

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Bioprospecção da peçonha bruta de *Odontomachus chelifer* (FOWLER, 1980): um estudo parcial sobre suas ações funcionais.

Thamires Silva Santos

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Julho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Bioprospecção da peçonha bruta de *Odontomachus chelifer* (FOWLER, 1980): um estudo parcial sobre suas ações funcionais.

Thamires Silva Santos

Orientadora: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Santos

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Bioprospecção da peçonha bruta de *Odontomachus chelifer* (FOWLER, 1980): um estudo parcial sobre suas ações funcionais.

Thamires Silva Santos

Orientadora: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues
Instituto de Biotecnologia – UFU

Co-orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Santos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ecologia. Universidade Federal de Sergipe.

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em ____/____/____

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG
Julho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Bioprospecção da peçonha bruta de *Odontomachus chelifer* (FOWLER, 1980): um estudo parcial sobre suas ações funcionais.

Thamires Silva Santos

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Uberlândia, 11 de julho de 2019.

Dedico esse trabalho à minha família,
pois sem seus ensinamentos, sua
compreensão e suas orações, eu não
teria alcançado tantas bênçãos como
esta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sua infinita graça, seu imenso amor e sua misericórdia constrangedora em me amar, me amparar e sustentar todos os dias da minha vida.

À minha família, meus pais, Gerson e Telma, e minha irmã Thaís, que se fizeram tão presentes em todos os momentos dessa graduação, sempre me incentivando, orando por mim e me amando, mesmo nos momentos em que não estávamos perto.

Ao meu namorado, Lucas, que mesmo de longe, orou por mim, me deu forças e me animou para que eu não desistisse dos meus sonhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues, que desde o começo da graduação, me acolheu e sonhou junto comigo. Obrigada por me proporcionar a oportunidade de me desenvolver, tanto profissionalmente, como pessoalmente. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Jean Carlos Santos, por todas as idas ao campo, por estar sempre disposto a me ajudar e por todos os conselhos e ideias que me acrescentaram muito.

À todas as professoras, equipe e alunos do LaBiTox, que me acolheram tão bem, me ajudaram com minhas dúvidas, me incentivaram nos meus experimentos e fizeram parte da minha trajetória acadêmica.

Às minhas colegas de sala, Ana Cláudia e Bruna, que sempre estiveram comigo nas atividades acadêmicas e nos momentos de descontração. Sua presença foi muito importante durante esses anos.

À Dra. Tássia Rafaella Costa que me auxiliou na realização desse trabalho de forma tão generosa.

À Msc. Andreia Zago Ciuffa, que de forma bondosa e alegre me ajudou tanto no desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Biotecnologia que proporcionaram a realização da minha graduação.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

O avanço das ciências naturais e suas tecnologias tornou possível aprimorar o uso de metabólitos secundários no tratamento de doenças, por meio da prática da bioprospecção. Um dos alvos de maior estudo é a peçonha, material no qual existem inúmeros compostos bioativos já encontrados. A peçonha de formigas se mostra ricamente diversa em toxinas e outros tipos de moléculas que possuem atividades biológicas variadas, entretanto, suas propriedades ainda são pouco estudadas, por conta das limitações no processo de obtenção das formigas e extração de sua peçonha. Considerando-se o potencial dessa peçonha e as dificuldades relacionadas à investigação de possíveis agentes terapêuticos presentes nela, o trabalho doravante discutido objetivou realizar um estudo bioprospectivo das propriedades funcionais da peçonha bruta de *Odontomachus chelifer*. Em primeiro lugar, analisou-se o perfil eletroforético de proteínas e peptídeos da peçonha bruta, através de géis de poliacrilamida, onde foi demonstrada a presença abundante de diversos componentes proteicos, com possível ação biológica. Também se avaliou sua atividade fosfolipásica, na qual não foi encontrada atividade catalítica. Os testes antimicrobianos foram feitos por ensaio de microdiluição contra três cepas de bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, em que foi possível constatar sensibilidade das três cepas à peçonha, com destaque para *Escherichia coli*. Foi analisada a ação da peçonha em estudo, através de teste de Citotoxicidade, contra o parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis*, constatando que não houve sensibilidade desse parasito à peçonha. Por último, testou-se a peçonha bruta sobre células da linhagem de adenocarcinoma de mama humano metastático (MDA). A maior concentração testada (100 µg/mL) foi capaz de inibir aproximadamente 10% da viabilidade celular. Os resultados encontrados demonstram que a peçonha bruta de *O. chelifer* é um potencial agente citotóxico para bactérias e células tumorais, sendo promissora para a realização de estudos futuros, que elucidem sua importância biotecnológica.

Palavras-chave: peçonha de formiga, atividade antimicrobiana, atividade antitumoral.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bioprospecção e produtos naturais.....	1
1.2. Formigas e suas peçonhas.....	2
1.3. Formigas do gênero <i>Odontomachus</i>	5
1.4. Breves informações sobre bactérias gram negativas e gram positivas, Leishmaniose e câncer de mama.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Seleção e coleta de formigas da espécie <i>Odontomachus chelifer</i> no campus Glória da Universidade Federal de Uberlândia.....	12
3.2. Extração e processamento da peçonha de <i>Odontomachus chelifer</i>	13
3.3. Determinação da concentração proteica.....	13
3.4. Determinação do perfil eletroforético de proteínas e peptídeos.....	14
3.5. Atividade fosfolipásica.....	15
3.6. Atividade antimicrobiana.....	16
3.7. Atividades antiparasitária e citotóxica.....	17

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	20
4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixo e ultrabaixo massa molecular.....	23
4.3. Atividade fosfolipásica.....	25
4.4. Atividade antimicrobiana.....	27
4.5. Atividade antiparasitária.....	31
4.6. Atividade de citotoxicidade.....	33
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre espécies de abelhas, vespas e formigas quanto a sua atividade fosfolipásica.	25
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Operária de <i>Myrmicinae</i> em vista lateral. (Fonte: Guia para os gêneros de formigas do Brasil, 2015)	3
Figura 2 - Local de hidrólise de diferentes fosfolipases (caracterização funcional – norival 2009).....	4
Figura 3 - Morfologia externa de <i>Odontomachus chelifer</i> . Visão frontal da cabeça (A), visão dorsal do corpo (B) e visão lateral do corpo (C). Fonte: AntWeb.	6
Figura 4 - Ocorrência das formigas do gênero <i>Odontomachus</i> no território brasileiro. (Fonte: Guia para os gêneros de formigas do Brasil, 2015)	7
Figura 5 - Coleta manual das formigas <i>Odontomachus chelifer</i> . Fonte: Imagem autoral.	12
Figura 6 - Perfil eletroforético de proteínas da peçonha de <i>O. chelifer</i> . Gel SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie blue.....	20
Figura 7 - Perfil eletroforético de peptídeos da peçonha de <i>O. chelifer</i> . Gel para proteínas de baixo e ultrabaixo peso molecular 16,6%, corado com Coomassie blue.....	23
Figura 8 - Redução de UFC (%) das bactérias (A) <i>Enterococcus faecalis</i> (B) <i>Staphylococcus aureus</i> e (C) <i>Escherichia coli</i> , frente ao tratamento com a peçonha bruta de <i>O. chelifer</i>	29
Figura 9 - Viabilidade celular (%) de <i>Leishmania braziliensis</i> em função da concentração de peçonha da formiga <i>O. chelifer</i>	32
Figura 10 - Viabilidade celular (%) da linhagem celular tumoral MDA-MB-231 em função da concentração de peçonha da formiga <i>O. chelifer</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Acrilamida/Bis:** Acrilamida/Bis-Acrilamida
- Asp49:** aminoácido Asparagina na posição 49
- ATCC:** American Type Culture Collection
- B. asper:*** *Bothrops asper*
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- HEPES:** ácido sulfônico zwitteriônico
- IMDM:** Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Meio Dulbecco Modificado por Iscove)
- Lys49:** aminoácido Lisina na posição 49
- MDA-MB-231:** linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano metastático
- mL:** Mililitro
- MTT:** 3, (-4,5 – dimetiltiazol – 2 il) - 2,5 difenil tetrazolium brometo
- O. chelifer:*** *Odontomachus chelifer*
- PB *O. chelifer*:** Peçanha bruta de *Odontomachus chelifer*
- PBS:** Tampão fosfato-salino
- PLA₂:** fosfolipase A2
- P. striata:*** *Poecilotheria striata*
- SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
- SFB:** Soro Fetal Bovino
- TEMED:** tetrametiletilenodiamina
- TRIS:** (hidroximetil) aminometano
- Tris HCl:** tampão de (hidroximetil) aminometano e ácido clorídrico
- UFC:** Unidades Formadoras de Colônia
- μL:** Microlitro
- w/v:** weight/volume (massa/volume)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bioprospecção e Produtos naturais

Desde os tempos antigos, os seres humanos utilizam produtos de origem natural de diversas maneiras. Uma das formas que nossa espécie encontrou para sobreviver às diferentes intempéries da vida foi a manipulação dos produtos naturais como agentes terapêuticos. O avanço das ciências naturais e suas tecnologias tornou possível aprimorar o uso de metabólitos secundários naturais no tratamento de doenças, a partir de extrações, purificações, e, até mesmo, da síntese destes compostos bioativos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; GUO, 2017).

Para que tudo isso seja possível, é necessário se aplicar a chamada bioprospecção. Esse termo se refere, segundo Saccaro JR. (2011):

à busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto.

Considerando a grande quantidade de produtos desenvolvidos a partir de moléculas de fonte biológica, fica evidente a importância da bioprospecção nos setores de inovação biotecnológica. (UFRGS, 2019)

Existem diversas fontes de agentes naturais utilizadas para fins terapêuticos, sendo as mais comuns as originárias de plantas, algas, fungos e outros microrganismos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Entretanto, produtos do metabolismo secundário de origem animal também possuem alto potencial terapêutico, o qual vem sendo estudado cada vez mais. Um dos alvos de maior estudo é a peçonha, material no qual existem inúmeros compostos bioativos já encontrados. O principal foco dessas pesquisas se dá em animais peçonhentos como as serpentes, aranhas e os escorpiões (BORDON et al., 2015; HARVEY, 2014; KOH;

KINI, 2012; RASHID et al., 2015). Entretanto, há animais com grande potencial farmacológico que ainda são comumente negligenciados, os Himenópteros.

1.2. Formigas e suas peçonhas

As formigas são insetos sociais que pertencem à família Formicidae, ordem Hymenoptera, na qual também estão as abelhas e vespas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Segundo estatísticas do ano de 2019, existem mais de 16.000 espécies de formigas, distribuídas em 17 subfamílias e 334 gêneros (“AntWeb”, 2019). Pelo fato de serem tão abundantes e diversas, as formigas têm exercido um papel fundamental no ecossistema do planeta (WHEELER, 1960), possuindo uma área das ciências biológicas reservada para seus estudos: a Mirmecologia.

O ramo de pesquisas que estuda as formigas, chamado Mirmecologia, tem crescido a cada ano entre os especialistas formados, e demonstra grande contribuição para o avanço das ciências naturais. Tal ciência estuda desde os aspectos comportamentais, sociais e ecológicos da formiga até os produtos formados por elas, como sua peçonha (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Como todo organismo vivo, as formigas também precisam de métodos de defesa para manter sua sobrevivência. Os mecanismos de defesa das formigas são variados e complexos, sofrendo modificações em cada espécie. Algumas formigas possuem ferrões, usados para injetar sua peçonha armazenada em glândulas, em seus inimigos ou presas (**Figura 1**). Outras espécies já não possuem ferrões, pois secretam o veneno com o objetivo de atingir seus possíveis predadores a certa distância (CEPLAC, 2014).

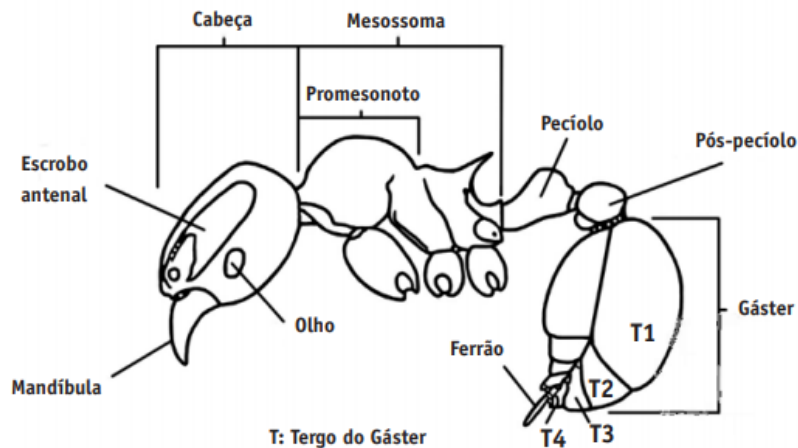


Figura 1 - Operária de Myrmicinae em vista lateral. (Fonte: Guia para os gêneros de formigas do Brasil, 2015)

O fato que pode explicar o desfalque de dados sobre a peçonha desses animais, em geral, é que estes oferecem quantidade limitada de peçonha por indivíduo, além da dificuldade nos processos de dissecação e extração de peçonha (FOX et al., 2013; TOUCHARD et al., 2016b)

A peçonha das formigas tem mostrado, através de pesquisas, ser ricamente diversa em toxinas e outros tipos de moléculas, incluindo sais, carboidratos, ácido fórmico, aminas biogênicas, alcaloides, aminoácidos livres, peptídeos e proteínas (BRAND, 1978; SCHMIDT; BLUM, 1978). A diversidade de componentes químicos e biológicos da peçonha da formiga é o que faz dela uma fonte rica de biomoléculas para pesquisas bioquímicas e farmacêuticas, uma vez que vários dos componentes antes citados possuem atividades biológicas variadas.

Uma pesquisa feita por Lopes (2014) mostrou que a peçonha da formiga possui propriedades neuroativas e anticonvulsivantes. Além dessas importantes atividades biológicas, a peçonha das formigas ainda possuem proteínas e peptídeos antimicrobianos, que são usadas por elas para controlar a proliferação de bactérias no interior dos ninhos e em seus estoques de alimento (QUINET et al., 2012; TOUCHARD et al., 2016b).

1.2.1 Fosfolipases

As fosfolipases fazem parte de uma superfamília de enzimas que atua sobre membranas celulares, clivando fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios. As fosfolipases se diferenciam pela especificidade que possuem pelos sítios de clivagem nos fosfolipídios onde realizam a hidrólise. Para as fosfolipases A_1 , existe a interação com a ligação éster na posição 1 dos fosfolipídios; as fosfolipases A_2 catalisam a hidrólise da ligação éster na posição 2 dos fosfolipídios; as fosfolipases C atacam a ligação éster na posição 3 e as fosfolipases D são enzimas encontradas principalmente em plantas, que realizam hidrólise na ligação fosfodiéster de glicerofosfolipídios (MCDERMOTT et al., 2004). As fosfolipases B catalisam o grupo 1-acil de um lisofosfolipídio (**Figura 2**) (ZALAT; SCHMIDT; MOAWAD, 2003).

O tipo de fosfolipase mais encontrada nas peçonhas animais são as do grupo A_2 , como é o caso das serpentes. Tais proteínas constituem um dos componentes mais abundantes nas peçonhas secretadas (KINI, 2005).

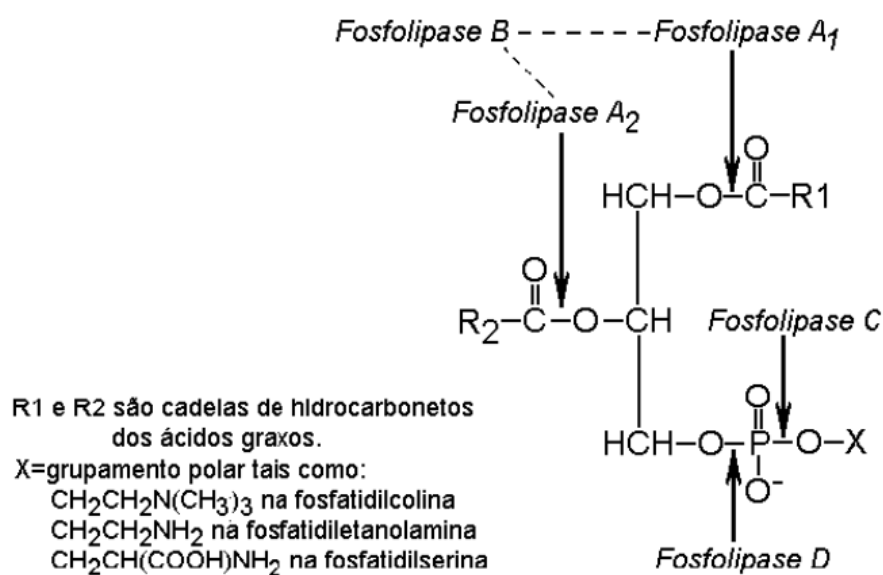


Figura 2 - Local de hidrólise de diferentes fosfolipases. Fonte: (FILHO, 2009)

As fosfolipases demonstram diversos efeitos biológicos como: neurotoxicidade, cardiotoxicidade, atividade hemolítica, indução de edema, efeito anticoagulante, ação anticonvulsivante, miotoxicidade e ação antimicrobiana (FORST et al., 1987; WEINRAUCH et al., 1996). Podendo-se inferir que a presença dessa toxina nas peçonhas animais confere a estas a capacidade de inibir microrganismos, por diversas vias de ação (KINI, R. M., 2003; PÁRAMO, L. et al., 1998).

1.2.2 Peptídeos

Da mesma forma, estudos recentes referentes à ação e presença de peptídeos em peçonhas de espécies de formigas demonstraram as atividades antimicrobiana e antiparasitária frente a diferentes tipos de microrganismos. Dentre os peptídeos identificados como antimicrobianos, podem-se destacar as ponerinas, provindas da peçonha de *Pachycondyla goeldii* (JÉRÔME ORIVEL et al., 2001); as dinoponeratoxinas da peçonha de *Dinoponera australis* (STEPHEN R. JOHNSON et al., 2009) e a bicarinalina, da formiga *Tetramorium bicarinatum* (ALINE RIFFLET et al., 2012). Tais peptídeos, como muitos outros, demonstraram atividade antimicrobiana acentuada, e, portanto, foram classificados como peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês, antimicrobial peptides) (KIRILL A. PLUZHNIKOV et al., 2014).

1.3 Formigas do gênero *Odontomachus*

O objeto de estudo deste trabalho, a formiga do gênero *Odontomachus*, se destaca por ter como características físicas os fortes músculos em suas mandíbulas, cabeça com formato singular para cada espécie e seu ferrão localizado no ápice do abdômen (**Figura 3**) (SORGER, D. M.; ZETTEL, H., 2011).

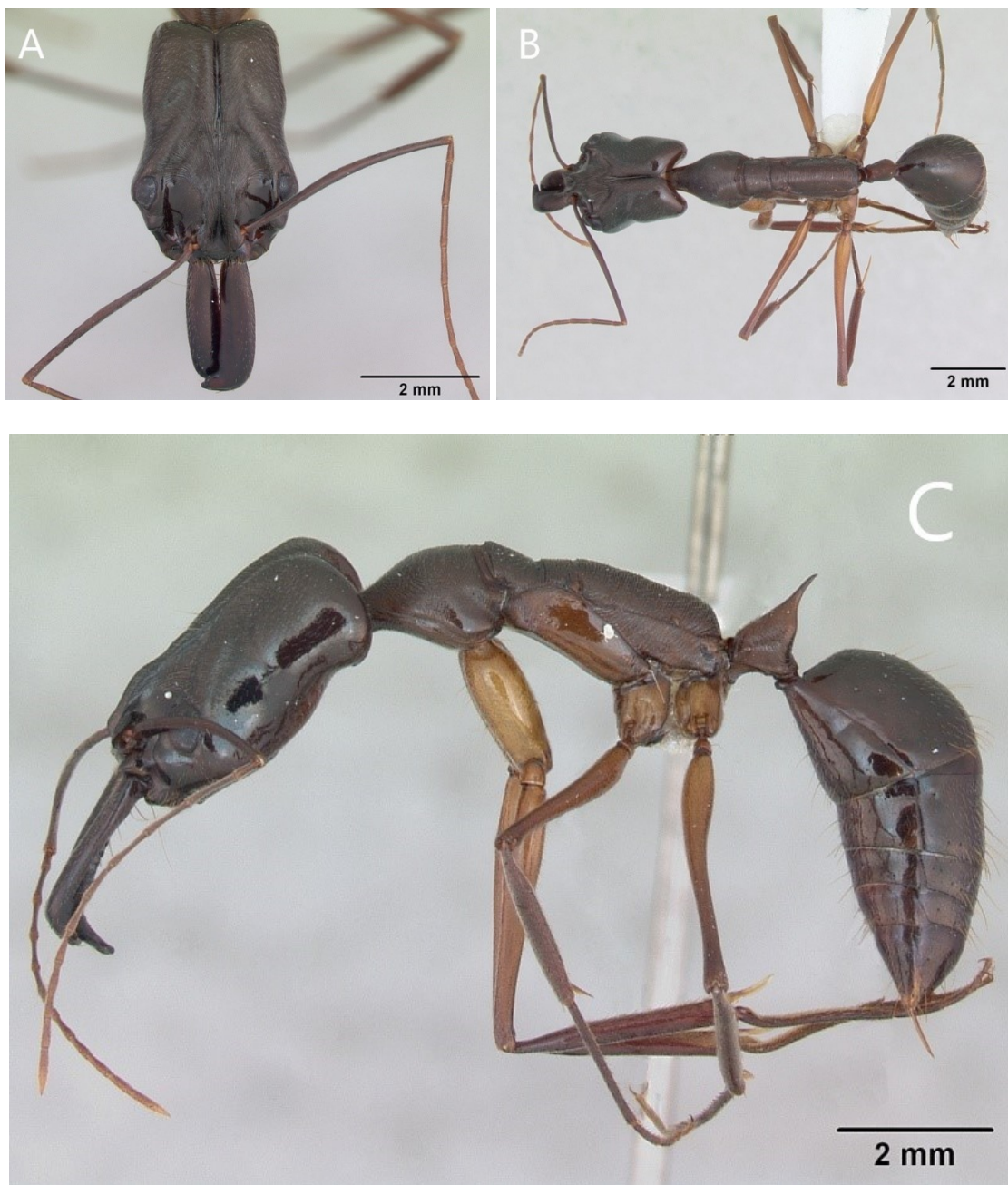


Figura 3 - Morfologia externa de *Odontomachus chelifer*. Visão frontal da cabeça (A), visão dorsal do corpo (B) e visão lateral do corpo (C). Fonte: AntWeb.

Este gênero tem ocorrência Pantropical e em todo o Brasil (*Figura 4*), possuindo 73 espécies descritas até o momento (“AntWeb”, 2019), sendo 26 destas presentes na Região Neotropical e 14 espécies registradas para o Brasil (BACCARO et al., 2015).



Figura 4 - Ocorrência das formigas do gênero *Odontomachus* no território brasileiro. (Fonte: Guia para os gêneros de formigas do Brasil, 2015)

Um estudo realizado por Silva et al. (2015) traçou o perfil biológico e enzimático da peçonha da espécie *Odontomachus bauri*, com destaque para as enzimas proteolíticas presentes na peçonha bruta desta formiga. Foram encontradas as atividades de proteólise sobre o substrato de azocaseína, com especificidade para os inibidores leupeptina, EDTA e aproptina. Também foram demonstradas atividades gelatinolíticas e fibrinogenolíticas. Para os ensaios de atividade biológica, foram demonstradas atividades hemolíticas, coagulantes e defibrinantes. De modo especial, a peçonha bruta de *Odontomachus bauri* apresentou proteínas com atividade antimicrobiana, sobre *S. aureus* e *E. coli*, e antiparasitária sobre o parasito *T. gondii* em ensaios *in vitro* (SILVA, M. F. et al., 2015).

Outro estudo feito por Kazuma et al. (2017) utilizou técnicas de transcriptoma e peptidoma para elucidar a composição da glândula venenífera e composição peptídica, respectivamente, da peçonha bruta de *Odontomachus monticola* e suas propriedades. A partir de análises transcriptômicas da glândula da peçonha, foram identificados seis peptídeos pilosulina-like. Ademais, foram identificados o peptídeo 1 pilosulina-like intacto e os peptídeos 2 e 3 pilosulina-like truncados, por análise de peptidoma.

Em termos de toxinas isoladas e descritas, a peçonha de *O. chelifér* ainda não possui nenhuma toxina caracterizada. Considerando-se o potencial dessa peçonha e as dificuldades relacionadas à investigação de possíveis agentes terapêuticos presentes na mesma, o trabalho doravante discutido tem por objetivo realizar um estudo bioprospectivo da peçonha bruta de *O. chelifér*.

Dessa forma, este não é um estudo que busca mostrar a eficácia do material investigado em tratamentos de doenças microbianas, ou de qualquer espécie, específicas. O que se requer nesse estudo é a investigação do possível potencial biotecnológico da peçonha, podendo ser aplicável para diversos fins. Por isso, trata-se nesse trabalho de analisar as propriedades contidas na peçonha, e a partir das descobertas feitas, futuramente procurar uma aplicação para esta, o que não descarta a possibilidade de se encontrar compostos aplicáveis no desenvolvimento de tratamentos dos microorganismos e células aqui testadas.

1.4 Breves informações sobre bactérias gram negativas e gram positivas,

Leishmaniose e câncer de mama.

Nesse trabalho, tratamos de algumas atividades biológicas que envolvem bactérias gram positivas e negativas, o parasito da Leishmaniose, e células causadoras do câncer de mama.

Começando pelas bactérias, *Escherichia coli*, bactéria gram negativa, é encontrada de forma constante no intestino normal humano. As doenças relacionadas a essa bactéria são as de trato urinário, causada principalmente pela UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica). Além de infecções urinárias, essa bactéria pode causar outras infecções como septicemias e meningites. Outros biossorotipos de *E. coli* causam problemas intestinais, como é o caso das ETEC (enterotoxigênica), EPEC (enteropatogênica), EIEC (enteroinvasora), EHEC (entero-hemorrágica), EAggEC (enteroagregativa) e DAEC (aderência difusa) (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009). Um sorotipo muito importante na saúde animal é a APEC

(*E. coli* patogênica aviária), causadora da doença de colibacilose aviária, uma das principais causas de mortalidade em lotes aviários, tendo como fator facilitador a sua resistência a antibióticos (ROCHA et al., 2017).

As bactérias gram positivas, *Enterococcus*, fazem parte da família *Enterococcaceae* e estão presentes na microbiota entérica e no trato genitourinário. Podem ser causadoras de doenças pela via urinária, ou através de feridas e bacteremias, geralmente em pessoas imunodeprimidas. São microrganismos considerados extremamente resistentes, podendo se desenvolver em condições de pH e temperatura extremas. Tais bactérias possuem resistência intrínseca a antimicrobianos, podendo ser resistentes à penicilina, cefalosporinas e alguns aminoglicosídeos. A resistência dessas bactérias aos tratamentos é de grande preocupação em hospitais, pois, mesmo sendo um patógeno de baixa virulência, ele é capaz de transferir sua resistência por meio de plasmídeos para outros agentes bacterianos, como o *S. aureus* (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009).

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram positiva que podem compor a microbiota normal da pele e das mucosas normal do homem, mas que também podem ser responsáveis por diversas infecções, levando a septicemias fatais. Alguns sorotipos podem se tornar resistentes a antimicrobianos, causando multirresistência em infecções hospitalares, gerando dificuldades nos tratamentos. Pelo fato de produzir enzimas e toxinas extracelulares, podem causar intoxicações alimentares e síndromes como a do choque tóxico. Outras doenças como osteomielite, pneumonia, meningite, endocardite e mastite bovina são associadas a este microrganismo (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2009).

No que se refere à Leishmaniose, os microrganismos causadores dessa doença são os parasitos intracelulares do gênero *Leishmania*, que possuem duas principais formas evolutivas: promastigota e amastigota. Seu habitat são células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* está distribuída amplamente no Brasil, na

Venezuela, na Guiana Francesa e na América Central. Seu ciclo de transmissão está associado a animais domésticos e a sinantrópicos, como os roedores. Um dos fatores que se relacionam com a ocorrência de casos humanos é a ocupação desordenada na periferia dos grandes centros urbanos ou desmatamentos (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2012).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer – INCA, o câncer de mama é causado pela multiplicação desordenada das células da mama, gerando células mutadas que se multiplicam e formam um tumor. Esse tipo de câncer é o mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, correspondendo a cerca de 25% dos casos novos a cada ano no mundo; no Brasil esse percentual é ainda maior, 29%. Foram esperados para o ano de 2018, 59.700 casos novos de câncer de mama no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo Geral

Avaliar parcialmente as propriedades funcionais da peçonha bruta da formiga *O. chelifer*, incentivando a bioprospecção de peçonhas animais com atividade biológica para aplicação na produção de fármacos e outros produtos biotecnológicos.

2.2.Objetivos específicos

- Selecionar e coletar formigas da espécie *O. chelifer* no campus Glória da Universidade Federal de Uberlândia.
- Extrair e processar peçonha da formiga *O. chelifer*.
- Analisar proteínas da peçonha bruta de *O. chelifer* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% e em gel de poliacrilamida SDS-PAGE Tris-tricina, para peptídeos.
- Analisar a atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂) da peçonha bruta de *O. chelifer*.
- Analisar a ação da peçonha de *O. chelifer* sobre as bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, através de ensaios de atividade antimicrobiana.
- Analisar a ação da peçonha bruta de *O. chelifer* sobre o parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis* e sobre células da linhagem de adenocarcinoma de mama humano metastático.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção e coleta de formigas da espécie *Odontomachus chelifer* no campus

Glória da Universidade Federal de Uberlândia.

Para a obtenção das formigas da espécie *O. chelifer*, os ninhos foram identificados na área de campo do campus Glória da Universidade Federal de Uberlândia. Aproximadamente, 70 exemplares da espécie foram coletados pelo método manual, com a utilização de pinças (*Figura 5*), como descreve Filho e Junior (2005), e armazenados em recipientes de vidro ou plástico, levados para o laboratório para a extração da peçonha.



Figura 5 - Coleta manual das formigas *Odontomachus chelifer*. Fonte: Imagem autoral.

3.2.Extração e processamento da peçonha de *Odontomachus chelifer*.

Para a extração da peçonha, as formigas foram dissecadas com o auxílio de pinças retirando-se o ferrão e o reservatório da peçonha com o material glandular, contidos no interior do abdômen.

Posteriormente, as glândulas que continham a peçonha foram transferidas para um microtubo contendo solução de Acetonitrila (ACN) com concentração de 30% e 0,1% de ácido Trifluoracético (TFA) (0,1%), para retardar a ação de enzimas proteolíticas presentes na peçonha. Logo após este procedimento, as soluções contendo as glândulas foram submetidas à sonicação por cinco minutos para que a membrana das glândulas veneníferas fosse rompida e o material da peçonha liberado para o meio. Como próximo passo, teve-se a centrifugação das soluções sonicadas por duas vezes a 2000 rpm por cinco minutos, retirando-se o sobrenadante após a primeira vez, e utilizando-o para a próxima e última centrifugação. Após a segunda centrifugação, usou-se o sobrenadante para a determinação das proteínas totais e descartou-se o pellet.

3.3. Determinação da concentração proteica

Para a dosagem das proteínas contidas na peçonha de *O. chelifer*, seguiu-se a metodologia segundo Bradford, 1976. As amostras foram quantificadas em duplicata e a leitura da absorbância realizada a 595nm em espectrofotômetro. Desenvolveu-se uma curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) (2mg/mL), para a determinação da concentração de proteínas em µg/µL, definida por cálculos de regressão linear baseados nos valores provindos da curva padrão.

Após a quantificação das proteínas, o material foi aliqotado para liofilização e armazenado para uso posterior nos testes.

3.4. Determinação do perfil eletroforético de proteínas e peptídeos.

3.4.1. Eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE

A determinação do perfil eletroforético de proteínas e peptídeos da peçonha bruta de *O. chelifer* foi realizada através da técnica de eletroforese de gel de poliacrilamida, como descreve (LAEMMLI, 1970), com modificações. Para a confecção do gel de empilhamento (5%) foram utilizados os seguintes reagentes: 2.088 ml água deionizada, 0.506 ml 30% Acrilamida/Bis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.375 ml 1 M Tris (pH 6.8), 15 µl 20% (w/v) SDS 15 µl 10% Persulfato de amônio e 1.5 µl TEMED. Para a confecção do gel de separação utilizou-se: Acrilamida/Bis-Acrilamida (37,5:1; m/m) em uma concentração de 12,5% (m/v), Tris HCl (pH 8.8), SDS 0,1% (m/v), persulfato de amônio 0,05% (m/v) e TEMED 0,05% (v/v).

Foram aplicadas amostras da peçonha com as concentrações de 5µg e 10µg. Os géis de eletroforese para proteínas foram executados sob condições redutoras (com β-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich), e com a utilização de marcador molecular (MrS) (LMW-SDS Marker Kit, 250 µg - GE Healthcare – 17044601).

O marcador de massa molecular usado é composto pelas seguintes proteínas: fosforilase b (~97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa).

O gel foi corado com solução de Coomassie blue R-250 (Sigma-Aldrich), segundo metodologia (LAEMMLI, 1970). A digitalização do gel foi realizada em equipamento LabScan 6 e as imagens foram analisadas utilizando o programa Image Master Platinum 2D – Platinum 7 (GE Healthcare).

3.4.2. Eletroforese em gel Poliacrilamida para proteínas de baixo e ultrabaixo peso molecular

Para a confecção do gel de eletroforese para proteínas de baixo peso molecular (peptídeos), utilizou-se o método descrito por (SCHÄGGER, H; VON JAGOW, G., 1987), no qual o tampão utilizado foi Tricina-Tris. Preparou-se o gel fracionador com 16,6% de acrilamida-bisacrilamida, com os seguintes reagentes: Acrilamida/Bis-Acrilamida 49,5% T, 3% C, Tampão do gel – Tris 2 M, SDS 0,3 %, água deionizada; Tampão ânodo – Tris 0,2 M, água deionizada; Tampão Cátodo – Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 0,1%, água deionizada; Glicerol, persulfato de amônio 20% e TEMED 100%. Para o gel concentrador utilizou-se aproximadamente 5% de Acrilamida/Bis-Acrilamida, sem a adição de glicerol.

Foram aplicadas amostras da peçonha com as concentrações de 30ug. Os géis de eletroforese para peptídeos foram executados sob condições redutoras (com β -mercaptoetanol, Sigma-Aldrich). O marcador de massa molecular ultrabaixa utilizado foi M3546 (Sigma-Aldrich), com as seguintes proteínas: triose-fosfato isomerase (26,625 kDa); mioglobina (16,950 kDa); α -lactalbumina (14,437 kDa); aprotinina (6,512 kDa); insulina β -oxidada (3,496 kDa); bacitracina (1,423 kDa). O gel foi corado com solução de Coomassie blue R-250 (Sigma-Aldrich), segundo metodologia.

A digitalização do gel foi realizada em equipamento LabScan 6 e as imagens foram analisadas utilizando o programa Image Master Platinum 2D – Platinum 7 (GE Healthcare).

3.5. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *O. chelifer* foi determinada por titulação potenciométrica em um substrato emulsão de gema de ovo, segundo a metodologia descrita por De Haas et al., (1968), com modificações. A liberação dos ácidos graxos pela ação das enzimas presentes na peçonha de *O. chelifer* foi medida pela titulação com solução padrão de NaOH 0,1

M em pH 8,0, sob temperatura ambiente. A atividade fosfolipásica foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto. A atividade específica foi expressa pelo número de microequivalentes por minutos, por mg de proteína. Em cada ensaio, foram utilizados 10µg, 20µg e 30µg de peçonha bruta de *O. chelifera*. O ensaio foi realizado em triplicata, para cada quantidade de amostra utilizada.

3.6. Atividade antimicrobiana

3.6.1. Cultura de bactérias e preparo de inóculos

Avaliou-se a atividade antimicrobiana da peçonha bruta de *O. chelifera* contra três cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* patogênica aviária – APEC e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, cedidas pelo acervo biológico do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas e pelo Laboratório Microbiologia Molecular da UFU.

Para o desenvolvimento e a manutenção de estoques dessas cepas bacterianas, foi realizado repiques periódicos através da técnica de semeadura por esgotamento em Ágar sangue e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C, para multiplicação bacteriana.

3.6.2 Ensaio de Microdiluição em caldo

Foi realizado o teste de microdiluição em caldo com a utilização de microplacas de 96 poços esterilizadas. Os testes foram realizados com base no protocolo **M07-A10 (CLSI, 2015)** adaptado (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

Cada suspensão bacteriana foi ajustada à escala de 0,5 de Mc Farland, equivalente a $(1,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL})$. 50 µL dessa suspensão foram adicionados ao 1º poço da placa juntamente com 50 µL de peçonha na concentração de 667 µg/mL. A solução contida no 1º poço foi diluída até 10^{-5} UFC/mL , sendo o primeiro poço da placa o de maior concentração da peçonha bruta, e o sexto, o de menor concentração (667 µg/mL e 2,74 µg/mL, respectivamente). Todas as

concentrações da peçonha bruta foram de 667; 222,33; 74,1; 24,7; 8,23; 2,74 (µg/mL). A mesma diluição foi realizada para cada suspensão bacteriana, porém sem tratamento (sem adição de peçonha) com o controle negativo.

Como controle positivo a mesma diluição da suspensão bacteriana foi feita com gentamicina (10 µg/mL).

3.6.3 Inoculação das bactérias em meio de cultura para contagem de UFC's

Uma alíquota de cada diluição dos poços tratados e dos controles foi inoculada e incubada à 37°C por 24h.

Após a incubação, foi feita a contagem das colônias para determinação do percentual de redução das UFC's de cada diluição dos tratamentos. O percentual de redução das UFC's foi calculado em relação ao controle negativo. As diluições em que houve grande crescimento bacteriano, foram consideradas como incontáveis.

3.7. Atividades antiparasitária e citotóxica

3.7.1. Cultura de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Para a realização do ensaio de atividade antiparasitária utilizou-se promastigotas da cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904 strain), cultivadas em meio Liver Infusion Triptose LIT, pH 7.4 e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de glicose e 1% de penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e) e glicose a 2% – LIT completo. As garrafas de cultura foram mantidas a $23 \pm 0,5$ °C com a tampa bem vedada. As promastigotas usadas foram isoladas da fase estacionária de crescimento.

3.7.2. Manutenção de linhagem celular MDA-MB-231

A linhagem de adenocarcinoma de mama humano metastático (MDA-MB-231), foi obtida do “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantida

congelada em nitrogênio líquido a -195 °C em alíquotas de 1×10^6 células/mL, sob solução de congelamento (10% DMSO e 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos elas foram descongeladas e mantidas sob monocamada em garrafas de 25 cm² a 37° C com 10 mL de meio de cultura IMDM (Sigma, Brasil) suplementado com 10% SFB, 25mM de HEPES e gentamicina. As garrafas das células descongeladas foram mantidas em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂ até atingirem o estado de confluência ($\sim 5 \times 10^6$ de células por garrafa), sendo, então, submetidas ao subcultivo.

3.7.2.1. Subcultivo de células MDA-MB-231

Para realização do subcultivo de células aderentes MDA-MB-231, inicialmente verteu-se a garrafa sobre um descarte, desprezando o meio e mantendo as células aderidas ao fundo. Em seguida, lavou-se com solução de PBS (Phosphate Buffer Saline – Na₂HPO₄ 3,2 mM; KH₂PO₄ 0,5 mM; KCl 1,3 mM; NaCl 135 mM) estéril, pH 7,4, para então descartar novamente. Adicionou-se 2 mL de tripsina 0,25% (SAFC Bioscience 59429C, USA) à garrafa e esperou-se 5 minutos para a enzima agir. Após este procedimento, neutralizou-se a solução com meio IMDM suplementado com 10% SFB, 25mM de HEPES e gentamicina com uma quantidade de volume duas vezes maior à de tripsina adicionada anteriormente.

Realizada essa etapa, transferiu-se os conteúdos das garrafas para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugou-se por 5 minutos a 900 *xg*. Desprezou-se todo o sobrenadante, sendo o pellet ressuspensionado em IMDM. Em seguida, foi feita a contagem do número de células em câmara de Neubauer na presença do corante azul de Tripan, depois a suspensão celular foi distribuída em garrafas 75 cm² com 10 mL de meio de cultura IMDM, de modo que cada garrafa recebesse 1×10^6 células. Novamente, as garrafas foram incubadas em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂, até atingirem o estado de confluência, que é quando necessitam de um novo subcultivo. Os ensaios com a peçonha de *O. chelifer* foram executados com células entre o 3° e 9° subcultivo.

3.7.3. Ensaio de citotoxicidade (MTT) para atividades citotóxica e antiparasitária

Para a realização do teste de citotoxicidade na linhagem tumoral foram utilizadas placas de 96 poços, de modo a se reservar 3 poços para a leitura do branco que não receberam células ou tratamento, apenas meio de cultura. O restante dos poços recebeu 5×10^4 células/poço, com um volume final de 100 μ L. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas e incubadas por 24 horas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37°C. Após este período as células foram tratadas com diferentes concentrações da peçonha bruta de *O. chelifera* (diluições seriadas em duplicata de 100 a 0,78 μ g/mL). Para o ensaio com as células MDA-MB-231, foi feito controle positivo de citotoxicidade com diferentes concentrações de LAAO cisplatina (Incel –Darrow®) e para controle negativo utilizou-se PBS.

Nos ensaios com *Leishmania (Viannia) braziliensis*, diferentemente dos ensaios com a linhagem tumoral, os parasitas foram tratados com diferentes concentrações da peçonha bruta de *O. chelifera* (diluições seriadas em duplicata de 200 a 0,20 μ g/mL), imediatamente após o plaqueamento e incubadas por 72 horas, a 25°C. O controle negativo recebeu apenas meio de cultura.

Após 24h ou 72h de tratamento (em MDA-MB-231 e *Leishmania*, respectivamente), os poços receberam 20 μ L de 3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5- difenil brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma M2128, USA) e foram incubados por 3 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de SDS em cada poço, e as placas mantidas na estufa a 37°C, até a total dissolução dos cristais. As placas foram por fim levadas ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância em 570 nm (Mosmann, 1983).

Foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicatas, para cada concentração. Os dados obtidos foram transferidos para o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software

Inc., San Diego, USA), no qual gerou-se os gráficos e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A quantificação proteica da peçonha bruta de *O. chelifer* foi de 740 µg/mL. O perfil eletroforético em gel SDS-PAGE da peçonha bruta de *O. chelifer* mostrou diferentes componentes proteicos, com massas moleculares (M_r) relativas variando entre 97 kDa e 25 kDa, quando analisada sobre condições redutoras (Figura 6).

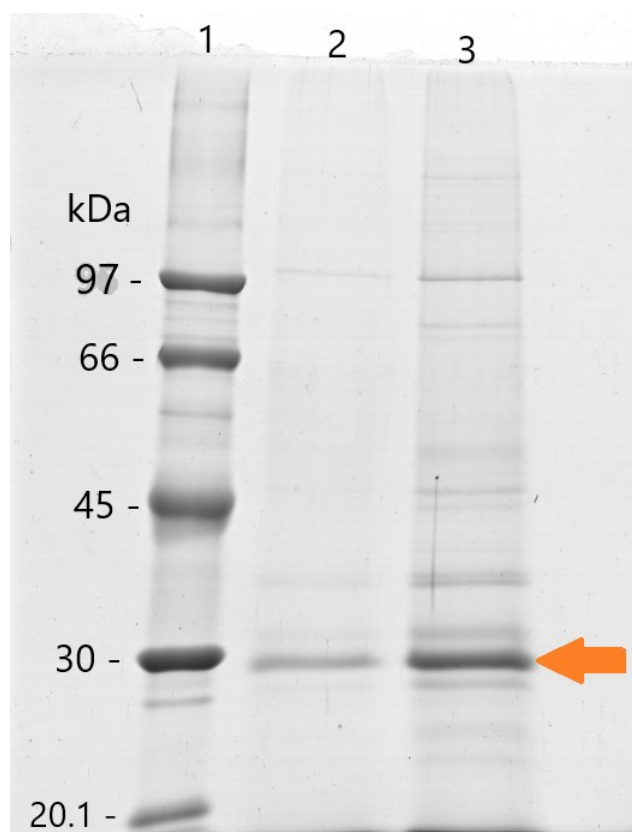


Figura 6 - Perfil eletroforético de proteínas da peçonha de *O. chelifer*. Gel SDS-PAGE 12,5%, corado com Coomassie blue R-250. Amostras da peçonha de *O. chelifer* (5µg e 10µg, faixas 2 e 3, respectivamente) foram analisadas em condições redutoras. Foram aplicados, 10µl de padrão de massa molecular (faixa 1). Nesse gel, a proteína α -lactalbumina (14,4 kDa) do padrão de peso molecular usado não foi mostrada. A seta em laranja indica a banda de proteínas mais intensa nesse perfil eletroforético (aproximadamente 30 kDa).

O perfil eletroforético de proteínas da peçonha bruta de *O. chelifera* revelou bandas de proteínas com massa molecular entre 25 e 97 kDa. A banda de proteínas predominante nesse perfil contém massa molecular aproximada de 30 kDa (**Figura 6**).

A peçonha dos himenópteros contém vários componentes proteicos que podem ou não apresentar atividades enzimáticas (GONZÁLEZ et al., 2009). Grande parte destes são alérgenos, a maioria glicoproteínas, e possuem massa molecular entre 10 e 50 kDa, onde se destacam as fosfolipases A e B, hialuronidases e serinoproteases (GONZÁLEZ et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

Para a peçonha de *O. chelifera*, ainda não foram identificadas as moléculas proteicas que a compõem, logo, através de estudos comparativos, é que se infere as possíveis proteínas presentes nessa peçonha.

Estudo realizado por Silva et al., 2015 revelou que a peçonha de *O. bauri* apresentou vários componentes proteicos com massas moleculares variando entre 18 e 160 kDa em condições não redutoras, destacando uma banda proteica de aproximadamente 30kDa. Sob condições redutoras, as massas moleculares variaram entre 24 e 160 kDa.

Destacando a banda proteica mais intensa na **Figura 6**, pode-se perceber que esta corresponde a maior parte dos componentes proteicos da peçonha bruta em estudo. De acordo com estudos anteriores (SCHMIDT; BLUM; OVERAL, 1986), grande parte da composição proteica das peçonhas brutas de diversos animais peçonhentos são enzimas, dentre as quais se destacam as fosfolipases. Para as peçonhas brutas de formigas, isso também parece se aplicar, uma vez que foi identificada atividade fosfolipásica em todas as espécies utilizadas no estudo de Schmidt et al. (1986).

As fosfolipases A₂ secretadas (PLA₂s) presentes em peçonhas de serpentes possuem massa molecular entre 12-15kDa (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011). Uma variação em um subgrupo de PLA₂s foi detectada, por esta apresentar uma perda na capacidade catalítica de

hidrólise de fosfolipídios, por conta de uma substituição em seu sítio catalítico do resíduo Asp49 por um resíduo Lys49, juntamente com a mudança do sítio de ligação de cálcio (J. WARD et al., 2002; PETAN; KRIŽAJ; PUNGERČAR, 2007). Tal substituição leva a uma diminuição ou perda completa da atividade enzimática. Essas proteínas são chamadas de PLA₂ Lys49 homólogas, PLA₂-like ou miotoxinas Lys49 (LOMONTE; RANGEL, 2012).

Apesar de não possuírem atividade catalítica significativa, as PLA₂ Lys49 apresentam ação miotóxica e citotóxica, que independem de sua ação enzimática. Entretanto, o mecanismo de ação dessas toxinas ainda não é bem elucidado (GHAZARYAN et al., 2015; OWNBY et al., 1999).

Certas miotoxinas se apresentam como dímeros, como é o caso da miotoxina de *B. nummifer* e a miotoxina II de *B. asper*, que possuem duas cadeias polipeptídicas com 16kDa cada uma (GUTIÉRREZ et al., 1989; HUATUCO; ESCOBAR; YARLEQUÉ, 2004).

Acredita-se que é possível que tais perfis de proteínas também estejam presentes nas peçonhas de outros animais, como as formigas, podendo se apresentar como monômeros ou dímeros. Um estudo que corrobora tal hipótese foi realizado por Pinto et al. (2012), no qual identificou-se diversas miotoxinas e fosfolipases na peçonha bruta da formiga de fogo *Solenopsis invicta* Buren, com massa molecular variando entre 28,5 e 43 kDa.

Nesse cenário, infere-se que a peçonha bruta de *O. chelifer* também possua em seu *pool* proteico diversos componentes com diferentes atividades e mecanismos de ação. Para a comprovação dessa hipótese, são necessários estudos proteômicos e funcionais aprofundados, visando a identificação desses compostos bioativos.

4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixo e ultrabaixo massa molecular

O perfil do gel de poliacrilamida da peçonha bruta de *O. chelifera* mostrou diferentes peptídeos, com massas moleculares (M_r) relativas variando entre 1 kDa e proteínas acima de 26 kDa, quando analisada sobre condições redutoras.

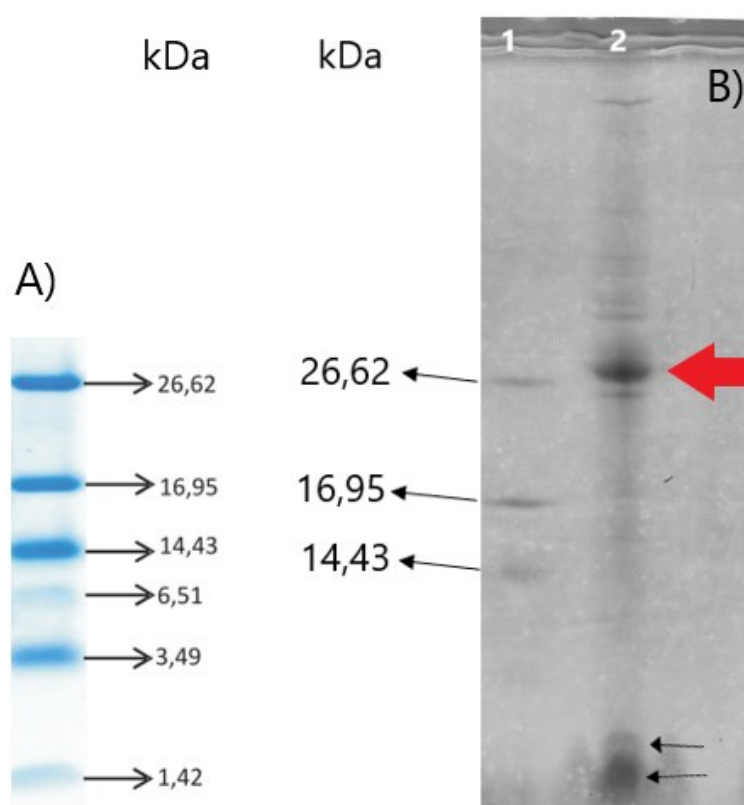


Figura 7 - Perfil eletroforético de peptídeos da peçonha de *O. chelifera* (B). Gel para proteínas de baixo e ultrabaixo massa molecular 16,6%, corado com Coomassie blue R250. Amostra da peçonha de *O. chelifera* (30µg, faixa 2) foi analisada em condições redutoras. Foram aplicados, 4µl de padrão de massa molecular ultrabaixa (faixa 1). Nesse gel, as proteínas: aprotinina (6,512 kDa); insulina β-oxidada (3,496 kDa) e bacitracina (1,423 kDa) do padrão de massa molecular usado não foram mostradas. A seta em vermelho indica a banda de peptídeos mais abundante nesse perfil eletroforético (aproximadamente 27 kDa). As duas setas em preto indicam as bandas de peptídeos de menor massa molecular que se mostraram presentes na peçonha de *O. chelifera*, com massa molecular aproximada de 1 kDa. (A) Padrão de massa molecular ultrabaixa (PUB) em gel de SDS-PAGE Tris-tricina (gel para peptídeos). Fonte: Stephan et al. (2013).

As bandas reveladas no perfil eletroforético para peptídeos da peçonha bruta de *O. chelifera* se mostraram semelhantes às bandas observadas no perfil eletroforético de proteínas desta peçonha. As bandas que se mostraram predominantes no gel de eletroforese são

destacadas na Figura 7B, onde se observa uma banda com massa molecular, aparentemente, pouco maior que 26 kDa, (seta vermelha); e duas bandas (setas pretas) com massa molecular entre a 1 e 3 kDa, de acordo com o padrão de gel para peptídeos (Figura 7A) (STEPHAN et al., 2013) usado como parâmetro para essa medição, uma vez que o padrão para peptídeos usado para o ensaio do presente estudo não mostrou as últimas três bandas no gel.

Segundo Santos et al. (2011), os peptídeos presentes nas peçonhas de himenópteros sociais possuem massa molecular na faixa de 1,4 a 7 kDa, correspondendo a cerca de 70% do peso seco da peçonha, o que confirma os resultados obtidos nesse ensaio, uma vez que foram observados peptídeos com massa molecular próximo e maior que 1 kDa.

Alguns peptídeos já foram identificados em espécies de formigas, como é o caso da formiga *Pachycondyla goeldii* (Ponerinae), onde se isolaram 15 peptídeos com atividade antimicrobiana significativa (ORIVEL, J., et al., 2001). Em outro estudo, foram detectados 142 peptídeos na peçonha da formiga *Myrmica rubra*, o que levou ao isolamento de um peptídeo que não possui atividade antimicrobiana, mas apresentou potencial biológico inseticida (HEEP et al., 2019).

Outros peptídeos identificados que apresentaram atividade antimicrobiana foram a dinoponeratoxina, encontrada na peçonha de *Dinoponera australis* (JOHNSON et al., 2010) e a pilosulina, proveniente da peçonha de espécies do subgênero *Myrmecia* (Myrmecinae) (ZELEZETSKY et al., 2005).

Considerando o potencial antimicrobiano e biológico, de forma geral, dos peptídeos já isolados de peçonhas de formigas, fazem-se necessárias futuras abordagens proteômicas para a elucidação e classificação dos peptídeos presentes na peçonha de *O. chelifera*.

4.3. Atividade fosfolipásica

Para a detecção da atividade fosfolipásica (PLA₂) foi realizado o ensaio segundo a metodologia de De Haas et al., (1968).

Tabela 1 – Comparação entre espécies de abelhas, vespas e formigas quanto a sua atividade fosfolipásica. Fonte: Adaptado de Schmidt et al. (1986).

Espécies em ordem filogenética*	Categoria animal	PLA (U/mg)
Anthophoridae		
<i>Xylocopa virginica</i>	Abelha solitária	28
Vespidae		
Polistinae		
<i>Polistes inuscatu</i> s	Vespa social	560
Vespinae		
<i>Vespula (P.) pensylvanica</i>	Vespa social	94
Formicidae		
Ponerinae		
<i>Ectatomma quadridens</i>	Formiga	13
<i>Odontomachus hematodus</i>	Formiga	0,7
<i>Odontomachus chelifer</i>	Formiga	0
Myrmicinae		
<i>Pogonomyrmex badius</i>	Formiga	94

Abreviação: PLA = Fosfolipase A.

* A ordem é do ancestral até a espécies derivadas dentro das famílias e de insetos solitários a insetos sociais entre as famílias.

Para a peçonha de *O. chelifer*, a atividade fosfolipásica não foi detectada, como mostra a *Tabela 1*. Nessa tabela é possível observar como a atividade fosfolipásica se diferencia entre espécies da ordem Hymenoptera, demonstrando que esta pode ser variável, até mesmo, dentro de animais da mesma família filogenética.

As fosfolipases são proteínas comumente encontradas nas peçonhas de formigas e outros himenópteros (SCHMIDT; BLUM; OVERAL, 1986; TOUCHARD et al., 2016b). Em muitas espécies de formigas foi encontrada atividade fosfolipásica por análises enzimáticas, como em, *Pamponaa claveta*, *Ectatomma quadridens*, *Pogonomyrmex badius*, *Eciton burchellii* (SCHMIDT; BLUM; OVERAL, 1986), *Ectatomma tuberculatum* (ZALAT;

SCHMIDT; MOAWAD, 2003), *Pseudomyrmex triplarinus* (HINK; PAPPAS; JAWORSKI, 1994).

Embora tenha-se reportado atividade fosfolipásica na maioria das espécies de formigas já estudadas, determinados grupos de espécies demonstraram não possuir, ou possuir de forma não significativa, essa atividade que seria aparentemente onipresente na peçonha de himenópteros (VON SICARD; CANDY; ANDERSON, 1989).

Da mesma forma, acredita-se que a peçonha bruta de *O. chelififer* esteja nesse grupo de espécies que não demonstram tal atividade de forma expressiva. Um estudo feito por SCHMIDT et al., (1986) mostrou que algumas espécies de formigas de diferentes famílias e gêneros possuem baixa ou nenhuma atividade fosfolipásica se comparadas a mesma atividade em vespas e abelhas. Neste mesmo estudo, ainda foi possível observar que a atividade fosfolipásica pode ser expressa diferentemente, até mesmo, entre os gêneros de formigas. Nas formigas do gênero *Ectatomma*, a atividade fosfolipásica foi de 13 U/mg, enquanto na formiga do gênero *Odontomachus*, essa mesma atividade foi de 0,7 U/mg (*Tabela 1*). Tal análise corrobora o resultado obtido com o teste para atividade fosfolipásica da peçonha bruta de *O. chelififer*, indicando que a atividade fosfolipásica não é amplamente distribuída nas peçonhas das espécies de formigas.

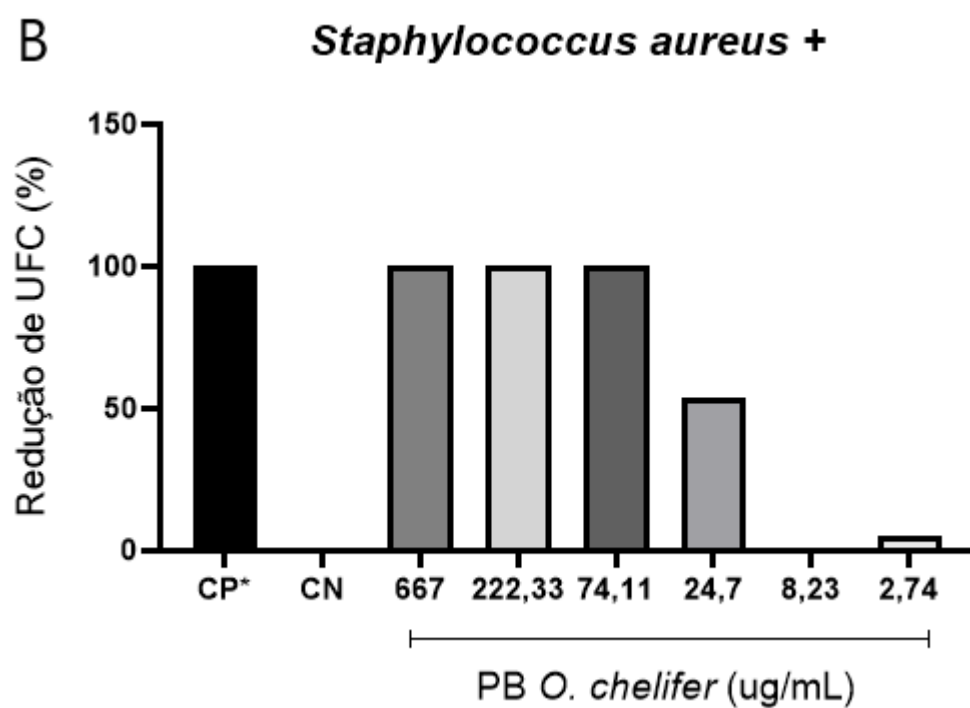
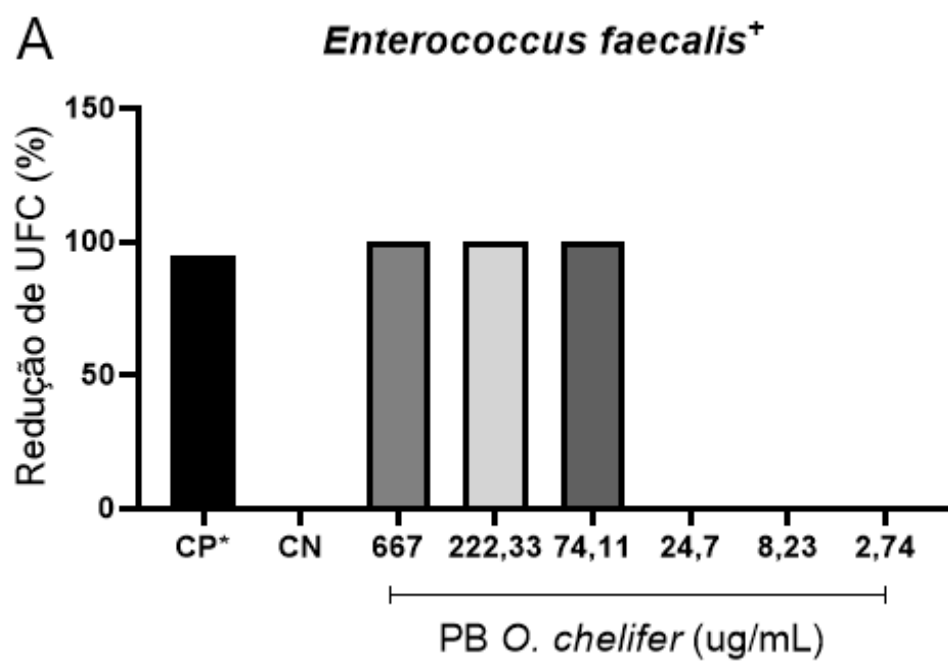
Outra possível explicação para a não detecção de atividade enzimática, mesmo com grandes possibilidades dessas enzimas estarem presentes na peçonha bruta, é o fato de que existem variações e modificações estruturais dessas enzimas, como citado no item 4.1, fazendo com que estas possuam baixa atividade catalítica, ou mesmo, não a possuam. Entretanto, tais enzimas similares a fosfolipases, como as miotoxinas, podem adquirir outras ações funcionais, como miotoxidade e citotoxicidade, que não dependem intrinsecamente de sua ação enzimática de hidrólise em fosfolipídios (GHAZARYAN et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 1989; OWNBY et al., 1999).

Outro fator que pode dificultar a detecção da atividade fosfolipásica nas peçonhas de formigas é o fato de que, nesse material estão contidos diferentes compostos proteicos e não proteicos, que podem interferir na ação enzimática das fosfolipases. Em uma análise de caracterização de proteínas da peçonha de *Pseudomyrmex triplarinus* (HINK; PAPPAS; JAWORSKI, 1994), observou-se que, ao se utilizar um *pool* de proteínas para a verificação de diversas atividades enzimáticas, incluindo a atividade fosfolipásica, essa atividade não foi detectada. Por outro lado, quando utilizaram proteínas purificadas da peçonha bruta de *Pseudomyrmex triplarinus* foi possível detectar a atividade fosfolipásica, assim como outras atividades, o que mostra que proteínas isoladas e purificadas têm seu desempenho melhorado quando comparadas à peçonha bruta, em relação às suas atividades enzimáticas.

Portanto, para o esclarecimento de cada uma das hipóteses, faz-se necessário dar continuidade aos estudos, examinando de forma mais aprofundada cada uma das situações aqui expostas.

4.4. Atividade antimicrobiana

Os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana realizados são mostrados na *Figura 8*.



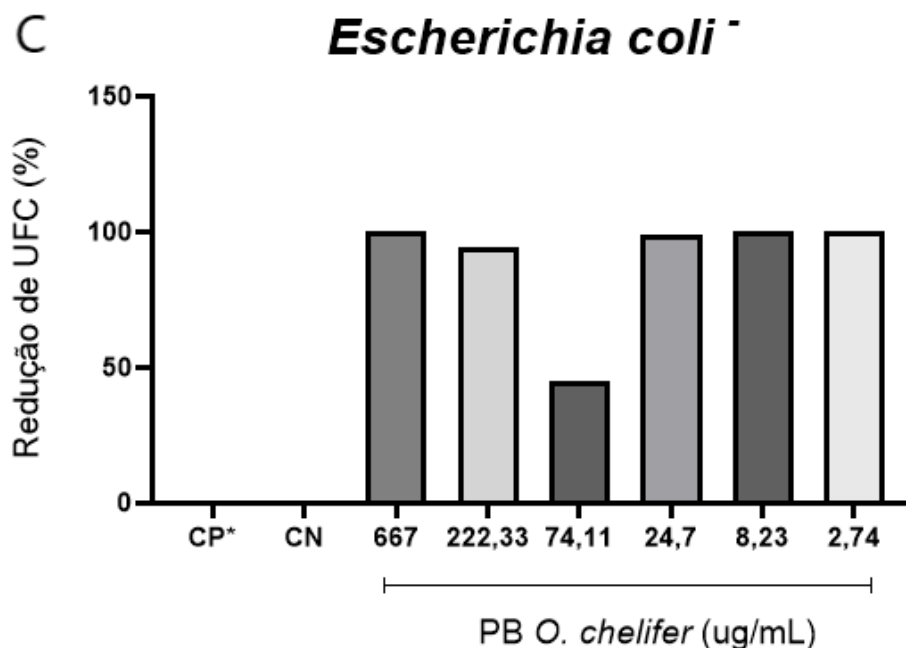


Figura 8 - Redução de UFC (%) das bactérias (A) *Enterococcus faecalis* (B) *Staphylococcus aureus* e (C) *Escherichia coli*, frente ao tratamento com a peçonha bruta de *O. chelifer*, com diferentes concentrações (667; 222,33; 74,1; 24,7; 8,23; 2,74 µg/mL), após 24h. CP* = Valores para controle positivo (antibiótico = Gentamicina) em concentração de 10 µg/µL. Controle negativo (CN) – somente solução salina e bactérias (para todas as diluições).

Além disso, o teste foi realizado somente em duplicata, por conta da pouca quantidade de peçonha disponível, o que também inviabilizou a realização do teste com *n* amostral suficiente para análise estatística.

No estudo de atividade antimicrobiana, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* demonstraram um perfil de redução de UFC's semelhantes. Para as duas cepas, as concentrações de 667; 222,33; 74,1 µg/mL, foram capazes de reduzir 100% do crescimento de colônias bacterianas (Figuras 8A e 8B). No caso de *Enterococcus faecalis*, as três últimas diluições não inibiram o crescimento de UFC's (Figura 8A). Diferentemente, em *Staphylococcus aureus*, na concentração de 24,7 µg/mL, foi possível observar uma redução de aproximadamente 55% das UFC's (Figura 8B).

Observa-se que, para *Enterococcus faecalis*, o antibiótico usado como controle positivo apresentou menor eficiência na redução de UFC's (94,94%), se comparado ao tratamento com a peçonha bruta, nas concentrações onde houve inibição de 100%.

Em relação às bactérias gram positivas, resultado semelhante foi obtido em estudo realizado por Silva et al. (2015), onde se testou a peçonha bruta de *Odontomachus bauri* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a mesma cepa utilizada no presente estudo, que demonstrou ser sensível à peçonha da formiga do gênero *Odontomachus*. A cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foi sensível à peçonha de *Odontomachus bauri* em estudos realizados por Filho et al. (2017) e Bernardi et al. (2017), corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Bernardi et al., 2017 observou experimentalmente que *Enterococcus faecalis* foi sensível à peçonha da formiga *Odontomachus chelifer*.

A bactéria gram negativa, *Escherichia coli* – de cepa patogênica aviária – APEC, demonstrou sensibilidade à peçonha bruta de *O. chelifer*, uma vez que houve redução de UFC's em todas as concentrações utilizadas (Figura 8C). Outros autores demonstraram que essa bactéria apresentou sensibilidade frente à peçonha de formigas do gênero *Odontomachus* (FILHO et al., 2017; BERNARDI et al., 2017; SILVA et al., 2015).

O resultado obtido nesse estudo, no que se refere à sensibilidade de *Escherichia coli* patogênica aviária – APEC, merece destaque, uma vez que o tratamento com a peçonha bruta de *O. chelifer*, demonstrou ser mais eficaz no controle desses microorganismos, em todas as concentrações utilizadas, do que o próprio tratamento com antibiótico usado atualmente, que não conseguiu reduzir o número de UFC's nesse ensaio. Dessa forma, a peçonha bruta de *O. chelifer* mostrou ser um potencial agente antimicrobiano no tratamento dessa cepa, necessitando estudos mais aprofundados para elucidar os compostos bioativos responsáveis pela atividade antimicrobiana e seu mecanismo de ação.

Vários estudos relacionam a capacidade antimicrobiana de peçonhas animais com a presença de proteínas e peptídeos antimicrobianos, como as fosfolipases e, até mesmo, as miotoxinas (FORST et al., 1987; WEINRAUCH et al., 1996). Um estudo de Páramo et al. (1998) demonstrou que a miotoxina II, uma PLA₂ Lys49 cataliticamente inativa, encontra na peçonha de *B. asper*, tem ação bactericida sobre variadas cepas de bactérias gram positivas e negativas.

Outros estudos detectaram duas proteínas (Dinoponeratoxina Da-1837 e Analgesina) provindas da peçonha da aranha *P. striata*, que apresentam atividade biológica de amplo espectro contra diversas bactérias gram positivas e gram negativas (JOHNSON et al., 2010; WU et al., 2011).

A presença de proteínas com função antimicrobiana na peçonha de formigas predadoras pode ser justificada pela necessidade de se controlar a proliferação de bactérias, fungos e vírus em seus ninhos e estoques de alimento, os quais poderiam causar danos à colônia. O fato dessas formigas levarem suas presas para seus ninhos, após sua imobilização, faz com que o potencial de infecção por microorganismos presentes nas presas aumente (QUINET et al., 2012; TOUCHARD et al., 2016a). Acredita-se que essa também seja a função dos compostos que dão à peçonha de *O. chelifer* a capacidade antimicrobiana.

4.5. Atividade antiparasitária

Com o objetivo de analisar uma possível atividade antiparasitária da peçonha de *O. chelifer* sobre parasitas, foi realizado o ensaio de citotoxicidade de MTT. Utilizou-se parasitos da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Os parasitos foram tratados com diferentes concentrações da peçonha bruta de *O. chelifer* (200 a 0,2 µg/mL). O controle negativo recebeu somente meio de cultura. Os resultados desse ensaio são mostrados na *Figura 9*.

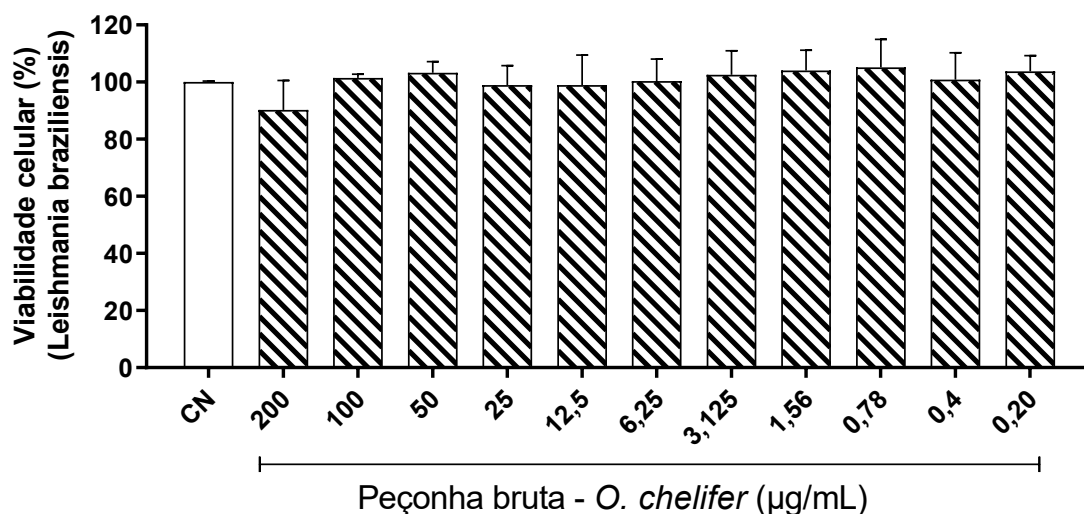


Figura 9 - Viabilidade celular (%) de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em função da concentração de peçonha da formiga *O. chelifer*. As culturas celulares foram tratadas com diferentes concentrações de peçonha bruta de *O. chelifer* (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,4 e 0,2 µg/mL), por 72h.

Nenhuma das concentrações da peçonha bruta de *O. chelifer* testadas (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,4 e 0,2 µg/mL) apresentou citotoxicidade sobre o parasito *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

As formas extracelulares de parasitos, no caso desse estudo, promastigotas de *Leishmania* flageladas (“As Leishmanioses - FIOCRUZ”, 1997), são comumente utilizadas em ensaios antiparasitários, onde são testados compostos de diferentes origens, pelo fato de serem de fácil cultivo, por conta da necessidade apenas do parasito extracelular *in vitro* (MESQUITA et al., 2005; TEMPONE et al., 2005). Nesse estudo, esses parasitos foram escolhidos com o objetivo de realizar uma atividade antiparasitária em testes preliminares sobre a peçonha de *O. chelifer*.

O método utilizado para determinar a viabilidade celular dos parasitos no sistema foi o de MTT. Esse é um método enzimático e colorimétrico quantitativo que se baseia na capacidade das células ativas de reduzirem o sal 3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5- difenil brometo de tetrazolium, que possui cor amarelo-ouro, no produto formado pela ação das enzimas hidrogenases succínicas presentes na mitocôndria de tais células (Mosmann, 1983). Portanto, é

possível detectar, através desse método, a viabilidade das células após o tratamento com diferentes compostos.

Na **Figura 9**, pode-se observar que a peçonha bruta de *O. chelifer* estudada não demonstrou ser citotóxica para as células promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, apresentando porcentagem de células vivas em torno de 90,2%, quando tratadas com a maior concentração utilizada, de 200 µg/mL. A não citotoxicidade de alguns compostos frente a parasitos extracelulares também foi observado no estudo de Morato (2013).

4.6. Atividade de citotoxicidade

A fim de analisar a possibilidade de a peçonha de *O. chelifer* ser citotóxica em células de linhagem tumoral, realizou-se o ensaio de citotoxicidade de MTT. Utilizou-se a linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humano metastático (MDA-MB-231).

As células de linhagem tumoral foram tratadas com diferentes concentrações da peçonha bruta de *O. chelifer* (100 a 0,78 µg/mL). O controle negativo recebeu meio de cultura, e no controle positivo se utilizou diferentes concentrações de cisplatina (Incel –Darrow®). Os resultados desse ensaio são mostrados na **Figura 10**.

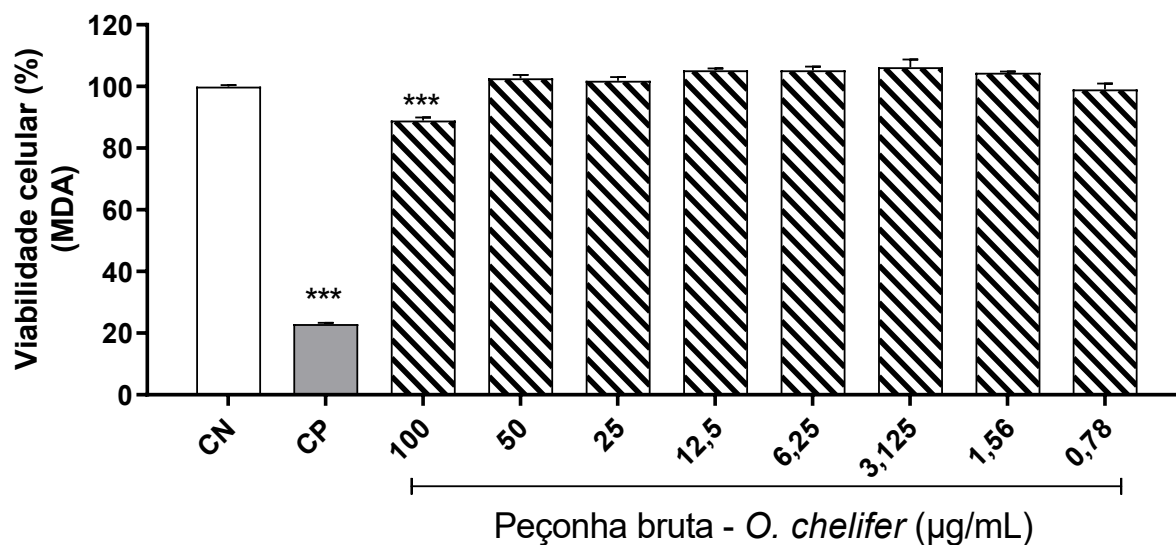


Figura 10 - Viabilidade celular (%) da linhagem celular tumoral MDA-MB-231 em função da concentração de peçonha da formiga *O. chelifer*. As culturas celulares foram tratadas com diferentes concentrações de peçonha bruta de *O. chelifer* (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 µg/mL), por 24h. One-way ANOVA, *** $p < 0.05$ em relação ao grupo controle negativo (CN).

A peçonha bruta de *O. chelifer* demonstrou ser citotóxica para, aproximadamente, 11,08% das células de linhagem tumoral MDA-MB-231 (tumor de mama) tratadas com a maior concentração utilizada, 100 µg/mL.

A atividade da peçonha bruta de *O. chelifer* encontrada nessa linhagem tumoral específica deve ser destacada de forma especial, pois esta é uma linhagem tripla negativa, o que significa que ela não apresenta receptores de estrogênio, progesterona e de fator de crescimento transdérnico (HER-2) (BADVE et al., 2011). Sendo assim, esse tipo de tumor não é afetado quando tratado com terapias de base hormonal ou com fármacos atuantes em receptores HER-2. Portanto, a identificação de compostos ativos sobre esta linhagem tumoral deve ser destacada, pois o fato desta linhagem ter características estruturais específicas, faz com que as opções de tratamento sejam limitadas (FERNANDES, 2015). Nesse sentido, pode-se inferir que a peçonha bruta de *O. chelifer* possui outro mecanismo de ação sobre essa linhagem tumoral, que não atuem sobre nenhum desses fatores de identificação tumoral, que faltam nas células de MDA-MB-231.

Dessa forma, fazem-se necessários futuros estudos para elucidar a capacidade citotóxica da peçonha bruta de *O. chelifer* sobre essa linhagem tumoral, uma vez que a peçonha se mostrou um potencial agente citotóxico sobre essa linhagem.

5. CONCLUSÃO

A bioprospecção de peçonhas animais é de extrema importância para o desenvolvimento de medicamentos ou fármacos para o tratamento de doenças específicas e na criação de produtos biotecnológicos.

Os ensaios realizados nesse trabalho com a peçonha de *Odontomachus chelifer* contribuíram de forma significativa para o campo de pesquisa sobre peçonhas de formigas, que ainda é pouco conhecido.

Este estudo mostrou que a peçonha de *Odontomachus chelifer* possui propriedades antimicrobianas e antitumorais, demonstrando assim, pontos promissores para estudos futuros, onde seria possível mostrar de forma detalhada as características de seus ativos biológicos com importância biotecnológica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AntWeb**. Disponível em: <<https://www.antweb.org/>>. Acesso em: 10 maio. 2018.
- As Leishmanioses - FIOCRUZ**. Disponível em: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>>. Acesso em: 12 jul. 2018.
- BACCARO, F. B. et al. **Guia para os gêneros de formigas do Brasil**. Manaus: Editora INPA, 2015, [s.d.].
- BADVE, S. et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Modern Pathology**, v. 24, n. 2, p. 157–167, fev. 2011.
- BERNARDI, R. C. et al. SCREENING DO POTENCIAL DA PEÇONHA DA FORMIGA *Odontomachus chelifer* (FOWLER, 1980) COMO FONTE DE AGENTES TERAPÊUTICOS. v. v.11, 2017.
- BORDON, K. C. F. et al. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 43, dez. 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRAND, J. M. Fire ant venom alkaloids: Their contribution to chemosystematics and biochemical evolution. 1978.
- CEPLAC. **A defesa. Formigas - Generalidades**, 2014. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/Laboratorios/mirmecologia/htmlFormiga/defesa.html>>. Acesso em: 6 fev. 2017

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (ED.). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: M07-A10 ; approved standard**. 10. ed ed. Wayne, PA: Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

DE HAAS, G. H. et al. Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology**, v. 159, n. 1, p. 103–117, abr. 1968.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 16 abr. 2012.

DOS SANTOS PINTO, J. R. A. et al. Proteomic View of the Venom from the Fire Ant *Solenopsis invicta* Buren. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 9, p. 4643–4653, 7 set. 2012.

FERNANDES, T. B. **Planejamento, síntese e avaliação do potencial antitumoral de compostos arilsulfonil-hidrazônicos**. Mestrado em Insumos Farmacêuticos—São Paulo: Universidade de São Paulo, 18 set. 2015.

FILHO, N. A. S. **Caracterização funcional e estrutural de uma Fosfolipase A2 ácida tóxica isolada da peçonha de Bothrops moojeni**, 2009.

FILHO, P. et al. Biotechnological potential of secondary metabolites obtained from *Odontomachus bauri* (Emery, 1892) ants collected in Maranguape, Ceará, Brazil. 2017.

FILHO, W. S. D. A.; JUNIOR, P. H. D. S. P. **Técnicas de coleta e identificação de insetos**. [s.l.] EDIPUCRS, 2005.

FORST, S. et al. Relation between binding and the action of phospholipases A2 on *Escherichia coli* exposed to the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 920, n. 3, p. 221–225, ago. 1987.

GHАЗARYAN, N. A. et al. Phospholipases a2 from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 2, p. 463–468, 1 fev. 2015.

GONZÁLEZ, D. et al. The major antennal chemosensory protein of red imported fire ant workers. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 3, p. 395–404, jun. 2009.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119–136, mar. 2017.

GUTIÉRREZ, J. et al. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 735–745, jan. 1989.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193–200, dez. 2014.

HEEP, J. et al. Proteomic Analysis of the Venom from the Ruby Ant *Myrmica rubra* and the Isolation of a Novel Insecticidal Decapeptide. **Insects**, v. 10, n. 2, p. 42, 1 fev. 2019.

HINK, W. F.; PAPPAS, P. W.; JAWORSKI, D. C. Partial biochemical characterization of venom from the ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. **Toxicon**, v. 32, n. 7, p. 763–772, jul. 1994.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. [s.l.] Harvard University Press, 1990.

HUATUCO, S.; ESCOBAR, E.; YARLEQUÉ, A. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). **Revista Peruana de Biología**, v. 11, n. 1, p. 79–86, jul. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÁNCER. **Cáncer de mama**, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>

J. WARD, R. et al. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal**, v. 362, n. 1, p. 89, 15 fev. 2002.

JOHNSON, S. R. et al. A biochemical characterization of the major peptides from the Venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 702–710, abr. 2010.

KAZUMA, K. et al. Combined Venom Gland Transcriptomic and Venom Peptidomic Analysis of the Predatory Ant *Odontomachus monticola*. v. 9, n. 323, 2017.

KINI, R. M. Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147–1161, jun. 2005.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497–506, mar. 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. **Phospholipases A2 From Viperidae Snake Venoms: How do They Induce Skeletal Muscle Damage?** Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/256984234_Phospholipases_A2_From_Viperidae_Snake_Venoms_How_do_They_Induce_Skeletal_Muscle_Damage>. Acesso em: 15 jul. 2018.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 520–530, set. 2012.

LOPES, K. S. **Estudo do potencial terapêutico do veneno de *Dinoponera quadricaps* sobre os modelos de convulsão in vivo e sobre astrócitos in vitro**. Fortaleza, 2014.

MCDERMOTT, M.; WAKELAM, M. J. O.; MORRIS, A. J. Phospholipase D. **Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire**, v. 82, n. 1, p. 225–253, fev. 2004.

MESQUITA, M. L. DE et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783–787, nov. 2005.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. [s.l: s.n.]. v. Vol. 4

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. [s.l: s.n.]. v. Vol. 5

MORATO, C. I. Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania Viannia braziliensis* por leucotrienos. p. 153, 2013.

MOSMANN, TIM. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. v. 83, n. 1983 Elsevier Science Publishers B.V., 1983.

ORIVEL, J., et al. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii* . 2001.

OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411–445, mar. 1999.

PÁRAMO, L. et al. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 452–461, 1998.

PETAN, T.; KRIŽAJ, I.; PUNGERČAR, J. Restoration of Enzymatic Activity in a Ser-49 Phospholipase A₂ Homologue Decreases Its Ca²⁺-Independent Membrane-Damaging Activity and Increases Its Toxicity[†]. **Biochemistry**, v. 46, n. 44, p. 12795–12809, nov. 2007.

QUINET, Y. et al. Antibacterial properties of contact defensive secretions in neotropical *Crematogaster* ants. v. 18, n. 4, p. 441–445, 2012.

RASHID, M. H. et al. A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 4509, maio 2015.

ROCHA, S. L. DA S. et al. Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade in vivo. 2017.

SACCARO JR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 14, n. 1, p. 229–244, jun. 2011.

SANTOS, L. et al. A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 4, 2011.

SCHÄGGER, H; VON JAGOW, G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. n. 166, p. 368–379, 1987.

SCHMIDT, J. O.; BLUM, M. S. The biochemical constituents of the venom of the harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. v. 61, n. 1, 1978.

SCHMIDT, J. O.; BLUM, M. S.; OVERAL, W. L. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, v. 24, n. 9, p. 907–921, jan. 1986.

SILVA, M. et al. Biological and Enzymatic Characterization of Proteases from Crude Venom of the Ant *Odontomachus bauri*. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5114–5128, 30 nov. 2015.

SILVA, M. F. et al. Biological and Enzymatic Characterization of Proteases from Crude Venom of the Ant *Odontomachus bauri*. p. 5114–5128, 2015.

SORGER, D. M.; ZETTEL, H. On the ants (Hymenoptera: Formicidae) of the Philippine Islands: V. The genus *Odontomachus* LATREILLE, 1804. v. 14, p. 141–163, 2011.

STEPHAN, M. P.; AZEVEDO, T. DE L.; SILVA, C. M. Implantação do Método de Eletroforese Tris-tricina para Identificação de Peptídeos em Croquete de Carne Mecanicamente Separada de Tilápia. p. 4, 2013.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382–390, maio 2005.

TOUCHARD, A. et al. The Biochemical Toxin Arsenal from Ant Venoms. *Toxins*. 2016a.

UFRGS. **Bioprospecção — Patrimônio Genético**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/patrimoniogenetico/conceitos-e-definicoes/bioprospeccao>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

VON SICARD, N. A. E.; CANDY, D. J.; ANDERSON, M. The biochemical composition of venom from the pavement ant (*Tetramorium caespitum* L.). **Toxicon**, v. 27, n. 10, p. 1127–1133, jan. 1989.

WEINRAUCH, Y. et al. The potent anti-Staphylococcus aureus activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14-kD phospholipase A2. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 1, p. 250–257, 1 jan. 1996.

WHEELER, W. M. **Ants: Their Structure, Development and Behavior**. [s.l.] Columbia University Press, 1960.

WU, J. et al. Proteomic Analysis of Skin Defensive Factors of Tree Frog *Hyla simplex*. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 9, p. 4230–4240, 2 set. 2011.

ZALAT, S. M.; SCHMIDT, J.; MOAWAD, T. I. S. **Lipase and phospholipase activities of Hymenoptera venoms (wasps and ants)**. 2003

ZELEZETSKY, I. et al. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. 2005.