

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

**Mediadores químicos de interações intraespecíficas e
atividade biológica da peçonha da espécie *Polybia
sericea* (Vespidae: Polistinae)**

EVA RAMONA PEREIRA SOARES

Dourados-MS
Janeiro de 2019

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

EVA RAMONA PEREIRA SOARES

**MEDIADORES QUÍMICOS DE INTERAÇÕES
INTRAESPECÍFICAS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PEÇONHA
DA ESPÉCIE *Polybia sericea* (VESPIDAE: POLISTINAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Andrea Lima Cardoso

Dourados-MS

Janeiro de 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S576m Soares, Eva Ramona Pereira
MEDIADORES QUÍMICOS DE INTERAÇÕES INTRAESPECÍFICAS E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DA PEÇONHA DA ESPÉCIE *Polybia sericea* (VESPIDAE: POLISTINAE) [recurso
eletrônico] / Eva Ramona Pereira Soares. – 2019.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Prof. Dr. William Fernando Antonelli Junior .
Coorientadora: Profa. Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso.
Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)-Universidade Federal de
Grande Dourados, 2019.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/etec/biblioteca/repositorio>

1. Hidrocarbonetos cuticulares. 2. vespa social. 3. peçonha. 4. *Polybia sericea*. I. Antonelli
Junior, Prof. Dr. William Fernando . II. Cardoso, Profa. Dra. Cláudia Andrea Lima. III. Título.

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

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

“MEDIADORES QUÍMICOS DE INTERAÇÕES INTRAESPECÍFICAS E
ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PEÇONHA DA ESPÉCIE *Polybia Sericea*
(VESPIDAE: POLISTINAE)”.

Por

EVA RAMONA PEREIRA SOARES

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. Valter Vieira Alves Junior
Membro Titular – UFGD



Dr.ª Erika Fernandes Neves
Membro Titular – IFMS



Dr.ª Jaqueline Ferreira Campos
Membro Titular - UFGD



Dr.ª Maria Helena Verdan
Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 25 de janeiro de 2019.

Biografia do Acadêmico

Eva Ramona Pereira Soares, natural de Ponta Porã – Mato Grosso do Sul nascida aos 10 de Junho de 1985, filha de Severiana Carmona e Adolfo Pereira Soares.

Cursou o Ensino Fundamental na Escola Municipal Lydio Lima e Escola Estadual Geni Marques Magalhães – Ponta Porã /MS e o Ensino Médio na Escola Estadual Dr. Fernando Corrêa da Costa – Amambai/ MS.

Graduada em Ciências Biológicas – Licenciatura pela Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – UEMS, Unidade de Dourados de 2008 a 2012, na qual foi aluna de Iniciação científica pelo período de três anos (2010/2012) desenvolvendo trabalho relacionado a diferenças morfofisiológicas em vespas sociais, pesquisa que gerou um artigo com o título Reproductive Status of Females in the Eusocial Wasp *Polistes ferreri* Saussure (Hymenoptera: Vespidae) publicado na revista Neotropical Entomology.

Mestre em Entomologia e Conservação da Biodiversidade pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD de 2013 a 2015, desenvolvendo o projeto relacionado a composição química cuticular de vespas sociais utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa CG-EM, pesquisa publicada na Revista brasileira de Entomologia com o título Variation of cuticular chemical compounds in three species of *Mischocyttarus* (Hymenoptera: Vespidae) eusocial wasps.

No Doutorado, continuou desenvolvendo projeto relacionado a composição química cuticular por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), entretanto, com o enfoque nos mediadores químicos de interações intraespecíficas, além da atividade biológica da peçonha da vespa social *Polybia sericea*.

Agradecimentos

Agradeço,

Primeiramente a Deus, por me amar incondicionalmente e por me dar ânimo para jamais desistir e principalmente por colocar amigos tão valiosos em meu caminho.

Aos meus pais, Severiana e Adolfo, que mesmo não tendo a oportunidade de estudar sempre mostraram a importância do estudo em nossas vidas, e que estão sempre torcendo e acreditando em mim. Agradeço também a todos os meus irmãos, pois cada um de forma diferente, sempre torceram por mim.

Ao Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e desenvolver este trabalho, também por ser o responsável por grande parte da minha formação, agradeço incondicionalmente a paciência no decorrer da pesquisa, pelas correções no decorrer da escrita e também por todas as vezes que precisou me chamar atenção, pois tenha certeza que cada “puxão de orelha” não foi em vão.

À Prof. Dr. Claudia Andrea Lima Cardoso pela coorientação, paciência e carinho, por se esforçar incondicionalmente a ajudar sempre que precisei mesmo chegando de surpresa em sua sala além de dicas valiosas no decorrer deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e ao Laboratório de Ecologia Comportamental (LABECO) pelo apoio técnico ao longo desses anos, foi minha segunda casa em todo esse período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao meu companheiro e amado Marcelo, por todo amor e confiança depositado em mim, por ser sempre paciente, e sempre me confortar me dando ânimo para continuar mesmo nas horas mais difíceis.

À amiga Dr. Viviana de Oliveira Torres por toda colaboração durante a realização desta tese, além da amizade e carinho que sempre teve por mim.

A todos os meus “irmãos científicos” (Família LABECO) que levarei no coração onde quer que eu esteja, e em especial as “maninhas” Denise, Kamylla, Michele e Angélica, que me escutaram e me fortaleceram psicologicamente quando mais precisei,

nem sempre foram rosas, mas os momentos de crises com certeza contribuíram para o meu crescimento.

Ao seu Vítinho, por toda ajuda durante a procura incansável por colônias da espécie da vespa objeto de estudo da minha tese, agradeço de coração por sempre estar disposto a nos ajudar sem esperar nada em troca, realmente precisamos de mais pessoas assim neste mundo.

Por fim, e de forma alguma menos importante, aos amigos do Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da UFGD. Todos de forma diferente fizeram parte dessa jornada.

Agradeço a todos de coração.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

Dedicatória

Aos meus pais Severiana e Adolfo, meu amado Marcelo e a minha pequena Giuli Maria.

Sumário

Mediadores químicos de interações intraespecíficas e atividade biológica da peçonha da espécie <i>Polybia sericea</i> (Vespidae: Polistinae)	1
Resumo Geral:	1
General Abstract	2
Introdução Geral	3
Revisão Bibliográfica	6
Vespas sociais	6
Hidrocarbonetos cuticulares em Vespas sociais	8
Peçonha em vespas sociais	10
Objetivo Geral	13
Hipóteses	13
Referências	13
CAPÍTULO I	26
Mediadores químicos de interações intraespecíficas na vespa eussocial <i>Polybia sericea</i> (Vespidae: Polistinae)	27
Resumo	27
Abstract.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	31
Coletas	31
Obtenção das amostras para avaliar as diferenças entre a composição química cuticular em função do <i>status</i> fisiológico, idade relativa, e das diferentes partes do corpo.	32
Obtenção das amostras para avaliar as diferenças entre a composição química dos membros das colônias e do material de construção de seus ninhos em função da população.	32
Extração dos compostos cuticulares, do material de construção do ninho e análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	33
Análises estatísticas	34
Resultados.....	34
Discussão	36
Tabelas e Figuras	43
Referências	53

CAPÍTULO II	61
Efeitos tóxicos, mutagênicos e viabilidade celular da peçonha da vespa social <i>Polybia sericea</i> (Hymenoptera: Vespidae)	62
Resumo	62
Abstract.....	63
Introdução.....	64
Material e métodos	65
Coleta e preparação das amostras da peçonha de <i>Polybia sericea</i>	65
Ensaio de toxicidade da peçonha de <i>Polybia sericea</i> em <i>Artemia salina</i>	66
Bioensaio <i>in vitro</i> para determinação do índice mutagênico e citotóxico a partir do teste de Ames	66
Viabilidade celular	68
Análises estatísticas.....	68
Resultados e discussão	69
Conclusão.....	73
Tabelas e Figuras.....	74
Referências.....	83

Mediadores químicos de interações intraespecíficas e atividade biológica da peçonha da espécie *Polybia sericea* (Vespidae: Polistinae)

* Formatação nas normas da ABNT 6023.

Resumo Geral: A coesão das colônias de insetos sociais é mantida por mediadores químicos de interações entre seus membros, sobretudo, por aqueles presentes em sua cutícula, denominados de hidrocarbonetos cuticulares. Estes hidrocarbonetos oferecem primariamente uma barreira de proteção contra a desidratação, além de atuar como sinais trocados durante as interações entre companheiros de ninho. Além disso, as vespas sociais também produzem outros tipos de compostos químicos que atuam na manutenção de suas colônias agindo na captura de presas e defesa, dentre estes está a peçonha. A peçonha produzida e injetada pelo aparelho ferroador possui substâncias que podem ser biologicamente ativas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os mediadores químicos de interações intraespecíficas, além das atividades biológicas da peçonha da espécie de vespa social *Polybia sericea*. Os resultados de hidrocarbonetos cuticulares e do material de construção do ninho nos permitem confirmar as hipóteses testadas de que o perfil químico cuticular dos membros das colônias e do material do ninho podem ser usados como ferramentas complementares para avaliar diferenças populacionais, além da composição química cuticular variar de acordo com a idade relativa, *status* fisiológico e entre diferentes partes do corpo das fêmeas, podendo atuar como mediadores nas interações coloniais. Além disso, fortalecemos a ideia de que alcanos lineares podem atuar em conjunto com os alcanos ramificados e outros compostos tanto para promover a impermeabilização e proteção quanto servir como sinais durante as interações intracoloniais. Em relação à peçonha, os resultados demonstram que a peçonha apresenta toxicidade para *Artemia salina* em todas as concentrações testadas, em ausência e presença de inibidor de protease, entretanto, na presença do inibidor a toxicidade foi relativamente maior. No teste de Ames apenas a concentração de 150 $\mu\text{g placa}^{-1}$ na ausência de inibidor de protease aumentou significativamente o número das colônias revertentes e apresentou mutagenicidade para a linhagem TA98. Em relação à viabilidade celular a peçonha de *Polybia sericea* não apresentou citotoxicidade para a linhagem MRC-5, mas foi citotóxica para a linhagem CHO e a linhagem tumoral B16F10-Nex2. Por fim,

destacamos que em todos os tratamentos a ausência de inibidor de protease pode levar à degradação de substâncias que aumentam a citotoxicidade da peçonha.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos cuticulares, vespa social, peçonha, *Polybia sericea*.

Chemical mediators of intraspecific interactions and biological activity of the venom of the species *Polybia sericea* (Vespidae: Polistinae)

General Abstract: In the of social insects the cohesion is maintained by chemical mediators of interactions among their members, especially by those present in their cuticle, known as cuticular hydrocarbons. These hydrocarbons primarily provide a protective barrier against dehydration, besides acting as signs exchanged during interactions among nestmates. Moreover, social wasps also produce other types of chemical compounds that help in the maintenance of their colonies acting in the prey capture and defense, among which is the venom. The venom produced and injected by the stinging apparatus has compounds that can be biologically active. Thus, the objective of this work was to investigate the chemical mediators of intraspecific interactions, besides the biological activity of the social wasp venom *Polybia sericea*. Our results of cuticular hydrocarbons and nest material allow us to confirm the hypotheses tested that the cuticular chemical profile of the colonies and the nest material can be used as complementary tools to evaluate population differences, besides the cuticular chemical composition varies from according to the relative age, physiological *status* and between different parts of the female body, being able to act as mediators in the colonial interactions. In addition, we confirm the idea that linear alkanes can act together with branched alkanes and other compounds as much to promote waterproofing and protection as to serve as signals during intracolony interactions. In relation to the venom, the results show that the venom presents toxicity to *Artemia salina* in all the concentrations tested, with absence and presence of protease inhibitor, however, in the presence of the inhibitor the toxicity was relatively larger. In the Ames test only the concentration of 150 $\mu\text{g plate}^{-1}$ in the absence of a protease inhibitor significantly increased the number of the revertant colonies and showed mutagenicity for the TA98 lineage. In relation to cell viability the venom of *Polybia*

sericea did not present cytotoxicity to MRC-5 lineage, but was cytotoxic to the CHO line and B16F10-Nex2 tumoral lineage. Finally, we emphasize that in all treatments the absence of protease inhibitor may lead to the degradation of substances that increase the cytotoxicity of the venom.

Key words: Cuticular hydrocarbons, social wasp, venom, *Polybia sericea*.

Introdução Geral

A ordem Hymenoptera é uma das mais diversas e abundantes entre os insetos (HOLLOBLER & WILSON, 1990). Este grupo compreende grande parte dos insetos sociais, sendo representado pelas formigas, e os grupos mais derivados de abelhas e vespas. A organização da sociedade destes organismos compõe-se de uma ou poucas fêmeas reprodutivas, operárias e um grande número de crias (WILSON 1971; 1975), de forma que, em colônias de insetos sociais existe uma organização, com uma divisão de trabalho bem estabelecida (SMITH et al., 2008), mantendo a coesão dessas colônias por interações entre seus membros (O'DONNELL & BULOVA, 2007).

Entre os representantes dos insetos sociais, as vespas, que também são conhecidas como marimbondos, despertam elevado interesse, no que se diz respeito ao estudo da evolução do comportamento social, devido à constituição de suas colônias que possuem diversos níveis de interação entre seus indivíduos (SPRADBERY, 1973). Em particular, as vespas da família Vespidae são exemplares importantes para o entendimento da origem e evolução do comportamento social em insetos (MARKIEWICZ & O'DONNELL, 2001), uma vez que este grupo abrange desde espécies solitárias até altamente eussociais. Vespidae é uma família constituída por seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, no entanto, apenas os três últimos (Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae) apresentam comportamento social e destas, apenas Polistinae ocorre no Brasil (CARPENTER & MARQUES, 2001).

Dentre as subfamílias que exibem comportamento social, Polistinae apresenta características comportamentais que merecem destaque pelos modos de fundação de suas colônias que podem ocorrer de modo independente, ou seja as fêmeas constroem seus ninhos de forma simples e sem envelope protetor, normalmente fundadas por uma ou poucas fêmeas que representam os gêneros, *Belonogaster*, *Mischocyttarus*,

Parapolybia, *Polistes* e algumas espécies de *Ropalidia* (JEANNE, 1980; GADAGKAR, 1991; JEANNE, 1991), outras espécies apresentam fundação por enxameagem, quando várias rainhas acompanhadas por centenas de operárias fundam suas colônias, comumente numerosas e com ninhos geralmente constituídos por envelope protetor, representados pelos 20 gêneros da tribo Epiponini, pelo gênero *Polybioides* e alguns do gênero *Ropalidia* (JEANNE, 1980; 1991).

Apesar de ser uma família com distribuição cosmopolita, a maior diversidade está concentrada na região Neotropical (CARPENTER & MARQUES, 2001). Outro aspecto curioso da evolução do comportamento social em vespas é o mecanismo de determinação de castas (rainha e operárias), podendo ocorrer de duas formas: Pré-imaginal, quando a nutrição larval e a taxa de desenvolvimento dos imaturos são afetadas, dando origem a duas castas distintas (HUNT, 1991; O'DONNELL, 1998) e Pós imaginal, quando a casta é, ao menos em parte determinada durante a fase de adulto e as operárias não perdem sua capacidade de reprodução (GADAGKAR, 1991). Além disso, o repertório comportamental da rainha é menor quando comparado ao das operárias (PARDI, 1948; JEANNE, 1972; GIANNOTTI, 1999; ZARA & BALESTIERI, 2000; TORRES et al., 2009; TORRES et al., 2012).

Para que a divisão de trabalho dentro da colônia seja eficiente e essa organização se mantenha coesa, os insetos sociais desenvolveram um mecanismo de comunicação complexo, no qual, ocorre a troca de sinais por diversos canais sensoriais, como os visuais, acústicos, táteis, magnéticos e químicos (BILLEN, 2006), sendo a última a mais utilizada por estes insetos, a qual emprega inúmeros compostos que mediam diferentes interações comportamentais (MATTHEWS & MATTHEWS, 2010; BLOMQUIST & BAGNERES, 2010).

Os compostos químicos que conduzem algum tipo de informação podem ser denominados semioquímicos ou infoquímicos (VILELA & DELLA LUCIA, 2001). Esses compostos são divididos de acordo com a sua atuação, ou seja, aqueles que estão envolvidos na comunicação intraespecífica, chamados de feromônios ou aqueles que desempenham interações interespecíficas, os aleloquímicos (BILLEN, 2006; LE CONTE & HEFETZ, 2008; IZZO et al., 2010; RICHARD & HUNT, 2013; KHIDR et al., 2013).

As respostas comportamentais dos insetos estão intimamente relacionadas às variações quantitativas e qualitativas desses compostos, no meio em que vivem (HOWARD & BLOMQUIST, 2005). Como por exemplo as respostas comportamentais

que precisam de dispersão rápida desses sinais químicos, como os de alarme, podem envolver feromônios constituídos por moléculas pequenas e que são altamente voláteis, entretanto, os insetos sociais fazem uso de outros mecanismos de comunicação nos quais estão envolvidos compostos não voláteis (HOWARD & BLOMQUIST, 2005).

Dentre estes compostos não voláteis estão os denominados hidrocarbonetos cuticulares (HCs) como a própria nomenclatura sugere, estão presentes na cutícula dos insetos, que tem como função primária proteger contra a desidratação (LOCKEY, 1988; BLOMQUIST & BAGNÈRES, 2010). Outra função importante destes compostos é atuar como feromônio de contato ou de superfície (ABDALLA et al., 2003; GINZEL, 2010; OLANIRAN et al., 2013; BELLO et al., 2015), formados basicamente por hidrocarbonetos, principalmente os alcanos lineares, ramificados e alcenos (DEVIGNE & BISEAU, 2012; OLANIRAN et al., 2013).

Dos compostos sintetizados pelos himenópteros, as vespas sociais também despertam interesse pela potencialidade de sua peçonha, que é um importante mecanismo para manutenção de suas colônias, uma vez que o aparelho ovipositor dos Aculeatas foi modificado em um aparelho de ferrão para injetar estas substâncias, cuja função primária é a de imobilizar presas e secundariamente se tornou um meio para defesa de suas colônias (GRIMALDI & ENGEL, 2005). Esse aparato tem a capacidade de injetar a peçonha em suas presas e inimigos naturais, além disso, em espécies sociais a peçonha também é frequentemente utilizada como parte da defesa imune externa tanto na cutícula quanto na superfície do ninho (BARACCHI & TRAGUST, 2017).

A peçonha é composta por uma mistura complexa de moléculas biologicamente ativas, variando de substâncias de baixa massa molecular a peptídeos e proteínas (KRISHNAKUMARI & NAGARAJ, 1997; HOFFMAN, 2006). Além disso, foram encontrados compostos como ésteres, alcanos, alcenos, espiroacetatos e acetanamidas (VEITH, et al., 1984; SILVA et al., 2015), que estão relacionados a respostas de alarme e recrutamento para atacar quando as colônias são perturbadas (JEANNE, 1982).

Diante do exposto acima, fica claro a importância de estudos que reforcem o entendimento sobre como esses compostos atuam de forma inter e intraespecífica de modo eficiente, garantindo a coesão e sucesso na sobrevivência das vespas sociais, além de compreender a relação dos compostos químicos, como sinais trocados durante as interações, e de analisar a peçonha, afim de verificar sua atividade biológica e toxicidade. Assim, é importante destacar que o estudo da subfamília Polistinae, sobretudo, o gênero *Polybia*, se faz relevante, pois abrange espécies que são

consideradas importantes 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 dos compostos cuticulares e da peçonha nesse processo.

Revisão Bibliográfica

Vespas sociais

As vespas sociais pertencem a ordem Hymenoptera que 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 Apocrita possui abdome livre ou pedunculado, trocanter simples ou dítroco, asas com nervação simples, ovipositor estiliforme e larvas ápodas (GALLO et al., 2002; RAFAEL et al., 2012). Outra característica importante da subordem Apocrita é que além de ser o grupo mais recente na história evolutiva da ordem Hymenoptera é o grupo que tem sido historicamente dividido em Parasítica e Aculeata (GRIMALDI & ENGEL, 2005; SHARKEY, 2007; RAFAEL et al., 2012).

A principal característica dos Aculeata que os difere dos outros é a modificação do ovipositor das fêmeas em um aparelho que injeta peçonha (MACLINTAL & STARR, 1996). O aparelho ferroador é formado por duas partes funcionalmente diferentes: a porção glandular, onde a peçonha e outras substâncias são produzidas, e a porção motora, onde estruturas quitinosas e musculares atuam conjuntamente na protrusão do ferrão, ejetando a peçonha (SILVA & NOLL, 2006), cuja função primária é a captura da presa, contudo, se tornou um eficiente e importante meio de defesa, principalmente em espécies sociais (GRIMALDI & ENGEL, 2005).

Dentro do grupo Aculeata está a família Vespidae, dividida em seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Vespinae e Polistinae, entretanto apenas as três últimas subfamílias possuem representantes de espécies de vespas eussociais (RAFAEL et al., 2012). Vespas da subfamília Polistinae constroem seus ninhos 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), assim são também conhecidas como vespas papel. As colônias dessas vespas podem permanecer ativas por muitos anos, e apresentam várias camadas de células de

cria sobrepostas abrigando milhões de células envoltas por um invólucro (CARPENTER & MARQUES, 2001; SOUZA & ZANUNCIO, 2012).

Dentro da subfamília Polistinae temos o gênero *Polybia*, com 58 espécies descritas, distribuídas em 11 subgêneros (RICHARDS, 1978; CARPENTER & MARQUES, 2001). Esse é um gênero que possui um variado grupo de espécies, diferindo desde a estrutura e arquitetura de seus ninhos, quanto na biologia de suas espécies, alguns estudos relatam que esse grupo possui tanto espécies com e sem diferenças morfológicas entre as castas (RICHARDS & RICHARDS, 1951; RICHARDS, 1978; NOLL & ZUCCHI, 2000; NOLL et al., 2004; NOLL & WENZEL, 2008).

Polybia sericea (Olivier) (Fig. 1) é uma espécie de fundação por enxameagem que constroem seus ninhos geralmente globosos, comumente construído em ramos de árvores, e o tamanho da colônia pode variar de alguns a milhares de indivíduos, além de ser amplamente distribuído em toda a América do Sul, especialmente no Brasil (RICHARDS, 1978).



Figura 1. Fêmea de *Polybia sericea* (Olivier).

Hidrocarbonetos cuticulares em Vespas sociais

As colônias de vespas sociais funcionam como sistemas fechados, sendo consideradas sistemas biológicos complexos e estruturados devido as numerosas interações entre seus membros (GREENE, 2010). Essas colônias podem conter desde dezenas até milhões de indivíduos sendo então coordenadas de modo a funcionarem como unidades ecológicas coesas (BOURKE, 1999; BILLEN, 2006).

Assim se faz necessário que exista um tipo eficiente de comunicação entre os companheiros de ninho. A comunicação entre os membros de uma colônia pode ocorrer por meio de diversos canais sensoriais, como visuais, acústicos, táteis, magnéticos e, sobretudo, químicos (BILLEN, 2006). A comunicação química, é vantajosa em relação às demais por permitir que a transmissão dessas informações ocorra de forma rápida e eficiente em diversas condições (ZAHAVI, 2008; RICHARD & HUNT, 2013). Os compostos químicos que conduzem algum tipo de informação podem ser denominados semioquímicos ou infoquímicos (VILELA & DELLA LUCIA, 2001) e são divididos, de acordo com a sua atuação, ou seja, aqueles que estão envolvidos na comunicação intraespecífica são chamados de feromônios e aqueles que atuam durante interações interespecíficas são conhecidos como aleloquímicos (BILLEN 2006; LE CONTE & HEFETZ, 2008; RICHARD & HUNT, 2013).

Para os insetos sociais os feromônios são de suma importância, pois estão envolvidos nas atividades relacionadas a manutenção da coesão entre membros de suas colônias (BILLEN & MORGAN, 1998). Estes compostos são classificados em dois tipos: leves e voláteis que são secretadas por glândulas e aqueles mais pesados, de cadeias de hidrocarbonetos que são encontradas na cutícula (HOWARD, 1993).

A presença desses compostos químicos, sobretudo, os Hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são especialmente importantes para mediar respostas comportamentais das vespas sociais perante suas companheiras de ninho (LORENZI et al., 1997; TANNURE-NASCIMENTO et al., 2005; MURAKAMI et al., 2009). No entanto, sua função primária é atuar como uma barreira para difusão de umidade, formando uma camada cerosa na cutícula do inseto para manter o equilíbrio hídrico e, assim evitar a dessecação (HOWARD & BLOMQUIST, 1982; LOCKEY, 1988), além de atuar também como barreira contra a infecção por microorganismos, sendo essenciais para a sobrevivência dos insetos (BLOMQUIST et al., 1987; PROVOST et al., 2008).

Esses sinais químicos são tipicamente voláteis e podem ser constituídos por um único componente ativo ou um complexo de substâncias produzidas em uma ou mais

glândulas exócrinas (BILLEN & MORGAN, 1998; BILLEN, 2006). Estes compostos são utilizados no reconhecimento de coespecíficos, e sua composição pode ser determinada tanto por componentes genéticos (RATNIEKS, 1991; PAGE et al., 1991) quanto por fatores ambientais (RATNIEKS, 1991; GAMBOA, 1996). Os ambientais seriam aqueles adquiridos pelos indivíduos a partir das condições ambientais em que está exposto, como alimento e material levado para o ninho, e os genéticos estão relacionados a fatores genéticos (GAMBOA et al., 1986).

Os HCs são formados basicamente de hidrogênio e carbono e são parte constituinte da camada lipídica que recobre a cutícula dos insetos (LOCKEY, 1988) e apresentam um importante papel como mediadores na comunicação química (BLOMQUIST, 2010). Esses compostos atuam como feromônios de contato, conferindo uma assinatura química específica ao indivíduo que permite a identificação de indivíduos coespecíficos de modo que a estrutura hierárquica da colônia seja mantida (PROVOST et al., 2008). Estes HCs podem ser divididos em diferentes classes de compostos, dentre eles estão os alcanos lineares, considerados por alguns autores como os mais importantes para evitar dessecação (GIBBS, 1998; HEFETZ, 2007; MENZEL et al., 2017), enquanto os alcanos ramificados, alcenos e alcadienos são considerados mais eficazes para sinalização química (BONAVITA-COUGOURDAN et al., 1991; DANI et al., 1996, 2001; HEFETZ, 2007; MURAKAMI et al., 2015).

Contudo, Lorenzi et al. (2004) sugerem que os alcanos lineares também atuam na sinalização durante as interações comportamentais, sendo importantes para reconhecimento em vespas jovens de *Polistes dominula*. Além disso, alguns estudos mostram que alcenos e alcanos ramificados devem estar envolvidos tanto na resistência à dessecação quanto na comunicação química (CHUNG & CARROLL, 2015). Essa dupla função dos HCs já foi relatada em outros estudos (GIBBS, 1998; GIBBS, 2007; CHOWN et al., 2011; CHUNG & CARROLL, 2015; BOULAY et al., 2017). Ademais, Le Conte & Hefetz (2008), evidenciam em sua revisão sobre himenópteros sociais, que os HCs possuem um papel multiface, discutindo que um mesmo composto químico pode exercer várias funções ao mesmo tempo.

A função dos HCs como mediadores de interações é permitir a identificação de co-específicos (PROVOST et al., 2008). Neste sentido, estes compostos podem variar significativamente entre colônias (TANNURE-NASCIMENTO et al., 2007; SOARES et al., 2017) e, mesmo entre membros de uma mesma colônia (DAPPORTO et al., 2004;

TANNURE-NASCIMENTO et al., 2007; ANTONIALLI-JUNIOR et al., 2007; SOARES et al., 2017).

O perfil químico de cada indivíduo carrega informações sobre sua idade, sexo, linhagem, casta, fertilidade, *status* fisiológico, grupo funcional, entre outras (LORENZI et al., 1996; PROVOST et al., 2008) e o conjunto de perfis químicos dos membros de uma colônia forma uma assinatura química colonial ou “odor” característico da colônia. O odor colonial é provavelmente adquirido poucas horas após a emergência de um imago, pelo contato com o material do ninho e outros membros da colônia (ESPELIE & HERMANN, 1990; SINGER & ESPELIE, 1992, 1997; SINGER et al., 1998) e é usado como modelo de comparação no processo de reconhecimento entre companheiros e não-companheiros de ninho (D’ETTORRE & LENOIR, 2010; STURGIS & GORDON, 2012).

Segundo Van Zweden & D’ettorre (2010), a capacidade de reconhecer e discriminar indivíduos a partir de sua assinatura química é amplamente difundida entre os insetos sociais. Esta capacidade consiste na detecção de sinais químicos e na comparação desses sinais com um modelo desencadeando uma resposta comportamental. Assim, a atividade total de uma colônia em um dado momento é o reflexo das interações entre todos os seus membros, reguladas por trocas de informações baseadas principalmente em sinais químicos (GREENE & GORDON, 2003), com isso, informações como o tipo de tarefa que uma operária executa na colônia ou o grupo ao qual pertence, podem estar contidas no seu perfil químico.

Em vespas sociais, os estudos de comunicação química estão focados em alguns aspectos da atividade da colônia, como os feromônios envolvidos no comportamento de alarme e defesa, marcação de substrato e trilha para enxameio, reconhecimento intracolonial, feromônios sexuais e feromônios relacionados à dominância e *status* social (LANDOLT et al., 1998, BRUSCHINI et al., 2010). Portanto, os HCs são importantes compostos envolvidos na comunicação química atuando no reconhecimento intra e interespecíficos (MONNIN, 2006; BLOMQUIST & BAGNERES, 2010).

Peçonha em vespas sociais

Na ordem Hymenoptera, da qual as vespas sociais fazem parte, estes insetos tiveram uma evolução do ovipositor em aparelho ferroador, que inclui um mecanismo de produção e injeção de peçonha (WHITMAN et al., 1990; BRANDÃO, 1999). Segundo Cassier et al. (1994) esta estrutura é composta de modo geral, por uma porção

secretora formada pela glândula de peçonha e glândula convoluta, além de um saco de armazenamento e um ferrão. As vespas sociais, assim como abelhas sociais e todas as formigas são incluídas na ordem Hymenoptera, que abrange mais de 150 mil espécies (GULAN & CRANSTON, 2017). Estas espécies sociais apresentam um nível de organização comportamental e para manter essa coesão nas colônias existe divisão de trabalho e mecanismos de captura de presa e defesa da colônia que são extremamente eficientes (WILSON, 1971).

As vespas estão logo abaixo das abelhas no ranking em estudos com peçonha, isso se deve ao fato de algumas espécies apresentarem efeitos alergênicos considerados graves em acidentes com humanos, tornando o conhecimento desse mecanismo importante para prevenção de acidentes, além de abrir possibilidades a descoberta de novos fármacos. Peçonha de vespas é altamente tóxica, rica em enzimas, aminas biogênicas e peptídeos biologicamente ativos (HABERMANN, 1972; NAKAJIMA, 1986), com ação neurotóxica, analgésica, citotóxica, hemolítica, hemorrágica e atividade farmacológica alergênica (HO & KO, 1998; MORTARI et al., 2005; ARCURI et al., 2016). Além disso, os produtos naturais constituem importante fonte de agentes terapêuticos (GUO, 2016) e, dentre estes recursos, a peçonha pode apresentar substâncias com propriedades antitumorais (KING, 2011; HARVEY, 2014).

A peçonha de inseto melhor caracterizada ainda é a de *Apis mellifera* (WOOD & HOFFMAN, 1983; LIMA & BROCHETTO-BRAGA, 2003; GEORGIEVA et al., 2010; SCIANI et al., 2010; BRIGATTE et al., 2011), no entanto, pesquisas importantes com a peçonha de vespas sociais também foram realizadas, como a análise proteômica da peçonha da vespa *Polybia paulista* (SANTOS et al., 2010) que contribuiu como passo inicial para o estudo recente de Leite et al. (2015), no qual concluíram que o peptídeo denominado Polybia-MP1 da peçonha desta espécie, após isolado, apresentou atividade anticarcinogênica.

Além disso, Yashad Dongol et al. (2014), relatam as propriedades farmacológicas e imunológicas da peçonha das vespas, discutindo aspectos causados pela ferroada, bem como o tratamento que deve ser utilizado no caso de reações alérgicas. Dentre as propriedades farmacológicas citadas temos a imunossupressão, a imunoestimulação além da indução de morte celular.

São muitas as atividades biológicas já encontradas na peçonha de vespas: ação inseticida; antimicrobiana, como os peptídeos dominulina A e B identificados na peçonha de *Polistes dominula* (TURILLAZZI et al., 2006). Efeitos anticonvulsivantes

foram observados na peçonha de *Polybia occidentalis* (MORTARI et al., 2007). Além disso, a atividade antimicrobiana da peçonha já foi relatada em algumas espécies de vespas, tais como: *Protonectarina sylveirae* (DOHTSU et al., 1993), *Vespa basalis* (PARK et al., 1995) e a vespa *Agelaia pallipes pallipes* (MENDES et al., 2004). Além disso, Mortari et al. (2005) compararam o potencial de citotoxicidade de três espécies de vespas neotropicais brasileiras do gênero *Polybia*: *P. ignobilis*, *P. occidentalis* e *P. paulista*.

No entanto, apesar das pesquisas promissoras já realizadas com vespas sociais, segundo Santos et al. (2007), existem quase 500 espécies de vespas sociais no Brasil, das quais pouco se sabe sobre a bioquímica, farmacologia e imunologia de sua peçonha. Dentre os entraves relacionados à investigação de novas substâncias bioativas a partir da peçonha destes insetos, destaca-se principalmente a dificuldade de se obter esse material em quantidade suficiente, uma vez que é limitado o volume destas substâncias extraída de um único indivíduo (FOX et al., 2012; PLUZHNIKOV et al., 2014).

Outro desafio está relacionado à mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade deste produto natural, que pode ser um fator limitante para sua aplicação terapêutica (SIMÕES et al., 2016). Neste aspecto, estudos que avaliem a peçonha quanto sua atuação sobre a instabilidade genética e a citotoxicidade sobre modelos biológicos são relevantes para pesquisas mais aplicadas, como o estudo de novos agentes terapêuticos.

Entre os testes alternativos para a avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade, estão o teste de Ames, que é sensível a agentes mutagênicos e citotóxicos e, manifesta sua resposta baseado na indução de mutações reversas empregando bactérias auxotróficas para histidina (his-), que na presença de agentes mutagênicos reverte seu caráter de auxotrofia e passa a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido (ZEIGER, 2001; VARELLA et al., 2004); o teste sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, que é um modelo sensível para avaliação da citotoxicidade e determinação da dose letal para 50% dos indivíduos (DL₅₀) (MEYER et al., 1982), dado que se correlaciona com a razão entre a dose tóxica e a dose capaz de produzir a resposta terapêutica desejada (MELLO et al., 2004).

Além disso, há o ensaio de viabilidade celular, pela técnica do MTT, o teste MTT é um ensaio de citotoxicidade no qual é medida a viabilidade celular. Este teste baseia-se na capacidade das células viáveis em converter o sal MTT (Brometo de Tiazol Azul Thyazolyl). Este sal é solúvel na água e é convertido, pelas células viáveis, em um

sal insolúvel de coloração púrpura. Este produto não pode atravessar as membranas celulares de células viáveis e, portanto, se acumula em seu interior (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006).

Objetivo Geral

Avaliar a composição e variação dos mediadores químicos de interações intraespecíficas, além da atividade biológica da peçonha na espécie de vespa social *Polybia sericea*.

Hipóteses

- Tanto o perfil químico cuticular dos membros das colônias, quanto o perfil químico do material de construção do ninho, podem ser usados como ferramentas complementares para avaliar diferenças populacionais;
- A composição dos hidrocarbonetos cuticulares varia de acordo com a idade relativa, *status* fisiológico e entre as diferentes partes do corpo das fêmeas podendo atuar como mediadores nas interações intracoloniais.
- As atividades biológicas da peçonha podem ser diferentes na ausência e na presença de inibidor de protease, uma vez que na sua ausência pode haver degradação de substâncias podendo apresentar diferentes respostas.

Referências

- ARCURI, H.A.; GOMES, P.C.; DE SOUZA, B.M.; DIAS, N.B.; BRIGATTE, P.; STABELI, R.G.; PALMA, M.S. Paulistine the functional duality of a wasp venom peptide toxin, **Toxins** (Basel) 8, 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8030061>.
- 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**. 6, 492-499, 2007.
- 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**. 2, 191-199, 2003.

- 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. 11, .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**. 112, 1077-1082, 2015. DOI 10.1073/pnas.1417605112
- BILLEN, J. Signal variety and communication in social insects. **Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting**, v. 17, 2006.
- BILLEN, J.; MORGAN, E. D. Pheromone 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.
- BLOMQUIST, G.J. Structure and analysis of insect hydrocarbons. In: **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology** (BLOMQUIST. G. & BAGNÈRES. A.G.). New York: Cambridge U. P, 19-34 p, 2010
- BLOMQUIST, G. J. & BAGNÈRES, A.G. 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- 18p, 2010.
- BLOMQUIST, G. J.; NELSON, D. R.; RENOBALLES, M. Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 6, 227–265, 1987.
- BONAVITA-COUGOURDAN, A.; THERAULAZ, G.; BAGNERES, A.G.; ROUX, M.; PRATTE, M.; PROVOST, E.; CLEMENT, J.L. Cuticular hydrocarbons, social organization and ovar-ian development in a polistine wasp: *Polistes dominulus* Christ. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 4, 667–680, 1991.
- BOULAY, R.; ARON, S.; CERDÁ, X.; DOUMS, C.; GRAHAM, P.; HEFETZ, A.; MONNIN, T. Social Life in Arid Environments: The Case Study of *Cataglyphis* Ants. **Annual Review of Entomology**. 62, 305–21, 2017. Doi: 10.1146/annurev-ento-031616-034941.

- BOURKE, A.F.G. Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. **Journal of Evolutionary Biology**. 12(2): 245–257, 1999. DOI: 10.1046/j.1420-9101.1999.00028.x.
- BRANDÃO, C. R. F. Hymenoptera. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: **síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo-Brasil, FAPESP, 141-146, 1999.
- 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, p. 101-111, 2011.
- BRUSCHINI, C.; CERVO, R.; TURILLAZZI, S. Pheromones in social wasps. **Vitamins and Hormones**. 83, 447–492, 2010.
- 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.
- CASSIER, P.; TEL-ZUR, D.; LENSKY, Y. The sting sheaths of honey bee workers (*Apis mellifera* L.): Structure and alarm pheromone secretion. **Journal of Insect Physiology**. 40, 23-32, 1994.
- CHOWN, S. L.; SORENSEN, J. G.; TERBLANCHE, J. S. Water loss in insects: An environmental change perspective. **Journal of Insect Physiology**. 57, 1070–1084, 2011.
- CHUNG, H.; CARROLL S.B. Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. **BioEssays**. 37, 822–830, 2015.
- D’ETTORRE, P.; LENOIR, A. Nestmate Recognition. In Lach L, Parr CL, Abbott KL (eds) **Ant Ecology**. Oxford: Oxford U. P. 194-209, 2010.
- 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 Behavior**. 62, 165-171, 2001.
- DANI, F.R.; MORGAN, E.D.; TURILLAZZI, S. Dufour gland secretions of *Polistes* wasps: chemical composition and possible involvement in nestmate recognition (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Insect Physiology**. 42, 541–548, 1996.
- DAPPORTO, L.; THEODORA, P.; SPACCHINI, C.; PIERACCINI, G.; TURILLAZZI, S. Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper

- wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**. 51: 279–286, 2004. DOI 10.1007/s00040-004-0738-0.
- 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**. 91, 275-281, 2012. DOI doi.org/10.1016/j.beproc.2012.09.008.
- DOHTSU, K.; OKUMURA, K.; PALMA, M.S.; NAKAJIMA, T. Isolation na sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Himenoptera – Vespidae). **Natural Toxins**, New York, 1:271-6, 1993.
- ESPELIE, K.E.; HERMANN, H.R. Surface lipids of the social wasp *Polistes annularis* (L.) and its nest and nest pedicel. **Journal of Chemical Ecology**. 16(6), 1841–1852, 1990.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**. 160, 171–177, 2006.
- FOX, E.G.P.; PIANARO, A.; SOLIS, D.R.; DELABIE, J.H.C.; VAIRO, B.C.; MACHADO, E.A.; BUENO, O.C. Intraspecific and intracolony variation in the profile of venom alkaloids and cuticular hydrocarbons of the fire ant *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera: Formicidae). **Psyche**, 1-10, 2012.
- GADAGKAR, R. *Belonogaster*, *Mischocyttarus*, *Parapolybia*, and independent founding *Ropalidi*. In Ross KG, Matthews RW, **The social biology of wasps**. Ithaca: Cornell U. P. 149-190, 1991.
- 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. 920p., 2002.
- GAMBOA, G. J. Kin recognition in social wasps. In: Turillazzi S, West-Eberhard MJ. **Natural History and Evolution of Paper-Wasps**. Oxford U P, 161-177, 1996.
- GAMBOA, G.J.; REEVE, H.K.; FERGUSON, I.D.; WACKER, T.L. Nestmate recognition in social wasps: origin and acquisition of recognition odours. **Animal Behaviour**. 34, 685–695, 1986. DOI:10.1016/S0003-3472(86)80053-7
- GEORGIEVA, D.; GREUNKE, K.; BETZEL, C. Three-dimensional model of the honeybee venom allergen Api m 7: structural and functional insights. **Molecular BioSystems**. 6, 1056-1060, 2010.

- GIANNOTTI, E. Organization of the eussocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera: Vespidae). **Sociobiology**. 33, 325–338, 1999.
- GIBBS, A.G. Waterproof cockroaches: the early work of J. A. Ramsay. Invited commentary for JEB Classics. **Journal of Experimental Biology**. 210, 921-922, 2007. Doi: 10.1242/jeb.000661.
- GIBBS, A.G. Water-Proofing Properties of Cuticular Lipids. **American Zoologist**. 38, 471-482, 1998.
- 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, 375-389, 2010.
- GREENE, M.J. Cuticular hydrocarbon cues in the formation and maintenance of insect social groups, In Blomquist GJ, Bagnères AG. (eds). **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology**. New York: Cambridge U. P, 244-253, 2010.
- GREENE, M.J.; GORDON, D.M. Cuticular hydrocarbons inform task decisions. **Nature**. 423, 2190p, 2003.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. Evolution of the insects. **Cambridge**. New Jersey. 788p, 2005.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. Insetos - **Fundamentos da Entomologia** - 5ª Ed. Roca, 2017.
- GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. 7, 119-36, 2016.
- HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**. 177: 314–322, 1972.
- HARVEY, AL. Toxins and drug discovery. **Toxicon**. 92, 193-200, 2014.
- HEFETZ, A. The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae) – interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy. **Myrmecological News**. 10, 59-68, 2007.
- HO, C.L.; KO, J.L. Purification and characterization of lethal protein with phospholipases A1 activity from the hornet (*Vespa basalis*) venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, 962, 414–422, 1998.
- HOFFMAN, D.R. Hymenoptera venom allergens. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**. 30, 109-128, 2006.

- HOLLOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Ants**, Springer-Verlag, Berlin – Germany, 1990.
- HOWARD, R.W. Cuticular hydrocarbon and chemical communication. In Stanley-Samuelson DW, Nelson DR (Eds.), **Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology**. Lincoln: University of Nebraska Press, 179-226, 1993.
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**. 50, 371–393, 2005.
- HOWARD, R.W.; BLOMQUIST, G.J. Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**. 27, 149–172, 1982.
- HUNT, J.H. Nourishment and the evolution of the Social Vespidae. In Ross KG, Matthews RW (eds.), **The social biology of wasps**. Ithaca, New York: Cornell U. P. 426-450, 1991
- 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**. 64, 857–864, 2010.
- JEANNE, R. L. Social biology of the Neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**. 3, 63– 150, 1972.
- JEANNE, R. L. Evolution of social behavior in Vespidae. **Annual Review of Entomology**. 25: 371–395, 1980.
- JEANNE, R. L. Polyethism. In Ross KG, Matthews RW (eds), **The social biology of wasps**. Ithaca: Cornell U. P, 389-425, 1991
- JEANNE, R. L. The adaptivness of social wasps nest architecture. **Quarterly Review of Biology**. 50, 267–287, 1975.
- JEANNE, R.L. Evidence for an alarm substance in *Polistes canadensis*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 38(3), 329-330, 1982.
- 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**. 147, 175–185, 2013. DOI:10.1111/eea.12058.
- KING, G.F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**. 11: 1469-84, 2011.

- KRISHNAKUMARI, V.; NAGARAJI, R. Antimicrobial and hemolytic activities of cabrolin, a 13-residue peptide from the venom of European hornet, *Vespa cabro*, and its analogs. **Journal of Peptide Research**. 50, 88-93, 1997.
- LANDOLT, P.J.; JEANNE, R.L.; REED, H.C. Chemical communication in social wasps. In Vander Meer RK et al. (Eds). **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Colorado: Westview Press, 216-235, 1998
- 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**. 109, 936–947, 2015.
- LE CONTE. Y. L.. & HEFETZ. A. Primer pheromones in social Hymenoptera. **Annual Review Entomology**. 53, 523-542, 2008.
- LIMA, P. R. M.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venmous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. 9, 149-162, 2003.
- LOCKEY, K.H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 89, 595-645, 1988.
- LORENZI, M.C.; SLEDGE, M.F.; LAIOLO, P.; STURLINI, E.; TURILLAZZI, S. Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. **Journal of Insect Physiology**. 50, 935-941, 2004. DOI.org/10.1016/j.jinsphys.2004.07.005.
- LORENZI, M. C.; BAGNÈRES, A. G.; CLÉMENT. J. L.; TURILLAZZI, S. *Polistes biglumis bimaculatus* epicuticular hydrocarbons and nestmate recognition (Hymenoptera. Vespidae). **Insectes Sociaux**. 44, 123-138, 1997.
- 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**. 1, 107–108, 1996.
- MACLINTAL, E. A.; STARR, C. K. Comparative morphology af the stinger in the social wasp genus *Ropalidia* (Hymenoptera: Vespidae). **Memoirs of the Entomological Society of Washington**. 17, 108-150, 1996.
- MARKIEWICZ, D.A.; O'DONNELL, S. Social dominance, task performance and nutrition: implications for reproduction in eusocial wasps. **Journal of**

- comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology.** 187, 327–333, 2001.
- MATTHEWS, R.W.; MATTHEWS, J.R. **Insect behavior.** New York: Springer, 2010.
- MELLO, J.R.B.D.; MAIA, J.Z.; CASTRO, A.P.D.; MELLO, F.B.D. Avaliação dos efeitos do *Pygeum africanum* rosaceae sobre a fertilidade de ratos. **Acta Scientiae Veterinariae.** 32, 103-10, 2004.
- MENDES, M.A.; SOUZA, B.M.; SANTOS, L.D.; PALMA, M.S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes* by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** 7, 181, 2004.
- 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.** 284, 1-10, 2017.
- MEYER, B.N.; FERRIGINI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica,** 45: 31-4, 1982.
- MONNIN, T. Chemical recognition of reproductive status in social insects **Annales Zoologici Fennici.** 43, 515–530, 2006.
- MORTARI, M.R.; CUNHA, A.O.S.; OLIVEIRA, L.; VIEIRA, E.B.; GELFUSO, E.A.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W.F. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology.** 97(5), 289–95, 2007.
- MORTARI, M.R.; CUNHA, A.O.S.; OLIVEIRA, L.; GELFUSO, E.A.; VIEIRA, E.B.; SANTOS, W.F. Comparative toxic effects of the venoms from three wasp species of the genus *Polybia* (Hymenoptera, Vespidae). **Journal of Biological Sciences.** 5(4), 449–454, 2005.
- 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.** 62, 109-115, 2015.

- MURAKAMI, A. S. N.; SHIMA, S. N.; DESUÓ, I. C. More than one inseminated female in colonies of the independent-founding wasp *Mischocyttarus cassununga* Von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 53(4), 653–662, 2009.
- NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: Piek, T. (Ed.), **Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects**. Academic, London, 309–327, 1986.
- NOLL, F. B.; WENZEL, J. W. Caste in the swarming wasps: ‘queenless’ societies in highly social insects. **Biological Journal of the Linnean Society**. 93, 509–522, 2008.
- NOLL, F. B.; WENZEL, J. W.; ZUCCHI R. Evolution of caste in Neotropical swarmfounding wasps (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini). **American Museum Novitates**. 3467, 24, 2004.
- NOLL, F. B.; ZUCCHI, R. Increasing caste differences related to life cycle progression in some neotropical swarm-founding polygynic polistine wasps (Hymenoptera Vespidae Epiponini). **Ethology Ecology and Evolution**. 12, 43–65, 2000.
- 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 Societaux**. 54, 203–210, 2007.
- O’DONNELL, S. Dominance and polyethism in the eusocial wasp *Mischocyttarus mastigophorus* (Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**. 43, 327–331, 1998. DOI:10.1007/s002650050498.
- 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*. **Journal of Chemical Ecology**. 39, 559–568, 2013. DOI 10.1007/s10886-013-0272-5
- PAGE, R.E.JR.; METCALF, R.A.; METCALF, R.L.; ERICKSON, E.H.JR.; LAMPMAN, R.L. Extractable hydrocarbons and kin recognition in honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Chemical Ecology**. 17(4), 745–756, 1991. DOI 10.1007/BF00994197.

- 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. 1-17, 1996.
- PARDI, L. Dominance order in *Polistes* wasps. **Physiological Zoology**. 21: 1–13, 1948.
- PARK, N.G.; YAMATO, Y.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Tawian with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. **Biopolymers**. New York, 36:793-801, 1995.
- PLUZHNIKOV, K.A.; KOZLOV, S.A.; VASSILEVSKI, A.A.; VORONTSOVA, O.V.; FEOFANOV, A.V.; GRISHIN, E.V. Linear antimicrobial peptides from *Ectatomma quadridens* ant venom. **Biochimie**. 107, 211-215, 2014.
- 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, 19–72, 2008.
- 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. 810, 2012.
- RATNIEKS, F.L.W. The evolution of genetic odor cue diversity in social hymenoptera. **American Naturalist**. 137(2), 202–226, 1991.
- RICHARD, F.J.; HUNT, J.H. Intracolony chemical communication in social insects. **Insectes Sociaux**. 60, 275–291, 2013. DOI 10.1007/s00040-013-0306-6.
- RICHARDS, O. W. **The social wasps of the Americas (excluding the Vespinae)**. London, British Museum of Natural History, vii, 580, 1978.
- RICHARDS, O. W.; RICHARDS, M. J. Observations on the social wasps of South America (Hymenoptera, Vespidae). **Transactions of The Royal Entomological Society of London**, 102, 1-170. 1951.
- 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**. 9, 3867- 3877, 2010.
- SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; SOUZA, B. M.; ARCURI, H. A.; CUNHA-NETO, E.; CASTRO, F. M.; KALIL, J. E.; PALMA, M. S. Purification, Sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**. 50, 923-937, 2007.

- 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**. 31, 1473-1479, 2010.
- SHARKEY, M. J. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. **Zootaxa** **1668**. 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, M.F.; MOTA, C.M.; MIRANDA, V.D.S.; OLIVEIRA CUNHA, A.D.; SILVA, M.C.; NAVES, K.S.C.; OLIVEIRA, F.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; SANTIAGO, F.M. Biological and enzymatic characterization of proteases from crude venom of the ant *Odontomachus bauri*. **Toxins** **7**, 5114-5128, 2015.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre – Brazil: Artmed Editora, 2016.
- SINGER, T.L.; ESPELIE, E.K.; GAMBOA, G.J. Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML, Espelie EK (eds). **Pheromone communication in social insects**. Boulder, Westview Press, 104-125, 1998.
- SINGER, T.L.; ESPELIE, K.E. Exposure to nest paper hydrocarbons is important for nest recognition by a social wasp, *Polistes metricus* Say (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**. 44: 245–254, 1997. DOI 10.1007/s000400050045.
- SINGER, T.L.; ESPELIE, K.E. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. **Animal Behaviour**. 44(1), 63–68, 1992. DOI.org/10.1016/S0003-3472(05)80755-9.
- 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**. 172, 497–507, 2008.
- SOARES, E. R. P.; BATISTA, N. R.; SOUZA, R. D. S.; TORRES, V. D. 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. **Revista Brasileira de Entomologia**. 61(3), 224-231, 2017.

- SOUZA, M. M.; ZANUNCIO, J. C. **Marimbondos: vespas sociais (Hymenoptera: Vespidae)**. Editora UFV. 79, 2012.
- SPRADBERY, J.P. **Wasps: An account of the biology and natural history of solitary and social wasps**. London, Seattle: University of Washington Press, 1973.
- STURGIS, S.J.; GORDON, D.M. Nestmate recognition in ants (Hymenoptera: Formicidae): **a review. Myrmecological News**. 16, 101–110, 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.
- TANNURE-NASCIMENTO, I.C.; NASCIMENTO, F.S.; ZUCCHI, R. Size and colony cycle in *Polistes satan*, a Neotropical paper wasp (Hymenoptera, Vespidae). **Ethology Ecology & Evolution**. 17, 105–119, 2005. DOI: 10.1080/08927014.2005.9522601.
- TORRES, V.O.; MONTAGNA, T.S.; RAIZER, J.; ANTONIALLI-JUNIOR, W.F. Division of labor in colonies of the eusocial wasp, *Mischocyttarus consimilis*. **Journal of Insect Science**. 12:21, 2012. DOI: 10.1673/031.012.2101.
- TORRES, V.O.; ANTONIALLI-JUNIOR, W.F.; GIANNOTTI, E. Divisão de trabalho em colônias da vespa social neotropical *Polistes canadensis canadensis* Linnaeus (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 53(4), 593–599, 2009.
- TURILLAZZI, S.; MASTROBUONI, G.; DANI, F. R.; MONETI, G.; PIERACCINI, G.; LA MARCA, G.; BARTOLUCCI, G.; PERITO, B.; LAMBARDI, D.; CAVALLINI, V.; DAPPORTO, L. Dominulin A and B: two new antibacterial peptides identified on the cuticle and in the venom of the social paper wasp *Polistes dominulus* using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-ion trap. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. 17, 376-383, 2006.
- VAN ZWEDEN, J.S.; D'ETTORRE, P. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. In Blomquist GJ, Bagnères AG (eds). **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology**. New York: Cambridge U. P. 222-243, 2010.

- VARELLA, S.D.; POZETTI, G.L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food and Chemical Toxicology**. 42, 2029-35, 2004.
- 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**. 71, 328-329, 1984.
- VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. Introdução aos semioquímicos e terminologia, Feromônios de insetos: **biologia, química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos Editora. 9-12, 2001.
- WENZEL, J. W. A generic key to the nests of hornets, yellowjackets, and paper wasps worldwide (Vespidae: Vespinae, Polistinae). **American Museum Novitates** 3224. 1–39, 1998.
- WHITMAN, D. W.; BLUM, M. B.; ALSOP, D. W. Allomones: Chemicals for Defense. In: EVANS, D. L.; SMITH, J. **Insect Defenses**. Albany-EUA: State University of New York Press. 289-351, 1990.
- WILSON, E. O. **Sociobiology the new synthesis**. Cambridge, MA: Ed. Belknap press. 697, 1975.
- WILSON, E. O. **The insects societies**. Cambridge, Belknap Press of Harvard University Press. 548, 1971.
- WOOD, C. L.; HOFFMAN, D. R. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of hymenoptera venom and venom sac extrats. **Toxicon**. 21, 291-99, 1983.
- YASHAD-DONGOL, DHANANJAYA, B.L.; SHRESTHA, R.K.; ARYAL, G. Pharmacological and Immunological Properties of Wasp Venom, **Pharmacology and Therapeutics**. 3, 2014.
- ZAHAVI, A. The handicap principle and signalling in collaborative systems. In D'ettorre P, Hughes DP (Eds). **Sociobiology of communication: Na interdisciplinary perspective**. New York: Oxford U. P. 1-9, 2008.
- ZARA, F.J.; BALESTIERI, J.B.P. Behavioural catalogue of *Polistes versicolor* Oliver (Vespidae: Polistinae) post-emergence colonies. **Naturalia**. 25, 301– 319, 2000.
- ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests? **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 492, 9-38, 2001.

CAPÍTULO I

Mediadores químicos de interações intraespecíficas na vespa eussocial *Polybia sericea* (Vespidae: Polistinae)

* Formatação nas normas da revista *Insectes Sociaux* ISSN: 0020-1812.

Mediadores químicos de interações intraespecíficas na vespa eussocial *Polybia sericea* (Vespidae: Polistinae)

Eva R. P. Soares^{1,2}, Denise S. Antonio^{2,3,4}, Kamylla B. Michelutti^{2,3,4}, Viviana O. Torres¹, Claudia A. L. Cardoso³ & William F. Antonialli-Junior^{1,2,3,4}

¹Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970 Dourados-MS, Brasil. ²Laboratório de Ecologia Comportamental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Bsazil. ³Centro de Pesquisa em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Brasil. ⁴Programa de Pós Graduação de Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

Resumo: A comunicação química é fundamental para manter a coesão das colônias de insetos sociais e neste processo de comunicação os hidrocarbonetos cuticulares têm recebido destaque, uma vez que atuam como sinais trocados durante as interações entre membros da mesma colônia. Contudo, ainda são poucos os estudos que investigaram a variação intraespecífica numa vespa social Neotropical, especialmente da tribo Epiponini. Portanto, este estudo avaliou a variação intraespecífica de hidrocarbonetos cuticulares e do material de construção do ninho em função do que podem sinalizar em colônias da espécie *Polybia sericea*, testando as seguintes hipóteses: a) Que o perfil químico cuticular dos membros das colônias e do material do ninho podem ser usados como ferramentas complementares para avaliar diferenças populacionais; e b) A composição química cuticular varia de acordo com a idade relativa, *status* fisiológico e entre diferentes partes do corpo das fêmeas, podendo atuar como mediadores nas interações coloniais. As amostras foram coletadas de três diferentes populações e os compostos foram analisados por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas. Os resultados confirmam as hipóteses e, mostram também que os alcanos lineares são mais numerosos e abundantes nas amostras desta espécie, podendo atuar em conjunto com os alcanos ramificados e outros compostos tanto para promover a impermeabilização e proteção quanto servir como sinais durante as interações intracoloniais. Esses resultados divergem do padrão comum descrito em outras vespas sociais, estudadas até o momento.

Palavras chave: Desenvolvimento ovariano, hidrocarbonetos cuticulares, idade relativa, ninho.

Chemical mediators of intraspecific interactions in the eussocial wasp *Polybia sericea* (Vespidae: Polistinae)

Abstract: Chemical communication is fundamental to maintain the cohesion of the colonies of social insects and in this communication process cuticular hydrocarbons have been highlighted, since they act as signals exchanged during the interactions among members of the same colony. However, few studies have investigated intraspecific variation in a Neotropical social wasp, especially the Epiponini tribe. Therefore, this study evaluated the intraspecific variation of cuticular hydrocarbons and nest material depending on what they can signal in colonies of the species *Polybia sericea*, testing the following hypotheses: a) That the cuticular chemical profile of members of the colonies, and the nest material can be used as complementary tools to assess population differences; and b) The cuticular chemical composition varies according to the relative age, physiological *status* and between different parts of the female body, being able to act as mediators in the colonial interactions. Samples were collected from three different populations and the compounds were analyzed by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. The results confirm the hypotheses and also show that linear alkanes are more numerous and abundant in the samples of this species and can act together with branched alkanes and other compounds both to promote waterproofing and protection as well as to serve as signals during intracolonic interactions. These results diverge from the common pattern described in other social wasps studied so far.

Key words: Ovarian development, cuticular hydrocarbons, relative age, nest

Introdução

As colônias de vespas sociais, bem como, outros grupos de insetos sociais funcionam como unidades altamente integradas e para isso precisam manter sua organização durante suas interações entre companheiras de ninho. Neste contexto, a comunicação entre os membros de uma colônia pode ocorrer por diversos canais sensoriais, como visuais, acústicos, táteis, magnéticos e químicos (Billen 2006). A comunicação química é comumente mais utilizada por estes insetos, na qual diversos compostos podem mediar diferentes interações comportamentais (Blomquist e Bagnères 2010; Matthews e Matthews 2010).

Os compostos químicos que conduzem algum tipo de informação podem ser denominados semioquímicos ou infoquímicos (Vilela e Della Lucia 2001) e são divididos de acordo com a sua atuação, ou seja, aqueles que estão envolvidos na comunicação intraespecífica são chamados de feromônios e aqueles que atuam durante interações interespecíficas são conhecidos como aleloquímicos (Billen 2006; Le Conte e Hefetz 2008; Richard e Hunt 2013). Para os insetos sociais os feromônios são de suma importância, pois estão envolvidos nas atividades relacionadas a manutenção da coesão entre membros de suas colônias (Billen e Morgan 1998). Estes compostos são classificados em dois tipos: substâncias leves e voláteis que são secretadas por glândulas e substâncias mais pesadas, de cadeias de hidrocarbonetos que são encontradas na cutícula (Howard 1993).

A presença desses compostos químicos, sobretudo, os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são especialmente importantes para mediar respostas comportamentais das vespas sociais perante suas companheiras de ninho (Lorenzi et al. 1997; Tannure-Nascimento et al. 2005; Murakami et al. 2009). No entanto, sua função primária é atuar como uma barreira para difusão de umidade, formando uma camada cerosa na cutícula do inseto para manter o equilíbrio hídrico e, assim evitar a dessecação (Howard e Blomquist 1982; Lockey 1988), além de atuar como barreira contra a infecção por microorganismos, sendo, portanto, essenciais para sua sobrevivência (Blomquist et al. 1987; Provost et al. 2008).

Estes HCs podem ser divididos em diferentes classes de compostos, dentre eles estão os alcanos lineares, considerados por alguns autores como os mais importantes para evitar dessecação (Gibbs 1998; Hefetz 2007; Menzel et al. 2017), enquanto os alcanos ramificados, alcenos e alcadienos são considerados mais eficazes para sinalização química (Bonavita-Cougourdan et al. 1991; Dani et al. 1996, 2001; Hefetz

2007; Murakami et al. 2015). Contudo, Lorenzi et al. (2004) sugerem que os alcanos lineares também atuam na sinalização durante as interações comportamentais, sendo importantes para reconhecimento em vespas jovens de *Polistes dominula*. De fato, Michelutti et al. (2018) também sugerem que alcanos lineares agem como ferramenta para avaliar diferenças intraespecíficas em vespas sociais. Além disso, alguns estudos mostram que alcenos e alcanos ramificados devem estar envolvidos tanto na resistência à dessecação quanto na comunicação química (Chung e Carroll, 2015), atuando com dupla função (Gibbs 1998; Gibbs 2007; Chown et al. 2011; Chung e Carroll 2015; Boulay et al. 2017). Ademais, Le Conte e Hefetz (2008) evidenciam em sua revisão de himenópteros sociais que os HCs possuem um papel multiface, discutindo que um mesmo composto químico pode exercer vários papéis.

A função dos HCs como mediadores de interações, denominados também de feromônios de contato é permitir a identificação de coespecíficos (Provost et al. 2008) atuando, como uma assinatura química específica do indivíduo. Assim, estes compostos podem variar significativamente entre colônias (Tannure-Nascimento et al. 2007; Soares et al. 2017) e membros de uma mesma colônia (Dapporto et al. 2004; Tannure-Nascimento et al. 2007; Antonialli-Junior et al. 2007; Soares et al. 2017).

O papel dos HCs como mediadores das interações em colônias de vespas sociais fica mais claro quando constatamos que estes compostos variam entre os membros de uma colônia (Liang e Silverman 2000 e Bruschini et al. 2011) em função da fisiologia (Sledge et al. 2001; Monnin 2006; Izzo et al. 2010; Torres et al. 2014; Soares et al. 2014), idade (Cuvillier-Hot 2001; Panek et al. 2001) e até mesmo entre as diferentes partes de seu corpo (Wang et al. 2016).

Vários estudos têm demonstrado, ainda, que a composição química dos membros das colônias e dos seus ninhos apresentam forte relação e, em conjunto formam a assinatura química colonial (Espelie e Hermann 1990; Espelie et al. 1990; Singer e Espelie 1997). Alguns compostos químicos são específicos de cada colônia e são utilizados como mediadores de interações (Murakami et al. 2015), além de variarem de forma significativa entre diferentes colônias, devem variar também de acordo com a população (Bonelli et al. 2015) já que são influenciados por fatores tanto genéticos como ambientais (Liang e Silverman 2000; Khidr et al. 2013). Portanto, os HCs têm potencial para serem usados como ferramenta biogeográfica (Dapporto et al. 2004; Calderón-Fernández et al. 2005; Soares et al. 2017) de modo avaliar como as diferenças populacionais entre colônias de uma mesma espécie pode evoluir.

No entanto, apesar da destacada importância dos HCs e de outros compostos encontrados no material de seus ninhos como sinais intraespecíficos ainda existem poucos estudos que investigaram essas variações em vespas sociais Neotropicais, sobretudo, em espécies de fundação por enxameagem, uma vez que constroem seus ninhos protegidos por envelope como é o caso do gênero *Polybia* e outras espécies de Epiponini. As colônias dessas espécies são numerosas dificultando, por exemplo, os estudos do *status* fisiológico já estudado em *Parachartergus smithii* (Mateus et al. 1997), *Pseudopolybia vespiceps* (Shima et al. 1998), *Chartergellus communis* (Mateus et al. 1999), *Brachygastra lecheguana* (Shima et al. 2000), *Parachartergus fraternus* (Mateus et al. 2004) e *Protopolybia chartegoides* (Felippotti et al. 2007). Além disso, nesses estudos o *status* fisiológico é correlacionado com a morfologia e não com a composição química cuticular.

Diante do exposto acima, este estudo testou as seguintes hipóteses: a) Tanto o perfil químico cuticular dos membros das colônias, quanto o perfil químico do material de construção do ninho, podem ser usados como ferramentas complementares para avaliar diferenças populacionais; e b) A composição química cuticular varia de acordo com a idade relativa, *status* fisiológico e entre as diferentes partes do corpo das fêmeas podendo atuar como mediadores nas interações intracoloniais.

Material e Métodos

Coletas

Foram coletadas seis colônias da espécie *Polybia sericea*, duas no município de Dourados (22° 11' 50.67" S; 54° 56' 10.64" W) (População 1), duas em Miranda (20° 14' 26" S; 56° 22' 42" W) (População 2), ambos no estado do Mato Grosso do Sul e duas no município de Castilho (20° 52' 20" S; 51° 29' 15" W) (População 3), no estado de São Paulo, Brasil. A distância em linha reta entre as populações 1 e 2 é de 275,33 km, entre a população 1 e 3 é de 375,56 km e entre a população 2 e 3 é de 515,63 km (Fig. 1). Após as coletas, todos os indivíduos adultos foram eutanasiadas por congelamento, já que o uso de qualquer tipo de fixador ou conservante químico poderia reagir com os compostos da cutícula, podendo alterar sua composição.

Obtenção das amostras para avaliar as diferenças entre a composição química cuticular em função do *status* fisiológico, idade relativa, e das diferentes partes do corpo.

Para comparar a composição química cuticular em função do *status* fisiológico, todas as fêmeas de cada colônia tiveram seu grau de desenvolvimento ovariano avaliado. Para isso, os gásteres de todas as fêmeas foram dissecados sob estereomicroscópio modelo Leica S6d acoplado a uma ocular micrométrica. O grau de desenvolvimento ovariano foi categorizado em 3 tipos seguindo os parâmetros descritos por Soares et al. (2014): rainhas, operárias 1 e operárias 2. Uma vez que foram encontradas 14 fêmeas categorizadas como rainhas, o número de amostras de operárias 1 e operárias 2 foi padronizado também em 14 para as análises de sua composição química cuticular.

Para análise da composição química da cutícula, em função de sua idade, foram utilizadas amostras de cinco operárias de cada idade, de cada colônia, totalizando 30 amostras de cada categoria de fêmeas. A idade relativa foi determinada pela taxa de pigmentação do apódema, uma vez que segundo Richards (1971) e West-Eberhard (1973) a maior pigmentação indica uma progressão na idade de indivíduos jovens (coloração clara) para fêmeas mais velhas (coloração escura). Dessa forma, as fêmeas foram categorizadas em três grupos: a) jovens: apódema de coloração amarela; b) intermediárias: apódema de coloração marrom; e c) velhas: apódema de coloração preta.

Para análise das diferenças entre a composição química da cutícula das diferentes partes do corpo foram utilizadas amostras de dez cabeças, dez tórax, dez pares de asas, dez gásteres e dez pares de pernas de operárias categorizadas como fêmeas velhas de uma colônia de cada população. A extração dos HCs da cabeça e antenas foi realizada conjuntamente, para este fim, foram feitas análises prévias com extração de cabeça e antenas separadamente confirmando que não haveria diferenças estatisticamente significativas entre a composição dessas partes.

Obtenção das amostras para avaliar as diferenças entre a composição química dos membros das colônias e do material de construção de seus ninhos em função da população.

Para avaliar as diferenças entre as amostras das populações foi padronizado o uso somente de operárias velhas de acordo com a coloração do apódema e sem desenvolvimento ovariano, segundo categorização de Soares et al. (2014). Foram avaliadas as cutículas de 10 operárias de cada colônia.

Para análise dos HCs do material de construção dos ninhos foram extraídos de cada ninho pedaços de 0,025 g da região interna (células) e 0,025 g da região externa (envelope). A massa de cada ninho foi definida após testes prévios com objetivo de determinar o melhor nível de detecção dos compostos no cromatograma. Para cada ninho foram realizadas 5 amostras, totalizando 10 amostras para cada população.

Extração dos compostos cuticulares, do material de construção do ninho e análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Para extração dos compostos cuticulares cada amostra (de fêmeas, partes de seu corpo e material do ninho) foram mergulhados durante 2 minutos em 2 ml de hexano (Vetec, grau HPLC). Após a extração dos compostos cada amostra foi seca em capela de exaustão e armazenada em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise no cromatógrafo a gás.

As amostras secas foram solubilizadas em 400 μl de hexano e as análises foram realizadas no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), (SHIMADZU, modelo GCMS-QP 2010) equipado com uma coluna DB5-MS (30.0 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura de filme), rampa de aquecimento com temperatura inicial de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ alcançando $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $3\text{ }^{\circ}\text{C}\text{ min}^{-1}$ e permanecendo na temperatura final por 25 minutos. O hélio (99,999 %) foi empregado como gás de arraste em um fluxo de 1 ml min^{-1} e as injeções foram de $1\text{ }\mu\text{l}$ no modo splitless. As temperaturas do injetor, detector e da linha de transferência foram $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $290\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Os parâmetros de varredura do espectrômetro de massas incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 eV, na faixa de massa de 40 a 600 m/z e com intervalo de varredura de 0.3 s.

Para identificação dos compostos foram utilizados os índices de retenção calculados (Van den Dool e Kratz, 1963) empregando uma série de alcanos lineares, a biblioteca do equipamento (NIST21 e WILEY229) e análise dos espectros de massas. Ainda foram utilizados padrões dos alcanos lineares ($\text{C}_8\text{-C}_{40}$, Sigma Aldrich) para auxiliarem na identificação dos compostos, analisados nas mesmas condições.

A área do pico de cada composto foi determinada por integração manual de cada cromatograma de íons totais (TIC). Em seguida todas as áreas foram transformadas em áreas percentuais relativas. Os compostos representados nas tabelas são somente aqueles com áreas percentuais > 0.1 , determinados como compostos majoritários.

Análises estatísticas

Para avaliar se existiam diferenças significativas entre a composição de HCs dos diferentes grupos de amostras (*status* fisiológico, idade relativa, partes do corpo e população) foram aplicadas análises de função discriminante utilizando os valores percentuais de cada composto calculado a partir das áreas dos picos obtidos em cada cromatograma. O valor de Wilks lambda foi utilizado para indicar a separação dos grupos analisados (Quinn e Keough 2002), no qual valores próximos a zero indicam que os grupos são diferentes entre si, enquanto valores próximos a um indicam sobreposição dos grupos e, inexistência de diferença significativa entre eles. Além disso, foi utilizado o valor de $p < 0,05$ para indicação de diferenças significativas.

Resultados

Em todas as amostras analisadas foram identificados os compostos das classes químicas em ordem decrescente de abundância e número: alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos. Os alcanos lineares correspondem a mais de 90% da área total dos picos em todas as amostras (Tabs. 1 e 2). Entre os compostos majoritários, três alcanos lineares são consistentemente mais abundantes, tricosano (n-C₂₃), pentacosano (n-C₂₅) e heptacosano (n-C₂₇).

Nas amostras das fêmeas com diferentes *status* fisiológicos foram detectados 64 compostos cuticulares, dos quais 36 (56,25%) foram identificados, e destes, 17 são compartilhados entre a cutícula das três categorias de fêmeas. Os alcanos lineares foram os mais abundantes tanto em números quanto em proporção relativa nas amostras de todas as fêmeas analisadas. Nas amostras de fêmeas sem nenhum grau de desenvolvimento ovariano (operárias 1) há três compostos exclusivos: 7- pentacoseno, 2-metil-hexacosano e tritriacontano, enquanto as amostras de fêmeas com desenvolvimento ovariano (operárias 2 e rainhas) somente o composto 9-metil-heneicosano é exclusivo enquanto compartilham todos os outros compostos.

A análise discriminante demonstra que há diferenças significativas entre as amostras das três categorias de fêmeas com Wilks' Lambda= 0,004; F=14,342; $p < 0,001$, no qual a primeira raiz canônica explicou 98,7% dos resultados e a segunda 1,3 %, portanto, juntas explicam 100% dos resultados (Fig. 2). Os compostos mais importantes para separação destes grupos foram os alcanos lineares octadecano, tricosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano.

Nas amostras de fêmeas jovens, intermediárias e velhas foram detectados 64 compostos e nenhum foi exclusivo de amostras de uma dada categoria de fêmeas. Destes compostos, 37 (57,81%) foram identificados, sendo os alcanos lineares mais numerosos e abundantes (Tab. 1).

A análise discriminante demonstra que há diferenças significativas entre a composição química cuticular das fêmeas de diferentes idades relativas Wilks' Lambda= 0,441; F= 3,995; $p < 0,001$ (Fig. 3). A primeira raiz canônica explicou 92% dos resultados e a segunda 7%, portanto, juntas explicam 99% dos resultados. Os compostos mais importantes para separação do grupo foram: os alcanos lineares eicosano, docosano, tricosano, tetracosano, pentacosano, heptacosano e os alcanos ramificados x-metildocosano, x- metiltetracosano, 10, 12, 14 - metiloctacosano e 2 metiloctacosano.

Nas amostras das diferentes partes do corpo das fêmeas foram detectados 62 compostos dos quais 37 (59,68 %) foram identificados. Destes, 22 são compartilhados por todas as amostras. O composto tritriacontano foi detectado apenas na cabeça, enquanto o composto hentriacontano apenas nas pernas (Tab. 2). As demais partes do corpo não apresentaram compostos exclusivos. Os alcanos lineares foram mais abundantes tanto em número quanto proporção relativa em todas as amostras (Fig. 4). A análise discriminante demonstra que há diferenças significativas entre a composição cuticular das diferentes partes do corpo, Wilks' Lambda= 0,051; F= 2,190; $p < 0,001$ (Fig. 5). A primeira raiz canônica explicou 90 % dos resultados e a segunda 5 %, portanto, juntas explicam 95 % dos resultados (Fig. 5). Além disso, dentre os 62 compostos químicos detectados apenas 11 não foram importantes para a separação das partes.

Em todas as amostras das fêmeas que representam as três populações foram detectados 64 compostos. Não há diferenças qualitativas, somente quantitativas (Tab. 1 e Fig. 6- A). Foram identificados 37 compostos (57,81%), sendo os alcanos lineares mais numerosos e abundantes (Tab. 1). De acordo com a análise discriminante há diferenças quantitativas significativas entre as amostras das diferentes populações (Wilks' Lambda= 0,057; F= 7,071; $p < 0,001$ Fig. 6- A). Sete compostos foram mais importantes para a separação dos grupos: x-metildocosano, tricosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano e 10-,12-,14- metiloctacosano, sendo a maioria, alcanos lineares. A primeira raiz canônica explicou 92,8 % dos resultados e a segunda 7,2 %, portanto, juntas explicam 100 % dos resultados (Fig. 6- A). Os compostos tricosano, pentacosano e heptacosano são os mais abundantes.

Nas amostras do material dos ninhos que representam as três populações foram detectados 62 compostos e identificados 38 (61%), destes compostos 61 também estão presentes na cutícula das fêmeas analisadas. Dos compostos identificados, apenas o composto x-docoseno é exclusivo do material do ninho. Os alcanos lineares também são os compostos mais numerosos e abundantes em todas as amostras (Tab. 1).

A análise discriminante mostra que há diferenças significativas entre as amostras dos ninhos das três populações (Wilks' Lambda= 0,001; F= 76,568; $p < 0,001$ Fig. 6- B). Onze compostos foram importantes para a separação dos grupos: octadecano, nonadecano, 3 metilnonadecano, x metil-heneicosano, docosano, pentacoseno, pentacosano, 3 metil-heptacosano, nonacosano, hentriacontano e triacontano, sendo a maioria alcanos lineares (Tab. 1).

Discussão

De forma geral os compostos químicos identificados nas diferentes amostras de *P. sericea* variaram de C₁₇ a C₃₇, sendo que os compostos entre C₃₄ a C₃₇, são compostos minoritários. Além disso, para a maioria dos grupos analisados as diferenças entre a composição química foram principalmente quantitativas, sendo mais numerosos e em maior proporção relativa os alcanos lineares, seguidos pelos alcanos ramificados e uma pequena parcela de alcenos. Os compostos, tricosano (n-C₂₃), pentacosano (n-C₂₅) e heptacosano (n-C₂₇) foram os mais abundantes em todas as categorias, e portanto, possuem importante papel como mediadores do reconhecimento em colônias desta espécie.

A predominância de alcanos lineares na cutícula de vespas sociais também foi encontrada por Kelstrup et al. (2014) na cutícula da espécie *Polybia micans*. Entretanto, em outras espécies como *Polybia occidentalis* (Espelie e Hermann 1988), *Parachartergus aztecus* (Singer et al. 1998), também espécie de fundação por enxameagem e mesmo em espécies com fundação independente como *Polistes satan* (Tannure-Nascimento et al. 2007), *Mischocyttarus cassununga* (Murakami et al. 2015), *Mischocyttarus consimilis*, *Mischocyttarus latior* e *Mischocyttarus bertonii* (Soares et al. 2017), alcanos ramificados são predominantes na cutícula. De fato, em muitos estudos os alcanos ramificados vem sendo considerados os compostos mais importantes para mediar interações de reconhecimento entre colônias de diferentes espécies de vespas sociais (Dani et al. 2005; Murakami et al. 2015). Por outro lado, em todas estas

espécies, mesmo não sendo predominantes, alguns alcanos lineares também foram considerados importantes.

Além disso, Lorenzi et al. (2004) avaliaram que os alcanos lineares podem ser importantes para mediar o reconhecimento entre companheiras de ninhos em colônias de vespas *Polistes* mais jovens. Os resultados ajudam a fomentar a ideia de que em ao menos algumas espécies os alcanos lineares também podem exercer papel significativo na sinalização durante interações de companheiras de ninho, como também descrito por Tannure-Nascimento et al. (2007). Embora outros estudos descrevam os alcanos ramificados como os principais compostos responsáveis para este fim, enquanto que os alcanos lineares seriam responsáveis por formar uma barreira para evitar desidratação (Dani et al. 2001, 2005; Martin et al. 2008; Murakami et al. 2015).

Alguns trabalhos já mostram, por exemplo, uma dupla função para os HCs atuando tanto na resistência à dessecação quanto na comunicação química (Gibbs 1998; Gibbs 2007; Chown et al. 2011; Chung e Carroll 2015; Boulay et al. 2017). Além disso, Le Conte e Hefetz (2008), evidenciam em sua revisão, um papel multiface, discutindo que um mesmo composto químico pode exercer vários papéis. Outro exemplo de dupla função de compostos, são os alcanos de cadeia longa que podem exercer um duplo papel de viscosidade reguladora e retenção de água a altas temperaturas, dada a falta de alcanos de alto peso molecular Batista-Pereira et al. (2013).

Blomquist e Bagnères (2010) afirmam que a camada lipídica da cutícula pode ser reestruturada para restaurar a capacidade de resistir à dessecação, dependendo da necessidade em determinado momento, assim, é possível que mudanças na produção de compostos ou classe de HCs, também poderiam afetar a produção de outros HCs que funcionam na comunicação química ou resistência à dessecação, assim, alterações de uma determinada classe de HCs acabam tendo um efeito indireto em outra (Chung e Carroll, 2015).

Uma vez que uma das funções primordiais dos compostos cuticulares em insetos é a de atuar como sinalizadores nas interações intra e interespecíficas (Blomquist e Bagnères 2010), a seleção de compostos para funções de comunicação química poderia interferir naquela dos compostos mais envolvidos na resistência à dessecação (Chown et al. 2011). Desse modo os compostos cuticulares por terem duplas funções, de comunicação e equilíbrio hídrico podem interagir de forma interessante (Gibbs 2007), além disso, essa flexibilidade permite a esses insetos se adaptarem de forma eficiente a diferentes situações. Por exemplo, Lorenzi et al. (2014) relatam que em colônias de

Polistes biglumis, populações atacadas por parasitas apresentaram uma proporção relativa de HCs ramificados maior do que populações não parasitadas. Neste sentido, ressalta-se que o padrão arquitetônico de *P. sericea* que constrói ninhos envelopados com uma única abertura para entrada/saída dos indivíduos e com várias camadas, estaria menos susceptível a predadores e parasitas diferente das espécies de fundação independente dos gêneros *Polistes* e *Michocyttarus* cujos ninhos são formados por favos abertos e com pequeno número de células (Jeanne 1975). Portanto, o menor número e abundância de alcanos ramificados, na cutícula de *P. sericea* também poderia estar ligada a menor suscetibilidade de seus ninhos ao ataque de parasitas.

A composição química cuticular das fêmeas com diferentes *status* fisiológico diferem de forma significativa, sendo os compostos 7- pentacoseno, 2-metil-hexacosano e tritriacontano exclusivos de fêmeas sem nenhum grau de desenvolvimento ovariano (operárias 1), além do composto 9-metil-heneicosano exclusivo de fêmeas com certo grau de desenvolvimento ovariano (operárias 2) e rainhas (Tab. 1). Portanto, nesta espécie estes compostos devem sinalizar a posição que cada fêmea ocupa na colônia. De acordo com Jeanne (1986) a variação do *status* fisiológico entre as fêmeas está relacionada ao seu ranque hierárquico na colônia, no qual fêmeas dominantes se especializam em determinadas tarefas, enquanto indivíduos subordinados são especializados em outras, portanto, as fêmeas devem reconhecer o papel de cada indivíduo dentro de suas colônias. De fato, há algumas evidências de que ao menos alguns compostos devem sinalizar a posição da fêmea dominante como, por exemplo, além do composto 9-metil-heneicosano exclusivo de operárias 2 e rainhas, o composto pentacosano (n-C₂₅) se destaca em termos de abundância nestas duas categorias de fêmeas.

Os estudos de Bonavita-Cougordan et al. (1991) com fêmeas de *Polistes dominula*, Soares et al. (2014) com *Polistes ferreri* e Kelstrup et al. (2014) com *Polybia micans* também encontraram uma correlação entre o perfil químico cuticular das fêmeas e o seu grau de desenvolvimento ovariano. Bonavita-Cougordan et al. (1991) discutem a existência de uma relação entre o estado hormonal que coincide com a presença de proporções específicas de alguns dos HCs de *Polistes dominula*. Outros estudos com vespas de fundação independente também encontraram esta relação, dentre eles, o de Tannure-Nascimento et al. (2005) em colônias de *Polistes satan*, Murakami (2012) em fêmeas de *Mischocyttarus cassununga* e Torres et al. (2014) em fêmeas de *Polistes versicolor*.

Entretanto, em espécies de fundação por enxameagem são poucos os estudos como este, como os de Mateus et al. (1997) com *Parachartergus smithii*, Shima et al. (1998) com *Pseudopolybia vespiceps*, Mateus et al. (1999) com *Chartergellus communis*, Shima et al. (2000) com *Brachygastra lecheguana*, Mateus et al. (2004) com *Parachartergus fraternus* e Felippotti et al. (2007) com *Protopolybia chartegoides*. Estudos deste parâmetro em vespas de fundação independente são mais propícios, uma vez que é mais fácil acompanhar o desempenho das funções que cada fêmea executa, devido à exposição do ninho, que possui como característica o favo aberto.

Também foram encontradas diferenças quantitativas significativas entre a composição química cuticular de fêmeas de diferentes idades (Tab.1, Fig. 3). O composto tricosano (n-C₂₃) está em maior concentração em fêmeas jovens e o heptacosano (n-C₂₇) na cutícula das intermediárias, aumentando ainda nas fêmeas velhas, portanto, é possível que esses compostos possam atuar como sinalizadores daquelas que estão cumprindo determinadas tarefas naquele momento de suas vidas.

Estas diferenças provavelmente estão relacionadas com o desenvolvimento de tarefas ao longo da vida das fêmeas, fenômeno denominado polietismo temporal (Franks 1994), bastante comum em espécies de vespas eussociais (Jeanne 1991). Naug e Gadagkar (1998) relatam a correlação entre a idade e o tipo de tarefa executada pela fêmea em colônias da vespa eussocial, *Ropalidia marginata*.

Em colônias de *Polistes versicolor* a frequência na tarefa de alimentar larvas aumenta à medida que a fêmea envelhece (Zara e Balestieri, 2000) e de acordo com O'Donnell e Jeanne (1990; 1992) em colônias de *Polybia occidentalis* a forrageadora é especializada em coletar um único tipo de material e o sucesso ao executar essa atividade aumenta de acordo com a idade. Além disso, Torres et al. (2012) descreveram que em colônias de *Mischocyttarus consimilis* os comportamentos intranidais são mais frequentes em operárias jovens, enquanto atividades extranidais são executadas com maior frequência por operárias velhas. Portanto, destaca-se a importância do reconhecimento da idade da fêmea, e sua correlação com as atividades para manutenção e organização de suas colônias, que provavelmente está relacionada com o perfil dos compostos cuticulares.

Os resultados mostram também que cada parte do corpo das operárias desta espécie têm uma composição química cuticular particular (Fig. 4, 5 e Tab. 2). A análise discriminante (Fig. 5) indica que o perfil químico da cabeça e pernas são distintos em relação as outras partes do corpo, sobretudo, porque na cabeça há maior proporção

relativa do composto tricosano, além dos compostos 13,17- dimetilhentriacontano e tritriacontano que são exclusivos desta região do corpo. Nas pernas também há composto exclusivo, o alcano linear hentriacontano. Mesmo os compostos compartilhados variam significativamente em teores entre as diferentes partes. Entretanto, de forma geral, a maior concentração de compostos está no gáster e nas pernas (Fig. 5 e Tab. 2).

A presença de alguns compostos exclusivos em apenas algumas partes do corpo sugerem que estas partes podem ter papel diferenciado nas trocas de sinais entre companheiras de ninho, sobretudo, na cabeça, uma vez que a antenação durante as interações ocorrem mais efetivamente nesta região do corpo (Mitra et al. 2014). Por outro lado, a presença dos mesmos compostos em diferentes partes do corpo sugere a possibilidade de que esses compostos possam fornecer sinais diferentes de comunicação, quando detectados em diferentes partes do corpo (Oi et al. 2015). Wang et al. (2016) avaliaram que os compostos das diferentes partes do corpo da formiga *Iridomyrmex purpureus* são significativamente diferentes, e sugerem que os sinais de HCs específicos de cada parte do corpo seja uma característica comum dos insetos sociais já que encontraram diferenças semelhantes tanto em machos quanto fêmeas de *I. purpureus*, no qual, os perfis de diferentes partes do corpo podem ser claramente separados, independentemente do sexo do indivíduo.

Uma vez que os compostos cuticulares são específicos de uma mesma colônia (Murakami et al. 2015) e mesmo entre fêmeas que executam diferentes tarefas ao longo de sua vida, como visto pelos resultados apresentados aqui, era de se esperar diferenças significativas entre as amostras das diferentes populações. Alguns compostos majoritários como o tricosano, pentacosano e heptacosano, além dos alcanos ramificados x-metildocosano e 10-,12-,14- metiloctacosano foram importantes para separar os diferentes grupos de populações (Fig. 6- A). Dessa forma, sugere-se que alguns compostos podem servir para sinalizar a população de origem no caso das amostras desta espécie. Estudos como os de Dapporto et al. (2014) e Bonelli et al. (2015) de fato, avaliaram que os compostos cuticulares podem ser úteis para este fim.

A composição do material dos ninhos também variou significativamente entre as populações (Fig. 6- B). Estudos como de Espelie e Hermann (1990), Espelie et al. (1990), Singer e Espelie (1997) e Sguarizi-Antonio et al. (2017) já destacaram que os compostos dos ninhos são importantes para compor a assinatura química da colônia, além de relatarem que os compostos são semelhantes aos da cutícula dos indivíduos

adultos e imaturos, existindo uma relação entre o perfil cuticular dos indivíduos e o perfil químico do ninho Espelie et al. (1990). Os resultados, de fato, mostram que os compostos dos ninhos, assim como a composição da cutícula podem ser úteis para avaliar as relações biogeográficas entre as populações.

As particularidades na composição das amostras devem estar relacionadas com fatores genéticos e ambientais específicos de cada uma destas populações, sendo portanto, úteis para avaliar diferenças e relações biogeográficas entre elas (Kather e Martin 2012; Espelie et al. 1994). Neste contexto, Dapporto et al. (2004) discutem que a semelhança do perfil de HCs pode estar relacionada à proximidade entre os sítios de nidificação das colônias, o que está diretamente relacionado a seus níveis de parentesco, que por sua vez é explicado pela capacidade de dispersão destas colônias (Service et al. 1985) ou pelos recursos explorados em cada um dos ambientes serem semelhantes (Menzel et al. 2017), destacando a importância dos fatores genéticos para compor o perfil de HCs das colônias e pelo compartilhamento de condições ambientais parecidos que pode levar a uma maior similaridade da composição química cuticular entre colônias próximas, como mostrada no estudo de Dapporto et al. (2004) em *Polistes dominula*.

Embora exista a tendência de os perfis de HCs serem espécie-específico, diferentes populações podem sofrer mudanças qualitativas ou quantitativas em suas composições (Howard 1993; Howard e Blomquist 2005). A composição da cutícula e do material dos ninhos em nosso estudo foram maiores, de fato, em populações geograficamente mais próximas (Fig. 6- A e B). A maior diferença está entre as amostras da população 3 em relação as outras duas. Estes resultados também podem ser explicados pela presença de uma barreira geográfica que é o rio Paraná, que divide o estado de Mato Grosso do Sul e São Paulo, dificultando o fluxo gênico entre estas populações (Barton et al. 2008; Dias et al. 2016). De acordo com Jallon e David (1987) as distâncias geográficas e barreiras envolvidas podem influenciar o grau de isolamento e em alguns casos impedir o fluxo gênico entre as populações.

Nossos resultados confirmam as hipóteses de que tanto o perfil químico cuticular dos membros das colônias, quanto o perfil químico do material do ninho, podem ser utilizados como ferramentas complementares para avaliar diferenças populacionais. Além disso, com auxílio das análises discriminantes é possível verificar diferenças significativas na composição química cuticular de acordo com a idade relativa, o *status*

fisiológico e entre as diferentes partes do corpo das fêmeas. Portanto, todos os parâmetros avaliados podem atuar como mediadores das interações nas colônias.

Por fim, ressaltamos que os alcanos lineares por serem mais numerosos e abundantes nas amostras de *P. sericea*, além de divergirem do padrão comum descrito em outras vespas sociais até aqui estudadas, fortalece a ideia de que esses compostos podem atuar em conjunto com os alcanos ramificados e outros compostos para promover a impermeabilização e proteção, além de servir como sinais químicos durante as interações.

Agradecimentos

Ao Dr. Orlando T. Silveira (Museu Paraense Emílio Goeldi) pela identificação da espécie. À CAPES pelas bolsas concedidas, ao CNPq e FUNDECT pelo apoio financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade dos autores WFAJ número de concessão (307998/2014-2) e CALC número de concessão (310801/2015-0).

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Valores médios de área percentual relativa ($> 0,1$) e seus desvios padrões de hidrocarbonetos cuticulares identificados em fêmeas de diferentes idades relativas e/ou operárias sem desenvolvimento ovariano (operárias 1), fêmeas com ovariolos parcialmente desenvolvidos (operárias 2); fêmeas com ovariolos totalmente desenvolvidos (Rainhas) e material do ninho da vespa social *Polybia sericea*.

Composto	Índice calculado	*Operárias Jovens Média ± DP (%)	*Operárias Intermediárias Média ± DP (%)	*Operárias Velhas Média ± DP (%)	Fêmeas com D.O (operárias 2) Média ± DP (%)	Fêmeas com D.O (Rainhas) Média ± DP (%)	Material do ninho Média ± DP (%)
Heptadecano	1700	0,21 ± 0,87	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	1,49 ± 1,26
Octadecano	1800	2,18 ± 2,14	1,99 ± 2,22	1,79 ± 2,10	0,35 ± 0,37	3,07 ± 1,99	(< 0,1)
X-metiloctadecano	1824	0,54 ± 1,51	0,45 ± 1,16	0,64 ± 0,79	(< 0,1)	(< 0,1)	0,15±0,53
3-metiloctadecano	1877	1,70 ± 1,61	0,56 ± 0,89	0,23 ± 0,37	(< 0,1)	(< 0,1)	3,38 ± 3,18
Nonadecano	1900	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	0,59 ± 0,87
Eicosano	2000	0,24 ± 0,31	0,19 ± 0,20	0,16± 0,19	(< 0,1)	0,33 ± 0,22	1,30 ± 1,84
Heneicosano	2100	1,48 ± 1,17	1,08 ± 1,01	1,52± 1,16	0,39 ± 0,36	0,15 ± 0,22	0,57 ± 0,45
9-Metil-heneicosano	2137	-	-	-	(< 0,1)	0,41 ± 1,01	-
X-docoseno	2174	-	-	-	-	-	5,95 ± 5,81
Docosano	2200	0,27 ± 0,20	0,19 ± 0,10	0,16 ± 0,13	0,13 ± 0,13	0,22 ± 0,16	0,87 ± 0,83
2-metildocosano	2271	(< 0,1)	(< 0,1)	0,20 ± 0,26	0,06 ± 0,07	0,37 ± 0,92	(< 0,1)

Tricosano**	2300	11,89 ± 10,26	8,95 ± 6,59	9,62 ± 4,32	4,80 ± 4,54	2,42 ± 0,91	4,53 ± 3,25
Tetracosano	2400	0,78 ± 0,43	0,79 ± 0,45	0,72 ± 0,34	0,83 ± 0,74	0,82 ± 0,22	1,29 ± 1,04
7- Pentacosene	2470	-	(< 0,1)	(< 0,1)	-	-	3,09 ± 7,46
Pentacosano**	2500	28,98 ± 10,36	29,27 ± 10,13	26,11 ± 8,12	48,44 ± 49,33	53,99 ± 5,19	16,69 ± 11,31
5- Metilpentacosano	2555	0,63 ± 0,60	0,53 ± 0,43	0,42 ± 0,26	0,95 ± 1,01	0,94 ± 0,61	1,78 ± 1,57
Hexacosano	2601	1,52 ± 0,67	1,60 ± 0,64	1,40 ± 0,46	2,65 ± 2,72	3,03 ± 0,56	1,78 ± 1,31
2-metil-hexacosano	2651	0,85 ± 6,62	(< 0,1)	(< 0,1)	-	-	1,68 ± 1,02
Heptacosano**	2700	44,43 ± 16,35	48,93 ± 12,88	50,4 ± 11,54	39,38 ± 8,57	29,37 ± 2,91	38,82 ± 16,57
13-Metil-heptacosano	2730	(< 0,1)	(< 0,1)	0,28 ± 0,24	(< 0,1)	(< 0,1)	0,10 ± 0,39
3-Metil-heptacosano	2774	(< 0,1)	(< 0,1)	0,48 ± 0,45	0,40 ± 0,43	0,23 ± 0,14	0,10 ± 0,09
Octacosano	2800	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	0,25 ± 0,19
10-, 12-, 14-Metiloctacosano	2834	(< 0,1)	(< 0,1)	0,17 ± 0,09	(< 0,1)	(< 0,1)	0,31 ± 0,22
Nonacosano	2901	(< 0,1)	0,10 ± 0,24	0,18 ± 0,84	(< 0,1)	(< 0,1)	3,04 ± 1,79
15-;13-Metilnonacosano	2931	(< 0,1)	-	0,10 ± 0,07	(< 0,1)	(< 0,1)	-
7,17-Dimetilnonacosano	2974	(< 0,1)	(< 0,1)	0,16 ± 0,02	(< 0,1)	(< 0,1)	0,29 ± 0,64
Hentriacontano	3100	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	2,57 ± 1,88
Tritriacontano	3300	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)	-	-	1,06 ± 0,75

D.O = Desenvolvimento ovariano, * = Operárias sem desenvolvimento ovariano (operárias 1), **= compostos consistentemente mais abundante, (< 0,1) = compostos minoritários.

Tabela 2. Valores médios de área percentual relativa (> 0,1) e seus desvios padrões de hidrocarbonetos cuticulares identificados em diferentes partes do corpo de fêmeas da vespa social *Polybia sericea*.

Composto	Índice calculado	Asas	Cabeça	Gáster	Pernas	Tórax
		Média ± DP (%)	Média ± DP (%)	Média ± DP (%)	Média ± DP (%)	Média ± DP (%)
Heptadecano	1700	0,15 ± 0,41	0,19 ± 0,41	0,14 ± 0,10	(< 0,1)	0,10 ± 0,09
Octadecano	1800	0,18 ± 0,13	0,28 ± 0,21	0,15 ± 0,11	0,19 ± 0,16	0,21 ± 0,12
X-metiloctadecano	1824	(< 0,1)	0,15 ± 0,05	(< 0,1)	0,11 ± 0,07	0,10 ± 0,08
3-Metiloctadecano	1877	1,71 ± 1,42	1,83 ± 1,29	2,15 ± 2,04	2,43 ± 1,25	4,50 ± 2,11
Nonadecano	1900	0,17 ± 0,11	0,24 ± 0,33	0,10 ± 0,14	0,14 ± 0,06	0,24 ± 0,13
Eicosano	2000	0,40 ± 0,32	0,53 ± 0,45	0,31 ± 0,30	0,40 ± 0,42	0,47 ± 0,35
Heneicosano	2100	0,74 ± 0,50	1,91 ± 1,39	0,78 ± 0,55	0,89 ± 0,82	0,88 ± 0,65
9-Metil-heneicosano	2137	(< 0,1)	0,15 ± 0,45	(< 0,1)	(< 0,1)	0,10 ± 0,09
Docosano	2200	0,78 ± 0,61	1,01 ± 0,69	0,55 ± 0,49	0,71 ± 0,62	0,72 ± 0,7
2-metildocosano	2271	(< 0,1)	0,12 ± 0,02	(< 0,1)	(< 0,1)	(< 0,1)
Tricosano**	2300	5,78 ± 1,87	16,63 ± 9,37	7,90 ± 4,14	6,69 ± 3,28	6,3 ± 3,96
Tetracosano	2400	2,22 ± 1,87	3,14 ± 2,36	2,33 ± 2,25	2,49 ± 2,41	2,26 ± 2,18
7- Pentacoseno	2470	0,83 ± 0,56	(< 0,1)	-	-	-
Pentacosano**	2500	28,58 ± 8,98	34,29 ± 9,50	34,81 ± 10,84	30,68 ± 8,65	28,24 ± 11,40

5- Metilpentacosano	2555	1,87 ± 1,65	1,79 ± 1,75	1,35 ± 1,03	1,62 ± 1,11	1,66 ± 1,43
Hexacosano	2601	2,11 ± 1,35	2,23 ± 1,58	1,79 ± 0,84	2,07 ± 1,20	1,79 ± 1,05
Heptacosano**	2700	49,97 ± 15,67	28,5 ± 9,27	46,82 ± 11,71	48,49 ± 9,31	48,34 ± 15,95
13-Metil-heptacosano	2730	0,29 ± 1,59	1,01 ± 3,2	0,10 ± 0,05	(< 0,1)	0,27 ± 1,49
3-Metil-heptacosano	2774	0,33 ± 0,72	1,33 ± 1,36	0,15 ± 0,08	0,12 ± 0,19	0,80 ± 0,64
Octacosano	2801	0,12 ± 0,26	0,26 ± 0,42	(< 0,1)	0,12 ± 0,18	0,12 ± 0,15
10-, 12-,14-Metiloctacosano	2834	0,42 ± 0,81	0,49 ± 0,77	0,12 ± 0,23	0,81 ± 0,80	1,26 ± 0,31
Nonacosano	2901	0,06 ± 0,02	0,43 ± 1,64	(< 0,1)	0,76 ± 4,06	0,14 ± 0,63
15-;13-Metilnonacosano	2931	0,10 ± 0,04	0,77 ± 1,03	-	-	0,15 ± 0,81
7,17-Dimetilnonacosano	2974	-	0,28 ± 1,17	(< 0,1)	-	0,08 ± 0,04
Hentriacontano	3094	-	-	-	0,25 ± 0,16	-
Tritriacontano	3297	-	0,15 ± 0,13	-	-	-

(< 0.1) = compostos minoritários, **= compostos consistentemente mais abundante

Brasil

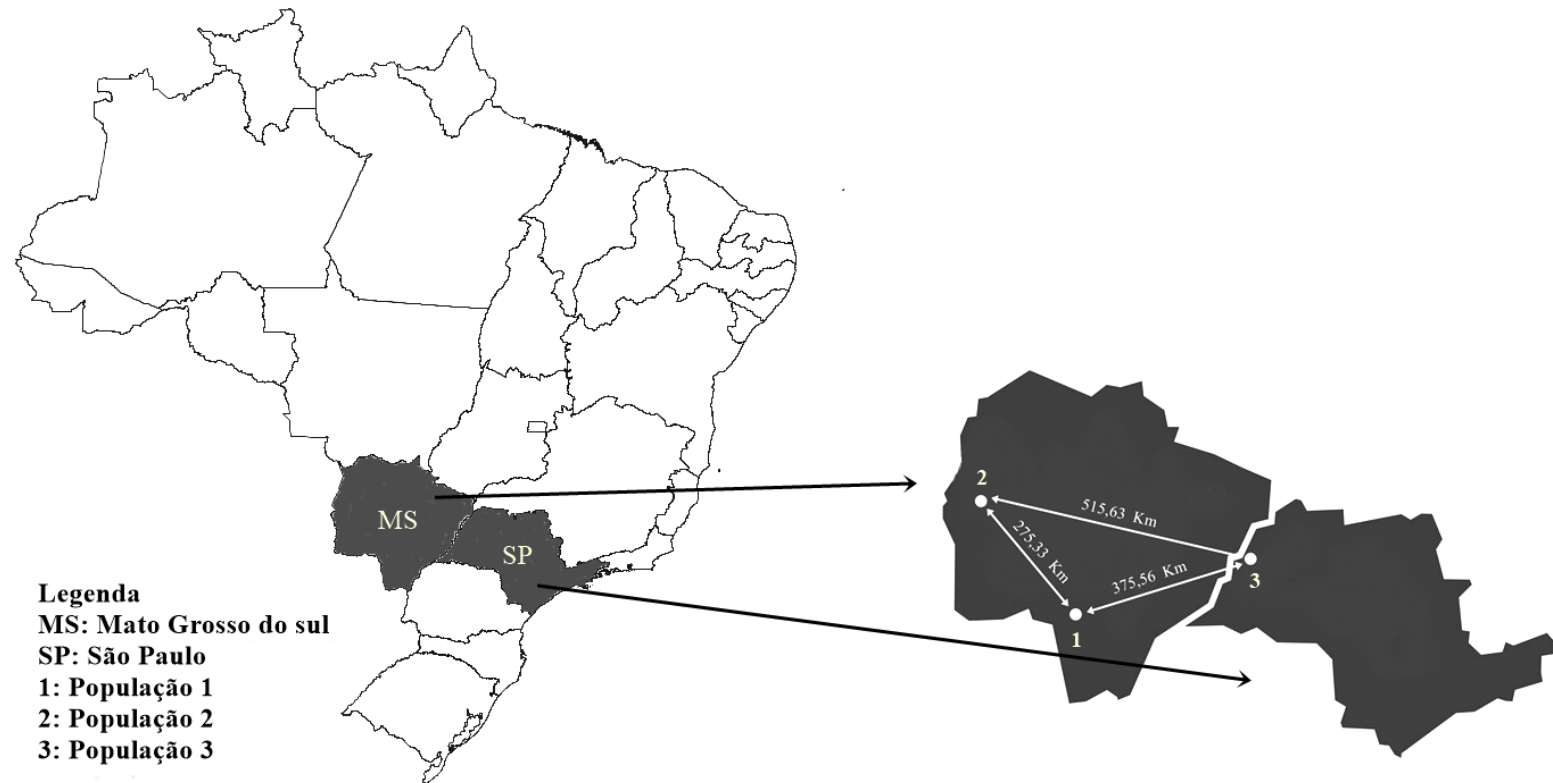


Figura 1. Mapa do Brasil com destaque para os municípios nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo, onde as populações de vespas *Polybia sericea* foram coletadas.

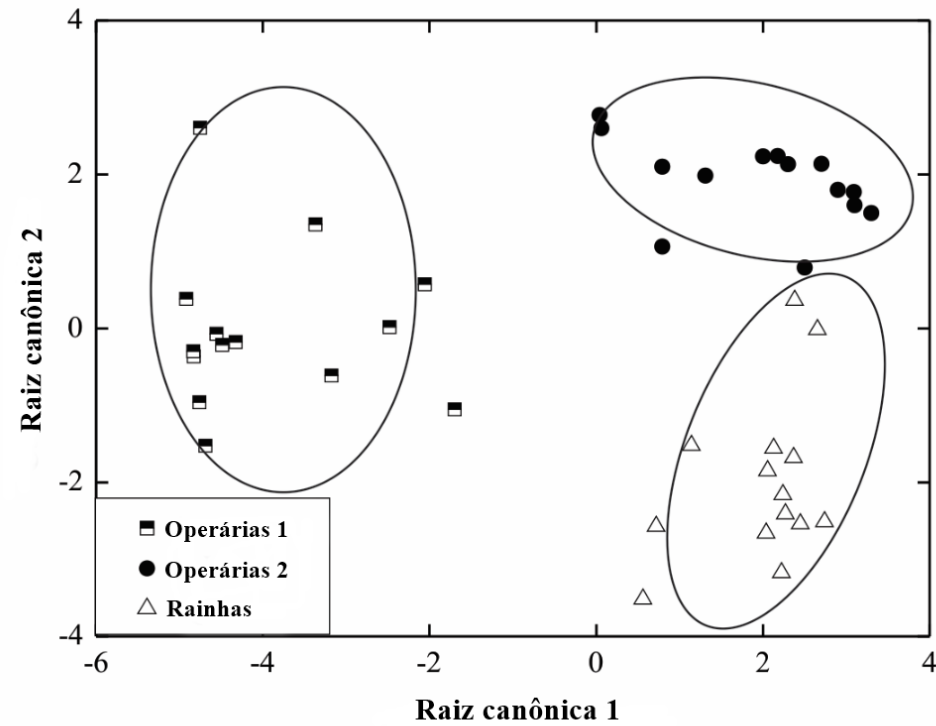


Figura 2. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante, mostrando as duas raízes canônicas para a diferenciação de três categorias de fêmeas de *Polybia sericea* agrupadas de acordo com o *status* fisiológico em (operárias 1, operárias 2 e rainhas) baseado nas áreas relativas (porcentagens) de hidrocarbonetos cuticulares.

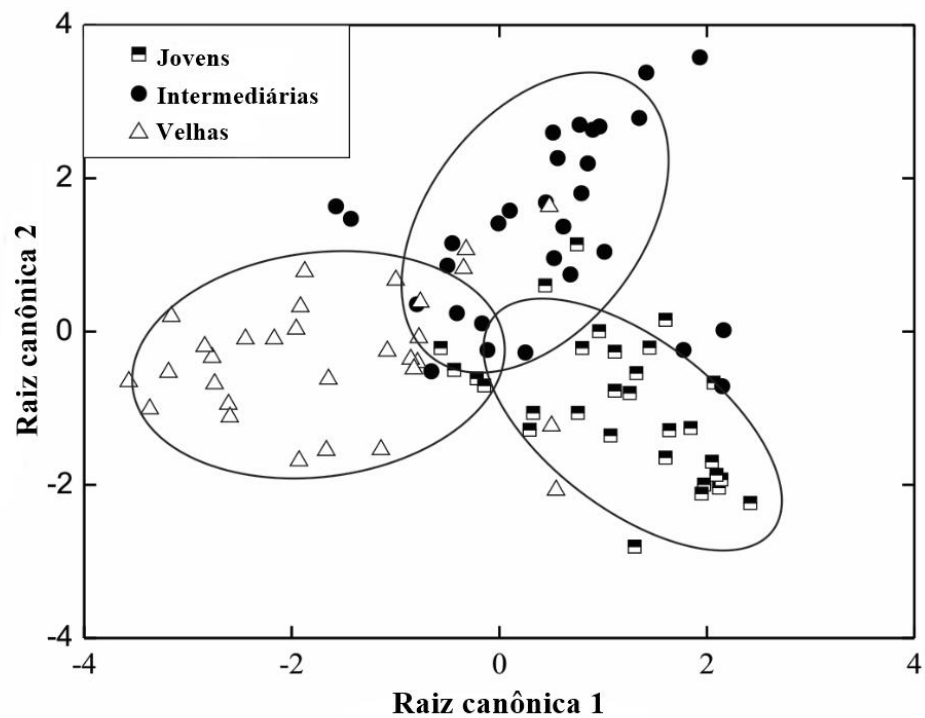


Figura 3. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante, mostrando as duas raízes canônicas para a diferenciação de três categorias de idade relativa em fêmeas de *Polybia sericea* baseado nas áreas relativas (porcentagens) de hidrocarbonetos cuticulares.

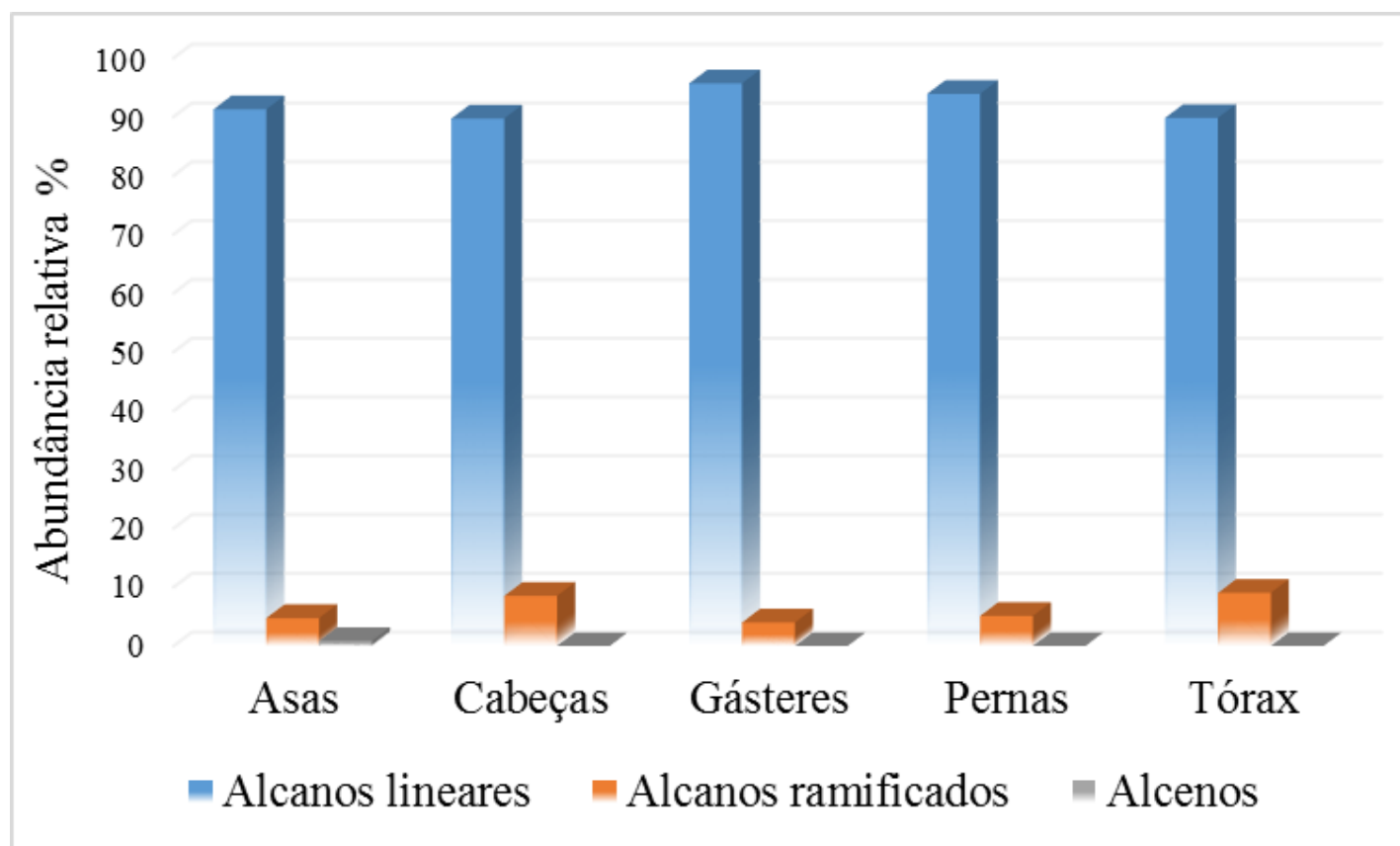


Figura 4. Abundância relativa (%) de hidrocarbonetos cuticulares em relação às classes desses compostos que foram identificados nas diferentes partes do corpo de fêmeas de *Polybia sericea*.

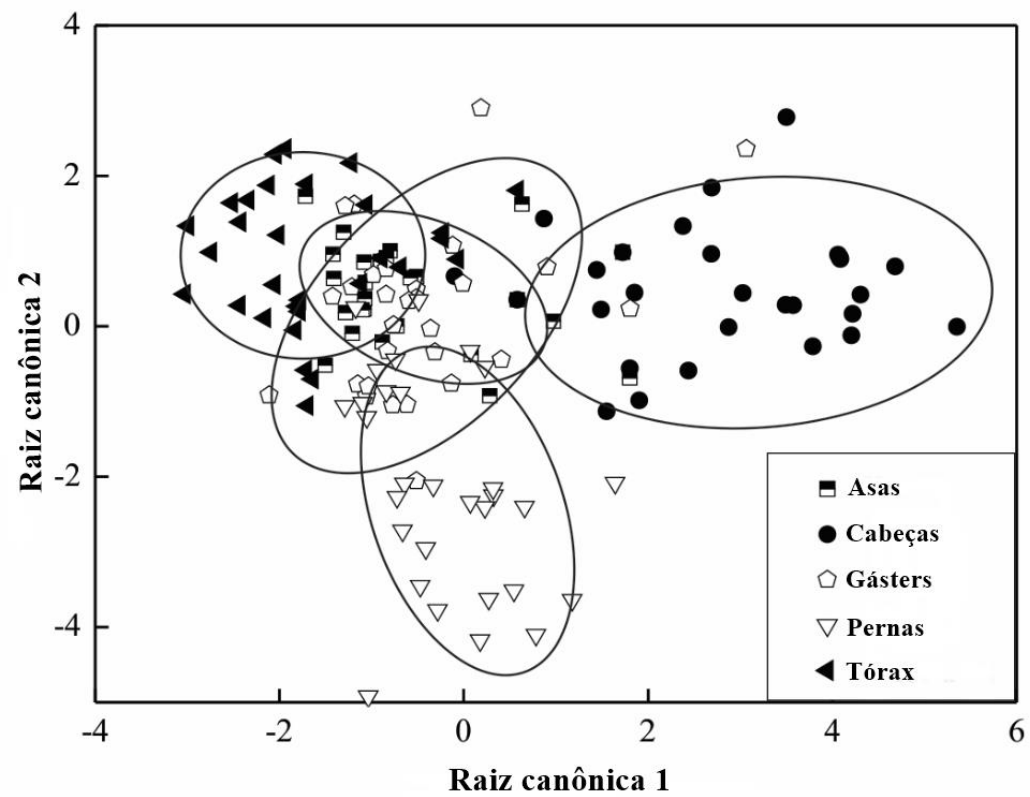


Figura 5. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante, mostrando as duas raízes canônicas para a diferenciação das diferentes partes dos corpos de fêmeas de *Polybia sericea* baseado nas áreas relativas (porcentagens) de hidrocarbonetos cuticulares.

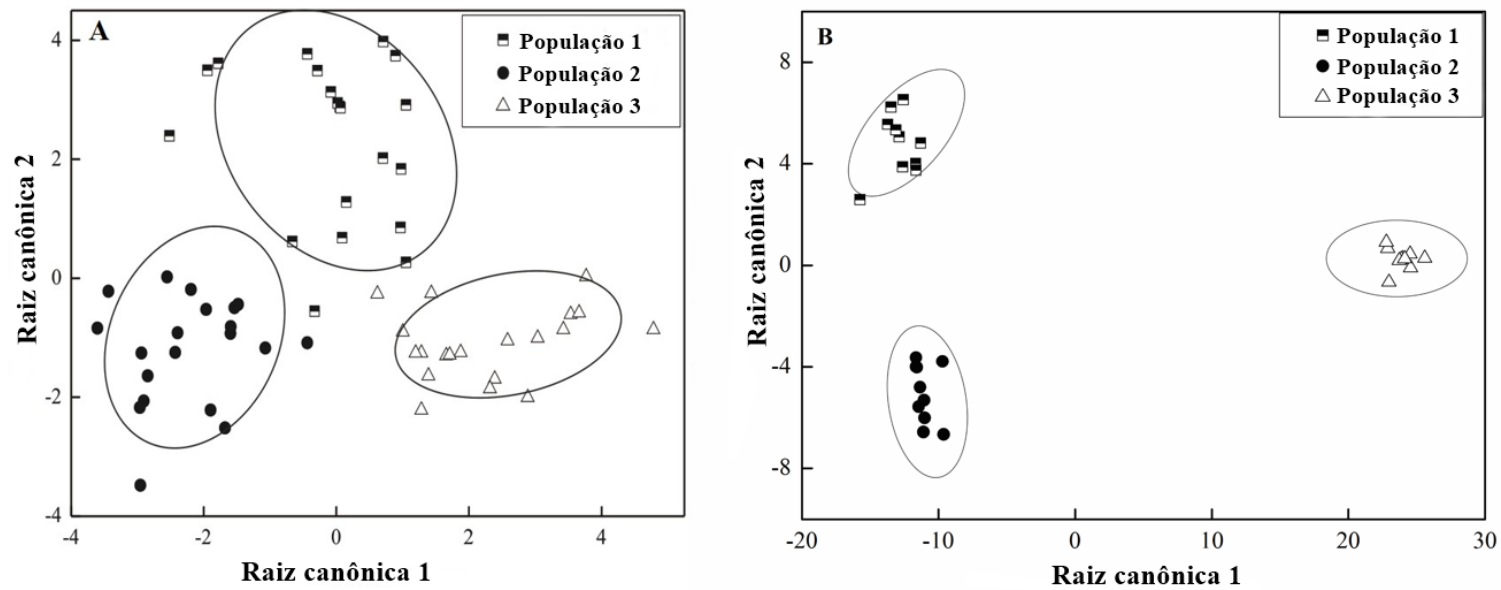


Figura 6. Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante, mostrando as duas raízes canônicas para a diferenciação de três populações de *Polybia sericea* baseado nas áreas relativas (porcentagens) dos hidrocarbonetos cuticulares das fêmeas (A) e dos compostos químicos presentes no material do ninho (B).

Referências

- Antonialli-Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suarez YR (2007) Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet Mol Res* 6: 492-499.
- Bagneres AG, Blomquist GJ (2010) Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons. In Blomquist GJ, Bagneres AG (Eds.), *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology* (pp. 75–99). Cambridge, New York: Cambridge University Press.
- Barton NH (2008) The effect of a barrier to gene flow on patterns of geographic variation. *Genet res* 90(1), 139-149.
- Batista-Pereira LG, Dos Santos MG, Corrêa AG, Fernandes JB, Arab A, Costa-Leonardo AM, Bueno OC (2004) Cuticular hydrocarbons of *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae): analyses and electrophysiological studies. *Z N C* 59(1-2), 135-139.
- Billen J (2006) Signal variety and communication in social insects. *Proc Neth Ento-mol Soc Meet* 17: 9.
- Billen J, Morgan ED (1998) Pheromone 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, pp. 388.
- Blomquist GJ (2010) Structure and analysis of insect hydrocarbons. In Blomquist GJ, Bagneres AG (Eds.), *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology* (pp. 19–34). New York: Cambridge University Press.
- Blomquist GJ, Bagneres AG (2010) *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. Cambridge University Press, New York.
- Blomquist GJ, Nelson DR, Renobales M (1987) Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch Insect Biochem Physiol* 6: 227–265.
- Bonavita-Cougourdan A, Theraulaz G, Bagneres AG, Roux M, Pratte M, Provost E, Clement JL (1991) Cuticular hydrocarbons, social organization and ovarian development in a polistine wasp: *Polistes dominulus* Christ *Comp Biochem Physiol* 100 (4): 667–680.

- Bonelli M, Lorenzi MC, Christidès JP, Duppont S, Bagnères AG (2015) Population Diversity in Cuticular Hydrocarbons and mtDNA in a Mountain Social Wasp. *J Chem Ecol* 41(1): 22-31. 10.1007/s10886-014-0531-0.
- Boulay R, Aron S, Cerdá X, Doums C, Graham P, Hefetz A, Monnin T (2017) Social Life in Arid Environments: The Case Study of *Cataglyphis* Ants. *Annu Rev Entomol* 62: 305–21. 10.1146/annurev-ento-031616-034941.
- Bruschini C, Cervo R, Cini A, Pieraccini G, Pontieri L, Signorotti L, Turillazzi S (2011) Cuticular hydrocarbons rather than peptides are responsible for nestmate recognition in *Polistes dominulus*. *Chem Senses* 36(8): 715-723. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr042>
- Calderón-Fernández G, Juárez MP, Monroy MC, Menes M, Bustamante DM, Mijailovsky S (2005) Intraspecific variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:Reduviidae) populations from Guatemala based on chemical and morphometric analyses. *J Med Entomol* 42(1): 29-35.
- Chown SL, Sorensen JG, Terblanche JS (2011) Water loss in insects: An environmental change perspective. *J Insect Physiol* 57: 1070-1084.
- Chung H, Carroll SB (2015) Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *BioEssays* 37: 822-830.
- Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, Peeters C (2001) Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J Insect Physiol*. 47: 485-493. DOI.org/10.1016/S0022-1910(00)00137-2.
- Dani FR, Jones GR, Corsi S, Beard R, Pradella D, Turillazzi S (2005) Nestmate recognition cues in the honey bee: differential importance of cuticular alkanes and alkenes. *Chem Senses*, 30:477-489.
- Dani FR, Jones GR, Destri, S., Spencer, S.H., Turillazzi, S., 2001. Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Anim Behav* 62: 165e171.
- Dani FR, Morgan ED, Turillazzi S (1996) Dufour gland secretions of *Polistes* wasps: chemical composition and possible involvement in nestmate recognition (Hymenoptera: Vespidae). *J Insect Physiol* 42: 541-548.
- Dapporto L, Theodora P, Spacchini C, Pieraccini G, Turillazzi S (2004a) Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera,Vespidae). *Insect Soc* 51: 279-286. 10.1007/s00040-004-0738-0.

- Dapporto L, Palagi E, Turillazzi S (2004b) Cuticular hydrocarbons of *Polistes dominulus* as a biogeographic tool: a study of populations from the Tuscan archipelago and surrounding areas. *J Chem Ecol* 30: 2139–2151.
- Dias EF, Moura M, Schaefer H, Silva L (2016) Geographical distance and barriers explain population genetic patterns in an endangered island perennial. *AoB Plants* 8.
- Espelie KE, Hermann HR (1988) Congruent cuticular hydrocarbons: biochemical convergence of a social wasp, an ant and a host plant. *Biochem Syst Ecol* 16, 505-508.
- Espelie KE, Hermann HR (1990) Surface lipids of the social wasp *Polistes annularis* (L.) and its nest and nest pedicel. *J Chem Ecol* 16 (6): 1841-1852.
- Espelie KE, Wenzel JW, Chang G (1990) Surface lipids of social wasp *Polistes metricus* Say and its nest and nest pedicel and their relation to nestmate recognition. *J Chem Ecol* 16(7): 2229-2241.
- Felippotti GT, Noll FB, Mateus S (2007) Morphological studies on castes of *Protopolybia chartergoides* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini) observed in colonies during male production stage. *Rev Bras Entomol* 51: 494-500. DOI.org/10.1590/S0085-56262007000400015.
- Franks NS (1994) Is age polyethism a myth? In: *Les Insectes Sociaux* (12th Congresso f the I.U.S.S.i. Paris, Sorbonne), Paris, Université Paris nord, pp.238.
- Gibbs AG (1998) Water-Proofing Properties of Cuticular Lipids. *Amer Zool* 38: 471-482.
- Gibbs AG (2007) Waterproof cockroaches: the early work of J. A. Ramsay. Invited commentary for *JEB Classics*. *J Exp Biol* 210: 921-922. 10.1242/jeb.000661.
- Hefetz A (2007) The evolution of hydrocarbon pheromone parsimony in ants (Hymenoptera: Formicidae) – interplay of colony odor uniformity and odor idiosyncrasy. A review. *Myrmecological News*. 10: 59-68.
- Howard RW (1993) Cuticular hydrocarbon and chemical communication. In Stanley-Samuelson DW, Nelson DR (Eds.). *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology* (pp. 179-226). Lincoln: University of Nebraska Press.
- Howard RW, Blomquist GJ (1982) Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 27 (1): 149-172.
- Howard RW, Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol* 50: 371-393.

- Izzo A, Wells M, Huang Z, Tibbetts E (2010). Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. *Behav Ecol Sociobiol* 64 (5): 857-874.
- Jallon JM, David JR (1987) Variations in cuticular hydrocarbons among the eight species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Evolution*, 41(2), 294-302.
- Jeanne RL (1975) The adaptivness of social wasps nest architecture. *Q Rev Biol* 50, 267–287.
- Jeanne RL (1986) The evolution of the organization of work in social insects. *Monit Zool Ital* 20: 119-133.
- Jeanne RL (1991) Polyethism. In Ross KG, Matthews RW (Eds), *The social biology of wasps* (pp. 389–425). Ithaca: Cornell University Press.
- Kather R, Martin SJ (2012) Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. *Physiol Entomol* 37: 25-32. 10.1111/j.1365-3032.2011.00826.x.
- Kelstrup HC, Hartfelder K, Nascimento FS, Riddiford LM (2014) Reproductive status, endocrine physiology and chemical signaling in the Neotropical, swarm-founding eusocial wasp, *Polybia micans* Ducke (Vespidae: Epiponini). *J Exp Biol* jeb-096750.
- Khidr SK, Linforth RST, Hardy ICW (2013) Genetic and environmental influences on the cuticular hydrocarbon profiles of *Goniozus* wasps. *Entomol Exp Appl* 147: 175-185. 10.1111/eea.12058.
- Le Conte Y, Hefetz A (2008) Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annu Rev Entomol* 53: 523-542.
- Liang D, Silverman J (2000) You are what you eat: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften* 87: 412-416. 10.1007/s001140050752.
- Lockey KH (1988) Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp Biochem Physiol B* 89: 595-645.
- Lorenzi MC, Azzani L, Bagnères A (2014) Evolutionary consequences of deception: Complexity and informational content of colony signature are favored by social parasitism. *Curr Zool* 60(1): 137-148.
- Lorenzi MC, Bagnères AG, Clément JL, Turillazzi S (1997) *Polistes biglumis bimaculatus* epicuticular hydrocarbons and nestmate recognition (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Soc* 44: 123-138.

- Lorenzi MC, Sledge MF, Laiolo P, Sturlini E, Turillazzi S (2004) Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. *J Insect Physiol* 50(10): 935-941. DOI.org/10.1016/j.jinsphys.2004.07.005.
- Martin SJ, Helantera H, Drijfhout FP (2008) Evolution of species specific cuticular hydrocarbon patterns in *Formica* ants. *Biol. J Linn Soc* 95: 131-140. 10.1111/j.1095-8312.2008.01038.x
- Mateus S, Noll FB, Zucchi R (1997) Morphological caste differences in the Neotropical swarm-founding Polistinae wasp, *Parachartegus smithii* (Hymenoptera, Vespidae). *J New York Entomol Soc* 105: 129-139.
- Mateus S, Noll FB, Zucchi R (1999) Caste differences and related bionomic aspects of *Chartergellus communis*, a neotropical swarm-founding polistinae wasp (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini). *J New York Entomol Soc* 107(4): 391-406.
- Mateus S, Noll FB, Zucchi R (2004) Caste flexibility and variation according to the colony cycle in the swarm-founding wasps, *Parachartergus fraternus* (Gribodo) (Hymenoptera; Apidae: Epipoini). *J Kansas Entomol Soc* 77(4): 470-483.
- Matthews RW, Matthews JR (2010) *Insect behavior*. New York: Springer.
- Menzel F, Blaimer BB, Schmitt T (2017) How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait. *Proc R Soc B* 284: 1-10.
- Michelutti KB, Cardoso CAL, Antonialli-Junior WF (2018) Linear alkanes as a tool to evaluate intraspecific differences in social wasps. *C e N* 40-62.
- Mitra A, Ramachandran A, Gadagkar R (2014) Nestmate discrimination in the social wasp *Ropalidia marginata*: chemical cues and chemosensory mechanism. *Anim Behav* 88, 113-124.
- Monnin T (2006) Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann Zool Fen* 43: 515-530.
- Murakami ASN, Nunes TM, Desuó IC, Shima SN, Mateus S (2015) The cuticular hydrocarbons profiles in the colonial recognition of the neotropical eusocial wasp, *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera: Vespidae). *Sociobiology* 62:109-115.

- Murakami ASN, Shima SN, Desuó IC (2009) More than one inseminated female in colonies of the independent-founding wasp *Mischocyttarus cassununga* Von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). *Rev Bras entomol* 53(4): 653-662.
- Naug D, Gadagkar R (1998) The role of age in temporal polyethism in a primitively eusocial wasp. *Behav Ecol Sociobiol* 42(1), 37-47.
- O'Donnell S, Jeanne RL (1992) The effects of colony characteristics on life span and foraging behavior of individual wasps (*Polybia occidentalis*, Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Soc* 39(1), 73-80.
- O'Donnell S, Jeanne RL (1990) Forager specialization and the control of nest repair in *Polybia occidentalis* Olivier (Hymenoptera: Vespidae). *Behav Ecol Sociobiol* 27(5), 359-364.
- Oi CA, Van Oystaeyen A, Oliveira RC, Millar JG, Verstrepen KJ, van Zweden, JS, Wenseleers T (2015) Dual effect of wasp queen pheromone in regulating insect sociality. *Curr Biol* 25:1638-1640.
- Panek LM, Gamboa GJ, Espelie KE (2001) The effect of a wasps age on its cuticular hydrocarbon profile and its tolerance by nestmate and non-nestmate conspecifics (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). *Ethology* 107: 55-63. 10.1046/j.1439-0310.2001.00633.x
- Provost E, Blight O, Tirard A, Renucci M (2008) Hydrocarbons and insects' social physiology. *In: Maes RP (ed.), Insect Physiology: new research.* Nova Science Publishers, pp. 19-72.
- Quinn GP, Keough MJ (2002) *Experimental design and data analysis for biologists.* Cambridge: Cambridge University Press.
- Richard FJ, Hunt JH 2013 Intracolony chemical communication in social insects. *Insectes Soc* 60: 275-291. 10.1007/s00040-013-0306-6.
- Richards OW (1971) The biology of the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). *Biol Rev* 46: 483-528.
- Service PM, Rose MR (1985) Genetic oviation among life-history components: the effect of novel environments. *Evolution* 39(4), pp. 943-9.
- Sguarizi-Antonio D, Torres VO, Firmino EL, Lima SM, Andrade LH, Antonialli-Junior WF (2017) Observation of intra-and interspecific differences in the nest chemical profiles of social wasps (Hymenoptera: Polistinae) using infrared photoacoustic spectroscopy. *J Photochem Photobiol B Biol* 176, 165-170.

- Shima SN, Noll FB, Zucchi R (2000) Morphological caste differences in the neotropical swarm-founding polistine wasp, *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae, Epiponini). *Sociobiology* 36(1): 41-52.
- Shima SN, Noll FB, Zucchi R, Yamane S (1998) Morphological caste differences in the Neotropical swarm-founding Polistine wasps IV. *Pseudopolybia vespiceps*, with preliminary considerations on the role of intermediate females in the social organization of the Epiponini (Hymenoptera, Vespidae). *J Hymenoptera Res* 7: 280-295.
- Singer TL, Espelie EK, Gamboa GJ, (1998) Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML, Espelie EK (Eds.), *Pheromone Communication in Social Insects*. Boulder, Westview Press, pp. 104–125.
- Singer TL, Espelie KE (1997) Exposure to nest paper hydrocarbons is important for nest recognition by a social wasp, *Polistes metricus* Say (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Soc* 44: 245-254. 10.1007/s000400050045.
- Sledge MF, Boscaro F, Turillazzi S (2001) Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behav Ecol Sociobiol* 49(5): 401-409.
- Soares ERP, Batista NR, Souza RDS, Torres VDO, Cardoso CAL, Nascimento FS, Antonialli-Junior WF (2017) Variation of cuticular chemical compounds in three species of *Mischocyttarus* (Hymenoptera: Vespidae) eusocial wasps. *Rev Bras Ent* 61 (3): 224-231.
- Soares ERP, Torres VO, Antonialli-Junior EF (2014) Reproductive Status of Females in the Eusocial Wasp *Polistes ferreri* Saussure (Hymenoptera: Vespidae). *Neotrop Entomol* 43: 500–508
- Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS, Turatti IC, Lopes NP, Trigo JR, Zucchi R (2007) Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a Neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae). *Genet Mol Res* 6(2): 390-396.
- Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS, Zucchi R (2005) Size and colony cycle in *Polistes satan*, a Neotropical paper wasp (Hymenoptera, Vespidae). *Ethol Ecol Evol* 17: 105–119. DOI: 10.1080/08927014.2005.9522601.
- Torres VO, Montagna TS, Raizer J, Antonialli-Junior WF (2012) Division of labor in colonies of the eusocial wasp, *Mischocyttarus consimilis*. *J Insect Sci* 12(1): 21.

- Torres VO, Sguarizi-Antonio D, Lima SM, Andrade LH, Antonialli-Junior WF (2014) Reproductive Status of the social wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology* 61: 218-224.
- Van den Dool H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* 11: 463-471.
- Vilela EF, Della Lucia TMC (2001) Introdução aos semioquímicos e terminologia, Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Ribeirão Preto: Holos Editora, pp. 9-12.
- Wang Q, Goodger JQ, Woodrow IE, Elgar MA (2016) Location-specific cuticular hydrocarbon signals in a social insect. *Proc R Soc B* 283(1827), 20160310.
- West-Eberhard MJ (1973) Monogyny in “polygynous” social wasps. *Proc. 7th Cong. I.U.S.S.I. London*, pp. 396–403.
- Zara FJ, Balestieri JBP (2000) Behavioural catalogue of *Polistes versicolor* Oliver (Vespidae: Polistinae) post-emergence colonies. *Naturalia* 25: 301-319.

CAPÍTULO II

Efeitos tóxicos, mutagênicos e viabilidade celular da peçonha da vespa social *Polybia sericea* (Hymenoptera: Vespidae)

* Formatação nas normas da revista Neotropical Entomology ISSN: 1519-566X.

Efeitos tóxicos, mutagênicos e viabilidade celular da peçonha da vespa social *Polybia sericea* (Hymenoptera: Vespidae)

Eva Ramona Pereira Soares^{1,2}, Viviana Oliveira Torres¹, Pamela Fukuda de Castilho³, Kelly Mari Pires de Oliveira³, David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro⁴, Edson Lucas dos Santos⁴, Sidnei Eduardo Lima-Junior⁵, Claudia Andrea Lima Cardoso⁵ & William Fernando Antonialli-Junior^{2,5}

¹Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970 Dourados-MS, Brasil. ²Laboratório de Ecologia Comportamental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Brasil. ³Laboratório de Microbiologia aplicada, Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970 Dourados-MS, Brasil. ⁴Laboratório de biologia molecular e cultura de células, Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970, Dourados-MS, Brasil. ⁵Centro de Pesquisa em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

Resumo. A peçonha de vespas sociais pode ser um produto natural promitente para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que nas últimas décadas estudos têm investigado seu potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante, anticarcinogênico, entre outros para sua aplicabilidade futura na indústria farmacológica. Embora alguns estudos já tenham destacado a importância destes compostos para este papel, ainda são poucas as espécies de vespas sociais que tiveram o potencial de sua peçonha investigado. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e viabilidade celular da peçonha da vespa *Polybia sericea*. Foram realizados os testes de citotoxicidade empregando *Artemia salina*, teste de Ames que avaliou a instabilidade genética e celular e o teste de viabilidade celular empregando linhagens não tumorais e tumoral. Os resultados demonstram que a peçonha apresenta citotoxicidade para *Artemia salina* em todas as concentrações testadas, com ausência e presença de inibidor de protease, entretanto, na presença do inibidor a citotoxicidade foi relativamente maior. No teste de Ames apenas a concentração de 150 µg placa⁻¹ na ausência de um inibidor de protease aumentou significativamente o número das colônias revertentes e apresentou mutagenicidade para a linhagem TA98. Em relação à viabilidade celular a peçonha de *Polybia sericea* não apresentou citotoxicidade para linhagem MRC-5, mas foi citotóxica para a linhagem CHO e linhagem tumoral B16F10-Nex2. Por fim, destacamos que em todos os tratamentos a ausência de inibidor de protease pode levar à degradação de substâncias presentes na peçonha.

Palavras-chave: Inibidor de protease, vespa social, B16F10-Nex2.

Toxic, mutagenic and cell viability effects of venom *Polybia sericea* (Hymenoptera: Vespidae)

Abstract: The venom from social wasps can be a promising natural product for the drugs development, since in recent decades studies have investigated its antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, anticarcinogenic and others potential for its future applicability in the drug industry. Although some studies have already highlighted the importance of these compounds to this role, there are still few species of social wasps that had the potential of their venom investigated. In this sense, the this study aims to evaluate the cytotoxicity, mutagenicity and cellular viability of the venom of *Polybia sericea*. We performed the cytotoxicity tests using *Artemia salina*, Ames test that evaluated the genetic and cellular instability and the cell viability test using non-tumor and tumoral cell lines. The results showed that the venom presented cytotoxicity to *Artemia salina* in all concentrations tested, in the absence and presence of protease inhibitor, however, in the presence of the inhibitor the cytotoxicity was relatively higher. In the Ames test only the concentration of 150 $\mu\text{g plate}^{-1}$ in the absence of a protease inhibitor significantly increased the number of the revertant colonies and showed mutagenicity for the TA98 lineage. In relation to cell viability the venom of *Polybia sericea* did not present cytotoxicity to MRC-5 lineage, but was cytotoxic to the CHO line and B16F10-Nex2 tumoral lineage. Finally, we highlight that in all treatments the absence of protease inhibitor can induce the degradation of substances present in the venom.

Key words: Protease inhibitor, social wasp, B16F10-Nex2.

Introdução

As vespas sociais, assim como abelhas sociais e todas as formigas são incluídas na ordem Hymenoptera, que abrange mais de 150 mil espécies (Gulan & Cranston 2017). Estas espécies sociais apresentam um nível de organização comportamental que intriga muitos estudiosos e para manter essa coesão nas colônias existe divisão de trabalho e mecanismos de captura de presa e defesa da colônia que são extremamente eficientes (Wilson 1971).

Dentre os mecanismos de defesa nessas espécies destaca-se o surgimento de um aparato ferroador a partir de um ovipositor ancestral, que inclui um mecanismo de produção e injeção de peçonha (Whitman *et al* 1990, Brandão 1999). Segundo Cassier *et al* (1994) esta estrutura é composta de modo geral, por uma porção secretora formada pela glândula de peçonha e glândula convoluta, além de um saco de armazenamento e um ferrão.

A peçonha desses insetos funciona como armas naturais para garantir a defesa da colônia contra predadores e captura de presas (Palma 2013). É sabido que a composição química da peçonha inclui substâncias de baixa massa molecular, como os peptídeos (Mendes *et al* 2004, Spillner *et al* 2014, Dias *et al* 2015), que estão frequentemente envolvidos em reações tóxicas (Arcuri *et al* 2016). Além disso, os produtos naturais constituem importante fonte de agentes terapêuticos (Guo 2016) e, dentre estes recursos, a peçonha pode apresentar substâncias com propriedades antitumorais (King 2011, Harvey 2014).

Apesar das pesquisas promissoras já realizadas com vespas sociais, segundo Santos *et al* (2007), existem quase 500 espécies de vespas sociais no Brasil, das quais pouco se sabe sobre a bioquímica, farmacologia e imunologia de sua peçonha. Dentre os entraves relacionados à investigação de novas substâncias bioativas a partir da peçonha destes insetos, destaca-se principalmente a dificuldade de se obter o material em quantidade suficiente, uma vez que é reduzido o volume de peçonha extraída de cada indivíduo, como já relatado para formigas (Fox *et al*, 2012, Pluzhnikov *et al* 2014).

Outro desafio está relacionado à mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade deste produto natural, que pode ser um fator limitante para sua aplicação terapêutica (Simões *et al* 2016). Neste aspecto, estudos que avaliem a peçonha quanto sua atuação sobre a instabilidade genética e a citotoxicidade sobre modelos biológicos são relevantes para pesquisas mais aplicadas, como o estudo de novos agentes terapêuticos.

Entre os testes alternativos para a avaliação da mutagenicidade, citotoxicidade, estão o teste de Ames, que é sensível a agentes mutagênicos e citotóxicos e, manifesta sua resposta baseado na indução de mutações reversas empregando uma bactéria auxotrófica para histidina (his-), que na presença de agentes mutagênicos reverte seu caráter de auxotrofia e passa a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido (Zeiger 2001, Varella *et al* 2004). O teste sobre o microcrustáceo *Artemia salina* que é um modelo sensível para avaliação da toxicidade e determinação da dose letal para 50% dos indivíduos (DL₅₀) (Meyer *et al* 1982), dado que se correlaciona com a razão entre a dose tóxica e a dose capaz de produzir a resposta terapêutica desejada (Mello *et al* 2004).

Além disso, há o ensaio de viabilidade celular, pela técnica do MTT que é um ensaio de citotoxicidade no qual é medida a viabilidade celular. Este teste baseia-se na capacidade das células viáveis em converter o sal MTT (Brometo de Tiazol Azul Thyazolyl) em um sal insolúvel de coloração púrpura. Este produto não pode atravessar as membranas celulares de células viáveis e, portanto, se acumula em seu interior (Fotakis & Timbrell 2006).

Considerando então a inexistência de estudos que avaliem as atividades biológicas da peçonha da espécie da vespa social *Polybia sericea* (Olivier), este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade, mutagenicidade e a viabilidade celular da peçonha desta espécie com implicações futuras para aplicação de compostos na indústria farmacológica.

Material e métodos

Coleta e preparação das amostras da peçonha de *Polybia sericea*

As coletas das colônias foram realizadas no município de Dourados-MS (Brasil) (22°11'52.67" S; 54°55'52.64" W) no estado de Mato grosso do Sul. Com auxílio de sacos plásticos e algodão embebido em éter, cujo saco envolveu o ninho para tentar coletar o maior número possível de indivíduos. Logo após a coleta, o algodão com éter foi retirado o mais rápido possível para evitar qualquer tipo de contaminação. Em seguida, as vespas foram conduzidas ao laboratório, onde foram anestesiadas sob a ação de baixa temperatura para posterior extração da peçonha.

A extração do reservatório da peçonha ocorreu por dissecação, com auxílio de pinça e microscópio estereoscópio, e posterior remoção dos filamentos glandulares e do

ferrão. Para extrair a peçonha o reservatório foi levemente pressionado dentro de um frasco de vidro, até a liberação do seu conteúdo. Durante todo o procedimento, todas as amostras foram mantidas em gelo para evitar a volatilização e degradação das substâncias mais leves.

Os reservatórios das glândulas da peçonha extraídos foram colocados em dois recipientes, com presença e ausência de uma solução aquosa de coquetel de inibidores de proteases a 10%. O inibidor de protease é um coquetel de reagentes que inibe a degradação geral de proteínas em tecidos ou extratos celulares por proteases endógenas, ou para investigar processos particulares que envolvem o bloqueio da atividade de proteases específicas (Sigma-Aldrich P2714). Após o processo de dissecação o material foi centrifugado a 12.000 RPM por 10 minutos, a 4 °C, para separação da membrana do invólucro do reservatório da glândula da peçonha. Em seguida, o sobrenadante contendo a peçonha foi transferido para outro microtubo, congelado e posteriormente liofilizado.

Os testes com ausência e presença de inibidor de protease foram realizados para avaliar diferenças nos resultados nesses dois tipos de amostras, uma vez que alguns artigos mencionam o uso destes (dos Santos *et al* 2010, Santos *et al* 2017) e outros não (de Souza *et al* 2009, Bernardi *et al.*, 2017).

Ensaio de toxicidade da peçonha de *Polybia sericea* em *Artemia salina*

A preparação das amostras e o teste de citotoxicidade, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bernardi *et al* (2017), com alteração das concentrações da peçonha de *P. sericea* que foram: 0,5; 15; 50; 100; 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluídas em solução salina (pH 8) em ausência e presença de inibidor de protease.

Os dados obtidos nas análises, em diferentes concentrações, foram utilizados para a construção de uma curva analítica e posteriormente, para determinação do DL₅₀ (Dose letal para 50% dos indivíduos).

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

O potencial mutagênico das amostras da peçonha de *P. sericea* em ausência e presença de inibidor de protease, foi avaliado de acordo com o método de Mortelmans & Zeiger (2000). As linhagens de *Salmonella Typhimurium* foram fornecidas pelo setor de Toxicologia e Genotoxicidade da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.

Para o preparo do inóculo alíquotas de 0,1 mL de *S. Typhimurium* TA 98 e TA 100 foram inoculadas em 20 mL de Caldo Nutriente (Oxoid n. 2) e incubadas a 37 °C

por 16 h em uma incubadora com agitação orbital de modo a obter uma suspensão de aproximadamente 1×10^8 bactérias mL^{-1} . Após este tempo as cepas foram concentradas por centrifugação (10.000 giros a 4°C) por 10 minutos e ressuspendidas em 4 mL de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Os ensaios foram realizados na presença e ausência da fração microsomal S9, a fim de avaliar o potencial mutagênico direto e indireto. Foram adicionados nos tubos teste 50 μL de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ou fração S9, 5 μL da amostra nas concentrações: 5, 15, 50, 150 e 500 $\mu\text{g placa}^{-1}$ e 50 μL da suspensão bacteriana. Os tubos foram pré-incubados por 90 minutos a 37°C . Após o período de incubação foi adicionado 2 mL de top ágar (0,6 % de ágar, 0,6% de NaCl, $0,05 \text{ m mol L}^{-1}$ L-histidina, $0,05 \text{ m mol L}^{-1}$ biotina, pH 7,4, 45°C) aos tubos e a mistura foi vertida em placas com ágar mínimo (1,5% de ágar, solução de Voguel-Boner 50x e solução de glicose 10%). As placas foram incubadas a 37°C por 48-66 horas e posteriormente, as colônias revertentes foram contadas.

Os controles positivos utilizados nos ensaios sem ativação metabólica foram: 4-nitro-ofenilenodiamino (NPD) ($10 \mu\text{g placa}^{-1}$) para a linhagem TA98 e azida sódica ($2,5 \mu\text{g placa}^{-1}$) para a linhagem TA100. Nos ensaios com ativação metabólica foi empregado o mesmo composto 2-antramino (2-ANTR) ($2,5 \mu\text{g placa}^{-1}$) para as duas linhagens. Como controle negativo foi utilizado a água destilada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, EUA, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, EUA), adotando o modelo de Bernstein *et al* (1982). O índice de mutagenicidade (IM) foi calculado de acordo com a fórmula: $\text{IM} = \text{número de revertentes induzidos} / \text{número de revertentes espontâneos}$. A peçonha foi considerada com potencial mutagênico quando o índice de mutagenicidade foi igual ou maior que 2 em pelo menos uma das concentrações testadas e quando houve uma relação de dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos (Valente-Campos *et al* 2009). As concentrações que apresentaram um IM inferior a 0,7 foram consideradas citotóxicas (Kummrow *et al* 2006).

Viabilidade celular

Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas foram: MRC-5 (Linhagem não tumoral de fibroblasto humano), CHO (linhagem não tumoral de ovário de hamster chinês) e B16F10-Nex2 (linhagem tumoral de melanoma murino). As células MRC-5 foram cultivadas em meio DMEM alta glicose, para as células CHO foram utilizados meio DMEM alta glicose e F-10 na proporção 1:1 e para as células B16F10-Nex2 foi utilizado o meio RPMI 1640. Todas as linhagens celulares foram mantidas em garrafas de laboratório contendo seus respectivos meios de cultura e suplementados com soro fetal bovino 10% adicionado 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) a 10 mg mL^{-1} , incubadas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 .

Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar o efeito citotóxico na viabilidade das células não tumorais e tumoral, foi realizado o ensaio colorimétrico com 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltrazolium bromide (MTT). Para isto, células foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com $100 \mu\text{L}$ em concentrações variadas. Após 24 e 48 h o sobrenatante foi descartado, lavados com PBS 1x e adicionado MTT (5 mg mL^{-1} por poço). Ao incubar por 4 h na estufa, sobrenadante foi retirado e adicionado $100 \mu\text{L}$ de DMSO. A leitura foi realizada a 570 nm em leitor de microplaca. As concentrações da peçonha de *P. sericea* foram: 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Análises estatísticas

Com o objetivo de testar a influência da concentração da peçonha na presença/ausência de inibidor de protease sobre a mortalidade de larvas de *A. salina* e sobre viabilidade celular das linhagens celulares MRC-5, CHO e B16F10-Nex2, foram utilizadas Análises de Variância de Dois Critérios, utilizando o software Statistica 13.3 (Tibco 2017).

Resultados e discussão

Toxicidade da peçonha de *Polybia sericea* em *Artemia salina*

Potencial de toxicidade da peçonha

Os resultados mostraram que para todas as concentrações da peçonha de *P. sericea* testadas, tanto em ausência e presença de inibidor de protease, houve mortalidade de *A. salina*, exceto no controle negativo que não apresentou mortalidade. Para determinação da DL₅₀ foram empregadas às concentrações da peçonha em função da porcentagem de mortalidade de *A. salina*, resultando na DL₅₀ de 427,4 µg mL⁻¹ em ausência e 221,0 µg mL⁻¹ com presença de inibidor de protease. Com o inibidor de protease, a toxicidade foi relativamente maior para todas as dosagens, tendo uma diferença significativa com valor de F= 51,2 e p<0,01 (Fig. 1), alcançando o máximo de mortalidade na concentração de 500 µg mL⁻¹ com 53,4% de mortalidade em ausência e 76,7% na presença do inibidor.

Os resultados de citotoxicidade no método de *A. salina* em produtos naturais pode ser um fator importante a ser considerado por demonstrar indícios de potencial terapêutico, como destacado por Meyer *et al* (1982), que sugere que substâncias com DL₅₀ < 1000 µg mL⁻¹ podem ser bioativas, correlacionadas com atividades antifúngica, viruscida, antibacteriana (MacRae *et al* 1988) parasiticida (Sahpaz *et al* 1994) e tripanossomicida (Zani *et al* 1995).

Além disso, o bioensaio com *A. salina* também é correlacionado com atuação antitumoral em substâncias com DL₅₀ < 1000 µg mL⁻¹ (Meyer *et al* 1982, McLaughlin *et al* 1993, Colman-Saizarbitoria *et al* 1995). Dessa forma nossos resultados demonstram que a peçonha de *P. sericea* é tóxica para *A. salina*, já que apresentaram DL₅₀ < 1000 µg mL⁻¹. Além disso, com o inibidor de protease na peçonha, houve um aumento significativo (F= 51,2 e p < 0,01, Fig. 1) da toxicidade da peçonha, sugerindo que sem o inibidor de protease há degradação de substâncias. Isso pode estar relacionado com o fato de que os inibidores de protease são reagentes extremamente importantes para inibir a degradação geral de proteínas em tecidos ou extratos celulares por proteases endógenas, que impedem o bloqueio da atividade de proteínas específicas.

Por fim, é importante enfatizar que a toxicidade da peçonha de *P. sericea* em todas as concentrações testadas e tanto na presença quanto na ausência do inibidor possuem DL₅₀ < 1000 µg mL⁻¹ e segundo os dados de Meyer *et al* (1982), essas

características ampliam as possibilidades do uso da peçonha de *P. sericea* para testes mais aplicados no futuro.

Determinação do índice mutagênico e citotóxico a partir do teste de Ames

O teste de Ames é um teste *in vitro* amplamente reconhecido e indicado por agências e corporações governamentais como a ANVISA, OECD, SBMCTA para avaliação do potencial mutagênico, sendo as linhagens TA 98 e TA 100, as utilizadas no presente trabalho, indicadas para um *screening* pois possuem capacidade de detectar grande parte dos agentes mutagênicos (Vargas *et al* 1993).

Dessa forma, de acordo com os dados da tabela 1, a concentração de 150 µg placa⁻¹ com ausência de inibidor de protease aumentou significativamente ($p < 0,01$) o número das colônias revertentes da linhagem TA98 de *S. Typhimurium* com ativação metabólica (S+) e o índice de mutagenicidade (IM) foi maior que 2, demonstrando que nessa concentração a amostra em ausência de inibidor apresentou mutagenicidade. Nas demais concentrações com ativação metabólica (S+) e sem ativação metabólica (S-) a amostra não apresentou potencial mutagênico, bem como para a linhagem de *S. Typhimurium* TA 100.

Na tabela 2, é mostrado o efeito da amostra com presença de inibidor de protease frente a linhagem TA 100 de *S. Typhimurium* com ativação metabólica (+S9). É possível avaliar que na concentração de 150 µg placa⁻¹ apesar de não ter o IM maior que 2 há uma tendência a se tornar mutagênica, pois teve um aumento significativo ($p < 0,01$) no número de colônias revertentes. A concentração de 500 µg placa⁻¹ apresentou citotoxicidade, pois seu IM foi menor que 0,7 assim como nas concentrações de 50, 150 e 500 µg placa⁻¹ sem ativação metabólica (S-).

De acordo com o teste de Ames apenas na concentração de 150 µg placa⁻¹, sem o inibidor de protease há aumento significativo ($p < 0,01$) do número das colônias revertentes da linhagem TA98 de *S. Typhimurium* com ativação metabólica (S+), apresentando então um índice de mutagenicidade positivo para esta concentração testada, demonstrando então potencial mutagênico. Esses resultados indicam que a peçonha desta espécie pode apresentar em sua constituição substâncias que causam mutações, diretamente ou após ativação metabólica, uma vez que os revertentes de TA98 são específicos para substâncias com esse mecanismo de ação (Santos *et al*

2009), ou seja os tipos de mutações detectadas pelo teste de Ames para essa linhagem incluem deslocamento do quadro de leitura.

Por outro lado, a peçonha com presença de inibidor de protease teve resposta somente frente a linhagem TA 100 de *S. Typhimurium* com ativação metabólica (+S9) já que a concentração de 150 $\mu\text{g placa}^{-1}$ apesar de não ter o IM maior que 2 apresentou uma tendência a se tornar mutagênica, pois teve um aumento significativo ($p < 0,01$) no número de colônias revertentes, demonstrando um potencial mutagênico do tipo substituição de pares de base.

Além disso, a maior concentração (500 $\mu\text{g placa}^{-1}$) apresentou citotoxicidade, pois seu IM foi menor que 0,7 assim como nas concentrações de 50, 150 e 500 $\mu\text{g placa}^{-1}$ sem ativação metabólica (S-). Dessa forma, é importante ressaltar que sem e com inibidor de protease a peçonha apresentou diferentes respostas, frente as linhagens testadas, ficando claro que não usar inibidor pode acarretar perda de proteínas e assim podem representar uma ameaça ao destino de uma proteína, além de resultar em um outro tipo de resposta.

Esses resultados indicam o cuidado com o modo no qual a extração da amostra deve ser realizada, já que o teste de Ames é utilizado mundialmente como uma ferramenta inicial para se determinar o potencial mutagênico de novos compostos, devido ao seu alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores, quando uma resposta mutagênica é obtida (Mortelmans & Zeiger 2000).

Para o teste são utilizadas cepas da bactéria *S. Typhimurium*, geneticamente modificadas para detecção de substâncias mutagênicas. O analgésico dipirona por exemplo, já foi testado pelo teste de Ames com cepas TA98 e TA100 da bactéria (Izumi *et al* 1991). As mutações estão intimamente envolvidas em etapas iniciais de doenças degenerativas, como o câncer (Maron & Ames 1983, Mortelmans & Zeiger 2000). Assim, nossos resultados destacam a importância de informações prévias que direcionem o estudo com a peçonha.

Viabilidade celular

Foi investigado o efeito da peçonha de *P. sericea* na viabilidade celular das linhagens: MRC-5, CHO e B16F10-Nex2. Os resultados dos ensaios demonstram que a viabilidade celular sobre efeito da peçonha desta espécie não apresenta diferenças

significativas em relação à citotoxicidade para linhagem MRC-5 nas concentrações e tempos testados ($p < 0,93$, $p < 0,58$) em comparação ao grupo controle (Fig. 2 A-B).

Para linhagem CHO os resultados demonstram que a peçonha apresenta citotoxicidade significativa nas maiores concentrações testadas ($p < 0,04$, $p < 0,04$) em comparação ao grupo controle (Fig. 4 A-B) com efeito dose-dependente. Entretanto, o tratamento das células com inibidor de protease, induziu uma diminuição significativa da viabilidade celular ($p < 0,01$), demonstrando que são mais sensíveis à ação dose dependente nesse caso (Fig. 4 A-B e 5 A-B), e que sem uso do inibidor de protease há degradação de substâncias que possam estar envolvidas com a citotoxicidade da peçonha.

Enquanto para a linhagem B16F10-Nex2, os resultados demonstram claramente que as células foram mais sensíveis à ação dose dependente da peçonha apresentando citotoxicidade significativa em todas as concentrações e tempos testados ($p < 0,01$, $p < 0,06$) em comparação ao grupo controle (Fig. 6 A-B). Além disso, há redução concludente na viabilidade celular de mais de 60% nas duas maiores concentrações (200 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Houve diminuição da viabilidade celular com inibidor de protease, com o valor de p significativo ($p < 0,01$), demonstrando que são mais sensíveis à ação dose dependente da peçonha de *P. sericea* (Fig. 7 A-B).

Dessa forma, todos os tratamentos, independente da linhagem demonstraram que sem inibidor de protease há degradação de substâncias responsáveis por aumentar a citotoxicidade da peçonha. Uma redução na viabilidade celular por um agente pode ser considerada como um efeito citotóxico decorrente da presença de substâncias tóxicas (Zegura *et al* 2009). Um fato importante a ser considerado nos resultados obtidos é que a peçonha na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi altamente citotóxica para a linhagem tumoral B16F10-Nex2, já que a viabilidade celular acima dessa concentração independente da presença ou ausência do inibidor de protease, reduziram significativamente a viabilidade celular da célula tumoral (Fig. 7 A-B).

Os fármacos atuais têm ações prejudiciais sobre as células não-alvo, isso acaba causando efeitos colaterais indesejáveis. Dessa forma, a busca por novos compostos seletivos a células tumorais se tornam importantes para pesquisas nessa área, e estudos básicos são importantes para embasar pesquisas futuras. A espécie de vespa social mais estudada nesse sentido é a *Polybia paulista*, os efeitos antitumorais das toxinas da peçonha de *P. paulista* já foram testados para o mastoparan Polybia-MP1, este peptídeo mostrou uma atividade altamente seletiva citotóxica e antiproliferativa contra células de câncer de próstata, bexiga (Wang *et al* 2008) e leucêmicas resistentes a múltiplas drogas

(Wang *et al* 2009). Além disso, Leite *et al* (2015), avaliaram que o peptídeo Polybia-MP1 da peçonha desta espécie, após isolado, apresenta atividade anticarcinogênica.

Conclusão

Os resultados deste estudo acrescentam conhecimentos sobre os efeitos citotóxicos, mutagênico e de viabilidade celular da peçonha de *P. sericea*, enfatizando a importância no investimento em novos estudos de atividade biológica deste material glandular. Além de resultados importantes sobre a utilização ou não de uma solução aquosa de coquetel de inibidores de proteases, que implicam em diferentes resultados. Dessa forma, a peçonha da espécie pode ser importante para fornecer substâncias modelo para aplicação na indústria farmacêutica.

Agradecimentos

Ao Dr. Orlando T. Silveira (Museu Paraense Emílio Goeldi) pela identificação da espécie. À CAPES pelas bolsas concedidas, ao CNPq e FUNDECT pelo apoio financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade dos autores WFAJ número de concessão (307998/2014-2) e CALC número de concessão (310801/2015-0).

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Atividade mutagênica expressa pela média de colônias revertentes/placa \pm desvio padrão da peçonha de *Polybia sericea* em ausência de inibidor de protease frente as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella* Typhimurium com ativação metabólica (S+) e sem ativação metabólica (S-).

Concentrações (μg placa ⁻¹)	TA 98		TA 100	
	S+	S-	S+	S-
^a 0	12,00 \pm 3,61	10,00 \pm 0,00	126,67 \pm 15,82	150,67 \pm 7,09
5	13,67 \pm 1,53	18,67 \pm 2,08	93,00 \pm 2,00	119,33 \pm 17,79
15	14,67 \pm 4,04	9,00 \pm 1,00	142,33 \pm 3,79	115,33 \pm 14,57
50	15,00 \pm 1,73	16,67 \pm 2,52	147,33 \pm 13,01	117,00 \pm 16,00
150	27,33 \pm 1,15**	12,33 \pm 1,53	133,67 \pm 21,03	129,33 \pm 7,51
500	6,00 \pm 2,00	16,67 \pm 2,08	114,00 \pm 5,00	138,67 \pm 4,62
C+	311,50 \pm 4,50 ^d	389,5 \pm 2,50 ^b	1317,00 \pm 1,00 ^d	307,00 \pm 3,00 ^c

^a0: água destilada usada como diluente do extrato; Controle Positivo (C +): ^b 4-nitro-o-phenylenediamine (10 μg placa⁻¹); ^c Azida sódica (2,5 μg placa⁻¹); ^d2AA-aminoantraceno (2,5 μg placa⁻¹). Diferença significativa ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 2. Atividade mutagênica expressa pela média de revertentes/placa \pm desvio padrão da peçonha de *Polybia sericea* com a presença de um inibidor de protease frente as linhagens TA 98 e TA 100 de *Salmonella* Typhimurium com ativação metabólica (S+) e sem ativação metabólica (S-).

Concentrações (μg placa ⁻¹)	TA 98		TA 100	
	S+	S-	S+	S-
0 ^a	13,67 \pm 2,52	10,00 \pm 0,00	126,67 \pm 15,82	150,67 \pm 7,09
5	18,00 \pm 3,00	17,33 \pm 3,51	96,33 \pm 1,53	116,00 \pm 10,39
15	18,33 \pm 3,51	15,67 \pm 4,04	90,00 \pm 2,65	181,67 \pm 13,28
50	18,00 \pm 2,65	15,00 \pm 3,61	148,67 \pm 4,62	103,33 \pm 2,31
150	18,67 \pm 5,03	7,33 \pm 2,08	213,00 \pm 6,93**	71,00 \pm 3,46
500	9,67 \pm 3,21	14,33 \pm 5,03	79,00 \pm 21,12	18,67 \pm 1,15
C+	311,50 \pm 4,50 ^d	389,5 \pm 2,50 ^b	307,00 \pm 4,24 ^d	1619 \pm 29,69 ^c

0^a: água destilada usada como diluente do extrato; Controle Positivo (C +): ^b 4-nitro-o-phenylenediamine (10 μg placa⁻¹); ^c Azida sódica (2,5 μg placa⁻¹); ^d2AA-aminoantraceno (2,5 μg placa⁻¹). Diferença significativa ANOVA: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

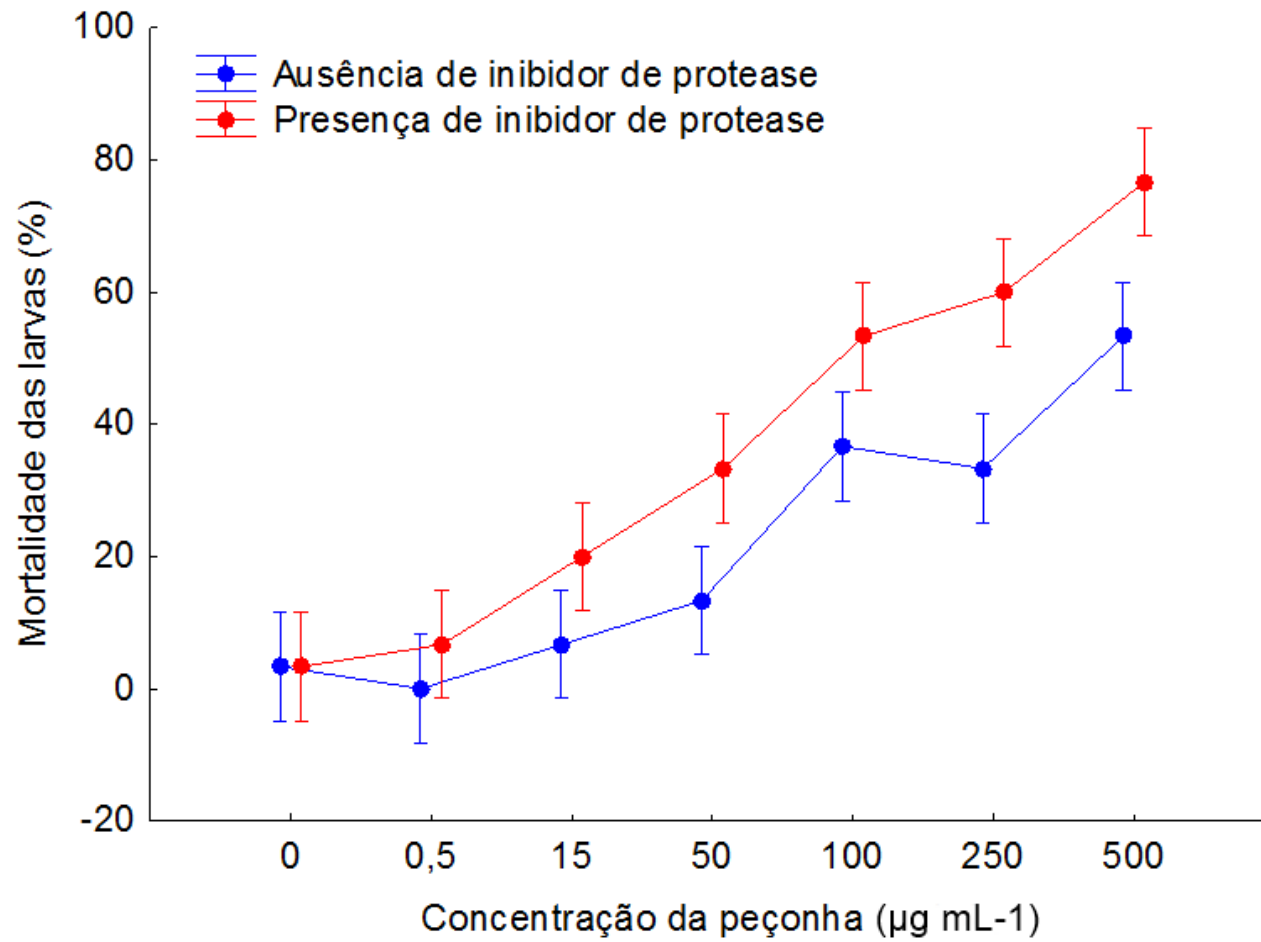


Figura 1. Taxa de mortalidade (%) das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* em função da concentração da peçonha de *Polybia sericea* sem e com inibidor de protease.

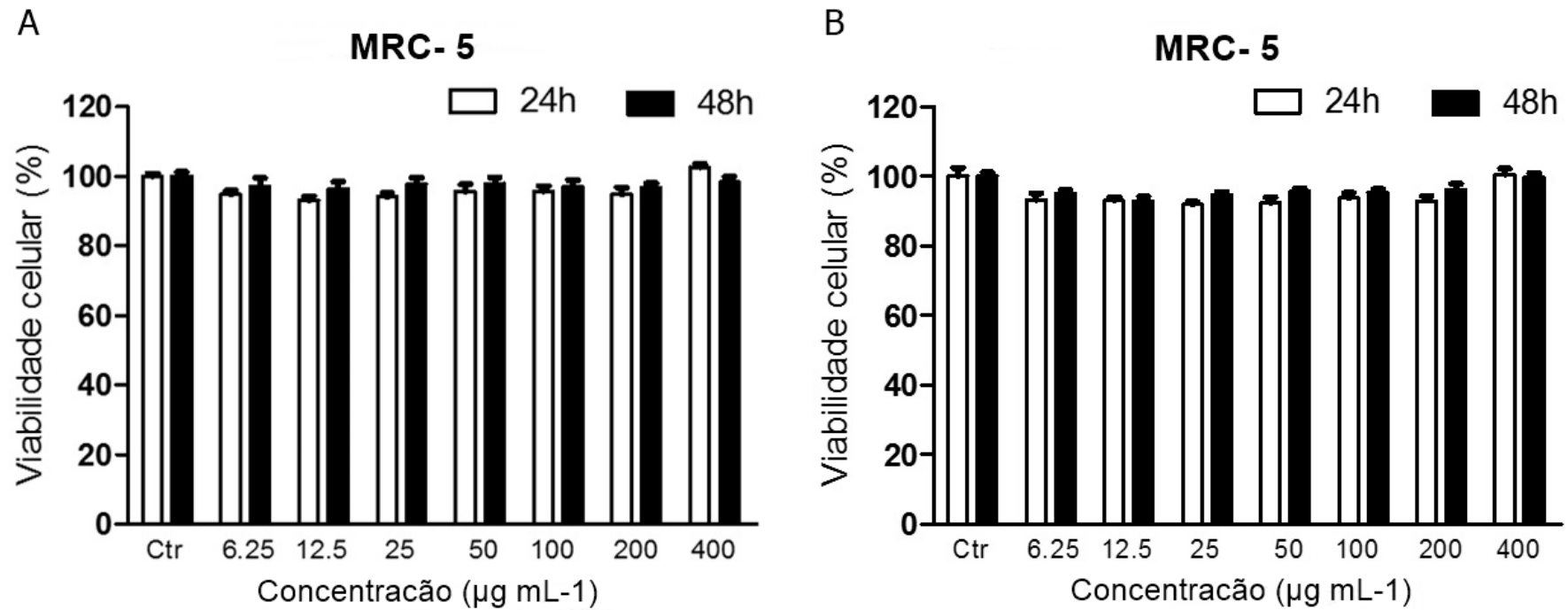


Figura 2. Viabilidade celular pelo ensaio MTT em células MRC-5 tratadas com diferentes concentrações da peçonha de *Polybia sericea* por 24 e 48 horas. Os dados são expressos em média \pm SEM em três experimentos independentes em triplicata. (A) em ausência de inibidor de protease e (B) com presença de inibidor de protease.

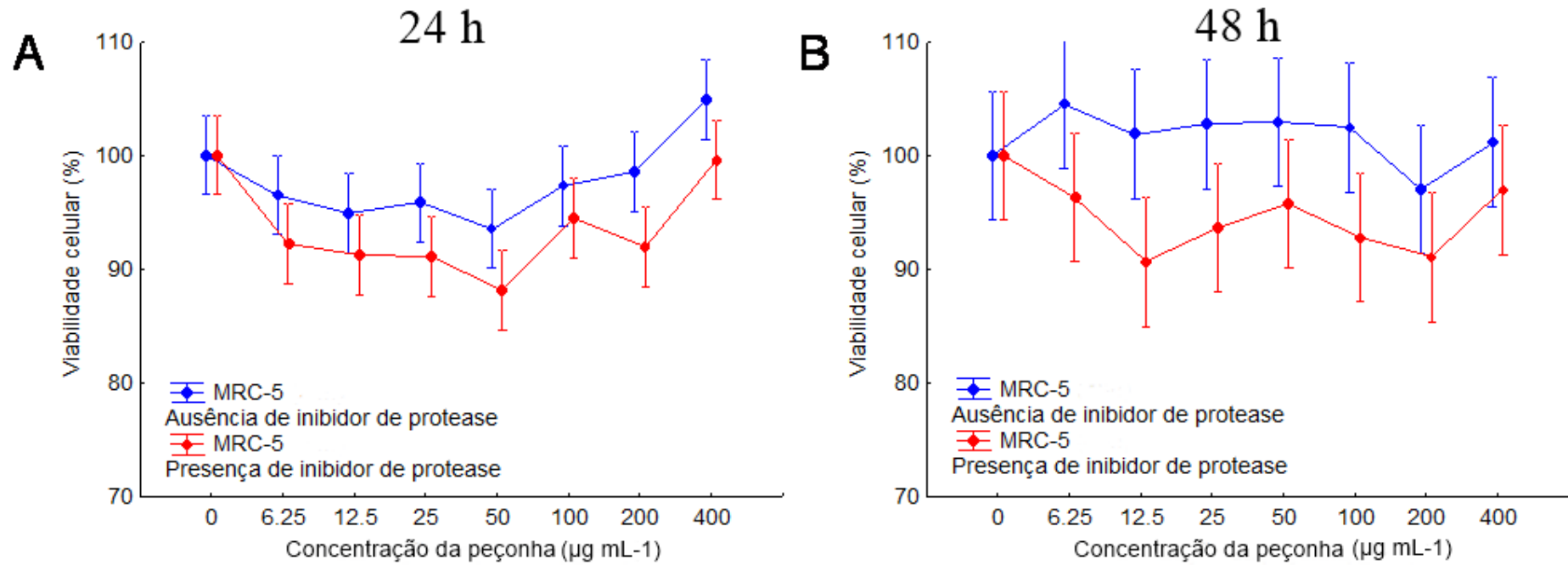


Figura 3. Porcentagem da viabilidade celular por MTT em Linhagem MRC-5 tratadas com diferentes concentrações da peçonha de *Polybia sericea* com ausência e presença de um inibidor de protease (A) (24 h) e (B) (48 h).

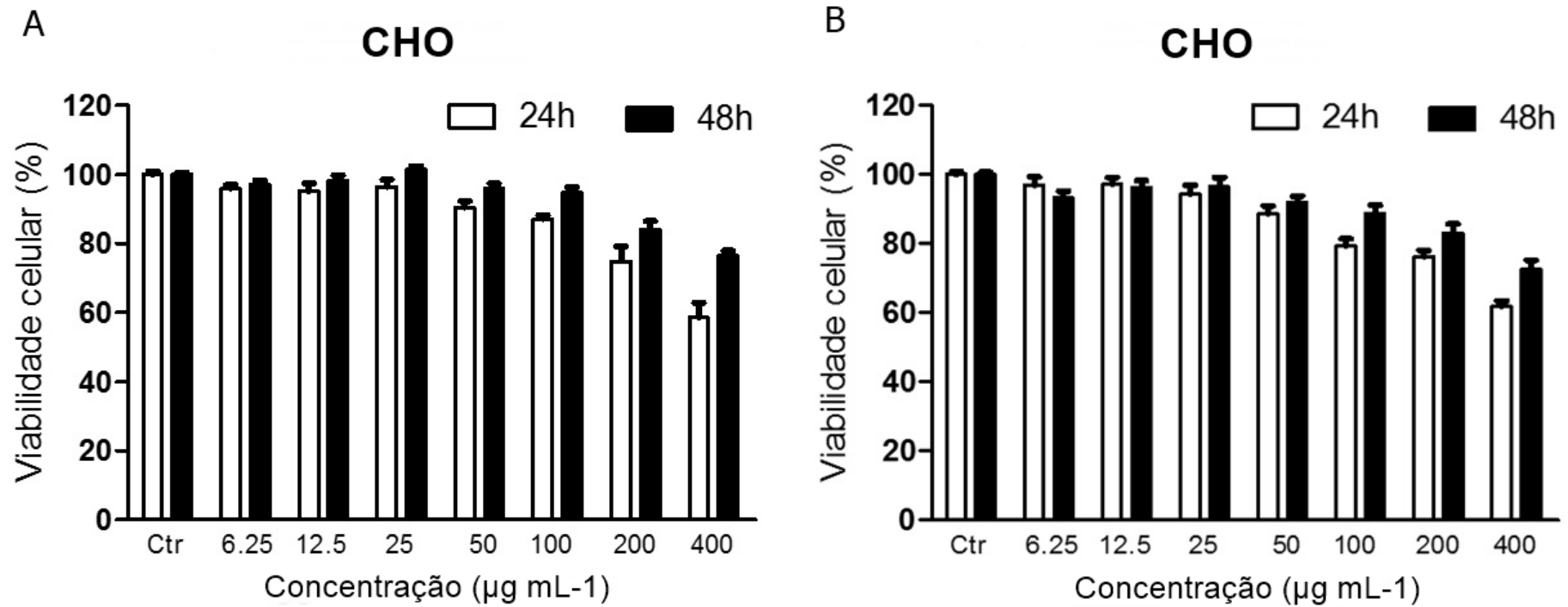


Figura 4. Viabilidade celular por MTT em células CHO tratadas com diferentes concentrações da peçonha de *Polybia sericea* por 24 e 48 horas. Os dados são expressos em média \pm SEM em três experimentos independentes em triplicata. (A) em ausência de inibidor de protease e (B) com presença de inibidor de protease.

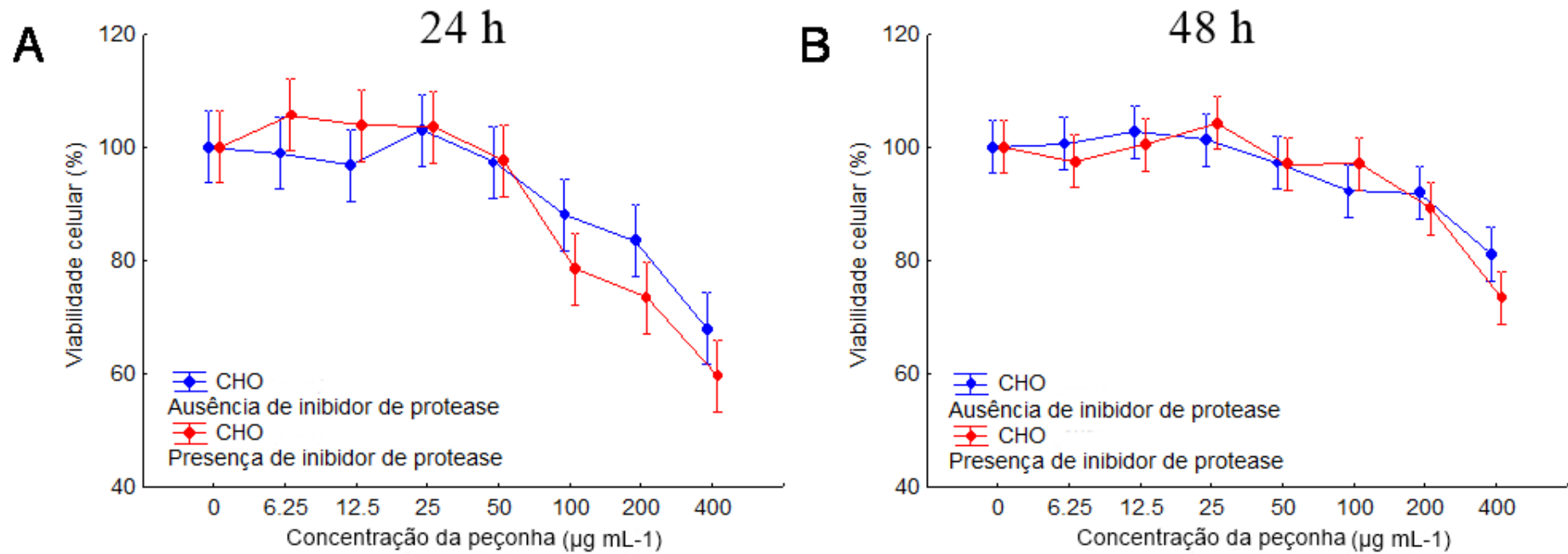


Figura 5. Porcentagem da viabilidade celular por MTT em células CHO tratadas com diferentes concentrações da peçonha de *Polybia sericea* com ausência e presença de um inibidor de protease (A) (24 h) e (B) (48 h).

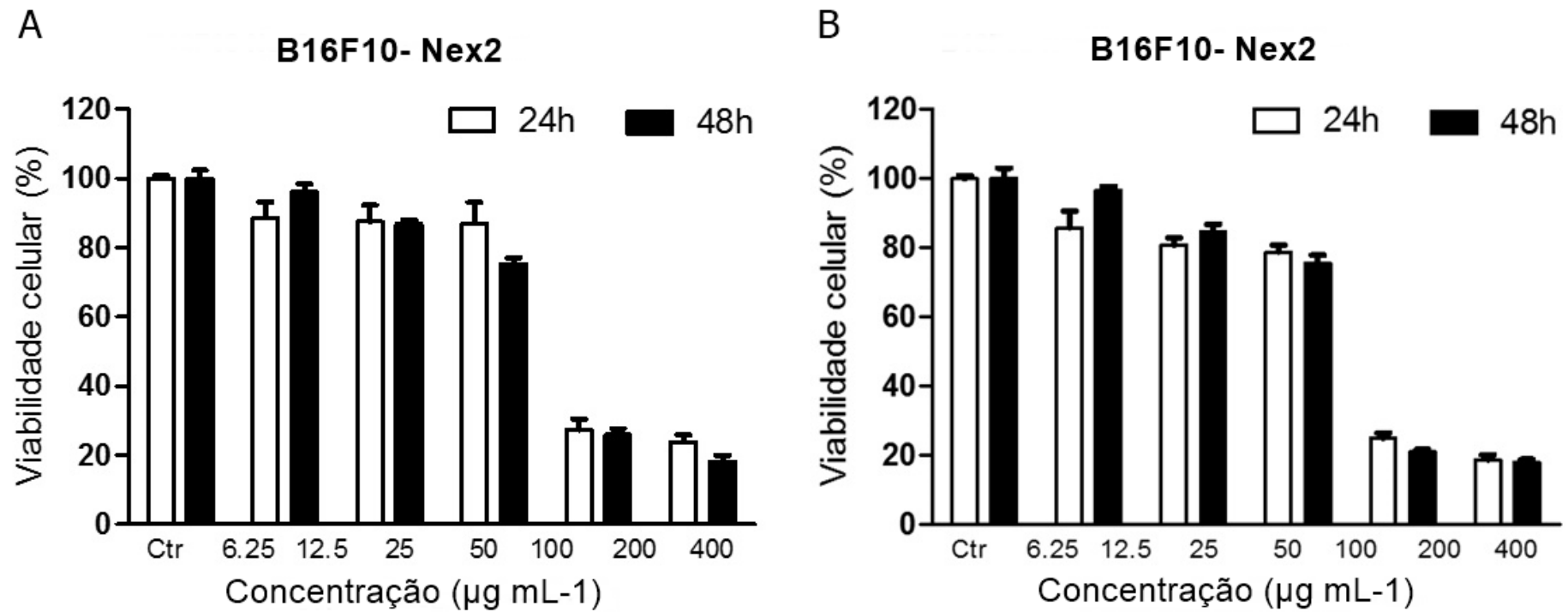


Figura 6. Viabilidade celular por MTT em células B16F10-Nex2 tratadas com diferentes concentrações da peçonha de *Polybia sericea* por 24 e 48 horas. Os dados são expressos em média \pm SEM em três experimentos independentes em triplicata. (A) Linhagem B16F10-Nex2 sem presença de inibidor de protease e (B) Linhagem B16F10-Nex2 com presença de inibidor de protease.

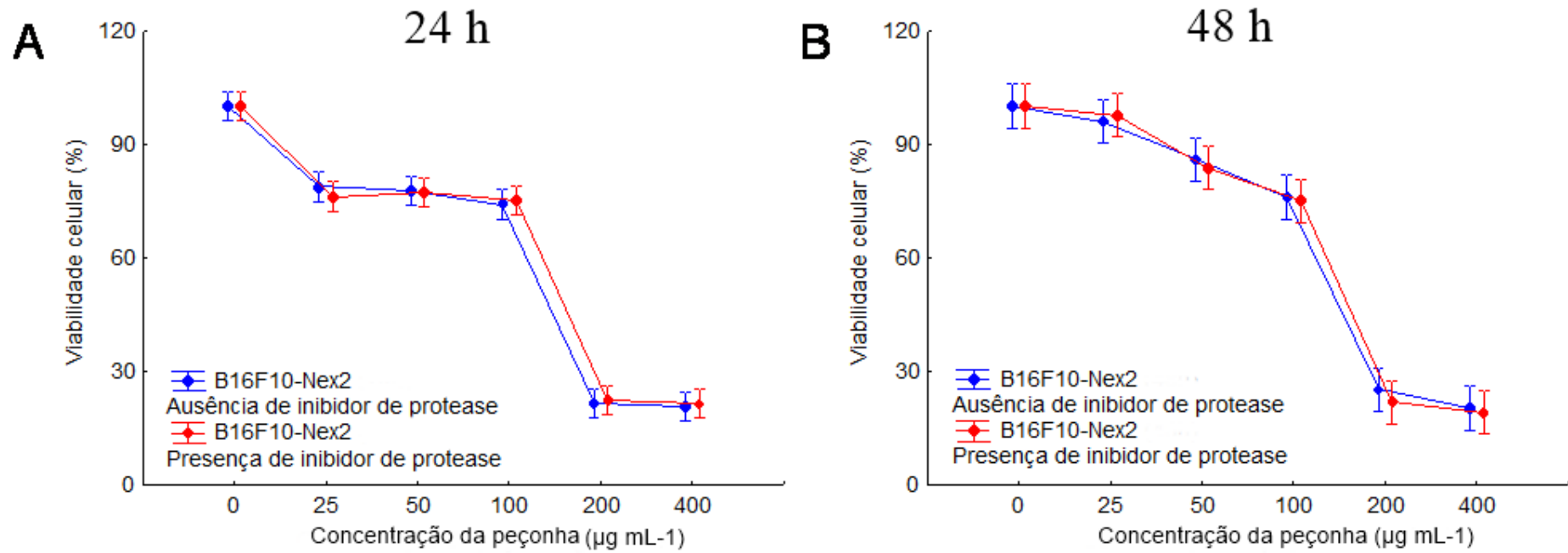


Figura 7. Porcentagem da viabilidade celular por MTT em células B16F10-Nex2 tratadas com diferentes concentrações da peçonha de *Polybia sericea* com ausência e presença de um inibidor de protease (A) Linhagem B16F10-Nex2 (24h) e (B) Linhagem B16F10-Nex2 (48h).

Referências

- Arcuri HA, Gomes PC, De Souza BM, Dias NB, Brigatte P, Stabeli RG, Palma MS (2016) Paulistine the functional duality of awasp venom peptide toxin, *Toxins* (Basel) 8. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8030061>.
- Bernardi RC, Santos-Junior LC, Guimarães IC, Macorini LFB, Antonialli-Junior WF, Cardoso CAL (2017) Screening do potencial da peçonha da formiga *Odontomachus chelifer* (fowler, 1980) como fonte de agentes terapêuticos. *Interbio* 11: 2.
- Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC (1982) An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res*, 97:267-281.
- Brandão CRF (1999) Hymenoptera. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. São Paulo-Brasil: FAPESP, p. 141-146.
- Cassier P, Tel-Zur D, Lensky Y (1994) The sting sheaths of honey bee workers (*Apis mellifera* L.): Structure and alarm pheromone secretion. *Journal of Insect Physiology*, v. 40, p. 23-32.
- Colman-Saizarbitoria T, Gu ZM, Zhao GX, Zeng L, Kozłowski JF, McLaughlin JL (1995) Venezenin: a new bioactive Annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopia aromatica*. *J Nat Prod* 58, 532-539.
- de Souza BM, da Silva AVR, Resende VMF, Arcuri HA, dos Santos Cabrera MP, Neto JR, Palma MS (2009) Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides* 30(8), 1387-1395.
- Dias NB, De Souza BM, Gomes PC, Brigatte P, Palma MS (2015) Peptidome profiling of venom from the social wasp *Polybia paulista*, *Toxicon* 107: 290–303, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.013>.
- dos Santos LD, Santos KS, Pinto JRA, Dias NB, Souza BMD, dos Santos M F, Palma MS (2010) Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *J Proteome Res* 9(8), 3867-3877. doi: 10.1021/pr1000829.

- Fotakis, G, Timbrell, JA (2006) In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160, 171–177.
- Fox EGP, Pianaro A, Solis DR, Delabie JHC, Vairo BC, Machado EA, Bueno OC (2012) Intraspecific and intracolony variation in the profile of venom alkaloids and cuticular hydrocarbons of the fire ant *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche*, 1-10.
- Gullan PJ, Cranston, P S (2017) *Insetos - Fundamentos da Entomologia - 5ª Ed.* Roca.
- Guo Z (2016) The modification of natural products for medical use. *Acta Pharm Sin B*. 7: 119-36.
- Harvey AL (2014) Toxins and drug discovery. *Toxicon*. 92: 193-200.
- Izumi K, Sano N, Otsuka H, Kinouchi T, Ohnishi Y (1991) Tumor promoting potential in male F344 rats and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of dipyrone. *Carcinogenesis* 12(7), 1221–1225.
- King GF (2011) Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 11: 1469-84.
- Kummrow F, Magalhães D, Franco A, Umbuzeiro GA (2006) Blue rayon e teste *Salmonella*/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras. *Rev Saúde Pública*, 40:890-897.
- Leite NB, Aufderhorst-Roberts A, Palma MS, Connell SD, Neto JR, Beales PA (2015) PE and PS lipids synergistically enhance membrane poration by a peptide with anticancer properties. *Bioph J* 109, 936–947.
- MacRae WD, Hudson JB, Towers GHN (1988) Studies on the pharmacological activity of amazonian Euphorbiaceae. *J Ethnopharmacol*, 22: 143-72.
- Maron DM, Ames BN (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113(3-4), 173–215.
- McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL (1993) Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumor compounds: review of recent progress. In: Kinghorn AD, Balandrin MF, editors. *Human Medicinal Agents from Plants*. Washington - USA: Am Chem Soc, p. 112-37.
- Mello JRBD, Maia JZ, Castro APD, Mello, FBD (2004) Avaliação dos efeitos do *Pygeum africanum* rosaceae sobre a fertilidade de ratos. *Acta Sci Vet* 32: 103-10.

- Mendes MA, Souza BM, Santos LD, Palma MS (2004) Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes* by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 7, 181.
- Meyer BN, Ferrigini NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL(1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45: 31-4.
- Mortelmans K, Zeiger E (2000) The Ames *Salmonella* microsome mutagenicity assay. *Mutat Res-Fund Mol M*, 455: 29-60.
- Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD (1997) Guidelinefor testing of chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test 471 (1–1).
- Palma MS (2013) Hymenoptera venom peptides, in: Abba Kastin (Ed.), *Handb. Biol. Act. Pept*, second ed.Academic press/Elsevier, San Diego, pp. 416–422.
- Pluzhnikov KA, Kozlov SA, Vassilevski AA, Vorontsova OV, Feofanov AV, Grishin EV (2014) Linear antimicrobial peptides from *Ectatomma quadridens* ant venom. *Biochim* 107: 211-5.
- Sahpaz S, Boris C, Loieau PM, Cortes D, Hacquemiller R, Laurens A, Cavé A (1994) Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Med*, 60: 538-40.
- Santos LD, Santos KS, Souza BM, Arcuri HA, Cunha-Neto E, Castro F M, Kalil JE, Palma M S (2007) Purification, Sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). *Toxicon*, Elmsford, v. 50, p. 923-937.
- Santos PP, Games PD, Azevedo DO, Barros E, de Oliveira LL, de Oliveira Ramos HJ, Serrão JE (2017) Proteomic analysis of the venom of the predatory ant *Pachycondyla striata* (Hymenoptera: Formicidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 96(3), e21424. DOI: 10.1002/arch.21424
- Santos RL, Raffatellu M, Bevins CL, Adams LG, Tukul Ç, Tsolis RM, Baumler AJ (2009) Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends in microb* 17(11), 498-506.
- Simões CMO, Schenke EP, De Mello JCP, Mentz La, Petrovick PR (2016) *Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento*. Porto Alegre – Brazil: Artmed Editora.

- Spillner E, Blank S, Jakob T (2014) Hymenoptera allergens: from venom to “venome,”
Front. Immunol 5: 1–7, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00077>.
- Tibco Software Inc (2017) Tibco Statistica. Quick Reference software release 13.3.
Retrieved from [https://docs.tibco.com/pub/stat/13.3.1/doc/pdf/TIB_stat_13.3_](https://docs.tibco.com/pub/stat/13.3.1/doc/pdf/TIB_stat_13.3_quick_ref.pdf)
[ck_ref.pdf](https://docs.tibco.com/pub/stat/13.3.1/doc/pdf/TIB_stat_13.3_quick_ref.pdf) p.205.
- Valente-Campos S, Dias CL, Barbour EDA, de Souza Nascimento E, de Aragão
Umbuzeiro G (2009) The introduction of the *Salmonella*/microsome
mutagenicity assay in a groundwater monitoring program. *Mutat Res Genet
Toxicol Environ Mutagen*, 675: 17-22.
- Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EA (2004). Mutagenic activity of
sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella*
tymphimurium. *Food Chem Toxicol* 42: 2029-35.
- Vargas VM, Motta VE, Henriques J (1993) Mutagenic activity detected by the Ames
test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat Res*
319(1), 31–45.
- Wang k, Yan J, Zhang B, Song J, Jia P, Wang R (2009) Novel mode of action of
polybia- MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic
cells, *Cancer Lett.* 278: 65–72, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.12.027>.
- Wang K, Zhang B, Zhang W, Yan, Li J, Wang R (2008) Antitumor effects, cell
selectivity and structure-activity relationship of a novel antimicrobial peptide
polybia-MPI, *Peptides* 29: 963–968, [http://dx.doi.org/10.1016/j.](http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.01.015)
[peptides.2008.01.015](http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2008.01.015).
- Whitman DW, Blum MB, ALSOP DW (1990) Allomones: Chemicals for Defense. In:
EVANS, D. L.; SMITH, J. *Insect Defenses*. Albany-EUA: State University of
New York Press, p. 289-351.
- Wilson EO (1971) *Insect societies*. Cambridge-Inglaterra: Belknap Press of Harvard
University Press, 548 p.
- Zani CL, Chaves PPG, Queiroz R, de Oliveira AB, Cardoso JE, Anjos AMG, Grandi
TSM (1995) Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-
Trypanosoma cruzi activity. *Phytomedicine* 2: 47-50.
- Zegura B, Heath E, Cernosa A, Filipic M (2009) Combination of in vitro bioassays for
the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface
water and drinking water samples. *Chemosphere* 75(11), 1453–1460.

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