande, I. Fractionation of bulldog ant venom. *Toxicon* 1974, 12.
- [75] W.F. Hink, P.W. Pappas, D.C. Jaworski. Partial biochemical characterization of venom from the ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon*, 32(7) 1994, 763-772.
- [76] H. Baer, T.Y. Liu, M.C. Anderson, M. Blum, W.H. Schmid, F.J. James, Protein components of fire ant venom (*Solenopsis invicta*). *Toxicon*. 17 (1979) 397–405.
- [77] B. Lomonte, A. Tarkowski, U. Bagge, L.A. Hanson. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 1509-1518.
- [78] S.R. Aili, A. Touchard, J.M. Koh, A. Dejean, J. Orivel, M.P. Padula, P. Escoubas G.M. Nicholson. Comparisons of protein and peptide complexity in poneroid and formicoid ant venoms. *J. Proteome Res.* 15(9) (2016), 3039-3054.

### **Considerações finais**

Nossos resultados revelam que em vespas com tipo de fundação nidal diferente, e que se organizam em colônias com número populacional significativamente diferente, a variação do tamanho da cadeia de compostos é relativamente similar, de forma que os alcanos ramificados são reconhecidamente os mais efetivos durante as interações entre companheiras de ninhos. Contudo, há significativamente maior similaridade de teores dos compostos compartilhados entre as amostras da cutícula e veneno de *A. pallens*, sugerindo que os mesmos compostos usados para mediar interações na cutícula também são utilizados no veneno.

Além disso, para o veneno de *A. pallens* foram passíveis de identificação 30 proteínas que estão divididas de acordo com sua função em: alergênicas, enzimáticas, metabólicas, estruturais, resposta ambiental, proteoglicana, atuantes no DNA e RNA e com função desconhecida. Um grande número de proteínas não possuem funções conhecidas em banco de dados devido a falta de dados proteômicos e por conta disso não foram passíveis de identificação.

Estudos da composição química da cutícula e do veneno de vespas sociais são de suma importância para compreensão das interações entre os indivíduos, bem como para o conhecimento da composição química do veneno, e posterior estudo do potencial antimicrobiano, os quais são importantes para os futuros estudos farmacológicos.