



UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
A M A Z O N A S



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA – MBT**

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Polistes canadensis*

TAÍS XAVIER GUIMARÃES

**MANAUS
2014**



UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
A M A Z O N A S



TAÍS XAVIER GUIMARÃES

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Polistes canadensis*

Dissertação apresentada à Universidade do Estado do Amazonas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca
Co-Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MANAUS
2014



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA – MBT

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA
ALUNA TAÍS XAVIER GUIMARÃES EM
BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA.

Aos vinte dias do mês de agosto do ano de dois mil e doze às quatorze horas e trinta minutos, realizou-se na Sala de Aula n.º 1.2, localizada no 1º andar do prédio da Administração da Escola Superior de Ciências da Saúde, situado na Avenida Carvalho Leal, n.º 1.777, Cachoeirinha, a Defesa Pública da dissertação de mestrado de Taís Xavier Guimarães, sob o título “Caracterização e atividade biológica da peçonha de *Polistes canadensis*”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, tendo como orientador o Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca, segundo encaminhamento da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores: Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca (Presidente), Dr. Pierre Alexandre dos Santos (membro), e a Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza (membro). Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os referidos membros da banca emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo a aluna sido Aprovada.

Dr. Claudio Ruy Vasconcelos da Fonseca
CPF: 015.962.332-49

Dr. Pierre Alexandre dos Santos
CPF: 779.259.201-49

Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza
CPF: 242.657.302-30

Universidade do Estado do Amazonas
Av.: Djalma Batista, 3578 - Flores
CEP: 69050-010 / Manaus - AM

UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micra (Micrometro)
μM	Micromolar
%	Porcentagem
AcOET	Acetato de etila
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL ₅₀	Concentração Letal de 50% dos indivíduos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
C-18	Octadecil
DCM	Diclorometano
EM	Espectrometria de massas
FR	Fase Reversa
IES	Ionização por eletrospray
kV	Kilovolt
PAM	Peptídeo antimicrobiano
MeOH	Metanol
MP	Mastoparanos
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
m/v	Massa/volume

m/z	Massa/carga
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
TFA	Ácido trifluoracético
UV	Ultra-violeta
V	Volt
Ves - CPs	Peptídeos Quimiotáticos de Vespas
Vis	Visível
v/v	Volume/Volume

LISTA DE ABREVIATURA DOS AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDO	CÓDIGO DE 3 LETRAS	CÓDIGO DE 1 LETRA
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Aspargina	Asn	N
Cisteína	Cis	C
Fenilalanina	Phe	F
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequência primária de peptídeos isolados de vespas	7
Tabela 2. Eluentes usados na pré-purificação do extrato bruto	15
Tabela 3. Eluentes usados no fracionamento do extrato bruto.....	16
Tabela 4. Sistema de eluição utilizado para analisar o extrato bruto da peçonha da vespa <i>Polistes canadensis</i> por CLAE.....	17
Tabela 5. : Resultado do extrato frente à <i>Artemia salina</i> visando conhecer seu potencial citotóxico.....	26
Tabela 6. : Resultado da atividade dos extratos visando conhecer o CIM do extrato bruto.....	2.6
Tabela 7: Resultado da atividade do extrato visando conhecer seu CMB.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Representação do aparato venenífero dos vespídeos de acordo com Kanwar e Shethi (1971), onde F: ferrão; Dv: ducto de veneno; Ga: glândula acida; Gac: glândula acessório; Sv-saco de veneno.....4
- Figura 2: Aminas biogênicas encontradas em peçonhas de vespas.....6
- Figura 3: Reações causadas pela ferroada das vespas, em (a) reação tóxica local; b) reação tóxica sistêmica; c) reação alérgica sistêmica.....10
- Figura 4: *Polistes canadensis*: em (a) ninhos e (b) a vespa em destaque..14
- Figura 5: Esquema de realização do CIM.....19
- Figura 6: Esquema de realização do ensaio de citotoxicidade.....21.
- Figura 6: Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social *Polistes canadensis* da 1ª coleta (a) e da 2ª coleta (b), 5mg/500µL, sob CLAE-FR, com coluna Luna C-18 (250x 10 mm, 5mm), sob gradiente linear de 5 a 20% de solução A- 0,1% de TFA em água ultrapura, solução B- Metanol sob fluxo de 1mL/minuto. As frações cromatográficas foram monitoradas em 214 nm e 216 nm.....22
- Figura 8: Espectros de massa do tipo ESI dos componentes presentes no extrato bruto da peçonha vespa social *Polistes canadensis*. Em (a) existem dois picos de carga: +1 na forma $[M+H]^+$ (m/z 537) e +2 na forma $[M+2H]^+$ (m/z 478); em (b) existe um pico de carga +1 na forma $[M+H]^+$ (m/z 318); (c) existem dois picos de carga: +1 na forma $[M+H]^+$ (m/z 269) e +2 na forma $[M+2H]^+$ (m/z 177).....23

SUMARIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Toxinas animais	1
1.1 Atividade tóxica	2
1.2 Manifestações clínicas de toxinas	5
1.3 Atividade antibacteriana	8
1.4 Gênero <i>Polistes</i>	10
1.5 <i>Polistes canadensis</i>	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.1 Objetivos Específicos	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Material biológico	19
3.2 Preparação das amostras	19
3.3 Pre- purificação em Sep- Pak C-18	20
3. 4 Fracionamento do extrato bruto	20
3.5 Análise dos extratos e das frações	21
3.5.1 Análise por CLAE	21
3.5.2 Análise por IES-EM	22
3.5.3 Quantificação por espectrofotômetro de UV-VIS das frações purificadas	22
3.6 Atividade antimicrobiana	23
3.6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	23
3.6.2 Concentração Mínima Bactericida (CMB)	24
3.7 Ensaio de citotoxicidade utilizando <i>Artemia salina</i>	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Análises preliminares com o extrato bruto	25
4.1.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
4.1.2 Análise por Espectrometria de Massas	27
4.1.3 Testes de citotoxicidade do extrato bruto frente à <i>Artemia salina</i>	30
4.1.4 Ensaio antibacteriano	32
5. DISCUSSÃO	35
5.1 Fracionamento do extrato bruto	37
5.2 Ensaio de citotoxicidade	40
5.3 Ensaio antibacteriano	45
6. CONCLUSÕES	50
7. BIBLIOGRAFIA	51

RESUMO

A peçonha de vespas tem provado ser uma fonte valiosa de componentes farmacologicamente ativos capazes de exercer as mais diversas funções. Por atuarem em diversos sistemas biológicos, a caracterização de componentes bioativos desperta grande interesse na prospecção de novos fármacos. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização química da peçonha de *Polistes canadensis* e a avaliação do seu potencial frente aos ensaios antimicrobiano e tóxico. Para a pesquisa foram realizadas duas coletas no Instituto de Plantas Mediciniais (Manaquiri), AM, em épocas distintas. A peçonha bruta foi extraída em metanol (MeOH) e água (H₂O), fracionado por cromatografia líquida clássica (CLC), e 56 frações foram eluídas e investigadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa e por espectrometria de massas (IES-EM). Foi possível detectar a Concentração Inibitória Mínima da peçonha bruta de *P. canadensis* contra *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium columnae* e *Staphylococcus aureus*. Quanto à Concentração Mínima Bactericida (CMB) o menor valor encontrado foi de 125 Tg/mL.

Palavras chave: Peçonha de vespa, *Polistes canadensis*, antimicrobial.

ABSTRACT

Wasp venom had proven to be a valued source of pharmacologically active compounds, capable of performing diverse functions. By acting on different biological systems, the characterization of such compounds exerts great interest in the prospection of new drugs. This work aimed to study the chemical extracts of *Polistes canadensis* and its potential antimicrobial tests ahead and toxic. For the research was carried out on the two collections in the Instituto de Planatas Medicinais (Manaquiri), AM, in epoch different. The crude venom was extracted methanol (MeOH) and water (H₂O), fractioned by liquid chromatography classical (LCC), and 56 fractions were eluted, were investigated by high performance liquid chromatography (HPLC) and Mass Spectrometry (MS). The minimal inhibitory concentration (MIC) of crude venom of *P. canadensis* was determinated against *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium columnae* and *Staphylococcus aureus*. As the Minimum Bactericidal Concentration (CMB), the lowest value found was 125 µg/mL.

Keywords: wasp venom, *Polistes canadensis*, antimicrobial.

1. INTRODUÇÃO

Através da história, envenenamento por toxinas animais tem fascinado a humanidade, e estão mantendo significativa contribuição para aumentar o conhecimento em fisiologia e farmacologia humana. Informações da natureza e mecanismos destas toxinas têm aumentado à abordagem científica para o tratamento de suas intoxicações (KARALLIEDDE, 1995).

Venenos e toxinas de artrópodes constituem uma rica fonte de moléculas com alto potencial terapêutico e tecnológico, já que muitos tem receptores, membranas e enzimas como alvos moleculares primários, o que os tornam altamente específicos e seletivos (PIMENTA, LIMA, 2005; SAIDEMBERG et al., 2010). Eles agem principalmente no sistema nervoso e apresentam uma grande faixa de efeitos farmacológicos em transmissões sinápticas. Muitos estudos estão buscando o isolamento e caracterização bioquímica e farmacológica de substâncias presentes nestas

secreções, e muito ainda há de se descobrir nestas maravilhosas fontes de substâncias (KONNO et al., 2000; MORTARI et al., 2007).

A seletividade e especificidade dos componentes das toxinas animais lhes permite realizar uma série de atividades biológicas (KONNO et al., 2007). Objetivando utilizar estas duas importantes características diversos estudos têm avaliado o perfil farmacológico desses compostos em modelos experimentais de indução de dor (MORTARI et al., 2007), como inseticidas (KONNO et al., 1997) e também como antibióticos (PALMA, 2006), visando o emprego em biotecnologia.

Todos os organismos vivos estão constantemente expostos ao ataque de milhares de potenciais patógenos através da ingestão, contato com superfícies infectadas e inalação (HANCOCK, DIAMOND, 2000), a efeitos deletérios aos organismos causados por substâncias oxidativas que podem colaborar com a mutagênese e carcinogênese (BIANCHI, ANTUNES, 1999), ou, para obter vantagens econômicas, o uso indiscriminado de inseticidas e agrotóxicos no controle de pragas às lavouras.

Como forma de defesa contra estas insistentes ameaças invasivas, estes organismos desenvolveram um potente mecanismo de defesa. Para a defesa contra microrganismos, os organismos desenvolveram como forma de defesa natural a imunidade inata e adquirida. Os invertebrados possuem somente a imunidade inata, reconhecida como o mais antigo mecanismo de defesa dos de todos os organismos vivos, enquanto que os vertebrados possuem as duas formas de defesa (HANCOCK, DIAMOND, 2000). Uma das armas deste mecanismo é a produção de peptídeos e/ou polipeptídeos com um amplo espectro de atividades contra microrganismos patógenos, como fungos, vírus e bactérias, em concentrações fisiológicas no tecido de origem, os chamados peptídeos antimicrobianos (PAM) (BULET et al., 2004; GANZ, 2003; HANCOCK, DIAMOND, 2000; YEAMAN, YOUNT, 2003).

Diversas substâncias com atividade neurotóxica estão sendo isoladas da peçonha de artrópodes, estas por sua vez, são armas químicas utilizadas na caça ou defesa destes seres, elas agem diretamente sobre os canais transmembranares e tem por objetivo paralisar ou matar suas presas (KONNO et al, 1997; SAHARA et al., 2000; STROMGAARD et al., 1999).

Os avanços obtidos em todos os campos da ciência, em especial a biotecnologia, a união de diversas áreas como física, química, biologia e informática, melhorando a eficiência do fracionamento químico, elucidação estrutural, estimulam a busca por novos e mais eficientes protótipos moleculares, advindo de produtos naturais.

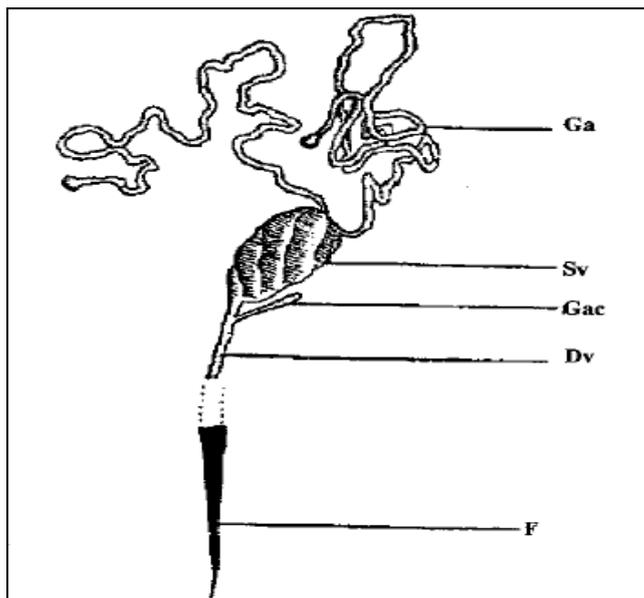
2. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1 As Vespas

As diferentes ordens de insetos, principalmente os himenópteros desenvolveram suas armas biológicas (veneno e aparelho de ferroar) de acordo com sua biologia e comportamento (PALMA, 2006). O aparelho de ferroar dos vespídeos (figura. 1) fornece um meio de penetração através do tegumento dos vertebrados, injetando assim uma potente mistura de compostos tóxicos e causadores de dor e por isso despertam um grande interesse do ponto de vista farmacológico (DIAS, 2007).

As vespas, juntamente com as formigas e abelhas, formam a ordem Hymenoptera (RIBEIRO, 2000), que divide-se em duas subordens, Symphyta e Apocrita, sendo a segunda dividida em dois grupos: Parasitica (Terebrantia) que são parasitoides de outros insetos e possuem um ovipositor bem desenvolvido e Aculeata,

que são espécies que possuem este ovipositor transformado em ferrão (CARPENTER e MARQUES, 2001) e em adição a estes, meios químicos de defesa e comunicação, cuja principal função é defender a colônia (BELEBONI et al., 2004; BRUSCHINI et al., 2006; CAVAGNOL, 1977; PALMA, 2006). É importante salientar que todos os organismos vivos produzem toxinas, e o fato das vespas terem desenvolvido este ferrão, as classifica como peçonhentas, pois possui um aparato inoculador de veneno (JUNGASS, BODIO, 2011).



Figural: Representação do aparato venenífero dos vespídeos de acordo com Kanwar e Silemi (1971), onde F: ferrão, Dv: ducto de veneno, Ga: glândula acida, Gac: glândula associada biológica (BELEBONI et al., 2004; MORTARI et al., 2007). Portanto, representa uma importante fonte de compostos bioativos com diversas moléculas com potencialidades biotecnológicas, tornando-se uma fonte única de protótipos moleculares a serem usados como novos agentes terapêuticos.

2.2 A composição da peçonha de vespas

Peçonhas de vespas são uma rica fonte de substâncias biologicamente ativas, e de acordo com Turillazzi et al.(2006), podem ser divididos em três grupos de acordo com suas faixas de massas moleculares. Aminoácidos biogênicos, aminoácidos livres, sais inorgânicos, substâncias voláteis, são classificadas como componentes de baixa massa molecular, pois possuem massa até 1 KDa, pequenos peptídeos situados entre 1KDa à 10KDa compõem o grupo de média massa molecular e proteínas tais como enzimas, alérgenos e toxinas com massa maior que 10KDa, formam o grupo de componentes de

alta massa molecular (BELEBONI, et al., 2004; HO et al., 1998; MENDES et al., 2004).

2.2.1 Componentes de Baixa Massa Molecular (BMM)

A fração de componentes de baixa massa molecular da peçonha é provavelmente a menos conhecida tanto aspecto químico e funcional (TURILLAZZI, 2006). A fração mais conhecida e estudada trata-se das aminas biogênicas, que em invertebrados servem como neurotransmissores, neuromoduladores e neurohormônios (ROSENBERG et al., 2005). A figura 2 apresenta as estruturas de algumas das aminas biogênicas encontradas em peçonha de artrópodes.

As aminas biogênicas são o produto final da decomposição dos aminoácidos ou produto de transformação de aldeídos e cetonas (BOMKE et al., 2008). Histamina é produto da descarboxilação do aminoácido histidina e é a mais importante amina biogênica, pois mantém um papel central em respostas alérgicas (BOMKE et al., 2008; GELFAND, 2005). Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), juntamente com histamina foram descritas pela primeira em veneno de vespas por Jaques e Schacte (1953). A presença destas duas aminas na peçonha vespas sociais e também em vespas solitárias fazem parte da estratégia de defesa, uma vez que histamina potencializa o processo inflamatório ocasionado pelo veneno, atraindo leucócitos por quimiotaxia para o local da ferroadada (GELFAND, 2005). Serotonina contribui por promovendo a penetração do veneno nas células aumentando a permeabilidade celular (YSHII et. al. 2009).

Em humanos, as catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina) são responsáveis pela vasoconstrição e redução de sangue no local da ferroadada, causando palidez. Em artrópodes, aceleram a frequência cardíaca aumentando a circulação da hemolinfa, facilitando a distribuição de outros componentes tóxicos da peçonha (HABERMANN, 1972).

Outros tipos de BMM aminoácidos neurotransmissores, foram demonstrados estar presentes por na peçonha de artrópodes por Abe et al. (1982).

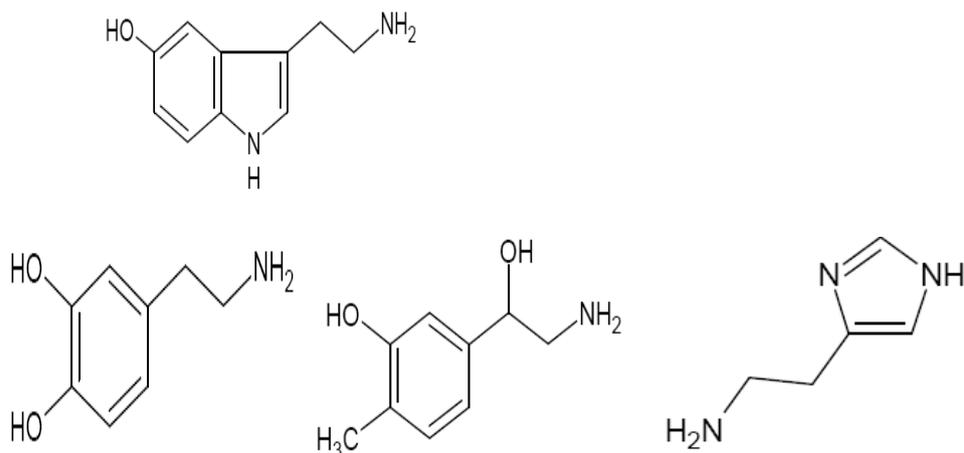
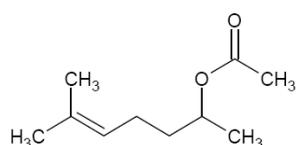
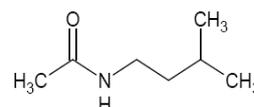


Figura 2: Aminas biogênicas isoladas da peçonha de vespa. Da esquerda para a direita: serotonina, dopamina, norepinefrina e histamina.

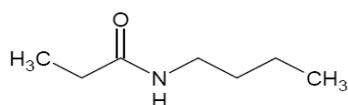
Os componentes voláteis da peçonha das vespas (Figura 3) têm sido fracamente estudados, embora a presença de alguns destes tenha sido registrado na literatura. A fração de volátil da peçonha de vespas é composta de álcoois, espirocetais, amidas, acetatos. Estas substâncias são relatas como feromônios de alarmes, envolvidos na atração sexual e aviso do perigo iminente (TURILLAZI et al., 2006).



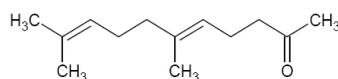
6-Metil- 5- hepten-2-il acetato



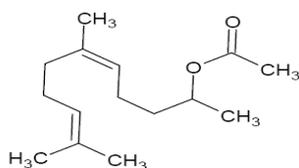
N – (3-Metilbutil) acetamina



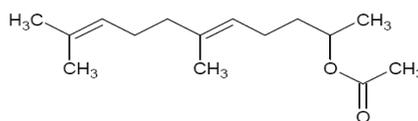
N-(3-Metilbutil) propanoamida



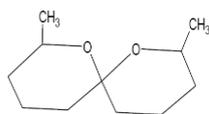
6,10-Dimetil-(E)-5,9-undecadien-2-one (Geranyl acetone)



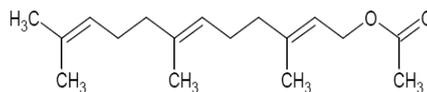
6,10-Dimetil-(Z)-5,9-undecadien-2-il acetato ((Z)-5-tangerinol)



6,10-Dimetil- (E)-5,9-undecadien-2-il acetato ((E)-5-tangerinol)



(E,E)-2,8- Dimetil-1,7- diaoxspiro
[5,5] Undecano



3,7,11-Trimetil-(E) 6, (E)10-dodecatrien-2-il
acetato ((E,E)-paranesil acetato)

Figura 3: Componentes voláteis encontrados na peçonha de vespas, em especial do gênero *Polistes*.

2.2.2 Componentes de Média Massa Molecular (MMM)

Os componentes de Média Massa Molecular (entre 900 e 3000 Da) podem ser definidos como a fração peptídica (TURILLAZI, 2006). Os peptídeos podem interagir com uma grande quantidade de proteínas receptoras das membranas biológicas, ou mesmo diretamente com os fosfolípidios do plasma/organelas ou com proteínas citosólicas para regular suas atividades e por isso são importantes em diversos processos fisiológicos funcionando como neurotransmissores, hormônios, toxinas e antibióticos (PALMA, 2010).

As vespas desenvolveram três tipos de peptídeos bioativos que vêm sendo isolados e caracterizados de varias espécies de peçonha de vespas: peptídeos quimiotáticos, cininas e mastoparanos (HO et al., 19998; PALMA, 2006), os quais perfazem cerca de 60% do peso seco do veneno (SOUZA et al., 2005). Do veneno de vespas foram sequenciados vários exemplares, como mostrados na tabela 1.

Tabela1: Peptídeos isolados de vespas

Peptídeo	Sequência	Espécie	Referência
Polybine-I	Ac-SADLVKKIWDNPAL-NH ₂	<i>Polybia paulista</i>	RIBEIRO et al., 2004
(EMP –AF)	INLLKIAKGIKSL-NH ₂	<i>Anterhynchium-flavomarginatum</i> <i>Micado</i>	KONNO et al., 2000
Polybia-MP-I	IDWKLLDAAKQIL-NH ₂	<i>P. paulista</i>	SOUZA et al., 2005
Protonectina	ILGTILGLLKGL-NH ₂	<i>Agelaia pallipes</i>	MENDES et

Agelaia-MP	IANWLKLGKAIIDAL-NH ₂	<i>pallipes</i> <i>Agelaia pallipes</i> <i>pallipes</i>	al., b2004 MENDES et al., 2004
Dominulina A	INWKKIAEVGGKILSSL	<i>Polistes dominulus</i>	TURILLAZZI et al., 2006
Dominulina B	INWKKIAEIGKQVLSAL	<i>Polistes dominulus</i>	TURILLAZZI et al., 2006
	RPPGFTPFR	<i>Polistes rothneyi</i>	Nakajima,1986
	ETNKKKLRPPGFSPFR	<i>Polistes fuscatus</i>	Nakajima,1986
	VDWKKIGQHILSVL	<i>Polistes jadwigae</i>	Nakajima,1986

2.2.2.1 Mastoparanos

Mastoparanos são peptídeos de baixo peso molecular, geralmente tem 14 resíduos de aminoácidos e sua principal atividade é a degranulação de mastócitos (KONNO et al., 2000; LEITE et al., 2010; SOUZA et al., 2005; SOUZA et al., 2009). Estes são os componentes mais abundantes nos sacos de veneno (HIRAI et al., 1979). Eles apresentam cerca de 7 a 10 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, tais como alanina, isoleucina e leucina, e de 2 a 4 resíduos de lisina geralmente nas posições 4, 11 e 12 (MENDES et al., 2004), e estes aminoácidos estão distribuídos de tal forma que permitem importantes atividades biológicas, como a hemolítica, de degranulação de mastócitos (HIRAI et al., 1979), e a antimicrobiana (KONNO et al., 2000) sendo assim, são os principais componentes na defesa destes insetos (LEITE et al., 2010).

Mastoparanos são característicos do veneno de vespas sociais, entretanto, Konno et al., (2000), isolaram o mastoparano EMP-AF do veneno da vespa eumenine *A. flavomarginatum micado*, o primeiro mastoparano isolado do veneno de uma vespa solitária. A sequência do EMP-AF é Ile-Asn-Leu-Leu-Lys-Ile-Ala-Lys-Gly-Ile-Ile-Lys-Ser-Leu-NH₂, e apresenta atividade hemolítica e degranuladora de mastócitos e também afeta a transmissão neuromuscular de pata de lagosta.

Santos Cabrera et al. (2004), utilizando análises de dicroísmo circular, constataram que o peptídeo EMP-AF adota uma conformação em α -hélice quando colocado em solução contendo TFE ou SDS. Além disso, este peptídeo é capaz de permeabilizar lipossomos aniônicos e, em menor intensidade, lipossomos neutros, e a

habilidade de permeabilizar membranas parece estar associada à quantidade de α -hélice assumida pelo peptídeo.

2.2.2.2 Peptídeos quimiotáticos

Os peptídeos quimiotáticos encontrados nos venenos de vespas são chamados de Ves-CPs (“*Vespid chemotactic peptides*”) (SOUZA, 2006). São o segundo grupo mais importante do veneno de vespas, são compostos tridecapeptídeos de amida, que induzem a quimiotaxia em alguns tipos de células (MENDES et al., 2004; OLIVEIRA e SCHEIDT, 2005; RIBEIRO et al., 2004; SOUZA et al., 2005), e são importantes na interação de peptídeos e o receptor quimiotático de neutrófilos (MENDES et al., 2004).

Segundo Souza et al. (2005), juntamente com os mastoparanos são os compostos em maior quantidade no veneno de vespas e são os maiores responsáveis pelos processos inflamatórios desencadeados pela ferroada. São ricos em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, e geralmente apresentam um único resíduo básico, eles geralmente atraem macrófagos e leucócitos polimorfonucleados (PMNL) para a região em volta do sítio da picada, e também possuem a propriedade de promover alguma degranulação de mastócitos (SOUZA et al., 2005).

A ligação dos Ves-CPs com as membranas lipídicas parece ser similar ao modo de ligação dos mastoparanos, devido às similaridades hidrofóbicas entre estas duas classes de compostos (SOUZA et al., 2005). A atividade quimiotática dos Ves-CPs geralmente é dependente de sinais específicos mediados por proteínas-G no nível da membrana plasmática para células quimioatrativas, fazendo a interação célula/peptídeo relativamente seletiva (MENDES et al., 2004).

Mendes et al. (2004), isolaram da vespa social neotropical *A. pallipes pallipes* dois peptídeos de sequência distinta, Protonectina (Tabela 1) é um peptídeo quimiotático não hemolítico para leucócitos polimorfonucleados (PMNL), apresentando alguma degranulação de mastócitos e potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gam- positiva e Gram- negativa, Agelaia-MP (Tabela 1), foi caracterizado como um toxina hemolítica e degranuladora de mastócitos, apresentado

uma ação antimicrobiana menos potente que a de Protonectina e não quimiotática para PMNL (BAPTISTA-SAIDEMBERG et al., 2010).

2.2.2.3 Cininas

Os primeiros componentes neurotóxicos isolados da peçonha de vespas solitárias foram as cininas (KONNO et al., 2002). Geralmente são conhecidos como peptídeos produtores de dor (PALMA, 2006). Cininas são polipeptídeos de 9-18 resíduos de aminoácidos contendo uma sequência de bradicina, um peptídeo de 9 resíduos de aminoácidos (PALMA, 2006; TURILLAZZI, 2006).

O primeiro relato de uma cinina no veneno de vespas sociais foi no gênero *Polistes*, um octadecapeptídeo nomeado Polistescinina 3, em uma mistura da peçonha de três espécies Norte Americanas (*P. fuscatus*, *P. exclamans* e *P. annularis*) (TURILLAZZI, 2006).

Protopolybiacinina-I (DKNKKPIRVGGRRPPGFTR-OH) e Protopolybiacinina-II (DKNKKPIWMAGFPGFTPIR-OH), foram isolados da peçonha de vespas sociais *Protopolybia exígua*, e apesar de causarem pouca constrição em músculo de ratos do que as bradicininas, são sete vezes mais potentes do que esta em degranular mastócitos (MENDES, PALMA, 2006). Cininas glicosiladas descritas no veneno de *Paravespula maculifrons*, estas toxinas são responsáveis por bloquear a transmissão excitatória nicotínica com uma corrente de ativação inibitória do sistema GABA-nergico e bloquear irreversivelmente a transmissão sináptica (MENDES, PALMA, 2006).

2.3 Componentes de Alta Massa Molecular (AMM)

A maioria dos componentes de alta massa molecular presente na peçonha das vespas são proteínas com atividade enzimática, e estão diretamente envolvidas nas respostas alérgicas causadas pela ferroada. Estudos imunológicos com peçonha de vespídeos tem demonstrado que as toxinas alergênicas mais importantes são fosfolipases A e B, hialuronidase e antígeno-5, fosfatases ácidas, nucleotidases (OLIVEIRA, PALMA, 1998; SANTOS et al., 2007).

A composição de vários venenos de Vespinae é similar entre si, mas pouco é conhecido sobre veneno de Polistinae tropicais. Fosfolipases A₂ são reconhecidas como os maiores alérgenos deste veneno, e são capazes de produzir uma série de efeitos

farmacológicos tais como: contração do músculo liso, queda da pressão arterial, hemilise *in vitro* e *in vivo*, liberação de histamina e heparina dos mastócitos (OLIVEIRA, PALMA, 1998).

A caracterização bioquímica e funcional das toxinas de alta massa molecular é um importante pré-requisito para o desenvolvimento de novas ferramentas tanto para terapia causada pelo envenenamento causada por múltiplas ferroadas e também para diagnósticos e terapia de reações alérgicas causada por esse tipo de veneno (SANTOS et al., 2007).

2.4 Gênero Polistes

O gênero *Polistes* (*Polistes* spp; Hymenoptera: Vespidae) é o mais comum dentre as vespas sociais (SEVERINO et al., 2006). A peçonha destas vespas, conhecidas como vespas papeleiras, é uma complexa mistura de proteínas com ou sem atividade enzimática, em especial alérgeno 5, hialuronidase, fosfolipase, peptídeos antimicrobianos, cininas, mastoparanos, substâncias de baixa massa molecular como aminas biogênicas e substâncias voláteis (figura 3) que funcionam como feromônios (BRUSCHIN I et al., 2006; YSHII et al., 2009, TURILLAZZI et al., 2006).

Turillazzi et al. (2006), registrou na peçonha de quatro espécies de *Polistes* europeias (*P.dominulus*, *P. gallicus*, *P. nimphus*, *P. sulcifer*) cerca de 54 substâncias voláteis. Amidas e espiroacetais já foram registrados como fermonios em outras espécies, enquanto que acetatos e propanoatos estão sendo bastante registrados para este gênero.

2.5 Manifestações clínicas do veneno de vespa

A intoxicação em mamíferos por veneno de himenópteros reflete o seu comportamento de defesa própria e do ninho. É caracterizada por sintomas que dependem da espécie infligida, da quantidade de veneno, da hipersensibilidade da vítima, e em alguns casos, do sítio da picada (CAVAGNOL, 1977).

O efeito da picada das vespas é parecido com a das abelhas e causam reações tóxicas locais como dor, eritema e edema (Figura 4); reações tóxicas sistêmicas como: prurido, rubor e calor generalizados, lesões urticariformes disseminadas, hipotensão,

taquicardia, cefaléia, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, broncoespasmo, choque, insuficiência respiratória aguda (Fig. 1b); algumas vezes, dependendo da sensibilidade da vítima e da quantidade de veneno é possível observar a ocorrência de reações alérgicas sistêmicas, anafilaxia, causando urticária, prurido, angioedema, colapso vascular, estado de choque e disfunção respiratória frequente e, eventualmente, morte de grandes mamíferos incluindo o homem (Fig. 1c) (CAVAGNOL, 1977; HO, CHEN E LIN, 1998; MENDES et al., 2004).

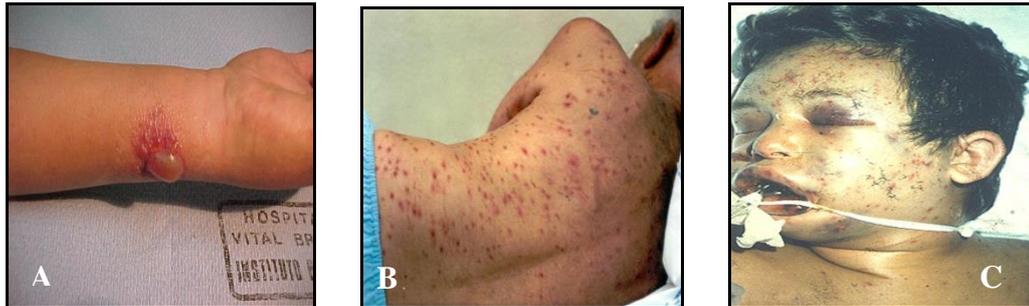


Figura 4: Reações causadas pela ferroada das vespas, em (a) reação tóxica local; b) reação tóxica sistêmica; c) reação alérgica sistêmica

As proteínas presentes no veneno são as principais responsáveis pelas lesões nos tecidos e frequentemente são imunogênicas (SANTOS et al., 2007). Entre os compostos de baixo peso molecular estão presentes aminas biogênicas, que estão envolvidas na produção de dor, e os peptídeos, que estão envolvidos no processo inflamatório e causam lise celular, hemólise, quimiotaxia e antibiose (SANTOS-CABRERA et al., 2006; SOUZA et al., 2005; SOUZA et al., 2009).

Por causa das reações de sua picada dolorosa e algumas vezes fatal em humanos, o veneno de himenópteros tornou-se de interesse médico e de pesquisadores (CAVAGNOL, 1977). Apesar da letalidade destas peçonhas, estas também podem agir como ferramentas biológicas e ajudar a compreender as várias ações farmacológicas do veneno tais como inflamações locais, hemólises, distúrbios respiratórios e cardiovasculares (HO, CHEN, LIN, 1998).

2.6 Ensaios antibacterianos

A introdução das sulfonamidas e penicilina como antibióticos revolucionou a medicina por diminuir o ritmo de mortes por infecções bacterianas. Estas descobertas levaram a uma busca por novas drogas antibacterianas resultando na descoberta de

novas classes, muitas das quais derivadas de produtos naturais (BUTLER; BUSS, 2006).

Novas estratégias de pesquisa em produtos naturais, envolvendo a busca de novas substâncias com potencial microbiano em organismos pouco explorados, aliados a utilização de ferramentas como genômica, proteômica e metabolômica e novos ensaios biológicos, podem acelerar o processo de descoberta de novos antibióticos, extremamente importantes num cenário onde há um rápido desenvolvimento de resistência pelas bactérias aos atuais agentes terapêuticos (GUIMARAES, MOMESSO, PUPO, 2001).

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano utilizando mecanismos como a fagocitose e a produção de anticorpos, normalmente destruindo o microrganismo (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Uma das formas de defesa natural criado por todos os organismo vivos são os peptídeos antimicrobianos (PAM). PAMs possuem efeito direto contra um amplo espectro para bactérias (Gram- positivas e Gram- negativas), com registro de atividades para vários tipos de ações como em infecções, atividade antitumoral, antifúngica e antiviral, e também estão envolvidos na orquestração de respostas imune inata e inflamatória (BULET et al., 2004; JENSSEN, HAMILL, HANCOCK, 2006). Eles são hábeis para aumentar a fagocitose e estimulam a liberação de prostaglandinas (YEAMAN, YOUNT, 2003), neutralizam os efeitos sépticos de lipopolissacarídeos (LPS) (FRECER, HO, DING, 2004), promovem recrutamento e acumulação de varias células imunes, como os monócitos, leucócitos e células T ao sítio inflamatório (GUYNTON; MENDES et al., 2004; SOUZA et al., 2005). A resistência bacteriana ao uso dos antibióticos tem exercido uma forte influência sobre a investigação e o descoberta de novos fármacos, com um amplo espectro de ação e menor toxicidade (ARANGO, 2004).

Muitos dos patógenos como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, e *Flavobacterium columnae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são considerados oportunistas, e fazem parte da microbiota natural de

humanos e animais, em especial os peixes quando há desequilíbrio dos sistemas bactéria- hospedeiro-ambiente, podem desencadear epizootias (BOIJINK E BRANDÃO, 2001). E, com o aumento da resistência destas bactérias aos antibióticos normais, a busca por compostos alternativos tornou-se imprescindível.

A ampla biodiversidade amazônica, combinadas as técnicas existentes estimulam a busca por novos fármacos que devem apresentar vantagens no combate aos microrganismos resistentes a antibióticos.

2.7 Atividade Antioxidante

Durante reações diversas reações biológicas essenciais para o corpo humano, são inevitavelmente co-produzidos os radicais livres, moléculas orgânicas e inorgânicas que contem um ou mais elétrons desemparelhados, e por isso tornam-se bastante instáveis, com meia vida curtíssima e quimicamente muito reativa (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A presença de radicais livres tem sido correlacionada com um grande número de doenças (Tabela 2), mas não como agentes etiológicos e sim como fatores que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos, os quais determinam a continuidade e as complicações de diversos estados patológicos (ROCHA et al., 2007). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Tabela 2: Doenças relacionadas com a geração de radicais livres

Artrite	Disfunção cerebral
Aterosclerose	Cardiopatias
Diabetes	Efisema
Catarata	Envelhecimento
Esclerose múltipla	Câncer
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune

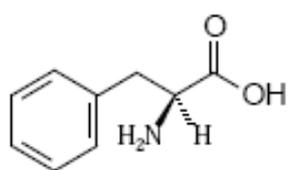
Fonte: BIANCHI; ANTUNES, 1999

Uma forma de defesa contra a produção de radicais livres e seus efeitos deletérios ao corpo humano é produção de antioxidantes. A definição mais aceita para antioxidantes é que estes são substâncias as quais, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, poderiam atrasar ou inibir as taxas de oxidação (BIANCHI; ANTUNES, 1999; ROCHA et al., 2007).

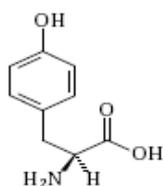
A busca por prolongar a vida com saúde e boa aparência tem impulsionando as pesquisas científicas visando novas substâncias antioxidantes. Atividade antioxidante é a capacidade de um componente (ou mistura) de inibir a degradação oxidativa causada pelos radicais livres (ROGINSKY; LISSI, 2005).

De acordo com Mosadik et al., (2005), substâncias com atividade antioxidante comprovada isoladas de produtos naturais geralmente contem uma porção fenólica derivadas dos aminoácidos: triptofano, fenilalanina e tirosina. Flavonoides, tocoferóis, cumarinas e catequinas são exemplos destes derivados. (Figura 4) (DAPKEVICIUS et al., 1998).

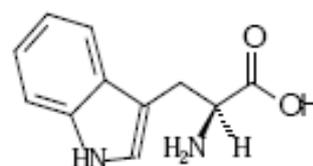
Outras substâncias, tais como ácidos orgânicos, carotenoides, proteínas, hidrolisados e taninos também podem atuar como antioxidantes ou ter um efeito sinérgico com os compostos fenólicos. Estudos de Brand-Williams et al. (1995) demonstram que a atividade antioxidante está correlacionada com o número de grupos hidroxila disponíveis, requisito estrutural que liga a presença flavonoides ou taninos condensados em extratos metanólicos.



a) Fenilalanina



b) Tirosina



c) Triptofano

2.8 Atividade de Tóxica

Venenos e toxinas de origem natural representam uma fonte de fascínio para o homem graças aos seus extraordinários efeitos farmacológicos. Desde os clássicos experimentos realizados por Claude Bernad em 1850 com o “curare”, utilizado pelas comunidades indígenas, muitas pesquisas vêm sendo realizadas buscando novas drogas com alto potencial terapêutico (PRATES, BLOCH JR).

A toxicidade da peçonha de artrópodes é bastante conhecida por conter uma variedade de substâncias que são altamente seletivas para o tecido nervoso, e atualmente estas neurotoxinas estão sendo usadas extensivamente para estudar mecanismos do sistema nervoso, tais como elucidação do canais de íons ou caracterização da função das proteínas receptoras (KONNO et al., 1997).

Do gênero *Vespa*, foram isoladas neurotoxinas com ação pós- sináptica que estão envolvidos na abertura de canais de cloreto (KAWAI et al., 1980). Philantotoxina-433 (PTX-433), isolada da vespa solitária *Philanthus triangulum*, é um potente antagonista de receptores glutamato, em preparações de crustáceos (PIEK et al., 1980). Esta toxina foi sintetizada e seus análogos utilizados no mesmo modelo de estudo e outros (ELDEFRAWI et al., 1988). Konno et al. (1997), isolaram do veneno da vespa solitária *Anoplius samariensis* uma neurotoxina nomeada a-PMTX, que facilita a neurotransmissão em musculo motor de lagosta através de uma ação pós- sináptica, e inativa a corrente de sódio do axônio através de uma ação pré – sináptica (SAHARA et al. 2000). Da peçonha de vespas sociais, foi isolada a Mandarotoxina (MDTX), do veneno de *Vespa mandarinia*, que quando injetada em musculo motor de lagosta bloqueia irreversivelmente o potencial excitatório pós-sináptico (ABE et al., 1982). Tais químicos são uteis para estudos e podem torna-se modelos em uma classe adicional de drogas terapêuticas e possivelmente inseticidas (ELDEFRAWI et al., 1988).

Os testes de toxicidade são utilizados para observar e quantificar os efeitos de determinada substancia ou amostra em concentrações variadas, sob determinado organismos-teste, em condições experimentais específicas e controladas (OLIVI et al., 2008). De acordo com Konno et al. (1997), o modo de ação da transmissão neuromuscular em crustáceos é similar ao sistema de transmissão química dos insetos.

O teste de toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS) é um ensaio biológico amplamente utilizado devido ser rápido, confiável, de baixo custo e por ter demonstrado uma boa correlação com várias atividades biológicas (MEYER et al., 1982), como atividade antitumoral (MCLAUGHLIN, 1991), atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (DOLABELA, 1997), atividade antibacteriana (NIÑO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2007), antifúngico (NIÑO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2007). A utilização dessa espécie é interessante porque seus ovos resistem à secagem e estocagem por longos períodos de tempo (COSTA et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades biológicas *in vitro* de da peçonha da vespa social *Polistes canadensis* (Himenoptera: Vespidae).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Fracionar o veneno por meio de técnicas cromatográficas.
- ✓ Avaliar seu potencial antimicrobiano.
- ✓ Avaliar seu potencial citotóxico

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Com o número de registro de autorização do Ibama 25206-2, os ninhos da vespa social *Polistes canadensis* (Himenoptera: Vespidae) (Figura 5) foram coletados no Instituto de Plantas Medicinais Dr. Juan Revilla, no município de Manaquiri, Estado do Amazonas, Brasil. A identificação da espécie foi feita no Laboratório de taxonomia de Hymenoptera do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Foram realizadas duas coletas, uma em outubro, estação seca e outra em janeiro, estação chuvosa. Os ninhos foram retirados com auxílio de facas e colocados inicialmente em sacos plásticos, depois colocados em caixas de isopor contendo gelo e transportados até o laboratório no INPA. Ali foram congelados em freezer a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Os ninhos foram desmontados e os exemplares mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem dissecadas.



Figura 4: *Polistes canadensis*: em (a) ninhos e (b) a vespa em destaque

4.2 Preparação das amostras

Fora utilizadas cerca 1000 vespas da primeira coleta e 3000 da segunda coleta, As glândulas de veneno foram removidas com auxílio de uma pinça entomológica de ponta fina, puxando-se a extremidade esclerotizada do ferrão.

Após a remoção, as glândulas foram separadas do ferrão e depositadas em tubos de 2 mL. Em seguida, as glândulas foram comprimidos com auxílio de um bastão de ponta arredondada na presença de solução de Metanol (MeOH) 50% (v/v) em água ultrapura. Foram realizadas três extrações com a solução de Metanol (MeOH) 50% (v/v) em banho de ultrassom por 20 min cada extração.

Após o banho em ultrassom, a amostra foi centrifugada à 13200 rpm por 15 minutos à 4 °C (Centrífuga Eppendorf - Centrifuge 5415D) de alta rotação. O líquido sobrenadante das amostras coletadas foi filtrado, utilizando-se filtro de 0,45 µm, concentrados em concentrador de amostras (Christy Beta) 2 – 4LD Plus LT/AVC – 2-33 CD Plus) e estocado a -20 °C. A tabela x mostra as massas obtidas dos estratos referentes a cada coleta.

Coleta	Quantidade	Solvente	Massa do extrato
1	1000	MeOH/H ₂ O	80mg
2	3000	MeOH/H ₂ O	200 mg

4.3 Fracionamento do extrato bruto

O fracionamento do extrato foi realizado em coluna cromatográfica aberta (h = 21 cm, di = 1,5) utilizando Florisil® como fase estacionária e eluida com gradiente de acetato de etila (AcOEt) em diclorometano (DCM), partindo da proporção 95:5 até acetato de etila 100%, acetato de etila / acetona 1:1 até acetona 100%, acetona / metanol (MeOH) 1:1 e depois MeOH 100% e MeOH/H₂O 1:1 e H₂O 100% (tabela 4).

O volume de eluição utilizado para o fracionamento da coluna cromatográfica aberta é calculado a partir do conhecimento do volume morto da coluna. Cada sistema de eluição utilizado é calculado para conter duas vezes o volume morto da coluna em que esse volume é a quantidade de solvente necessária para umedecer toda a fase estacionária.

Tabela 3: Eluentes usados no fracionamento do extrato bruto *Polistes canadensis*

Frações Reunidas	Eluente usado
0-3	DCM/AcOEt 9:1
4-6	DCM/ AcOEt 8:2
7-9	DCM/AcOEt 7:3
10-13	DCM/AcOEt 6:4
14-16	DCM/AcOEt 1:1
17-19	AcOEt 100%
20-22	AcOEt/Acetona 9:1
23-25	AcOEt/Acetona 7:3
26-28	AcOEt/Acetona 1:1
29-31	Acetona 100%
32-34	Acetona/MeOH 8:2
35-37	Acetona/MeOH 7:3
38-40	Acetona/MeOH 6:4
41-44	Acetona/MeOH 1:1
45-47	Acetona/MeOH 3:7
48-50	MeOH 100%
51-53	MeOH/H ₂ O 1:1
54-56	H ₂ O 100%

4.4 Análise dos extratos e das frações

Os extratos obtidos das duas coletas, assim como as frações obtidas do fracionamento cromatográfico foram analisadas por CLAE e por IES-EM.

4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras foram solubilizadas em solução de MeOH 50% (v/v) em água ultrapura, e então, analisadas por cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (CLAE-FR), em CLAE de marca SHIMADZU - Modelo LC-AD 10, acoplado a uma coluna LUNA-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm), sendo a eluição realizada com o uso de um gradiente linear de metanol de 5 a 40 % (v/v) [contendo 0,1 % (v/v) de TFA] detalhado na tabela 4, e monitorada por absorção da radiação ultravioleta em 220 nm.

Tabela 4: Sistema de eluição utilizado para analisar o extrato bruto da peçonha da vespa *Polistes canadensis* por CLAE

Tempo (min)	Solvente A	Solvente B
0,01	95	5
5	85	15
10	80	20
20	85	15
25	5	15
30		5

A = 0,1% (v/v) TFA em água ultrapura

4.4.2 Espectrometria de Massas por Eletrospray (IES-EM)

Os extratos brutos das peçonhas das duas coletas obtidos conforme descrito no item 4.2 foram analisados por IES-EM. Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados num Espectrômetro de Massas LCQ-Fleet-Thermo (Figura 4.4), que permite a realização de fragmentações sucessivas obtendo-se assim, tanto espectros EM quanto EM/EM. O espectrômetro de massas triploquadrupolo foi equipado com um probe padrão do tipo electrospray (IES). As amostras foram injetadas a um fluxo de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$, com auxílio de micro-seringas acopladas a uma microbomba de infusão (KD SCIENTIFIC). Durante todos os experimentos, a temperatura da fonte foi mantida a 80 $^{\circ}\text{C}$ e a voltagem na agulha a 3,6 kV, aplicando-se um fluxo de gás secante (nitrogênio) de 200 $\mu\text{L}/\text{h}$ e um fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 15 $\mu\text{L}/\text{h}$, adquirido direto de um gerador de acoplado ao espectrômetro. A massa molecular de cada substância foi determinada por IES-EM com o espectrômetro ajustado para formar picos, com largura à meia-altura, de uma unidade de massa. A voltagem entre o *skimmer* e o cone de amostra, que controla a transferência dos íons ao analisador de massas, foi ajustada para 30 V.

Cerca de 30 μmol (10^{-6}L) de cada amostra foi injetada no probe do tipo *electrospray*, transportados pelo solvente. Nos experimentos de MS no modo positivo, o solvente utilizado foi metanol 50% (v/v) acrescido; o espectro IES foi obtido no modo de aquisição contínua, varrendo num intervalo de massas de m/z 100 a 2000, com tempo de varredura de 7 segundos.

4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A composição química das amostras foi analisada inicialmente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H . Para obtenção dos espectros, dissolveu-se cerca de 1,5 mg frações em 0,7 mL de D_2O . Para melhor resolução digital, as frações foram filtradas, pois a ausência de partículas sólidas facilita o ajuste da homogeneidade do campo magnético Shim.

4.5 Ensaio biológicos

4.5.1 Atividade antimicrobiana

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos extratos e substâncias são realizadas conforme metodologia descrita conforme CLSI (2003) e Eloff (1998).

4.5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em meio líquido, através da técnica de microdiluição. Para isto, foram feitas diluições sucessivas do extrato em tubos de ensaio, e em seguida, 95 μL de cada diluição foram colocado em cada poço da placa. Em seguida, foram inoculados os microrganismo-teste (5 μL), preparado pela escala de (McFarland 0,5) diluído 10 vezes. As placas foram incubadas a temperatura (exemplo: 30 ou 37 $^{\circ}\text{C}$) e tempo adequado (18 a 24 horas), de acordo com a necessidade de cada microrganismo. Após esse período, foram inoculado 40 μL de revelador (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóleo) em cada tubo, e estes incubados novamente por 30 minutos.

Onde houve crescimento bacteriano, os tubos foram revelados em vermelho, e onde não houve crescimento, os tubos permaneceram incolor. A CIM é considerada a menor concentração do extrato ou substância onde não houve crescimento bacteriano (onde os tubos permanecerem incolor). O teste foi realizado em triplicata.

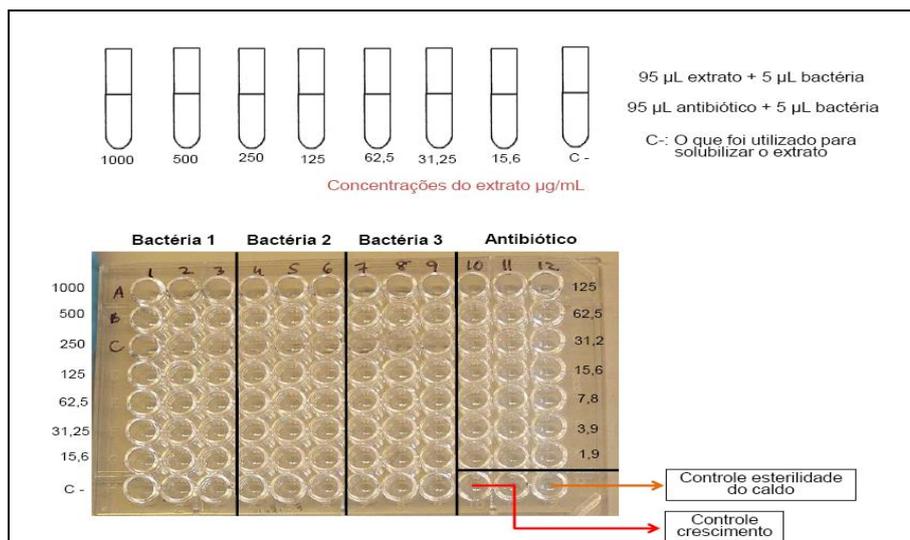


Figura 4: Esquema de realização do CIM

4.5.1.2 Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Os tubos utilizados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizados para determinação da CBM. Uma alíquota (100 µL) de cada concentração a partir da CIM foi inoculada em placas de Ágar Müeller-Hinton e posteriormente incubadas em temperatura e tempo adequado. A CBM é considerada a menor concentração do extrato onde não houver crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado.

4.5.2 Ensaio de citotoxicidade utilizando *Artemia salina*

Foi utilizado o bioensaio com o microcrustáceo para avaliar o potencial citotóxico do extrato bruto. Este ensaio foi escolhido por ser rápido, de baixo custo, eficiente e por requerer pouca quantidade de amostra (Andriolli et al., 2007).

Para o teste, utilizou-se como meio de crescimento uma solução salina (3,8%), e para a eclosão, adicionaram-se 10 mg de cistos de *Artemia salina*. As condições de crescimento utilizadas foram: temperatura de 25 a 28 °C, e iluminação em lâmpada branca comum fluorescente, durante 48 horas, e sistema de aeração. Após esse período, as larvas são transferidas para placas de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas de *Artemia salina* para cada poço. Nos poços são adicionados 100 µL do extrato na concentração de 1000 µg/mL, e avoluma-se para 1 mL, em triplicata. No controle, adiciona-se o solvente usado para dissolver o extrato.

As placas com as larvas de *A. salina* são mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada branca comum fluorescente. Após esse período, avalia-se o número de

larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste. Testa-se inicialmente na concentração de 1000 µg/mL e, se for citotóxico, diluir o extrato até encontrar a CL₅₀ (Figura x).

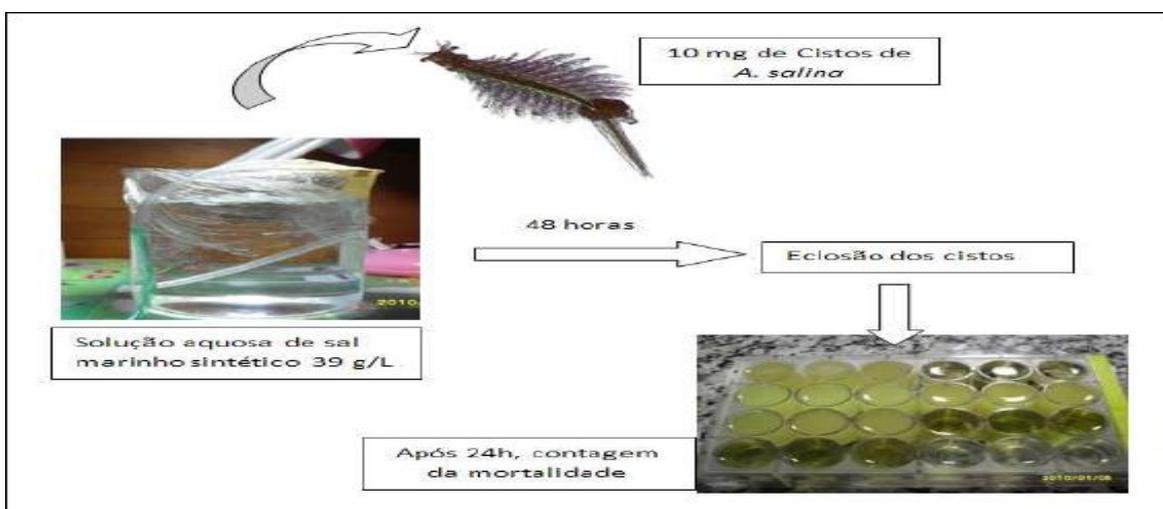


Figura 5: Esquema de realização do ensaio de citotoxicidade

4.5.3 Ensaio antioxidante empregando a metodologia do DPPH•

A solução de DPPH• foi preparada solubilizando 28 mg do DPPH• com 1mL de DCM e avolumando com MeOH até 100 mL.

A diluição da solução do ácido ascórbico com água deionizada resultou nas seguintes concentrações: 0, 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL. A solução de DPPH• é utilizada na concentração de 2,8 mg/L (Figura 21).

Preparação da curva do DPPH•: adicionam-se em seis novos microtubos 990 µL de DPPH• e completa-se com 10 µL da solução de ácido ascórbico. Espera-se por 30 minutos para realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm.

Ensaio com os extratos: após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, adicionam-se 0,5 mg/mL dos extratos nas soluções de DPPH•. Realiza-se a leitura da absorbância (517 nm) no espectrofotômetro, e após 30 minutos de reação, a leitura é realizada novamente. A variação da absorbância dos extratos é comparada com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante.

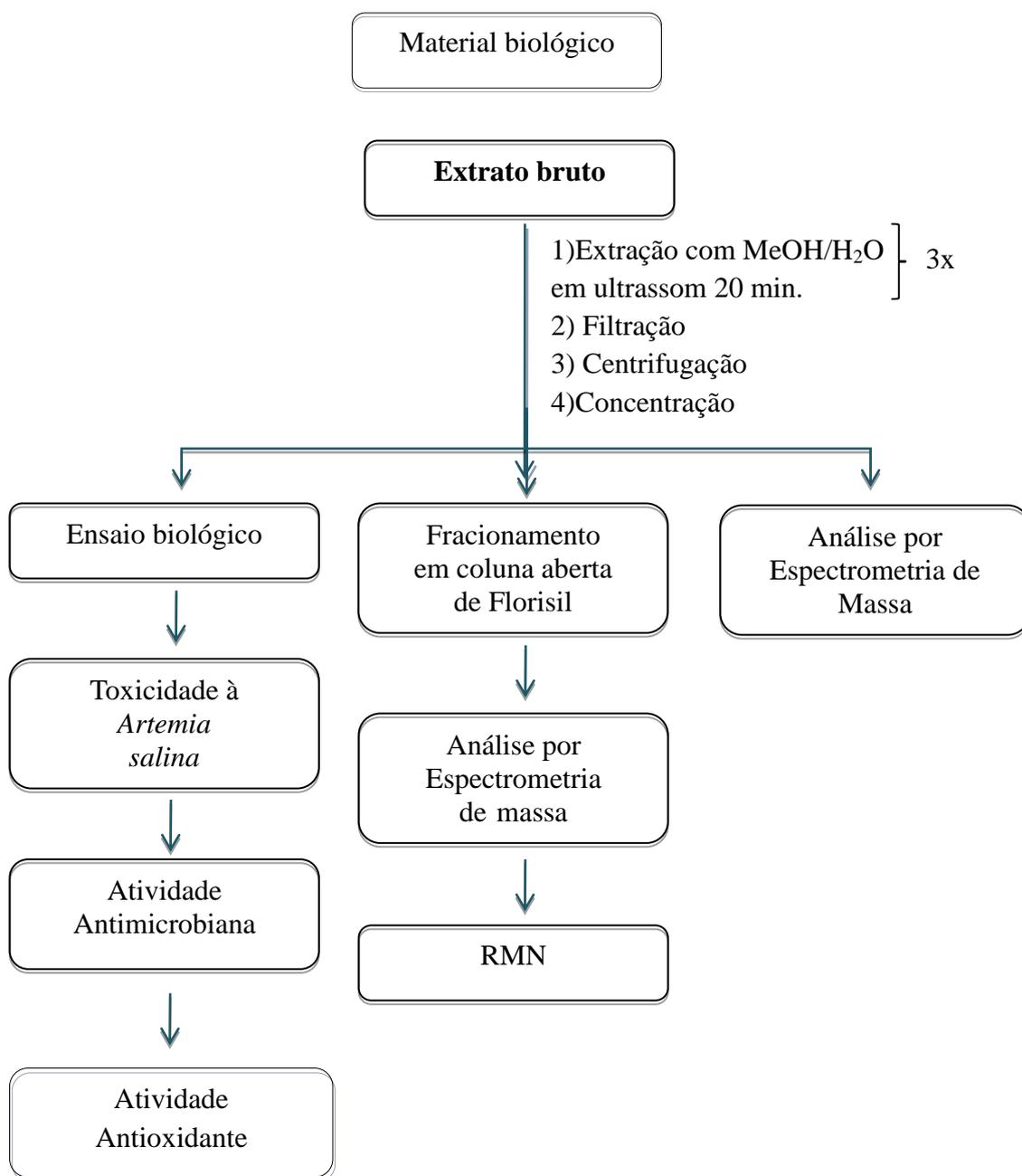


Figura 6: Esquema geral de estratégia experimental adotada no trabalho

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio biológicos

5.1.1 Testes de toxicidade do extrato bruto frente à *Artemia salina*

Para este ensaio foi submetido apenas amostra do extrato bruto da segunda coleta de *Polistes canadensis*, sendo este utilizado para avaliar a imobilidade/ toxicidade do extrato bruto do veneno.

A concentração inicial do extrato foi de 10.000 µg/mL, a partir desse valor inicial e de sucessivas diluições do veneno foram selecionadas as seguintes concentrações testes (em µg/mL) de 1000, 500, 250, 120, 60 e 30 a fim de se estabelecer a dose letal para 50% dos organismos testados. A correlação entre concentração e imobilidade está demonstrada na tabela:

Tabela 5: Resultado do extrato frente à *Artemia salina* visando conhecer seu potencial tóxico.

		Imobilidade (%) nas concentrações (µg/mL)					
Amostra	Solvente	1000	500	250	120	60	30
Extrato bruto	MeOH	6,67	3,33	0	0	0	0

Verificou-se que a peçonha bruta apresenta discreta atividade tóxica, sendo letal somente em altas concentrações, ainda assim com baixa letalidade, não chegando a 50% de mortos. De acordo com os dados apresentados, ao se testar a peçonha de *P. canadensis*, a maior atividade tóxica alcançada (6,67%) foi alcançada com a concentração de 1000µg/mL e (3,3%) na concentração de 500 µg/mL, não havendo atividade nas outras concentrações testadas. Devido a fraca atuação da peçonha frente à *A. salina*, optou-se por não dar prosseguimento aos ensaios com as frações.

5.1.2 Ensaio antibacteriano

A atividade antimicrobiana da peçonha bruta de *P. canadensis* foi investigada e os resultados sumarizados nas tabelas **x e y**. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos brutos da primeira e segunda coleta, baseados no método descrito por CLSI (2003) e Eloff (1998).

Foram selecionadas três linhagens de bactérias, duas patogênicas a peixes sendo uma gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883 T) e uma gram-positiva, *Flavobacterium columnae* (ATCC). E uma clínica, *Staphylococcus aureus* (ATCC) gram-positiva. A concentração inicial do extrato foi de 5.000 µg/mL, a partir desse valor inicial e de sucessivas diluições do veneno em DMSO, foram selecionadas as seguintes concentrações testes (em µg/mL) 500, 250 e 125.

Tabela 6: Resultado da atividade dos extratos visando conhecer o CIM do extrato bruto

Concentrações (µg/mL)	Concentração Inibitória Mínima 1ª coleta e 2ª coleta		
	Gram- negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram-positivas <i>Flavobacterium columnae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
500	+	+	+
250	+	+	+
125	+	-	+
Oxitetraciclina Legenda: (+): ativo; (-) não ativo 125 µg/mL	+	+	+

O resultado mostra que os extratos brutos obtidos nas duas coletas foram igualmente ativos tanto para bactérias gram-positivas quanto para a gram-negativa, sendo que frente à *K. pneumoniae* e *S. aureus*, o CIM (125 µg/mL) é duas vezes mais potente que para *F. columnae* (250 µg/mL). Comparativamente à oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL, observou-se que ambos os extratos demonstram potencial ação inibitória sobre estas bactérias.

A partir dos resultados obtidos com o CIM, foi possível determinar a Concentração Mínima Bactericida (CMB) para todas as três bactérias testadas a fim de

classificar o extrato como bacteriostático ou bactericida. Todas as linhagens testadas demonstraram sensibilidade aos extratos da primeira e segunda coleta de *P. canadensis*

	Concentração Inibitória Mínima 2^a coleta
--	--

e este revelou-se bacteriostático (Figura z).

Extratos	Concentração Mínima Bactericida – CMB (µg/mL)		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Flavobacterium columnae</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>
T1	125	500	125
T2	125	250	125

Os resultados expostos na tabela c, mostram que *K. pneumoniae* e *S. aureus* foram duas vezes mais sensíveis do que *F. columnae*, as duas primeiras tiveram seu crescimento inibido na concentração de 125 µg/mL para os extratos das duas coletas. Já *F. columnae* teve resultado diversificado, na primeira coleta, o extrato foi ativo na concentração de 500 µg/mL, a segunda coleta foi duas vezes mais ativa, sendo bacteriostático na concentração de 250 µg/mL.

Por apresentarem intensa semelhança na atividade biológica e química (seção xvp) decidiu-se por unir os extratos. Foi realizado um novo ensaio, sendo que desta vez amostra foi solubilizada em H₂O. Partindo de uma concentração de 10.000 µg/mL foi possível realizar o teste com seis microrganismos *Klebsiella pneumoniae* (ATCC); *Flavobacterium columnae*; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Aeromonas hydrofila* e *Escherichia coli*, nas seguintes concentrações 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 16,6. Os resultados podem ser visualizados na tabela q.

Os resultados da avaliação antimicrobiana dos extratos unidos de *P. canadensis* reproduziram os resultados obtidos quando estes foram testados em separado. Os testes realizados com novas linhagens bacterianas mostram que as bactérias gram-positivas são mais sensíveis ao extrato do que as gram- negativas, demonstrando ação de seletividade.

Concentrações (µg/mL)	Gram- negativas				Gram-positivas	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Aeromonas Hydrofila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Flavobacterium columnae</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>
500	+	-	-	-	+	+
250	+	-	-	-	+	+
125	+	-	-	-	-	+
62,5	-	-	-	-	-	-
31,25	-	-	-	-	-	-
15,6	-	-	-	-	-	-

5.1.3 Ensaio antioxidante

A determinação do potencial antioxidante de substâncias ocorre quando há redução do radical DPPH• em contato com as substâncias presentes em determinada amostra. Essa reação é perceptível quando há uma mudança na sua coloração, do roxo para o amarelo esbranquiçado, devido à presença de grupos doadores de hidrogênio.

Os extratos das duas coletas de *Polistes canadensis* foram testadas e por sua vez não apresentaram uma boa atividade antioxidante. A tabela x mostra os resultados obtidos no teste nas maiores concentrações testadas. Os extratos apresentaram respectivamente, na primeira coleta equivalência de 32, 048 e na segunda coleta equivalência de 26, 7333. Quando comparados com Fe³⁺, a equivalência da primeira coleta foi de 17,729 e da segunda coleta 21,248.

Método usando DPPH•						
Valores médios				Desvios padrões		
	[DABS ₅₁₇]	[AA] _{eq}	Equiv.	[DABS ₅₁₇]	[AA] _{eq}	Equiv.
Coleta 1	0,013	0,163	32,048	0,005	0,039	8,177
Coleta 2	0,016	0,189	26,733	0,003	0,022	3,196

Método usando Fe ³⁺						
Valores médios				Desvios padrões		
	[Fe ²⁺]	[AA] _{eq}	Equiv.	[Fe ²⁺]	[AA] _{eq}	Equiv.
Coleta 1	0,048	0,293	17,729	0,048	0,074	4,041
Coleta 2	0,012	0,236	21,248	0,010	0,016	1,407

5.2 Análises químicas

5.2.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos da peçonha de *Polistes canadensis* das suas coletas foi submetido à análise por CLAE-FR – C18 em coluna semi-preparativa Luna C-18 (250 x 10 mm), utilizando-se gradiente de MeOH de 5 a 20% (v/v) em 30 minutos (Tabela 4).

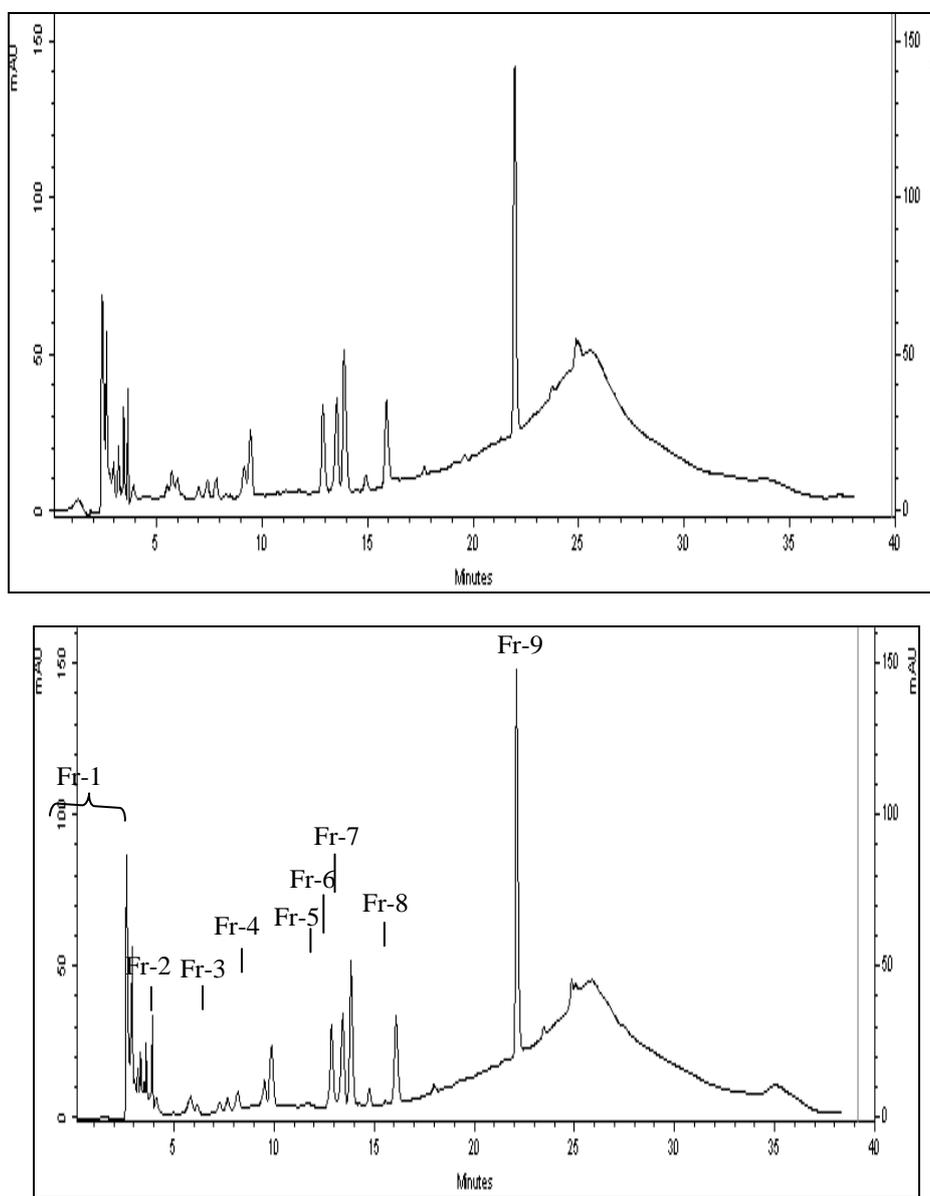


Figura 5: Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato do veneno da vespa social *Polistes canadensis* da 1ª coleta (a) e da 2ª coleta (b), 5mg/500µL, sob CLAE-FR, com coluna Luna C-18 (250x 10 mm, 5mm), sob gradiente linear de 5 a 20% de solução A- 0,1% de TFA em água ultrapura, solução B- Metanol sob fluxo de 1mL/minuto. As frações cromatográficas foram monitoradas em 214 nm.

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR de 5 mg de peçonha bruta mostram ótima reprodutibilidade em coluna analítica, observando-se 12 frações bem separadas e definidas (com excessão da fração 1), mostrando apenas diferenças mínimas quanto à intensidade e tempo de retenção para as duas coletas. Por mostrarem o mesmo

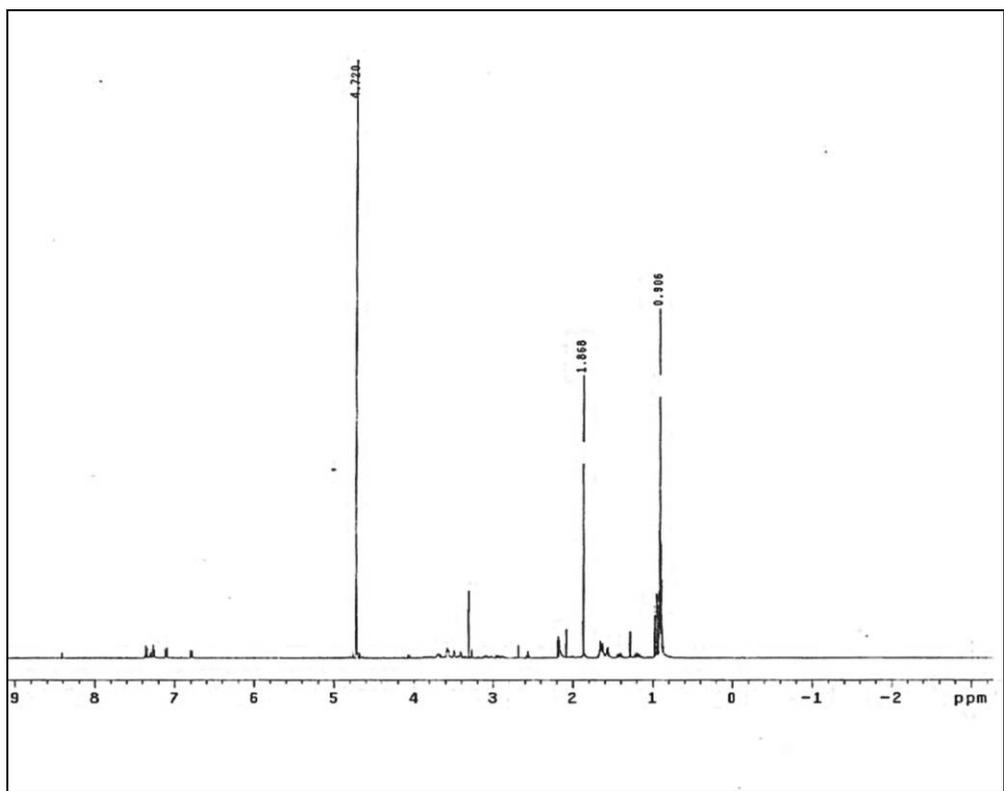
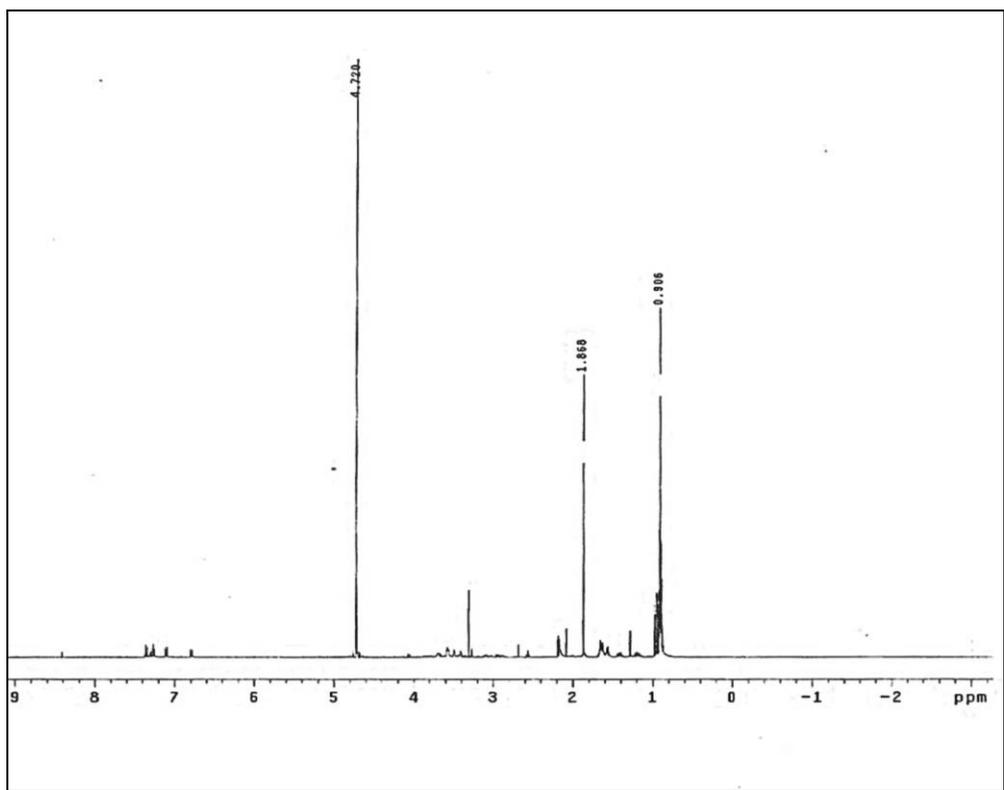
perfil cromatográfico e as mesmas atividades biológicas (seção 5.1.2), decidiu-se unir os extratos das duas coletas. Embora os perfis reproduzissem em coluna analítica, o mesmo não foi possível em coluna semi-preparativa, utilizando o mesmo sistema de eluição e outros sistemas diversos, impossibilitando a purificação através desta técnica, optou-se então pelo fracionamento em coluna aberta.

5.2.2 Fracionamento em coluna aberta

O extrato bruto da peçonha de *P. canadensis* foi fracionado em coluna aberta de Florisil e foram obtidas 56 frações de 17 mL de solvente por fração. As frações com quantidade de massa suficiente para serem trabalhadas obtidas (tabela X) foram submetidas à RMN.

5.2.2.1 Fração 32 e 33

Dentre as 56 frações obtidas, as frações 32 e 33 apresentaram maior semelhança química, quando analisadas por RMN (Figura 1 e 2) por isso foram reunidas, analisadas por CLAE utilizando as mesmas colunas já descritas, resultando em quatro novas sub-frações, que foram denominadas fr-1, fr-2, fr-3 e fr-4 cujos tempos de retenção foram: 2,86728; 4,94899; 11,704; 20,3077 (figura).



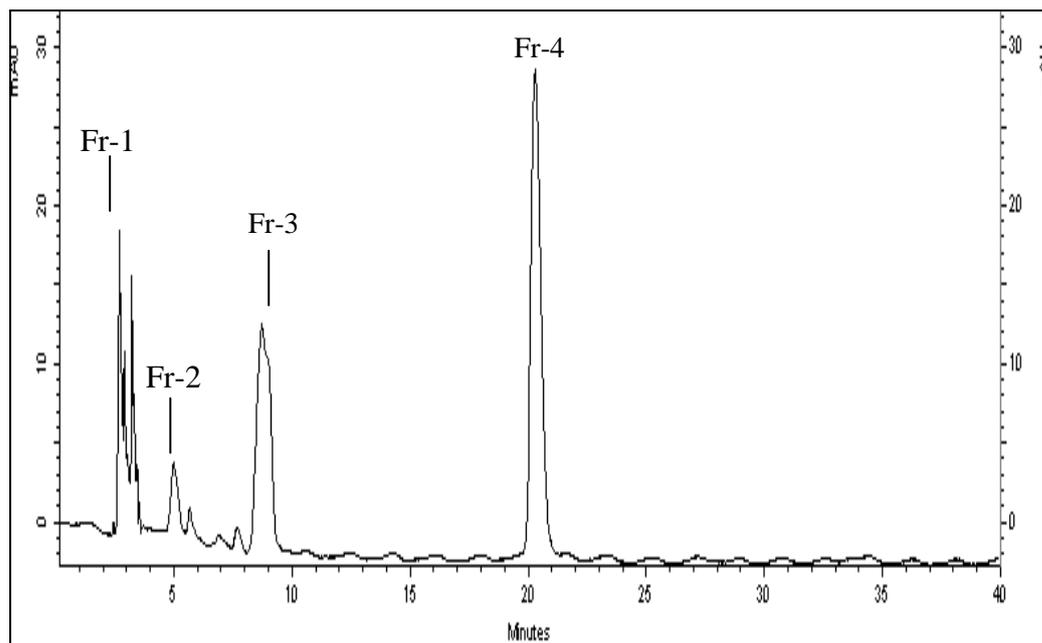


Figura 5: Perfil cromatográfico do fracionamento da reunião das frações 33 e 32 da peçonha de vespa *Polistes canadensis*, sob CLAE-FR, com coluna Luna C-18 (250x 10 mm, 5mm), utilizando-se eluição isocrática com MeOH/H₂O a 5% (v/v) [contendo 0.1% de TFA]. As frações cromatográficas foram monitoradas em 214 nm.

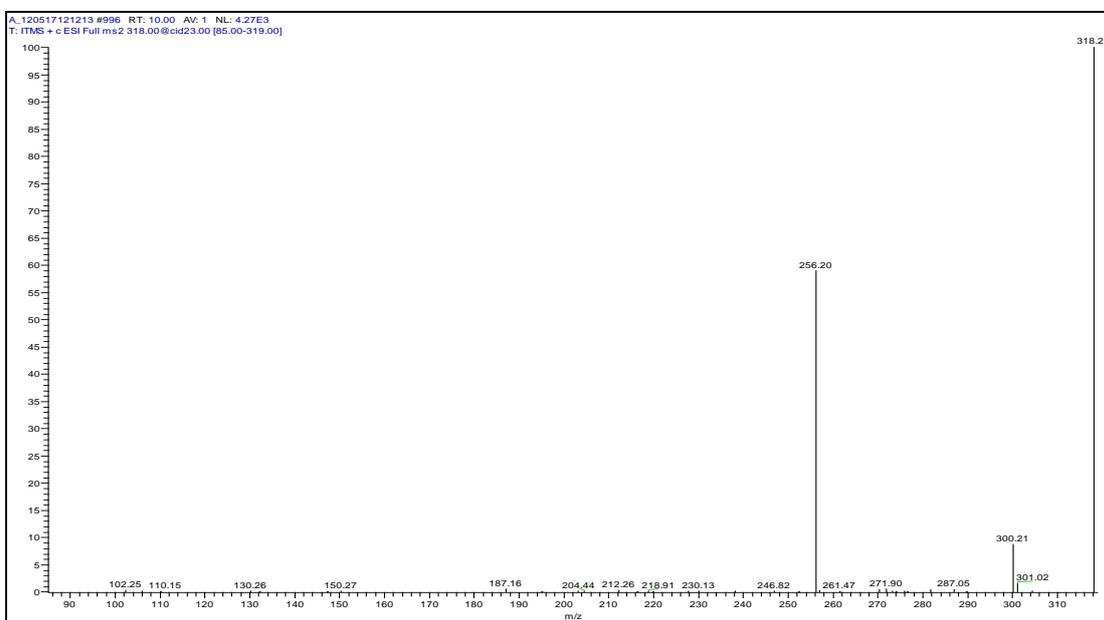
As frações foram coletas e submetidas à novas análises por RMN de ¹H.

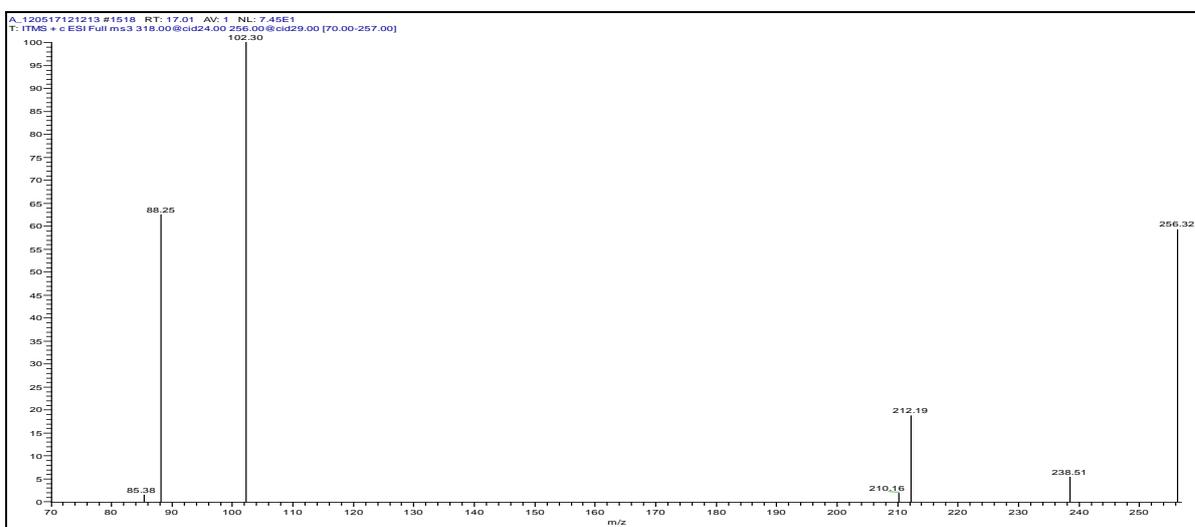
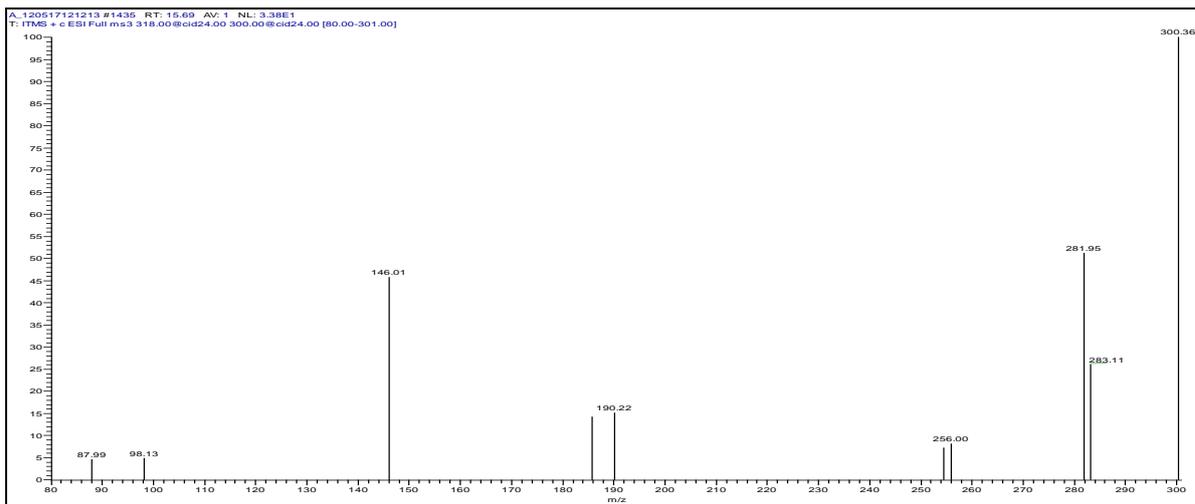
5.2.3 Análise por Espectrometria de Massas

O perfil das massas moleculares da peçonha de *P. canadensis* foi obtido por meio de análises de espectrometria de massas em sistema IES-EM. Os espectros de massa analisados foram comparados com bancos de dados eletrônicas de espectros de massa, tais como: Pherobase (Insect Pheromones and Semiochemicals), (www.pherobase.com); “Human Metabolomic Database” (www.hmdb.ca) e na literatura.

Íon m/z 318

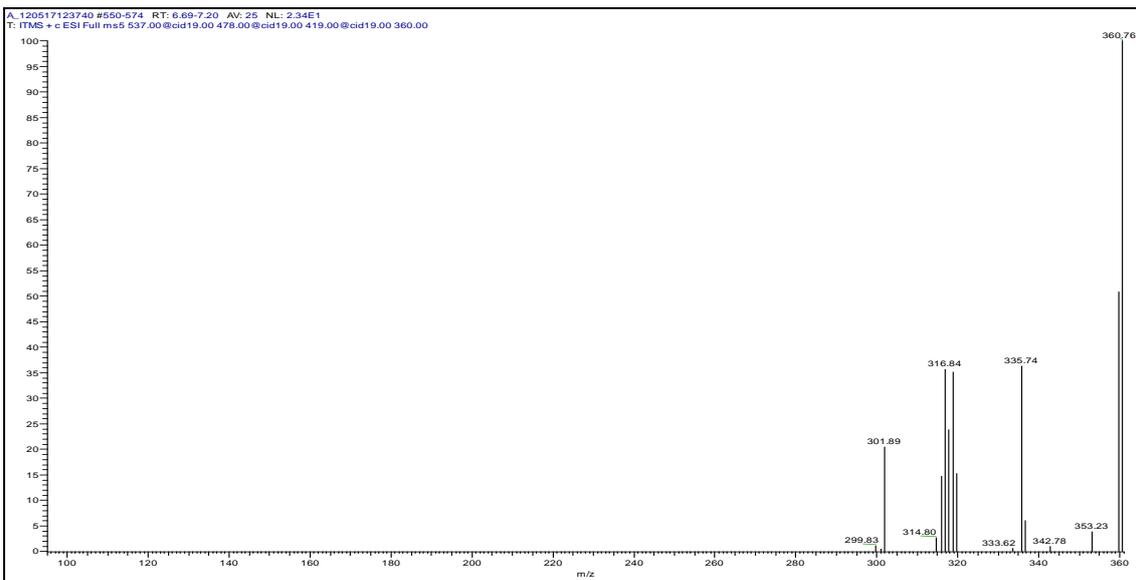
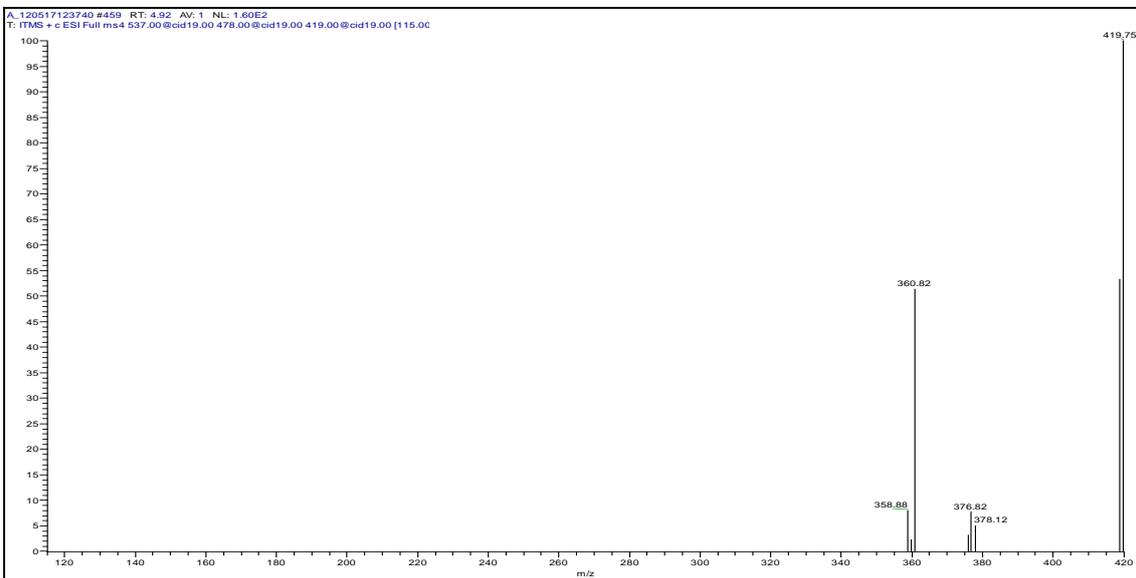
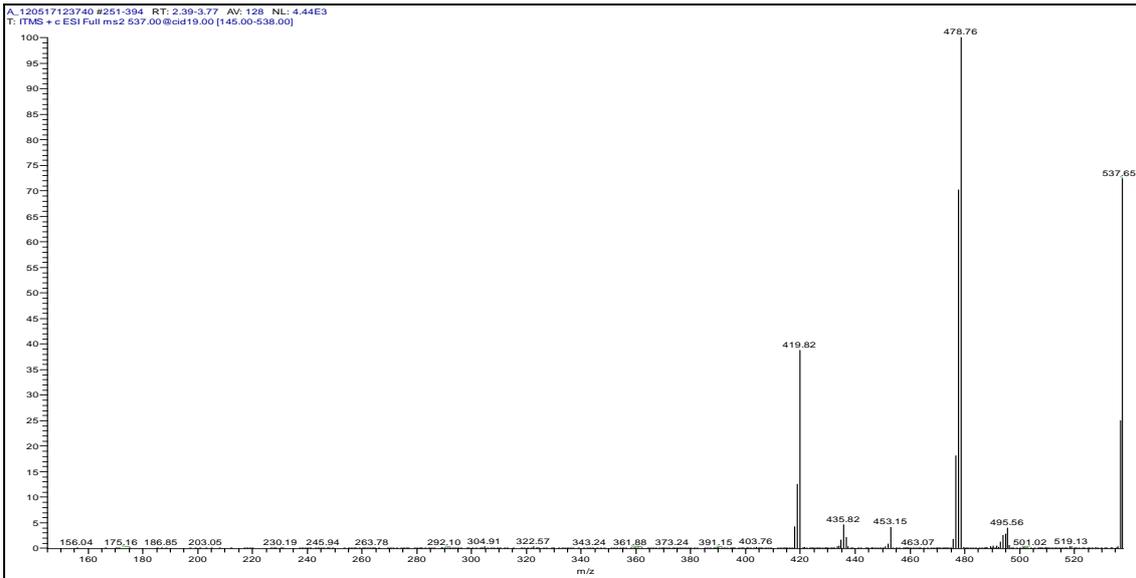
A figura 4A mostra o espectro ESI-MS, onde o íon de m/z 318,21 como $[M+H]^+$ apresenta-se como maior sinal. A perda de água (18 Da) à partir do íon molecular $[M+H]^+$ também é observada, gerando o íon de m/z 300,21, a partir do qual sofre a perda de uma carbonila (44 Da) gerando o íon m/z 256,20. Na sequência, figura 4B mostra o espectro MS^2 do íon molecular de m/z 300,36, revelando os fragmentos de íons m/z 281,95; 256,00; 190,22; 146,01, 98,13 e 87,99. A figura 4B mostra o espectro MS^3 do íon molecular de m/z 256,32, que apresenta os seguintes íons de m/z 238,51, 212,19, 102,30.





Íon 537

O íon de m/z 537, sofre duas perdas consecutivas de 59 Da e forma os seguintes íons m/z 478.78 e 419.82. O espectro MS^2 do íon molecular de m/z 419,82 ao ser fragmentado também sofre uma perda de 59 Da e forma o pico m/z 360. 82. O espectro MS^3 do íon molecular de m/z 360. 82



6. DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro realizado com a peçonha da vespa social *Polistes canadensis*. Como outras peçonhas de artrópodes, tais como aranhas e escorpiões, esperava-se que esta fosse uma rica fonte de substâncias com uma ampla faixa de efeitos farmacológicos em diversos sistemas (BELEBONI, et al., 2004), para os quais seriam altamente seletivas (KONNO et al., 1997). Uma vez que a produção de veneno pelas vespas é muito pequena e existe uma limitada disponibilidade de animais para extrair a peçonha bruta, poucos estudos foram realizados com venenos de vespas quando comparados com os estudos realizados com plantas e microrganismos (OIVEIRA; PALMA, 1998).

6.1 Análises químicas

Para obtenção do perfil químico da peçonha bruta da espécie *Polistes canadensis* foi utilizada uma combinação das técnicas de Cromatografia Líquida Clássica, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência sob Fase Reversa (CLAE-FR) e espectrometria de massas (IES-EM). A cromatografia em coluna aberta e a cromatografia líquida de alta eficiência permitem uma separação preparativa ou separação das substâncias orgânicas utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade (COLLINS et al., ano), a espectrometria de massas fornece detalhes importantes quanto à massa molecular e as fragmentações que auxiliam na determinação estrutural das substâncias presentes no veneno.

O perfil cromatográfico das duas coletas (preparadas de vespas coletadas em épocas diferentes, mas no mesmo local) mostrou que eles foram similares qualitativamente, havendo pequenas variações quantitativamente relativas ao tempo de retenção e intensidade. Não foi investigada a influência de variações sazonais, idade dos indivíduos ou outros fatores que podem influenciar na composição química e nas atividades biológicas. Quando comparados com os venenos de cobras, estes aspectos estão sendo fracamente estudados. Comparações realizadas entre sequências de peptídeos quimiotáticos isolados de vespas tropicais e outras de clima frio revelaram alguns aspectos interessantes (Souza et al., 2009):

- Peptídeos quimiotáticos isolados de vespas de clima frio apresentam sequência composta de 13 resíduos aminoácidos, e o tripeptídeo FLP característico na cadeia terminal e um resíduo de K na sétima posição.
- Peptídeos quimiotáticos isolados de vespas de clima tropical apresentam sequência de 12 aminoácidos, não apresenta o tripeptídeo FLP e o resíduo de K esta na décima posição.

6.2 Atividade tóxica

No primeiro ensaio biológico do trabalho, foi investigada a toxicidade da peçonha bruta da vespa social *P. canadensis* frente ao crustáceo *Artemia salina*. A atividade citotóxica da peçonha de vespas é bastante conhecida por apresentar uma grande variedade de toxinas com ação no sistema nervoso, principalmente de insetos e crustáceos (PALMA, 2006; KONNO et al., 1997).

Em geral, extratos com alta toxicidade para *A. salina* ($CL_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$) apresentam alto potencial para estas atividades antitumoral, tripanossomicida, antibacteriano e antifúngico. Verificou-se que a peçonha bruta de *P. canadensis* apresenta discreta atividade citotóxica para *A. salina* ($CL_{50} > 5000 \mu\text{g/mL}$) sendo letal somente em altas concentrações, ainda assim com baixa letalidade, não chegando a 50% de mortos (Tabela 6), sugerindo que talvez não tenha potencial para estas atividades.

Não existem relatos na literatura deste ensaio envolvendo vespas e *A. salina*. Com base nesses dados pode-se inferir que a baixa atividade da peçonha frente ao crustáceo reflita o comportamento da vespa, uma vez que *P. canadensis* é uma espécie social e seu veneno como de outros himenópteros sociais seja direcionado para proteção da colônia enquanto que espécies solitárias produzem neurotoxinas específicas para caça, causando paralisia e morte em outros artrópodes, uma vez que o *A. salina* é altamente sensível às influências do meio (COSTA et al., 2008; KONNO et al., 1987; KONNO et al., 2000; LIBERSAT, 2003; PALMA, 2006).

6.3 Atividade antimicrobiana

A problemática da resistência bacteriana às atuais drogas antimicrobianas constitui-se um problema de grande ameaça à homens e animais, e é procedente da

uso inadequado de antimicrobianos em medicina humana e veterinária (GUIMARAES, MOMESSO, PUPO, 2010). Bactérias patogênicas à peixes, podem atacar barbatanas, tegumento e intestino (OLIVEIRA et al., 2011). Um estudos *in vivo*, realizados com matrinxã (*Brycon amazonicus*), espécie de peixe com enorme potencial econômico na região amazônica, mostrou rápida ação destas bactérias, causando lesões ulcerativas nos olhos, barbatanas e abdômen após 24h, e morte após 57h (OLIVEIRA et al., 2011) evidenciado a necessidade de novas opções no tratamento destes patógenos.

Nakajima et al. (1982), em um levantamento para caracterizar a atividade dos componentes dos himenopteros, observou que a fração peptídica é a principal responsável pela ação antimicrobiana da peçonha destes, e que estes perfazem cerca

	Valores de MIC (µg/mL)					
	Gram- negativas			Gram-positivas		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Aeromonas Hydrofila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Flavobacterium Columnae</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>

de 60% de massa seca do extrato bruto. Baseando-se nas médias das CIMs obtidos, o presente estudo evidenciou que a atividade do extrato bruto da peçonha de *P. canadensis* foi superior a de muitos peptídeos isolados da peçonha de outras espécies de vespas. Resultados semelhantes foram observados por Souza et al. (2009), ao comparar a atividade antimicrobiana dos mastoparanos Polybia – MP II e Polybia – MP III isolados de *Polybia paulista* com outros peptídeos isolados de outras vespas de outras espécies (tabela u).

<i>Polistes canadensis</i>	125	-	-	-	250	125
Polybia – MP II	-	8	-	62	-	4
Polybia – MP III	-	62	-	500	-	31
Agelaia – MP	-	382	-	257	-	191
Cabrolina	-	150	-	-	-	-
Polybia	-	250	-	250	-	15

Os resultados aqui obtidos também indicam certo grau de afinidade do extrato com bactérias gram-positivas. Isto pode ser explicado pela interação entre peptídeos e membranas e pela estrutura molecular dos dois. A camada externa das membranas de celulares procarióticas tende a ser composta predominantemente por fosfolípídeos aniônicos como fosfatidilglicerol (PG), seu dímero, a cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS), que são praticamente ausentes em membranas de mamíferos (Yeaman & Yount, 2003), a diferença fundamental entre as bactérias gram-positivas e gram-negativas esta na parede celular das duas.

A parede celular de bactérias gram-positivas consiste de varias camadas de uma complexa mistura de peptídeoglicano com moléculas de ácido teicoico e é mais espessa. Já as bactérias gram-negativas, a parede celular é composta de uma única camada de peptídeoglicano envolto por uma membrana externa, que contem alguns lipopolissacarídeos, esta composição torna a membrana das gram-negativas mais hidrofóbica do que as gram-positivas tornando-se menos suscetível ao ataque de agentes hidrofóbicos como os peptídeos antimicrobianos e outros agentes antibióticos (SOUZA et al, 2005).

Quanto a baixa atividade do extrato frente à bactérias gram-negativas da união dos extratos da primeira e segunda coleta, ressalta-se também que a troca do solvente DMSO para análise do extrato em solução aquosa possa ter influenciado de alguma forma a atividade antimicrobiana deste, visto que, a literatura indica forte afinidade dos componentes antimicrobianos tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Outros estudos deverão ser realizados buscando melhor compreensão.

Com relação às concentrações bactericidas mínimas (CBM), a sensibilidade das cepas estudadas seguiu o mesmo padrão observado nas CIMs. Entretanto, a literatura não dispõe de estudos que classifiquem a atividade bacteriostática ou bactericida da peçonha bruta de animais, o que limita a apresentação destes dados. Outro fator

limitante na comparação dos nossos dados com a literatura, é que a grande maioria dos estudos utiliza peptídeos sintéticos em testes de atividade biológica, e o próprio ensaio de microdiluição segue procedimentos padronizados de forma diferente dos aqui empregados.

Enfim, este estudo permitiu demonstrar a inclinação da atividade do extrato da peçonha bruta de *P. canadensis* sobre bactérias clínicas gram-positivas, indicando uma nova possibilidade dentro dos produtos naturais. No entanto, estudos adicionais são essenciais para confirmação dos resultados aqui sugeridos.

6.4 Atividade antioxidante

A utilização de DPPH para o teste de atividade antioxidante, esta sendo muito utilizada para verificar a capacidade de muitos produtos naturais para sequestrar radicais livres (SILVA et al.).

Os extratos da primeira e segunda coleta de *P. canadensis* apresentaram respectivamente equivalência igual a 32, 048 e 26,733 demonstrando não possuir potencial antioxidante. No entanto, esse valor não é satisfatório quando se sabe que a constituição química desta peçonha é composta de peptídeos e aminoácidos livres, especialmente triptofano, tirosina e fenilalanina que dão origem às principais substâncias com alto potencial antioxidante.

Uma sugestão para tal resultado, é que método não foi eficaz porque depende da relação entre estrutura conformacional e a disponibilidade de doação de hidrogênio ou hidroxila à molécula de DPPH. Talvez, as substâncias presentes na peçonha de *P. canadensis* não tenham boa conformação capaz de estabilizar o radical.

CONCLUSÕES

- ✓ A peçonha de *Polistes canadensis* mostrou uma boa inibição *in vitro* frente ao crescimento *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium columnae* e *Staphylococcus aureus*;
- ✓ Foi possível estimar a concentração inibitória mínima da peçonha bruta de *P. canadensis* sobre o crescimento das cepas de *K. pneumoniae*, *F. columnae* e *S. aureus* empregadas nos testes.
- ✓ A peçonha de *P. canadensis* não mostrou diferenças quanto ao perfil molecular segundo análise cromatográfica quando coletada em época diferentes.
- ✓ Com o presente trabalho surge a possibilidade de isolar e averiguar se compostos peptídicos, presentes em peçonha de vespas das espécies *P. canadensis*, apresenta alguma atividade inibitória frente a cepas de *Candida albicans*

BIBLIOGRAFIA

ALEXANDRINO, Agar Costa; OKUMURA, Maria Paula Martinez, BALDASSI, Lúcia; TABATA, Yara Aiko; PAULI, André Otávio Santiago de; ARAUJO, Ana Paula; ROSA, Marcelo Bignardi. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo. **Boletim do Instituto de Pesca**. p. 121 - 123, 1998/1999.

ANDREU, David; RIVAS, Luis. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers (Peptide Science)**. vol. 47, p. 415–433, 1998.

BAPTISTA-SAIDEMBERG, Nicoli B.; SAIDEMBERG, Daniel M.; SOUZA, Bibiana M. de; CÉSAR-TOGNOLI, Lilian M.M.; FERREIRA, Virgínia M.R.; MENDES, Maria Anita; SANTOS- CABRERA, Marcia P. dos.; RUGGIERO NETO, João; PALMA, Mario S. Protonectin (1–6): A novel chemotactic peptide from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**. 2010, v. 56, p. 880–889, 2010.

BARCELLOS, Leonardo José Gil; KREUTZ, Luiz Carlos; RODRIGUES, Laura Beatriz; SANTOS, Luciana Ruschel; MOTTA, Adriana Costa da; RITTER, Filipe; BEDIN, Alexandra Calliari; SILVA, Leonardo Bolognesi da. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **B. Inst. Pesca**. vol. 3, n 34, p. 355 - 363, 2008

BECKER, Stefan e TERLAU, Heinrich. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. **Appl. Microbiol Biotechnol.** vol. 79, p. 1-9, 2008.

BELEBONI, René O.; PIZZO, Andréa B.; FONTANA, Andréia C. K.; CAROLINO, Ruither O. G.; COUTINHO-NETO, Joaquim & SANTOS, Wagner F. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. **Eur. J. Pharmacol.** vol. 493, p. 1-17, 2004.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Gregg. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr., Campinas**, vol. 12(2), p. 123-130, 1999.

BOMKE, Susanne; SEIWERT, Bettina; DUDEK, Lukas; EFFKEMANN, Stefan; KARST, Uwe. Determination of biogenic amines in food samples using derivatization followed by liquid chromatography/ mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem.** vol. 393, p. 247–256, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmwiss. A-Technol.** 28, 25–30, 1995.

BRUSCHINI, Claudia; DANI, Francesca R.; PIERACCINI, Giuseppe; GUARNA, Francesco; TURILLAZZI, Stefano. Volatiles from the venom of five species of paper wasps (*Polistes dominulus*, *P. gallicus*, *P. n c Cimphus*, *P. sulcifer* and *P. olivaceus*). **Toxicon.** 47, p. 812–825, 2006.

BRUSCHINI, C.; CERVO, R.; DANI, F. R.; TURILLAZZI, S. Can venom volatiles be a taxonomic tool for *Polistes* wasps (Hymenoptera, Vespidae)? **J Zool Syst Evol Res.** 45(3), p. 202–205, 2007.

BULET, Phillipe; HETRU, Charles; DIMARCQ, Jean-Luc; HOFFMANN, Daniéle. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology.** vol. 23, p. 329-344, 1999.

BUZIN, Marta P. **Atividade enzimáticas do extrato de sacos de veneno da vespa social *Polistes lanio lanio***. Campinas (SP): Unicamp, 1999. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

CANTU, Marcelo D; CARRILHO, Emanuel; WULFF, Nelson A. e PALMA, Mario S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quím. Nova**. vol.31, p. 669-675, 2008.

CAVAGNOL, Richard M. The pharmacological effects of Hymenoptera venoms. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** vol. 17, p. 479-498, 1977.

CDB - Convenção sobre Diversidade Biológica. **Ministério das Relações Exteriores/Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <<http://www.cdb.gov.br>> Acesso em 05 nov. 2010.

CEBIO- Centro Brasileiro de Aplicadas a Medicina <<http://www.ipepatro.org.br/index.php/labcebio>> Acesso em 10 ja. 2011

CIPRIANO, Rocco C. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research Washington, p. 1- 25, 2001.

DAFFRE, Sirlei; MIRANDA, Antonio; MIRANDA, M. Teresa M.; BULET, Philippe; SILVA JR, Pedro I.; MACHADO. Alessandra; FOGAÇA, Andrea C.; LORENZINI; Daniel M.; PEREIRA, Lourivado S.; FÁZIO, Marcos A.; ESTEVES, Eliane; BURGIERMAN, Marcelo R. Peptídeos antibióticos: peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. p.48-55

DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIS, R., BEEK, T. A. V. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of Science Food Agric**. vol. 77. 1998.

ELLIOT, H. O; OHLSTEIN, E. H; RUFFOLO JR, R.R. Drug discovery in the next millennium. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** vol. 40. p. 177-191, 2000.

HASPEL, G.; LIBERSAT, F. Wasp Venom Blocks Central Cholinergic Synapses to Induce Transient Paralysis in Cockroach Prey. **Inc. J Neurobiol.** vol. 54, p. 628–637, 2003.

HO, Chewn-Lang; CHEN, Wan-Chen; LIN, Yah-Luen. Structures and biological activities of new wasp venom peptides isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom. **Toxicon.** vol. 36, n° 4, p. 609-617, 1998.

JAQUES, R; SCHACHTERT, M. The presence of histamine, 5-hydroxytryptamine and a potent, slow contracting substance in wasp venom. **Brit. J. Pharmacol.** Vol.9,p. 53,1954.

KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **British Journal of Anaesthesia.** vol. 74, p. 319-327, 1995.

KONNO, Katsuhiro; MIWA; Akiko, TAKAYAMA, Hiroaki; HISADA; Miki; ITAGAKI, Yasuhiro; NAOKI, Hideo; YASUHARA, Tadashi; KAWAI, Nobufumi. ?-Pompilidotoxin (?-PMTX), a novel neurotoxin from the venom of a solitary wasp, facilitates transmission in the crustacean neuromuscular synapse. **Neuroscience Letters.** vol. 238, 99–102, 1997.

KONNO, Katsuhiro; HISADA, Miki; NAOKI, Hideo; ITAGAKI, Yasuhiro; KAWAI, Nobufumi; MIWA, Akiko; YASUHARA, Tadashi; MORIMOTO, Yukiko; NAKATA, Yoshihiro. Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon.** vol. 38, p. 1505-1515, 2000.

KONNO, Katsuhiro; HISADA, Miki; NAOKI, Hideo; ITAGAKI, Yasuhiro; FONTANA, Renata; RANGEL, Marisa; OLIVEIRA, Joacir S.; DOS SANTOS CABRERA, Márcia P; RUGGIERO NETO, João; HIDE, Izume; NAKATA, Yoshihiro; YASUHARA, Tadashi; NAKAJIMA, Terumi. Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. **Science direct.** vol. 27, p. 2624 – 2631, 2006.

LANÇAS, Fernando M. et al. A química analítica do proteoma. **Revista Analytica**. n 6, p. 60-66, 2003.

LEITE, Natalia B.; COSTA, Laiana C. da; ALVARES, Dayne dos S.; SANTOS-CABRERA, Marcia P. dos; SOUZA, Bibiana M. dos; PALMA, Mario S.; RUGGIERO NETO, João. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. **Amino acids**. 2010, p. 10, 2010.

LIMA, Edeltrudes de Oliveira; BELEM, Lindomar F; CECHINEL FILHO, Valdir; CORREA, Rogério; NUNES, Ricardo J.; ANDRICOPULO, Adriano SILVA, Victor E. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Malassezia furfur* a imidas cíclicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 38, n. 4, p.443-450, 2002.

MENDES, Maria A; DE SOUZA, Bibiana M; MARQUES, Mauricio R; PALMA, Mario S. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**. vol. 44, p. 67–74, 2004.

MORTARI, Márcia R.; CUNHA, Alexandra O. S; OLIVEIRA, Luciana de; VIEIRA, Eveline B.; GELFUSO, Erica A.; COUTINHO-NETTO, Joaquim e SANTOS, Wagner F. Anticonvulsant and Behavioural Effects of the Denatured Venom of the Social Wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. vol. 97, p. 289–295, 2007.

MORTARI, Márcia R.; FERREIRA, Luzitano B. Neurotoxinas: perspectivas para a descoberta de novos analgésicos. **Univ.Ci. Saúde, Brasília**. vol.5, n.1/2, p. 155-167, 2007.

MOSADDIKA, M. A., BANBURYA, L., FORSTERB, P., BOOTHB, R., MARKHAMC, J., LEACHA, D., WATERMAN, P.G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, vol. 11 p. 461–466. 2004.

NEVES, Marcelo dos S. **Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do veneno das serpentes amazônicas *Bothrops atrox* (LINNAEUS, 1758) e *Crotalus durissus ruruima* (HOGE, 1965).** 2008. 50 p. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infeciosas), Universidade do Estado do Amazonas, 2008.

OLIVEIRA, Josenildo Rodrigues de; MAZOCCO, Viviane Tom; STEINER, Denise. Pitiríase Versicolor . **An bras Dermatol, Rio de Janeiro.** vol. 5, n.77, p. 611-617, 2002.

PALMA, M. S. Insect venom peptides. In: KASTIN, A. J. **Handbook of biologically active peptides.** 1.ed. Oxford, Academic Press, p.389-96, 2006.

PASQUET, Alain; CARDOT, Julien; LEBORGNE, Raymond. Wasp attacks and spider defence in the orb weaving species *Zygiella x-notata*. **J. Insect Behav.** vol. 20, p. 553-564, 2007.

PIMENTA, ADRIANO M. C.; LIMA, MARIA ELENA DE. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms **J. Peptide Sci.** vol. 11, p. 670–676, 2005.

PINHEIRO, Ana Cristina do N. **Efeito das neurotoxinas da aranha *Phoneutria nigriventer* na isquemia cerebral *in vitro*.** 2007. Dissertação de Mestrado em Farmacologia e Bioquímica Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

PRATES, Maura V.; BLOCH JR, Carlos. Peptídeos antimicrobianos: Uma alternativa no combate a microrganismos resistentes. **Biociência** vol. 15, n. 1, p. 30-36, 2005.

RIBEIRO, Susan Pereira; MENDES, Maria Anita; SANTOS, Lucilene Delazari dos; SOUZA, Bibiana Monson; MARQUES, Mauricio Ribeiro; AZEVEDO JR, Walter Filgueira; PALMA, Mario SERGIO. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides.** vol 25, p. 2069–2078, 2004.

SHULMAN, Xidney; LANGLOIS, Claude; ARBESMAN, Carl E. The allergic response to stinging insects I. *Preparation of extracts and their biochemical characterization*. **J. Allergy**. vol 35(5), p. 443-463, 1964.

SENFF-RIBEIRO, Andreia; SILVA, Paulo Henrique da; CHAIM, Olga Meiri, GREMSKI, Luiza Helena; PALUDO, Kátia Sabrina; SILVEIRA, Rafael Bertoni da; GREMSKI, Waldemiro; MNGILI, Oldemir Carlos; VEIGAS, Silvio Sanches. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnology Advances**. vol. 26. p. 210–218, 2008.

ROCHA, Fabíola Dutra; PEREIRA, Renato Crespo; KAPLAN, Maria Auxiliadora Coelho; TEIXEIRA, Valéria Laneuville. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. vol, 17(4). p.631-639, 2007.

ROSENBERG, Lior A.; PLUGER, Hans- Joachim; WEGENER, Gerhard; LIBERSAT, Frederic. Wasp Venom Injected into the Prey's Brain Modulates Thoracic Identified Monoaminergic Neurons. **Inc. J Neurobiol**. vol. 66, p. 155–168, 2006.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, vol. 92, p. 235–254, 2005.

SAHARA, Yoshinori; GOTOH, Masamichi; KONNO, Katsuhiko; MIWA, Akiko; TSUBOKAWA, Hiroshi; ROBINSON, Hugh P. C; KAWAI, Nobufumi. A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current. **European Journal of Neuroscience**. vol. 12, p. 1961-1970, 2000.

SAIDEMBERG, Daniel M.; SILVA-FILHO Luiz C. da; TOGNOLI, Lilian M. M. Cesar; TORMENA, Claudio F.; PALMA, Mario S. Polybioside, a Neuroactive Compound from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy. **J. Nat. Prod**. vol. 73, p. 527–531, 2010.

SANTOS-CABRERA, Marcia P.; de SOUZA, B. M.; FONTANA, R.; KONNO, K.; PALMA, M. S.; de AZEVEDO JR, W. F.; NETO J. R. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **Copenhagen, J. Pep. Res.**, vol. 64, n.3, p. 95-103, 2004.

SANTOS-CABRERA, Márcia P. **Estudo da conformação e atividade lítica de peptídeos antimicrobianos de vespas.** 2006. 142p. Tese de Doutorado em Biofísica Molecular, Departamento de Física do Instituto de Biologia, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2006.

SOUZA, Bibiana M; MENDES, Maria A; SANTOS, Lucilene D; MARQUES, Maurício R; CÉSAR, Lilian M.M; ALMEIDA, Roberta N.A; PAGNOCCA, Fernando C; KONNO, Katsuhiko, PALMA, Mario S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**. vol. 26, p. 2157–2164, 2005.

SOUZA, Bibiana M. **Estrutura e função de mastoparanos dos venenos de vespas.** 2006. 154 p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro (SP): UNESP, 2006.

SOUZA, Bibiana M; SILVA, Alessandra V. R. da; RESENDE, Virginia M. F.; ARCURI, Helen A.; SANTOS CABRERA, Marcia P. DOS; RUGGIERO NETO, João; PALMA, Mario S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**. 2009, v. 30, p. 1387–1395, 2010.

SILVA, Alessandra V. R da. **Prospecção das interações mastoparano- membrana em proteolipossomos como modelo para o desenvolvimento racional de novos agentes antimicrobianos.** 2009. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2009..

SILVA, Ericleison C. **Caracterização de toxinas presentes em peçonhas de vespas**. 2003. 177 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003

TODOKORO, Yasuto; YUMEN, Ikuko; FUKUSHIMA, Kei; KANG, Shin-Won; PARK, Jang-Su; KOHNO, Toshiyuki; WAKAMATSU, Kaori; AKUTSU, Hideo; FUJIWARA, Toshimichi. Structure of Tightly Membrane-Bound Mastoparan-X, a G-Protein-Activating Peptide, Determined by Solid-State NMR. **Biophysical Journal**. vol. 91(4), p. 1368–1379, 2006.

TURILLAZZI, Stefano. Polistes venom: a multifunctional secretion. **Ann. Zool. Fennici**. Vol. 43, p. 488- 499, 2006.

VAZ, Rogério S.; PRADO, Maria Rosa M.; CARVALHO, Fátima de. Biotecnologia na indústria farmacêutica. **Revista de Biotecnologia**. n 37

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; Os produtos Naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, vol.29, No. 02, p. 326-337, 2006.

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**.vol. 415. p. 389-395, 2002.

ZHU, Heng; BILGIN, Metin; SNYDER, Michael. Proteômica. **Annu. Rev. Biochem.** vol. 72, p. 783-812, 2003.