

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

**ANÁLISE DA VARIAÇÃO INTRA E INTERESPECÍFICA  
NA COMPOSIÇÃO DO VENENO DE HYMENOPTERA  
SOCIAIS PELA TÉCNICA FTIR-PAS**

Angélica Mendonça

Dourados-MS  
Fevereiro-2014

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

Angélica Mendonça

**ANÁLISE DA VARIAÇÃO INTRA E INTERESPECÍFICA NA  
COMPOSIÇÃO DO VENENO DE HYMENOPTERA SOCIAIS  
PELA TÉCNICA FTIR-PAS**

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

Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Dr. William Fernando Antonialli Junior

Co-orientador: Dr. Wedson Desidério Fernandes

Dourados–MS  
Fevereiro–2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil**

M539a Mendonça, Angélica.  
Análise da variação intra e interespecífica na  
composição do veneno de Hymenoptera sociais pela  
técnica FTIR-PAS / Angélica Mendonça – Dourados-MS  
: UFGD, 2014.

63 f.

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli  
Junior.

Dissertação (Mestrado em Entomologia e  
Conservação da Biodiversidade) Universidade Federal da  
Grande Dourados.

1. Insetos. 2. Formigas. 3. Vespas. 4. Veneno de  
Hymenoptera. I. Antonialli Junior, William Fernando. II.  
Título.

CDD: 595.7


"Análise da variação intra e interespecífica na composição do veneno de Hymenoptera sociais pela técnica FTIR-PAS"

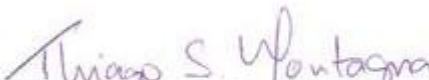
Por

**ANGÉLICA MENDONÇA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
**MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**  
Área de Concentração: Entomologia

  
Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior  
Orientador - UEMS

  
Prof. Dr. Luis Humberto da Cunha Andrade  
Membro Titular – UEMS

  
Prof. Dr. Thiago dos Santos Montagna  
Membro Titular – UEMS

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2014.

## **BIOGRAFIA DO ACADÊMICO**

Angélica Mendonça, natural de Mundo Novo – Mato Grosso do Sul nascida aos 05 de outubro de 1990, filha de Sonia de Oliveira Mendonça e José Paulo Mendonça.

Cursou todo o Ensino Fundamental (1997 a 2004) e o Ensino Médio (2005 a 2007) na Escola Estadual Marechal Rondon no município de Mundo Novo/MS.

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

Atualmente desenvolve projeto relacionado a composição de veneno de Hymenoptera utilizando a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR-PAS.

*“Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado.*

*Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente.*

*Já não caminho mais sozinha, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada  
lição.*

*E mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria saber que já não sou a mesma  
de ontem, me faz perceber que valeu a pena!!!”*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que concedeu em vida, não só nos momentos do mestrado, mas ao longo de toda minha caminhada a qual foi árdua e cansativa, mas Deus sempre esteve presente em minha vida e fez com que eu sempre acreditasse que era possível e foi por isso que cheguei até aqui.

À minha família em especial, agradeço enormemente aos meus pais Sonia e José Paulo por sempre me incentivarem a estudar desde criança, apesar deles não terem tido a oportunidade de estudar, sempre mostraram o quanto é importante buscar o saber. E apesar do mestrado ter nos distanciado por alguns quilômetros não pouparam esforços para que o meu sonho se realizasse, sempre me deram a força necessária para continuar nesta caminhada. As minhas irmãs Ana Paula e Aline pelo apoio, carinho, força e pela compreensão. Agradeço por compreenderem a minha ausência em muitos momentos destes últimos dois anos, tenham certeza de que vocês estiveram e sempre estarão presentes em meu pensamento e no meu coração.

Ao meu orientador professor Dr. William Fernando Antonialli Junior que apesar de “eu ter caído de paraquedas” me recebeu de braços abertos no laboratório e aceitou me orientar, mesmo não conhecendo meu trabalho, obrigada pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa e desenvolver este trabalho; pela paciência em me ensinar, já que era tudo muito novo “tive que começar do zero”; pelos “puxões de orelha” que com certeza foram e são necessários os quais no final fazem toda a diferença; e a todos os ensinamentos que tem transmitido.

Ao professor Dr. Wedson Desidério Fernandes por ter feito parte da minha caminhada e conseqüentemente contribuiu com tudo isso, como também pela paciência e disponibilidade quando precisei que assinasse documentos.

Aos professores Dr. Luis Humberto da Cunha Andrade e Dr. Sandro Marcio Lima pela paciência para ensinar, como também para resolver todos os imprevistos que surgiram ao longo do desenvolvimento do trabalho.

As colegas “de veneno” Rafaella e Ellen por termos conseguido concluir os trabalhos apesar de todas as adversidades e obstáculos que surgiram, como também pelo companheirismo em todos os momentos, mesmo nos de desespero, com certeza tudo que vivemos valeu muito a pena e aprendemos com os erros, aliás, fizemos “Ciência”.

À todos os colegas do laboratório de Ecologia Comportamental da UEMS, Dayana, Denise, Ellen, Erika, Eva, Ingrid, Juliana, Kamylla, Maria da Graça, Michele,

Viviana, Junior, Luan, Marlon, Romario e Thiago por fazerem parte da minha caminhada, vocês presenciaram todos os momentos bons e ruins e me deram força para continuar o trabalho. Obrigada pelos momentos de descontração na hora do cafezinho, do almoço com nossas “marmitas” e nas confraternizações. Obrigada por permitirem que eu faça parte desta família científica que esta mais unida do que nunca, aliás como dizem alguns professores literalmente parecemos “insetos sociais” só andamos em grupo, que esse companheirismo e união possam se tornar cada vez mais intenso.

Ás minhas amigas Priscila e Eires pelo companheirismo, amizade, paciência em me ouvir nos momentos de nervosismo e pelos conselhos.

Á todos os amigos do mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da UFGD, pelos momentos divertidos que passamos juntos, como também de desespero e aprendizado, os quais jamais serão apagados da memória, obrigada a todos por fazerem parte da minha história de vida.

Ao Dr. Orlando Tobias Silveira do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pela confirmação das espécies de vespas.

Ao Programa de Pós Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade e pelo suporte para desenvolvimento da pesquisa.

Á CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Á Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul pelo apoio técnico.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da dissertação.

Obrigada a todos por fazerem parte da minha caminhada e da minha vitória que hoje se concretiza!



## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais Sonia de Oliveira Mendonça e José Paulo Mendonça, e as minhas irmãs Ana Paula Mendonça e Aline Mendonça.*

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT .....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
FORMIGAS E VESPAS SOCIAIS.....	4
VENENO DE HYMENOPTERA SOCIAIS .....	7
FTIR-PAS .....	8
OBJETIVO GERAL .....	9
HIPÓTESES .....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10

## CAPÍTULO I

### **Diferenças inter e intraespecíficas da composição de veneno de formigas e vespas sociais pela técnica de FTIR-PAS**

RESUMO .....	17
ABSTRACT .....	18
INTRODUÇÃO .....	18
MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
COLETA DE DADOS.....	21
TÉCNICA DE FTIR-PAS.....	22
ANÁLISES ESTATÍSTICA .....	25
RESULTADOS .....	25
DISCUSSÃO .....	29
CONCLUSÕES .....	31
AGRADECIMENTOS.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## CAPÍTULO II

### **Variação intra e interespecífica dos venenos de duas espécies de vespas sociais do gênero *Polybia* (Hymenoptera: Vespidae) pela técnica de FTIR-PAS**

RESUMO .....	37
ABSTRACT .....	38
INTRODUÇÃO .....	39

MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
COLETA DOS DADOS .....	42
TÉCNICA DE FTIR-PAS.....	43
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
RESULTADOS .....	45
DISCUSSÃO .....	52
CONCLUSÕES .....	55
AGRADECIMENTOS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	63

## RESUMO GERAL

Os Hymenoptera são capazes de sintetizar compostos químicos que são denominados veneno. Estes compostos atuam na defesa da colônia e são utilizados para a captura de presas, sendo essenciais quando os insetos deixam os trabalhos no interior do ninho e passam a realizá-los fora, expondo-se frequentemente a situações de perigo. Desta forma, a função do veneno, sua ação bem como sua composição são distintas entre diferentes grupos de insetos. O objetivo deste trabalho, portanto, foi avaliar a variação intra e interespecífica da composição de veneno de vespas sociais e formigas por meio da Absorção Óptica no Infravermelho Médio. Para avaliar a importância dos componentes genéticos e exógenos para compor as diferenças entre os venenos de vespas e formigas, amostras dos dois grupos foram coletas nos mesmos ambientes. Os resultados demonstram que formigas e vespas apresentam diferenças evidentes na composição de seus venenos, mesmo entre amostras de um mesmo ambiente. Portanto, o componente genético parece ser preponderante para determinar os compostos encontrados em uma e outra espécie. Isto prova que a composição de veneno varia de uma família para outra nos Hymenoptera e pode, portanto, ser usado de certa forma como ferramenta taxonômica auxiliar. Por outro lado, fatores exógenos, como a dieta, em diferentes ambientes devem ser responsáveis pelas diferenças intraespecíficas, sobretudo em vespas. A Absorção Óptica no Infravermelho Médio, assim como em trabalhos com compostos químicos cuticulares mostrou-se confiável para avaliar as diferenças da composição de veneno de Hymenoptera sociais.

**Palavras-chave:** Insetos sociais, Infravermelho médio, Polistinae, Formicidae, Componentes genéticos, Componentes exógenos.

## GENERAL ABSTRACT

The Hymenoptera are capable of synthesizing chemical compounds that are named venom. These compounds act on the defense of the colony and are used for capturing prey, being essentials when insects stop working inside the nests and begin to work outside, often exposing themselves to dangerous situations. Although the function of the venom and its action are similar between different groups of insects, its composition may not be similar. Therefore, the aim of this study was to assess intra and interspecific variation in the venom composition of social wasps and ants by FTIR-PAS technique. To assess the importance of genetic and exogenous components to compose the differences among the venoms of wasps and ants, samples from the two groups were collected in the same environments. The results demonstrate that ants and wasps show clear differences in the composition of their venoms, even among samples of the same environment. Therefore, the genetic component appears to be preponderant to determine the compounds found in one or another species. This proves that the venom composition varies from one family to another in Hymenoptera and can therefore be used as an auxiliary taxonomic tool. On the other hand, exogenous factors, such as diet, in different environments might be responsible for intraspecific differences, particularly in wasps. The FTIR-PAS technique, as well as in work with cuticular chemical compounds proved to be reliable and effective to evaluate the differences in the composition of social Hymenoptera venom.

**Key-words:** Social insects, Spectroscopy, Polistinae, Formicidae, Genetic component, Exogenous components.

## INTRODUÇÃO GERAL

Insetos eusociais são os organismos que apresentam o grau mais elevado de socialidade, sendo definidos por três características básicas: a divisão reprodutiva de trabalho; cuidado cooperativo com a prole e sobreposição de gerações (Wilson, 1971).

Para que a divisão de trabalho dentro da colônia seja eficiente, de forma a coordenar estas atividades estes insetos desenvolveram ao longo da evolução um complexo sistema de comunicação, sendo capazes de sintetizar substâncias químicas, chamadas de feromônios que permitem mediar as interações entre companheiras da colônia (Izzo et al. 2010; Khidr et al. 2013). Dentre os feromônios destacam-se alguns tipos como: o feromônio sexual para atrair parceiros durante a cópula; feromônio de alarme que informa a aproximação de um potencial inimigo; feromônio de defesa que serve para avisar aos indivíduos da colônia que devem atacar o intruso; feromônio de agregação que atrai os membros da colônia para uma fonte de alimento ou novo local para nidificação e o feromônio de trilha para demarcar o caminho até uma fonte de alimento (Billen e Morgan, 1998).

Além destes, outro tipo de feromônios de superfície que atua como uma assinatura característica para cada espécie, colônia e casta (Antoniali- Junior et al., 2007, 2008; Neves et al., 2012, 2013)

Outros compostos sintetizados pelos Hymenoptera e também importante para manutenção das colônias são os venenos. Estes compostos atuam na defesa da colônia e são utilizados para a captura de presas, sendo essenciais quando os insetos deixam os trabalhos no interior do ninho e passam a realizá-los fora, expondo-se frequentemente a situações de perigo (Ortiz e Camargo-Mathias, 2006).

Além disso, em trabalho realizado por Mateus (2011) com *Parachartergus fraternus*, o autor observou que vespas do gênero *Parachartergus* utilizam o veneno para marcar um novo local para a fundação da colônia, antes do início da migração, assim o veneno também é utilizado na comunicação entre os indivíduos.

Dependendo do animal e de sua própria função estes compostos podem variar em composição. Dentre os fatores que podem influenciar as diferenças da composição do veneno, prevalecem na literatura as variações geográficas, genéticas, ambientais (clima, altitude, solo), sexuais, idade e sazonais (Daltry et al., 1997; Badhe et al., 2006; Abdel-Rahaman et al., 2009); além da possibilidade da variação ter influência da dieta (Abdel-Rahman et al., 2009 e 2010). Alguns estudos, de fato, demonstram ainda, que

animais sequestram elementos químicos do ambiente e o utilizam para compor seu veneno (Savitzky, 2012).

Os trabalhos, até o momento, realizados para avaliar compostos químicos de insetos, como a composição de veneno, têm utilizado técnicas cromatográficas (Santos et al., 2011; Pinto et al., 2012; Cologna et al., 2013; Jacomini et al., 2013). Entretanto, atualmente uma proposta recente que vem sendo utilizada para análise de compostos químicos em insetos sociais (Antoniali- Junior et al., 2007, 2008; Neves et al., 2012, 2013) é a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, “Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy”).

Esta técnica corresponde a uma medida da radiação na faixa espectral do infravermelho médio absorvida pela amostra, que apresenta como vantagens a aplicação em materiais de grande fragilidade como materiais biológicos, podendo ser empregada em medidas de amostras com dimensões reduzidas e em relativamente pouco tempo, comparada a outras técnicas para este fim, já que esta técnica não emprega métodos ópticos dispersivos na sua varredura espectral, de forma que a obtenção dos espectros pode ser realizada em poucos minutos, permitindo a análise de um grande número de amostras (Greene et al., 1992).

Portanto, uma nova proposta para o uso desta técnica é avaliar as variações intra e interespecífica na composição de veneno de formigas e vespas sociais.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **Formigas e vespas sociais**

Formigas e vespas sociais são da ordem Hymenoptera que é dividida em duas subordens: Symphyta e Apocrita; os Symphyta apresentam abdômen sésil, trocanter dítroco, asas com nervação complexa, ovipositor serreado, larvas eruciformes e fitófagas; enquanto que os Apocrita possuem abdômen livre ou pedunculado, trocanter simples ou dítroco, nervação simples, ovipositor estiliforme e larvas ápodas (Gallo et al., 2002; Triplehorn e Jonnson, 2011; Rafael et al, 2012).

Dentro dos Apocrita destacamos os Aculeata, um grupo cuja principal característica que os difere dos demais Hymenoptera é a modificação do ovipositor das fêmeas em um aparelho de ferrão (Macalintal e Starr, 1996). Os ovos desses himenópteros são depositados através de uma abertura na base do ferrão, ao invés de

passar por todo o aparelho ferroador; sendo o ferrão um par afiado e rígido de gonapófises, cuja base contém um reservatório de veneno (figura 1) (Grimaldi e Engel, 2005).

O aparelho de ferrão é formado por duas partes funcionalmente diferentes: a parte glandular, na qual o veneno e outras substâncias são produzidas, e a parte motora, onde estruturas quitinosas e musculares atuam conjuntamente na protrusão/extrusão do ferrão, ejetando o veneno (Manzoli-Palma e Gobbi, 1997). Sua função primária é a captura de presas, porém se tornou um eficiente meio de intimidação para potenciais inimigos e adquiriu importante função de defesa, principalmente nas espécies sociais (Macalintal e Starr, 1996).

A ordem Hymenoptera é representada pelas vespas, formigas, abelhas e sawflies. Dentre as vespas destaca-se neste trabalho *Polybia*, especificamente, *Polybia paulista* e *Polybia occidentalis* que são vespas eussociais neotropicais de grande abundância, as quais podem exibir fundação por enxameagem (Jeanne, 1991).

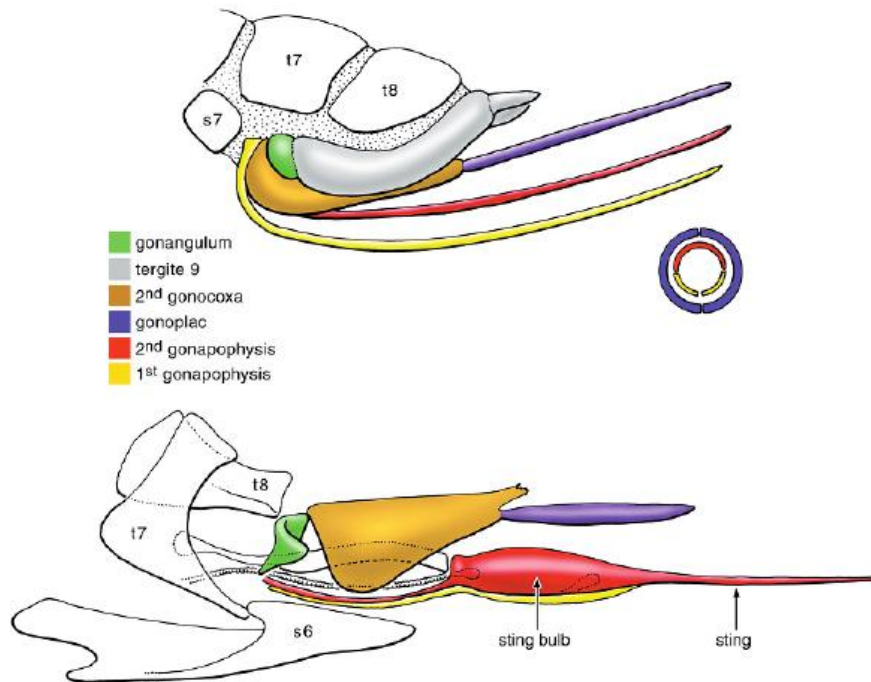
Os ninhos neste gênero podem apresentar diferentes locais de nidificação, podendo ser encontrados na face abaxial de folhas ou presos em ramos vegetais. De acordo com Carpenter e Marques (2001) *Polybia* apresenta ninhos fragmocítaros que não possuem pedicelo, portanto, o favo inicial fixa-se diretamente ao substrato apresentando um invólucro protetor construído ao redor. Além disso, o ninho apresenta apenas um orifício de entrada localizado na parte inferior (Wenzel 1998; Carpenter e Marques 2001).

*Polybia paulista* Von Ihering, 1896 (figura 2) é uma espécie amplamente distribuída na América do Sul (Richards, 1978). Em estudo realizado por Noll e Zucchi (2000) foram registradas colônias com populações em torno de 4.500 indivíduos durante a fase de emergência até 13.000 na fase de produção de machos. Além disso, as rainhas podem ser identificadas morfológicamente pelo seu tamanho, embora apresentem modificações morfológicas com o desenvolvimento da colônia. *Polybia occidentalis* (Oliver, 1791) (figura 3) apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo em grande parte da América tropical (Richards e Richards, 1951; Richards, 1978), sendo encontrada na Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Peru, Bolívia, Argentina, Paraguai e Brasil (Somavilla et al., 2012).

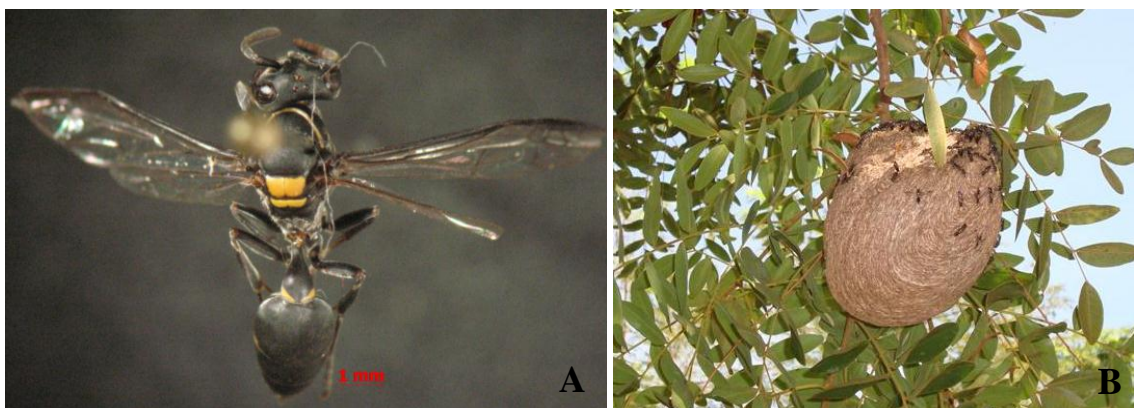
A formiga *Ectatomma brunneum* Smith, 1858 (figura 4) apresenta extensa distribuição na região Neotropical, ocorrendo desde o Panamá até a Argentina (Kempf, 1972), incluindo o Brasil. É uma espécie que apresenta caça solitária e ferrões bem



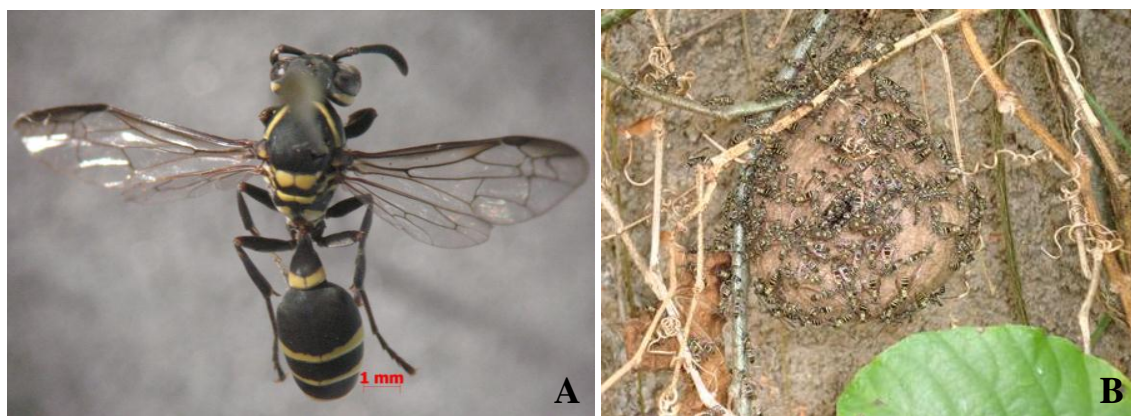
desenvolvidos, os ninhos são terrestres subterrâneos, sendo sua abundância perceptível em campos abertos ou áreas degradadas (pastagens, plantações, gramíneas, estradas não pavimentadas e clareiras) (Gomes et al., 2009).



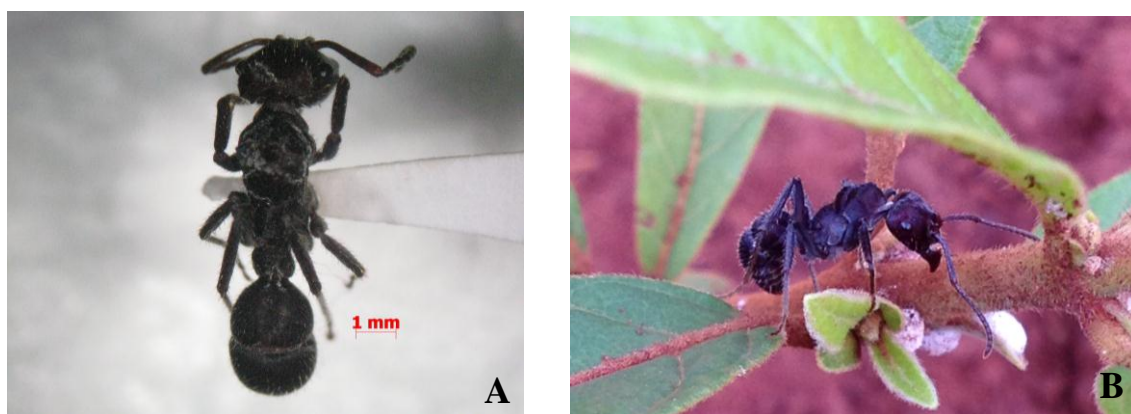
**Figura 1.** Estrutura do aparelho de ferrão dos Aculeata, mostrando o ovipositor modificado em aparelho que injeta veneno. **Fonte:** Grimaldi e Engel, 2005 (cap. 11, p.430).



**Figura 2.** Vespa *P. paulista* (A) e seu ninho frágil característico (B). **Fonte:** Mendonça, A.



**Figura 3.** *Vespa P. occidentalis* (A) e seu ninho frugocítaro característico (B). **Fonte:** Mendonça, A.



**Figura 4.** Formiga *E. brunneum* (A) e a formiga em ambiente natural (B). **Fonte:** Mendonça, A. e Firmino, E. L. B.

### **Veneno de Hymenoptera sociais**

O veneno de Hymenoptera é constituído por complexos de moléculas orgânicas, proteínas, peptídeos, lipídeos, aminas vasoativas (norepinefrina, histamina e dopamina) e enzimas como fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (Edstron, 1992; Lima e Brochetto-Braga, 2003), contudo, pode ser composto predominantemente por aminoácidos, ou uma mistura complexa de compostos de baixa massa molecular (Palma, 2006).

O veneno de vespas sociais é composto por aminas biogênicas, peptídeos básicos e proteínas de elevada massa molecular, principalmente enzimas (Castro et al., 1994). Estudos mostram que as principais proteínas alergênicas do veneno de vespas são fosfolipases, hialuronidases, antígeno 5 (King et al., 1996; Kolarich et al., 2005 e

Santos et al., 2010) e serino-proteases. Contudo, a qualidade e quantidade de compostos devem variar, de fato, dentro de uma espécie e, sobretudo, entre as espécies.

A composição de veneno já foi investigada em algumas espécies de vespas dentre as quais cabe ressaltar os trabalhos com *Polybia paulista* (Souza et al. 2004, 2005; Paula et al. 2006; Rocha et al. 2007; Brigatte et al. 2011; Pinto et al. 2012; Jacomini et al. 2013), *Polybia occidentalis* (Mortari et al. 2007a, b; Czaikoski et al. 2010), *Polistes versicolor* (Castro et al. 1993, 1994), *Polistes dominulus* (Bruschini et al. 2008), *Vespa* (*V. affinis*, *V. analis*, *V. basalis*, *V. ducalis*, *V. mandarinia*, *V. velutina flavitarsus*) (Lin et al. 2011) e *Protonectarina sylveirae* (Brigatte et al. 2011). E o veneno também já foi investigado para algumas espécies de formigas como: *Pachycondyla* (*P. sp. cf. crenata*; *P. apicalis*; *P. sp. inversa*; *P. goeldii*; *P. obscuricornis*; *P. constricta*; *P. senaarensis*; *P. cavinodis*; *P. rostrata*; *P. stigma*; *P. soror*; *P. harpax*) (Orivel e Dejean, 2001); *Solenopsis saevissima* (Fox et al.; 2012); *Dinoponera quadriceps* (Cologna et al.; 2013)

Contudo, a análise da composição de veneno destes insetos e de outros animais tem utilizados técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida e gasosa para identificar seus compostos (Santos et al., 2011; Pinto et al., 2012; Cologna et al., 2013; Jacomini et al., 2013). Porém, atualmente uma proposta recente que vem sendo utilizada para análise de compostos químicos em insetos sociais é a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, “Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy”).

## **FTIR-PAS**

Sobre a FTIR-PAS, os efeitos fotoacústicos foram observados pela primeira vez em 1880 por Alexandre Graham Bell, nos seus estudos sobre o “photofone” (Bell, 1880). Graham Bell percebeu que quando incidia luz solar modulada em um sólido dentro de uma célula, gerava no ar à sua volta sons audíveis que podiam ser amplificados e captados a partir de um tubo ligado à referida célula (Kerr e Atwood, 1968). Ele interpretou então, que a intensidade do sinal fotoacústico dependia da quantidade de luz absorvida pelo material na célula, isto é, dependia do coeficiente de absorção do material.

Por algum tempo este assunto foi deixado de lado, entretanto, com a criação do microfone o efeito fotoacústico voltou a despertar interesse, e em 1938, Veingerov

começou a usar o referido fenômeno para estudar a absorção de luz por gases na região do infravermelho (Veingerov, 1938). Nos anos seguintes (1950 e 1970) surgiram as fontes de luz laser, que são técnicas mais sensíveis utilizadas também para gerar um sinal fotoacústico (Patel, 1978).

Entretanto, a Espectroscopia com Transformada de Fourier foi desenvolvida apenas no início de 1950 por astrônomos com a finalidade de estudar os espectros infravermelhos das estrelas distantes, pois somente esta técnica poderia isolar os sinais muito fracos dos ruídos distantes (Skoog et al., 2002).

Desta forma, a técnica de FTIR-PAS pode ser empregada no estudo de sólidos, líquidos, gases e também na análise de materiais biológicos como no presente estudo.

Os primeiros estudos a respeito da técnica de FTIR-PAS para análises de compostos químicos em insetos sociais foram realizados com formigas, focando na variação da composição de compostos químicos cuticulares de castas e sexo (Antonialli-Junior et al., 2007) e entre espécies de formigas (Antonialli-Junior et al., 2008); posteriormente iniciaram-se estudos com vespas (Neves et al., 2012; 2013). Todos estes trabalhos comprovaram a eficiência desta técnica para este fim. Os compostos químicos cuticulares funcionam como uma assinatura química e hoje sabe-se que possibilitam diferenciar castas, colônias e espécies (Antonialli-Junior et al., 2007, 2008; Neves et al., 2012, 2013).

Assim, atualmente tem se proposto investigar a composição de veneno de vespas sociais por meio de FTIR-PAS, já que é um método que tem mostrado ser confiável para análises de compostos químicos de insetos e que exige, em análises prévias, um menor número de glândulas, bem como um tempo reduzido para obtenção dos resultados comparando-se a outras técnicas.

## **OBJETIVO GERAL**

Analisar a variação intra e interespecífica da composição de veneno de Hymenoptera sociais pela técnica de FTIR-PAS.

## **HIPÓTESES**

Há variação da composição de veneno entre vespas sociais e formigas.

Há variação da composição de veneno entre populações diferentes de vespas sociais.

Fatores genéticos bem como ambientais são responsáveis pela variação do perfil químico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, M. A.; Omran, M. A. A.; Abdel-Nabi, I. M.; Ueda, H.; Mcvean, A. 2009. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. **Toxicon**, v.53, 349–359.
- Abdel-Rahman, M. A.; Omran, M. A.A.; Abdel-Nabi, I. M.; Nassier, O. A.; Schemerhorn, B. J. 2010. Neurotoxic and cytotoxic effects of venom from different populations of the Egyptian *Scorpio maurus palmatus*. **Toxicon**, v.55, 298–30.
- Antonialli-Junior, W. F.; Lima, S. M.; Andrade, L. H. C.; Suárez, Y. R. 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 492-499.
- Antonialli-Junior, W. F.; Suarez, Y. R.; Izida, T.; Andrade, L. H. C.; Lima, S. M. 2008. Intra and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 559–66.
- Badhe, R. V.; Thomas, A. B.; Harer, S. L.; Deshpande, A. D.; Salvi, N., Waghmare, A., 2006. Intraspecific variation in protein of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, Coconsis, Pocock) venoms from Western and Southern India. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.4, 612–619.
- Bell, A. G. 1880. On the production and reproduction of sound by light. **Am. J. Sci.**, v.20, n.305.
- Billen, J.; Morgan, E. D. 1998. Pheromone communication in social insects: sources and secretions. Cap. 1, 3-33. In: Meer, R. K. V.; Breed, M. D.; Espelie, K. E.;

Winston, M. L. **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites.** Westview Press, 388p.

- Brigatte, P.; Cury, Y.; Souza, B. M.; Baptista-Saidemberg, N. B.; Saidemberg, D. M.; Gutierrez, V. P.; Palma, M. S. 2011. Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of honeybee (*Apis mellifera*) and neotropical social wasps (*Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae*). **Amino Acids**, v.40, 101-111.
- Bruschini, C.; Cervo, R.; Protti, I.; Turillazzi, S. 2008. Caste differences in venom volatiles and their effect on alarm behaviour in the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ). **The Journal of Experimental Biology**, v.211, 2442-2449.
- Carpenter, J. M.; Marques, O. M. 2001. Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta; Hymenoptera; Vespoidea, Vespidae). Universidade Federal da Bahia. **Série publicações digitais**, v. 02.
- Castro, F. F. M.; Palma, M. S.; Braga, M. R. B.; Malaspina, O.; Lazaretti, J.; Baldo, M. A. B.; Antila, M. A.; Zuppi, L. J.; Cossermelli, W.; Croce, J. 1993. Caracterização dos componentes dos venenos de abelhas (*Apis mellifera*) e vespas (*Polistes versicolor*) e estudo da reatividade antigênica cruzada. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.16, n.4, 128-133.
- Castro, F.F.; Palma, M.S.; Brochetto-Braga, M.R.; Malaspina, O.; Lazaretti, J.; Baldo, M.A.; Antila, M.A.; Zuppi, L.J.; Croce, J.; Cossermelli, W. 1994. Biochemical properties and study of antigenic cross-reactivity between Africanized honey bee and wasp venom. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v.4, n.1, 37-41.
- Cologna, C. T.; Cardoso, J. S.; Jourdan, E.; Degueldre, M.; Upert, G.; Gilles, N.; Uetanabaro, A. P. T.; Neto, E. M. C.; Trovatti, P.; Pauw, E.; Quinton, L. 2013. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four diferente areas of Brazil. **Journal of proteomics**, n. 94, 413-422.
- Czaikoski, P. G.; Menaldo, D. L.; Marcussi, S.; Baseggio, A. L. C.; Fuly, A. L.; Paula, R. C.; Quadros, A. U., Romão, P. R. T.; Buschini, M. L. T. Cunha, F. Q.; Soares, A. M.; Monteiro, M. C. Anticoagulant and fibrinolytic properties of the venom of *Polybia occidentalis* social wasp. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 21, n.7, 653-659.

- Daltry, C. J.; Wuster, W.; Thorpe, S. R. 1997. The role of ecology in determining venom variation in the Malayan pitviper, *Calloselasma rhodostoma*. **Symposium of the Zoological Society of London**, v.70, 155–171.
- Edstrom, A. 1992. **Venomous and Poisonous Animals**. Malabar: Krieger Publishing Company, 210 p.
- Fox, E. G. P.; Pianaro, A.; Solis, D. R.; Delabie, J. H. C.; Vairo, B. C.; Machado, E. A.; Bueno, O. C. 2012. Intraspecific and intracolony variation in the profile of venom alkaloids and cuticular hydrocarbons of the fire ant *Solenopsis saevissima* Smith (Hymenoptera: Formicidae). **Psyche: A Journal of Entomology**, 1-10.
- Gallo, D., Nakano, O., Neto, S. S., Carvalho, R. P. L., Batista, G. C., Filho, E. B., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B., Vendramim, J. D., Marchini, L. C., Lopes, J. R. S., Omoto C. 2002. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, FEALQ. 920p.
- Gomes, L.; Desuó, I. C.; Gomes, G.; Giannotti, E. 2009. Behavior of *Ectatomma brunneum* (Formicidae: Ectatomminae) preying on dipterans in field conditions. **Sociobiology**, v. 53, n. 3.
- Greene, R. V.; Gordon, S. H.; Jackson, M. A.; Bennett, G. A. 1992. Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, 1144-1149.
- Grimaldi, D., Engel, M. S. 2005. **Evolution of the insects**. Cambridge. New Jersey. 788p.
- Izzo, A.; Wells, M.; Huang, Z.; Tibbetts, E. 2010. Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 64:857–864.
- Jacomini, D. L. J.; Pereira, F. D. C.; Pinto, J. R. A. S.; Santos, L. D.; Neto, A. J. S.; Giratto, D. T.; Palma, M. S.; Zollner, R. L.; Braga, M. R. B. 2013. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v.64, 70-80.
- Jeanne, R. L. 1991. “The swarm-founding Polistinae,” in **The social Biology of Wasps**, K. G. Ross and R. W. Matthews, Eds., pp. 191–231, Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Kempf, W. W. 1972. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, 15: 1-344.



- Kerr, E. L.; Atwood, J. G. 1968. The laser illuminated absorptivity spectrophone: a method for measurement of weak absorptivity in gases at laser wavelengths. **Applied Optics**, v.7, n. 915.
- Khidr, S. K.; Linforth, R. S. T.; Hardy, I. C. W. 2013. Genetic and environmental influences on the cuticular hydrocarbon profiles of *Goniozus* wasps. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 147: 175–185.
- King, T. P.; Lu, G.; Gozalez, M.; Quian, N. F.; Soldatova, L. 1996. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic-cross reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 98, 588-600.
- Kolarich, D.; Léonard, R.; Hemmer, W.; Altmann, F. 2005. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidase and the protein sequence of its major isoform in *Vespa vulgaris*. **FEBS Journal**, 272, 5182-5190.
- Lima, P. R. M.; Brochetto-Braga, M. R. 2003. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.9, p.149-162.
- Lin, C. H.; Tzen, J. T. C.; Shyu, C. L.; Yang, M. J.; Tu, W.C. 2011. Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan. **Peptides**, v.32, 2027-2036.
- Macalintal E. A., Starr C. K. 1996. Comparative morphology of the stinger in the social wasp genus *Ropalidia* (Hymenoptera: Vespidae). **Memoirs of the Entomological Society of Washington**, v.17, 108-150.
- Manzoli-Palma, M. S. C.; Gobbi, N. 1997. Muscles-bearing of sting apparatus in social wasp and their relationship with the autotomy (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). **Journal of Advanced Zoology**, v. 18, 1-6.
- Mateus, S. 2011. Observations on forced colony emigration in *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini): New nest site marked with sprayed venom. **Psyche: A Journal of Entomology (Cambridge)**, 1-8.
- Mortari, M. R.; Cunha, A. O. S.; Oliveira, L.; Vieira, E. B.; Gelfuso, E. A.; Coutinho-Netto, J.; Santos, W. F. 2007a. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.97, 289–295.a
- Mortari, M. R. Cunha, A. O. S.; Carolino, R. O. G.; Coutinho-Netto, J.; Tomaz, J. C.; Lopes, N. P.; Coimbra, N. C.; Santos, W. F. 2007b. Inhibition of acute



- nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, 860–869.b
- Neves, E. F.; Andrade, L. H. C.; Suarez, Y. R.; Lima, S. M.; Antonialli-Junior, W. F. 2012. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.3, 1891-1898.
- Neves, E. F.; Montagna, T. S.; Andrade, L. H.; Suarez, Y. R.; Lima, S. M.; Antonialli-Junior, W. F. 2013. Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.86, n.1, 69-77.
- Noll, F. B.; Zucchi, R. 2000. Increasing caste differences related to life cycle progression in some neotropical swarm-founding polygynic polistine wasps (Hymenoptera Vespidae Epiponini). **Ethology Ecology & Evolution**, 12: 43-65.
- Orivel, J.; Dejean, A. 2001. Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae). **Toxicon**, 39, 195-201
- Ortiz, G.; Camargo-Mathias, M. I. 2006. Venom gland of *Pachycondyla striata* worker ants (Hymenoptera: Ponerinae). Ultrastructural characterization. **Micron**, 37: 243-248.
- Palma M.S. 2006. **Insect Venom Peptides**. In: *Kastin A.J. (Org.)*. The Handbook of Biologically Active Peptides. Oxford: Ed. Academic Press, 409–416.
- Patel, C. K. N. 1978. Use of Vibrational Energy Transfer for Excited-State Optoacoustic Spectroscopy of Molecules. **Physical Review Letters**, 40: 535 – 538.
- Paula, L.; Santos, W. F.; Malheiro, A.; Carlos, D.; Faccioli, L. H. 2006. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a model of *Polybia paulista* venom-induced inflammation. **International Immunopharmacology**, n.6, 182–189.
- Pinto, J. R. A. S.; Santos, L. D.; Arcuri, H. A.; Dias, N. B.; Palma, M. S. 2012. Proteomic characterization of the hyaluronidase (E.C. 3.2.1.35) from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Protein & Peptide Letters**, v.19, 625-635.
- Rafael, J. A., Melo, G. A. R., Carvalho, C. J. B., Casari, A. S., Constantino, R. 2012. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 810p.

- Richards, O. W. 1978. **The social wasps of America excluding the Vespinae**. London, British Museum (Natural History), 580 p.
- Richards, O. W.; Richards, M. J. 1951. Observations on the social wasps of South America (Hymenoptera, Vespidae). **Transactions of the Entomological Society of London**. 102: 1–170.
- Rocha, T.; Souza, B. M.; Palma, M. S.; Cruz-Höfling, M. A. 2007. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. **Toxicon**, v. 50, 589-599.
- Santos, L.D.; Santos, K.S.; Pinto, J.R.A.S.; Dias, N.B.; Souza, B.M.; Santos, M.F.; Perales, J.; Domont, G.B.;Castro, F.M.; Kalil, J.E.; Palma, M.S. 2010. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: A clue to understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research**, 9, 3867-3877.
- Santos, L. D.; Menegasso, A. R. S.; Pinto, J. R. A. S.; Santos, K. S.; Castro, F. M.; Kalil, J. E.; Palma, M. S. 2011. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Proteomics**, v.11, 1403-1412.
- Savitzky, A. H.; Mori, A.; Hutchinson, D. A.; Saporito, R. A.; Burghardt, G. M.; Lillywhite, H. B.; Meinwald, J. 2012. Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. **Chemoecology**, v.22, 141–158.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. 2002. **Princípios de análise instrumental**. 5a edição. Porto Alegre: Editora Bookman.
- Somavilla, A.; Oliveira, M. L.; Silveira, O. T. 2012. Guia de identificação de vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) na Reserva Ducke, Manaus, Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.56, n.4.
- Souza, B. M.; Marques, M. R.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Palma, M. S. 2004. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n.18, 1095-1102.
- Souza, B. M.; Mendes, M. A.; Santos, L. D.; Marques, M. R.; César, L. M. M; Almeida, R. N. A.; Pagnocca, F. C.; Konno, K.; Palma, M. S. 2005. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, n.26, 2157–2164.

- Triplehorn, C. A., Johnson, N. F. 2011. **Estudo dos insetos**. Cengage Learning, São Paulo. 809p.
- Veingerov, M. L. 1938. Eine methode der gasanalyse beruhend auf dem optisch-akustischen Tyndall-R'ntgeneffekt. **Doklady Akademii Nauk SSSR**, v.19, n.687.
- Wenzel, J. W. 1998. A generic key to the nests of hornets, yellowjackets, and paper wasps worldwide (vespidae: Vespinae, Polistinae). **American Museum novitates**, n. 3224, p. 1-39. American Museum novitates ; no. 3224
- Wilson, E. O. 1971. **The insect societies**. Cambridge, Belknap Press, 548p.

# CAPÍTULO I

## Diferenças inter e intraespecíficas da composição de veneno de formigas e vespas sociais pela técnica de FTIR-PAS

Angélica Mendonça<sup>1\*</sup>; Rafaella Caroline Bernardi<sup>2</sup>; Ellen Liciane Barbosa Firmino<sup>2</sup>; Denise Sguarizi Antônio<sup>2</sup>; Wedson Desidério Fernandes<sup>1</sup>; William Fernando Antonialli Junior<sup>1,2,3</sup>; Sandro Marcio Lima<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

<sup>3</sup>Centro Integrado de Análise e Monitoramento Ambiental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

\*Endereço para correspondência: angel\_biol@yahoo.com.br

### Resumo

Os Hymenoptera sociais além de produzirem diversos tipos de compostos químicos que servem para mediar interações em suas colônias, também sintetizam compostos que servem para captura de presa e defesa da colônia, denominados de veneno. No entanto, o conhecimento sobre a composição destes compostos ainda é limitado, pelas dificuldades de obtenção das amostras, sua análise e complexidade dos compostos. Para tentar superar estas dificuldades, recentemente, tem se usado para análise de compostos químicos de insetos a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS). Assim, este trabalho teve por objetivo investigar a variação da composição do veneno entre a vespa *Polybia paulista* e a formiga *Ectatomma brunneum* por meio da técnica de FTIR-PAS. Amostras destas espécies de vespa e formiga foram coletadas nas mesmas áreas e tipos de ambientes. Os resultados demonstram que formigas e vespas apresentam diferenças na composição de seus venenos, mesmo entre amostras de um mesmo ambiente. Desta forma, o componente genético parece ser preponderante para determinar os compostos encontrados em uma e outra espécie. Por outro lado, os resultados também demonstram que fatores exógenos, como a dieta, também devem ser responsáveis pelas diferenças intraespecíficas, sobretudo em vespas. Além disso, a técnica de FTIR-PAS mostrou-se confiável para

avaliar as diferenças intra e interespecíficas da composição de veneno de Hymenoptera sociais.

**Palavras-chave:** *Polybia*, *Ectatomma*, Componente genético, Componentes exógenos, Infravermelho médio.

## **Inter and intraspecific differences in the composition of ants and social wasps venom by FTIR-PAS technique**

### **Abstract**

The social Hymenoptera, besides producing several types of chemical compounds that serve to mediate interactions in their colonies, also synthesize compounds that serve to capture prey and defense, called venom. However, knowledge about the composition of these compounds is still limited by the difficulties of obtaining samples and their analysis. To try to overcome these difficulties, recently, it has been used for analysis of chemical compounds the Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy (FTIR-PAS) technique. Thus, this work aimed to investigate the variation in the composition of the venom between the wasp *Polybia paulista* and the ant *Ectatomma brunneum* by FTIR-PAS technique. Samples of these species of wasp and ant were collected in the same areas and types of environments. The results show that ants and wasps differ in the composition of their venoms, even among samples from the same environment. Thus, the genetic component appears to be preponderant to determine the compounds found in one or another species. On the other hand, the results also demonstrate that exogenous factors, such as diet, might also be responsible for intraspecific differences, particularly in wasps. In addition, the FTIR-PAS technique proved to be reliable to assess intra and interspecific differences in the composition of social Hymenoptera venom.

**Key-words:** *Polybia*, *Ectatomma*, Genetic component, Exogenous components, Spectroscopy.

## INTRODUÇÃO

Os Hymenoptera são compostos por vespas, abelhas, formigas e sawflies, constituindo umas das maiores ordens de insetos, que é composta em sua grande parte, pelos denominados insetos eusociais, os quais apresentam três características básicas para a eussociedade: a divisão reprodutiva de trabalho, cuidado cooperativo da prole e sobreposição de gerações (Wilson, 1971).

Para que a divisão de trabalho dentro da colônia seja eficiente, estes organismos desenvolveram ao longo de sua evolução um eficiente sistema de comunicação com o uso de diversos sinais, entre eles os visuais, sonoros, de tatos e, sobretudo, os sinais químicos sendo, portanto, capazes de sintetizar substâncias, os denominados feromônios, que os permitem o reconhecimento, interação e comunicação entre os indivíduos da colônia (Izzo et al. 2010; Khidr et al. 2013).

Entre os feromônios cabe destacar alguns tipos como: o feromônio sexual para atrair parceiros durante a cópula; feromônio de alarme que tem a função de informar a aproximação de um inimigo; feromônio de marcação de trilha que demarca o caminho até uma fonte de alimento; feromônio de defesa que serve para avisar aos indivíduos da colônia que devem atacar o intruso e feromônio de agregação que atrai os membros da colônia para uma fonte de alimento ou novo local para nidificação (Billen e Morgan, 1998). e feromônios de superfície que atua como uma assinatura característica para cada espécie, colônia e casta (Antoniali- Junior et al., 2007, 2008; Neves et al., 2012, 2013).

Outro traço importante dos Hymenoptera, nos Aculeata, é a presença do ferrão que injeta veneno em presas e inimigos. Este aparelho de ferrão é uma modificação do aparelho ovipositor de grupos ancestrais. Os ovos desses himenópteros são depositados através de uma abertura na base do ferrão ao invés de passar por todo o aparelho ferroador, sendo o ferrão um par afiado e rígido de gonapófises, cuja base contém um reservatório de veneno (Grimaldi e Engel, 2005).

O aparelho de ferrão é formado por duas partes funcionalmente diferentes: a parte glandular, na qual o veneno e outras substâncias são produzidos, e a parte motora, onde estruturas quitinosas e musculares atuam conjuntamente na protrusão/extrusão do ferrão, ejetando o veneno (Manzoli-Palma e Gobbi, 1997). Sua função primária é a captura de presas, porém se tornou um eficiente meio de intimidação, sobretudo para

vertebrados e adquiriu importante função de defesa, principalmente nas espécies sociais (Macalintal e Starr, 1996).

Além disso, em trabalho realizado por Mateus (2011) com *Parachartergus fraternus*, o autor observou que vespas do gênero *Parachartergus* utilizam o veneno para marcar um novo local para a fundação da colônia, antes do início da migração, assim o veneno também é utilizado na comunicação entre os indivíduos.

O veneno é constituído de um verdadeiro coquetel de substâncias, que são selecionados para a sobrevivência das espécies (Abdel-Rahman et al., 2009). Em particular, o veneno de Hymenoptera é constituído por complexos de moléculas orgânicas, proteínas, peptídeos, lipídeos, amins vasoativas (norepinefrina, histamina e dopamina) e enzimas como fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (Edstron, 1992; Lima e Brochetto-Braga, 2003), contudo, pode ser composto predominantemente por aminoácidos ou uma mistura complexa de compostos de baixa massa molecular (Palma, 2006).

No entanto, o conhecimento sobre a composição do veneno em Hymenoptera, em geral é, ainda muito limitado, pois há dificuldades para se obter quantidades suficientes que permita a realização de determinados estudos (Lima e Brochetto-Braga, 2003; Favreau et al. 2006;). Além disso, a produção de veneno por parte de alguns organismos é consideravelmente baixa, já que algumas espécies apresentam populações com apenas algumas dezenas de indivíduos, havendo, portanto, uma disponibilidade limitada de material para análise (Souza et al. 2004), e conseqüentemente, a inviabilidade para realização dos estudos.

Os métodos mais utilizados para investigar a composição do veneno em Hymenoptera, bem como em outros tipos de organismos, são a cromatografia líquida e a gasosa (Santos et al., 2011; Pinto et al., 2012; Cologna et al., 2013; Jacomini et al., 2013). Contudo, um método que já vem sendo usado para análise de compostos químicos em himenópteros sociais (Antonialli- Junior et al., 2007, 2008; Neves et al., 2012, 2013) é a Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, “Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy”).

Esta técnica (FTIR-PAS) é uma medida da radiação na faixa espectral do infravermelho médio absorvida pela amostra, proporcionado a aplicação em materiais de grande fragilidade como materiais biológicos, como também em medidas de amostras com dimensões reduzidas e em relativamente pouco tempo, comparando-se a outras técnicas utilizadas para esta finalidade, pelo fato de não empregar métodos

ópticos dispersivos na sua varredura espectral, de forma que a obtenção dos espectros pode ser realizada em poucos minutos, (Greene et al., 1992).

Vespa social *Polybia paulista* Von Ihering, 1896, tem ampla distribuição na América do Sul (Richards, 1978). De acordo com Carpenter e Marques (2001) este gênero apresenta ninhos fragmocítaros que não possuem pedicelo, portanto, o favo inicial fixa-se diretamente ao substrato, apresentando um invólucro protetor construído ao redor. Além disso, o ninho apresenta apenas um orifício de entrada localizado na parte inferior (Wenzel, 1998; Carpenter e Marques, 2001).

A formiga *Ectatomma brunneum* Smith, 1858 apresenta ampla distribuição na região Neotropical, ocorrendo desde o Panamá até a Argentina (Kempf, 1972). É uma espécie predadora generalista que possuem ferrões bem desenvolvidos. Os ninhos são construídos no chão sendo sua abundância perceptível em campos abertos ou áreas degradadas como pastagens, plantações, gramíneas, estradas não pavimentadas e clareiras (Gomes et al., 2009).

Uma vez que a variação da composição de venenos de vespas sociais e formigas ainda é pouco conhecida, sobretudo, pelas dificuldades de obtenção de amostras, sua análise e a complexidade dos compostos, este trabalho teve por objetivo investigar a variação inter e intraespecífica da composição do veneno da vespa *Polybia paulista* e a formiga *Ectatomma brunneum* por meio da técnica de FTIR-PAS, além de demonstrar a importância taxonômica do veneno destes Hymenoptera.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Coleta dos dados*

Para comparar a variação inter e intraespecífica da composição do veneno da vespa social *P. paulista* e a formiga *E. brunneum*, foram coletadas cinco colônias da vespa *P. paulista* no município de Dourados-MS, sendo três na área A, situada na Cidade Universitária campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (22°11'50.1"S; 54°55'48.5"W) e duas colônias na área B, situada na área central do município de Dourados (1° colônia: 22°14'38.8"S; 054°49'36.6"W) e (2° colônia: 22°15'23.5"S; 054°47'59.1"W).

Para a coleta das colônias foram utilizados sacos plásticos que envolvia todo o ninho, o qual, em seguida era desprendido do substrato no qual estavam fixados. De



cada colônia coletada da respectiva área, foram utilizadas entre 25 e 40 vespas para realização das leituras.

A colônia toda era anestesiada em laboratório pela ação de baixa temperatura através do congelamento, em seguida todos os indivíduos foram acondicionados em eppendorfs.

Foram coletadas forrageadoras de formigas da espécie *E. brunneum* nas mesmas áreas A e B. Todo o procedimento de captura dos indivíduos foi realizado por coleta ativa e aleatória, dentro das duas áreas e diversificando os locais de captura a fim de obter uma maior representação da população local. De cada uma das áreas foram coletadas 100 forrageadoras.

Os procedimentos de anestesiamento e armazenamento foram similares aos adotados para as amostras de vespas.

### ***Técnica de FTIR-PAS***

As análises da composição do veneno das duas espécies de Hymenoptera foram realizadas pela técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS). Os indivíduos foram dissecados com auxílio de lupa e pinças e suas glândulas de veneno com os reservatórios de armazenamentos foram extraídos puxando se o ferrão, em seguida todo o conteúdo foi colocado em um suporte característico da célula fotoacústica, imediatamente após a extração para evitar a degradação proteica.

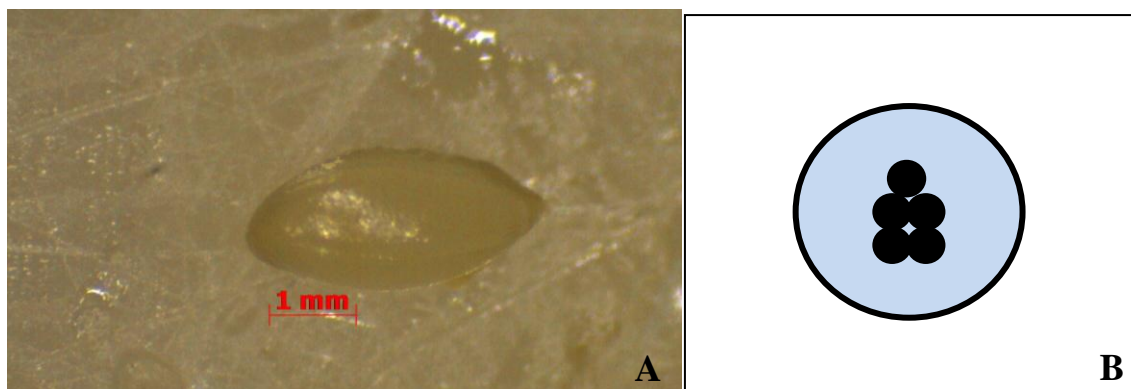
O FTIR-PAS foi realizado com um Espectrofotômetro Thermo-Nocolet Nexus 670 (figura 1) combinado com um detector Fotoacústico (MTEC-300). Esta técnica mede a radiação absorvida pela amostra e convertidas em calor, o processo é realizado na região espectral do infravermelho médio que compreende de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  que abrange a região conhecida como impressão digital (na faixa de 1500 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Esta região é sensível as vibrações e rotações de grupos químicos moleculares, o que possibilita identificar e distinguir grupos de radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas nas respectivas amostras, sendo este, o aspecto mais vantajoso desta técnica (Smith 1999); além de ser relativamente rápida e de fácil manuseio (Skoog et al., 2002).



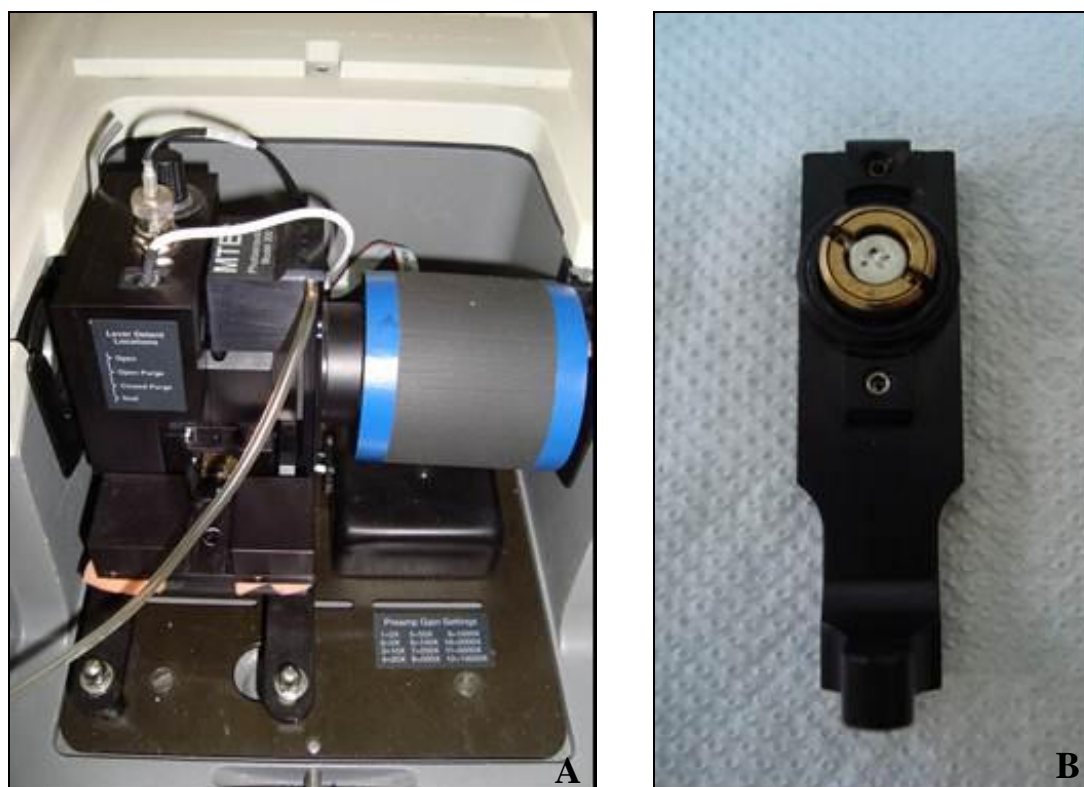
**Figura 1.** Espectrofotômetro com Transformada de Fourier utilizado para análise do veneno. **Fonte:** Mendonça, A.

Foram realizadas em torno de 15 leituras para cada área de cada uma das espécies, sendo que cada leitura era a soma de 5 glândulas e os reservatórios de venenos das operárias (figura 2A). Estas glândulas foram dispostas lado a lado no centro do suporte da célula fotoacústica, com uma leve sobreposição entre elas, de modo a preencher o maior espaço possível, sendo pressionadas levemente no suporte até expelir o seu conteúdo (figura 2B), otimizando assim o sinal captado.

A célula fotoacústica foi purgada com gás hélio antes de cada leitura com o objetivo de maximizar o sinal fotoacústico, retirando o  $\text{CO}_2$  e vapor de água do interior do espectrofotômetro (figura 3).



**Figura 2.** **A** – Glândula de veneno e seu reservatório, da vespa *Polybia paulista*. **B** – Esquema representativo da disposição das glândulas de veneno e seus reservatórios no suporte do aparelho, este suporte é conhecido como “cadinho”. **Fonte:** Mendonça, A.



**Figura 3.** **A** – Célula fotoacústica, **B** – suporte da célula fotoacústica mostrado em detalhe. **Fonte:** Mendonça, A.

O espectro resultante de cada análise foi obtido pela média de 128 varreduras (“scans”) com resolução espectral de  $16 \text{ cm}^{-1}$ . Antes da leitura dos espectros das amostras, foi utilizada uma amostra preta de carbono como referência (“background”)

para a normalização da intensidade espectral, de modo que novos espectros de referência foram realizados a cada 100 minutos.

Após a obtenção de todos os espectros estes foram normalizados, a fim de possibilitar uma análise comparativa entre as duas espécies de Hymenoptera.

### ***Análise estatística***

Os dados foram processados com o auxílio do Software Origin 8, sendo que as diferenças inter e intraespecífica da composição de veneno das duas espécies foram avaliadas pela função discriminante (DFA – *Discriminant Function Analysis*), indicada porque revela um conjunto de variáveis que melhor diferenciam os grupos avaliados (Quinn e Keough, 2002).

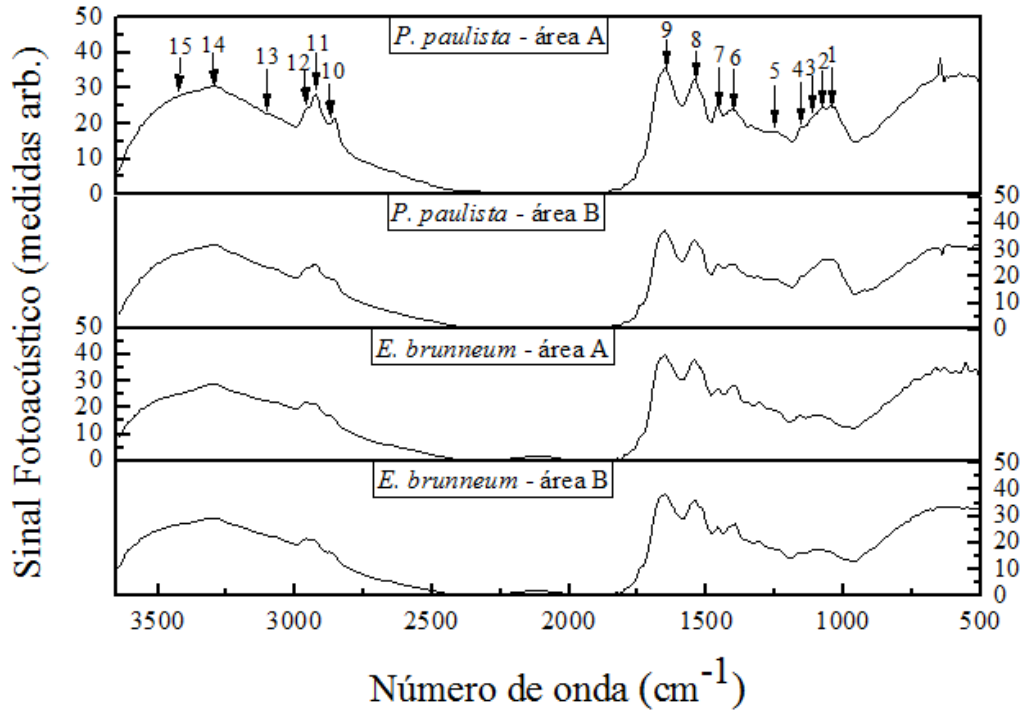
Nesta análise a variável Wilks's Lambda é utilizada como medida da diferença entre os grupos, sendo que valores próximos a zero indicam que os grupos não se sobrepõem, enquanto, valores próximos a 1 indicam elevada sobreposição entre os grupos e conseqüentemente, inexistência de diferença significativa entre eles (Manly, 2008).

A distância de Mahalanobis ao quadrado foi utilizada para percepção das diferenças entre as espécies analisadas.

As análises estatísticas foram computadas pelos programas Statistica 7 e Systat 12.

## **RESULTADOS**

Os espectros médios dos venenos de *P. paulista* e *E. brunneum* analisados por FTIR-PAS estão apresentados na figura 4 e nela estão apontados 15 grupos funcionais que estão listados na tabela 1, na qual constam os números de onda e modos vibracionais correspondentes, identificados a partir de dados reportados na literatura para estes compostos (Lin-vien et al., 1991; Smith, 1999).



**Figura 4.** Espectros médios obtidos da leitura das glândulas e reservatórios de veneno de *P. paulista* e *E. brunneum* gerados por FTIR-PAS, com a indicação dos 15 picos de maior relevância para as análises estatísticas.

Por meio da inspeção visual dos espectros médios obtidos é possível detectar diferenças entre vespas e formigas, principalmente quando avalia-se as faixas de 1200 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ , 1400 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  e entre 3000 a 2900  $\text{cm}^{-1}$  (figura 4). Essas diferenças, de acordo, com as análises estatísticas, de fato foram significativas com Wilk's Lambda= 0.005, indicando que o veneno das vespas e formigas analisadas são bem distintos,  $F= 14.347$  e  $p < 0.001$ .

Os resultados revelam que a primeira raiz canônica explica 98.8% destas diferenças. Sendo que dos 15 picos de maior relevância apenas 4 picos foram significativos para separação dos grupos, correspondendo aos picos 1, 2, 4 e 15 (1041, 1079, 1157 e 3425) (figura 4 e tabela 1).

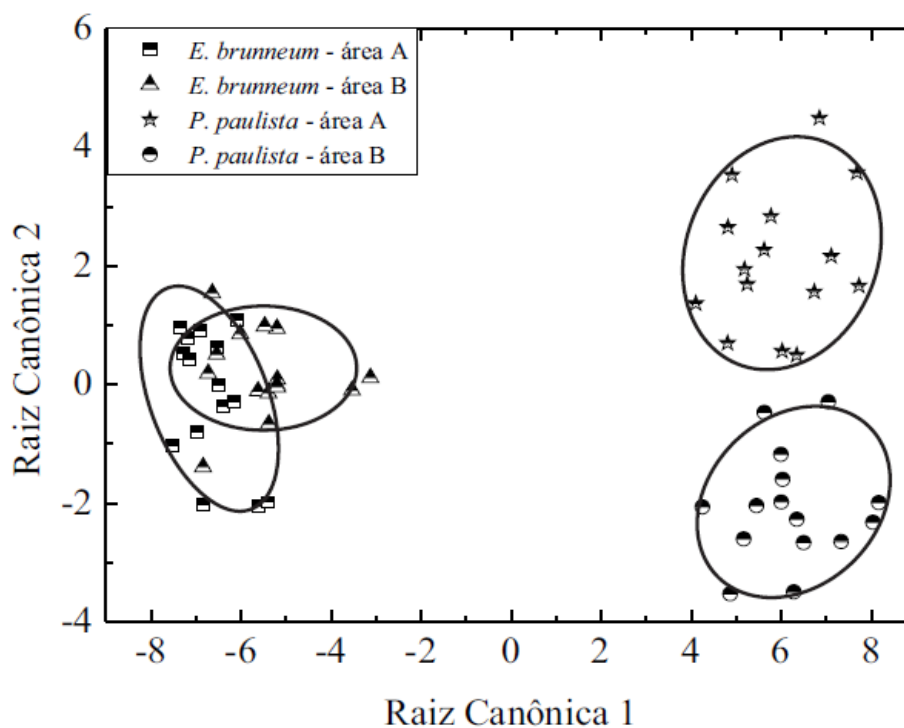
**Tabela 1.** Relação dos 15 principais grupos funcionais e seus respectivos modos de vibração selecionados para análise estatística. \* picos estatisticamente significativos para separação dos grupos.

<b>Pico</b>	<b>Número de Ondas (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>	<b>Modo vibracional</b>
1*	1041	CH	Dobramento no plano
2*	1079	CH	Dobramento no plano
3	1110	CH	Dobramento no plano
4*	1157	CH	Dobramento no plano
5	1241	CH <sub>3</sub> -CO	Estiramento Simétrico
6	1396	O-CH <sub>2</sub>	Torção fora do Plano
7	1457	O-CH <sub>2</sub>	Tesoura
8	1542	NH e ou CN (Amida II)	Torção no Plano e/ou Estiramento assimétrico
9	1650	C=N (Amida I)	Estiramento
10	2877	CH <sub>3</sub>	Estiramento Simétrico
11	2931	CH <sub>2</sub>	Estiramento Assimétrico
12	2962	CH <sub>3</sub>	Estiramento Assimétrico
13	3093	NH	Flexão harmônica
14	3293	NH	Estiramento
15*	3425	OH	Estiramento

A distância de Mahalanobis ao quadrado (tabela 2) confirma que a composição de veneno de *P. paulista* e *E. brunneum* diferem estatisticamente com um  $p < 0.001$ . Esta análise revela que apesar de vespas e formigas da área B nidificarem no mesmo tipo de ambiente, a composição de veneno foi distinta entre as espécies. O mesmo também ocorre quando compara-se as amostras de vespas e formigas que ocorrem na área A (figura 5).

**Tabela 2.** Distância de Mahalanobis ao quadrado entre os grupos de *E. brunneum* e *P. paulista*, comparando a composição de veneno entre os indivíduos coletados em duas diferentes áreas do município de Dourados-MS.

	<i>E. brunneum</i> área A	<i>E. brunneum</i> área B	<i>P. paulista</i> área A	<i>P. paulista</i> área B
<i>E. brunneum</i> área A	0.000	4.828	164.415	169.783
<i>E. brunneum</i> área B	4.828	0.000	134.794	142.218
<i>P. paulista</i> área A	164.415	134.794	0.000	17.555
<i>P. paulista</i> área B	169.783	142.218	17.555	0.000



**Figura 5.** Gráfico de dispersão mostrando a diferenciação da composição de veneno entre *P. paulista* e *E. brunneum* coletadas em duas diferentes áreas do município de Dourados-MS.

## DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a composição do veneno de vespas e formigas que ocorrem em um mesmo tipo de ambiente são significativamente diferentes. Portanto, estas diferenças devem ser por conta da componente genético, afinal, trata-se de insetos pertencentes a famílias distintas dentro dos Hymenoptera.

Considerando-se as diferenças da composição de veneno entre estas espécies, em trabalho realizado com serpentes, Daltry et al. (1996) observou que indivíduos nascidos em cativeiro apresentam composições de veneno idênticas aos das espécimes selvagens da mesma localidade de origem, e sugeriu que a associação entre o veneno e a presa é uma característica herdada e não induzida pelo ambiente.

No entanto, o veneno é uma mistura complexa e desta maneira, sua variação não pode ser atribuída a um único fator, já que alguns pesquisadores (Tsai et al., 2004; Badhe et al., 2006; Abdel-Rahman et al., 2009, 2011; Cologna et al., 2013) também relatam em seus estudos que além dos fatores genéticos, os ambientais como a variação geográfica e as diferenças climáticas podem afetar a distribuição de alimento e conseqüentemente, influenciar a dieta dos organismos, de forma que o ambiente também exerça influência sobre a composição de veneno.

Ainda assim, deve-se ressaltar que os componentes genéticos podem ser determinantes na composição de veneno (Menezes et al. 2006). De fato, os resultados apresentados aqui corroboram os de Badhe et al. (2006) que avaliou a atuação de fatores genéticos sobre as diferentes populações de escorpiões vermelhos *Mesobuthus tamulus*, sugerindo a existência de variação genética entre as populações, entretanto, o autor concluiu que as condições ambientais afetam significativamente a letalidade do veneno.

Por outro lado, ao observar a figura 5, é possível perceber que vespas da área A e B, estão mais distantes, comparados aos resultados das mesmas áreas de *E. brunneum*. Estes resultados provavelmente podem estar relacionados aos recursos alimentares que cada espécie utiliza. Vespas predam com frequência larvas de Lepidoptera (Giannotti et al. 1995; Prezoto et al.; 2006; Bichara Filho et al., 2009; Fernandes et al., 2010), o que deve acarretar em diferenças mais acentuadas nas duas áreas, de acordo com a disposição de presas deste tipo em cada área. Já *E. brunneum*, assim como outras formigas deste gênero predam uma diversidade maior de presas (Overal 1986; Giannotti e Machado 1992; Marques et al., 1995), o que pode levar a uma “diluição” das diferenças entre as amostras das duas áreas.



Por outro lado, Canevazzi e Noll (2011) avaliando itens alimentares coletados por forrageadoras de *P paulista*, concluíram que o material líquido (água e néctar) foram sempre mais coletados (cerca de 55% a 80%) que outros itens alimentares, sendo que a coleta de presas foi sempre menos frequente. Além disso, alguns autores (Andrade e Prezoto, 2001; Resende et al., 2001; e Elisei et al., 2008) relatam em seus estudos sobre forrageamento de vespas, que o néctar é o componente mais coletado nos diversos períodos do ano. Cabe ainda ressaltar que adultos tanto de vespas, quanto de formigas se alimentam mais frequentemente de carboidratos, disponíveis no néctar coletado de plantas.

Deve se ponderar que as vespas, diferentemente das formigas, forrageam voando, o que acarreta em um raio de ação maior comparado ao de formigas. Portanto, a diversidade de plantas visitadas por um grupo comparado ao outro é relativamente maior, o que pode influenciar na composição de seus venenos.

Em estudo realizado com formiga *Dinoponera quadriceps* de quatro regiões diferentes, Cologna et al. (2013) observou que o veneno dos indivíduos que foram coletados em áreas próximas são mais similares comparados aos de regiões distantes. Além disso, este mesmo estudo revelou que dos 335 compostos encontrados, apenas 4 foram compartilhados entre as formigas, indicando que a composição de veneno é influenciada significativamente pelo ambiente. A variação na composição de veneno de acordo com a localidade também foi observada por Abdel-Rahman (2008) e Abdel-Rahman et al. (2009) em escorpiões *Maurus palmatus*.

De fato, estudos revelam que alguns animais, podem sintetizar o veneno a partir de precursores ou sequestrarem os elementos químicos do ambiente através da dieta para compor seu veneno (Savitzky et al., 2012). Portanto, fatores ambientais influenciam significativamente na composição de veneno dos organismos.

Assim, fica claro que as duas espécies sintetizam elementos significativamente diferentes para compor seus venenos. Estas diferenças tem base genética, contudo, como relatado na literatura os fatores exógenos também podem ser determinantes para compor as diferenças entre o veneno de diferentes populações de uma espécie, sobretudo, neste caso o de vespas sociais.

## CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que formigas e vespas apresentam diferenças claras na composição de seus venenos, mesmo entre amostras de um mesmo ambiente. Portanto, o componente genético parece ser preponderante para determinar os compostos encontrados em uma e outra espécie. Isto prova que a composição de veneno varia de uma família para outra nos Hymenoptera e pode, portanto, ser usado de certa forma como ferramenta taxonômica auxiliar. Por outro lado, fatores exógenos, como a dieta, em diferentes ambientes devem ser responsáveis pelas diferenças intraespecíficas, sobretudo em vespas. A técnica de FTIR-PAS, assim como em trabalhos com compostos químicos cuticulares mostrou-se confiável e eficaz para avaliar as diferenças da composição de veneno de Hymenoptera sociais.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a CAPES pela concessão da bolsa de metrado ao primeiro autor, ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade de William Fernando Antonialli-Junior, ao Dr. Orlando Tobias Silveira do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pela confirmação das espécies de vespas e a UEMS pelo suporte técnico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, M. A. 2008. Intraspecific diversity of scorpions venom and its implication in the pathophysiological effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.14, n.1, 191-192.
- Abdel-Rahman, M. A.; Omran, M. A. A.; Abdel-Nabi, I. M.; Ueda, H.; Mcvean, A. 2009. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. **Toxicon**, v.53, 349–359.
- Abdel-Rahman, M. A.; Abdel-Nabi, I. M.; El-Naggar, M. S.; Abbas, O. A.; Strong, P. N. 2011. Intraspecific variation in the venom of the vermivorous cone snail *Conus vexillum*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 154, 318–325.

- Andrade, F. R.; Prezoto, F. 2001. Horários de atividade forrageadora e material coletado por *Polistes ferreri* Saussure 1853 (Hymenoptera, Vespidae), nas diferentes fases de seu ciclo biológico. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 3, n. 1, 117–128.
- Antonialli-Junior, W. F.; Lima, S. M.; Andrade, L. H. C.; Suárez, Y. R. 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, 492-499.
- Antonialli-Junior, W. F.; Suarez, Y. R.; Izida, T.; Andrade, L. H. C.; Lima, S. M. 2008. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, 559–66.
- Badhe, R. V.; Thomas, A. B.; Harer, S. L.; Deshpande, A. D.; Salvi, N., Waghmare, A., 2006. Intraspecific variation in protein of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, Coconsis, Pocock) venoms from Western and Southern India. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.4, 612–619.
- Bichara Filho, C. C.; Santos, G. M. M.; Resende, J. J.; Cruz, J. D.; Gobbi, N.; Machado, V. L. L. 2009. Foraging behavior of the swarm-founding wasp, *Polybia (Trichothorax) sericea* (Hymneoptera, Vespidae): prey capture and load capacity. **Sociobiology**, v. 53, n. 1, 61-69.
- Billen, J.; Morgan, E. D. 1998. Pheromone communication in social insects: sources and secretions. Cap. 1, 3-33. In: Meer, R. K. V.; Breed, M. D.; Espelie, K. E.; Winston, M. L. **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Westview Press, 388p.
- Breed, M. D.; Stiller, T. M.; Moor, M. J. 1998. The ontogeny of kin discrimination cues in the honeybee, *Apis mellifera*. **Behavior Genetics**, v. 18, 439-448.
- Canevazzi, N. C. S.; Noll, F. B. 2011. Environmental factors influencing foraging activity in the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini). **Psyche: A Jornal of Entomology**, 1-8.
- Carpenter, J. M.; Marques, O. M. 2001. Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta; Hymenoptera; Vespoidea, Vespidae). Universidade Federal da Bahia. **Série publicações digitais**, v. 02.

- Cologna, C. T.; Cardoso, J. S.; Jourdan, E.; Degueldre, M.; Upert, G.; Gilles, N.; Uetanabaro, A. P. T.; Neto, E. M. C.; Trovatti, P.; Pauw, E.; Quinton, L. 2013. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four diferente areas of Brazil. **Journal of proteomics**, n. 94, 413-422.
- Daltry, J. C.; Wüster, W.; Thorpe, R. S. 1996. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v.379, 537-540.
- Edstrom, A. 1992. **Venomous and Poisonous Animals**. Malabar: Krieger Publishing Company, 210 p.
- Elisei, T.; Ribeiro, C.; Guimarães, D. L.; Prezoto, F. 2005. Foraging activity and nesting of swarm-founding wasp *Synoeca cyanea* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). **Sociobiology**, v. 46, n. 2, 317–327.
- Favreau, P.; Menin, L.; Michalet, S.; Perret, F.; Cheneval, O.; Stöcklin, M.; Bulet, P.; Stöcklin, R. 2006. Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. **Toxicon**, v. 47, n. 6, 676-687.
- Fernandes, F. L.; Sena, F. M. E.; Picanco, M. C.; Geraldo, G. C.; Demuner, A. J.; Silva, R. S. 2010. Coffee volatiles and predatory wasps (Hymenoptera: Vespidae) of the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Sociobiology**, v.56, 455-464.
- Giannotti, E.; Machado, V. L. L. 1992. Notes on the foraging of two species of Ponerinae ants: Food and resources and daily hunting activities (Hymenoptera: Formicidae). **Bioikos**, v. 6, 7-17.
- Giannotti, E., Prezoto, F.; Machado, V. L. L. 1995. Foraging activity of *Polistes lanio lanio* (Fabr.) (Hymenoptera: Vespidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **24**,455-463.
- Gomes, L.; Desuó, I. C.; Gomes, G.; Giannotti, E. 2009. Behavior of *Ectatomma brunneum* (Formicidae: Ectatomminae) preying on dipterans in field conditions. **Sociobiology**, v. 53, n. 3.
- Greene, R. V.; Gordon, S. H.; Jackson, M. A.; Bennett, G. A. 1992. Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, 1144-1149.
- Grimaldi, D.; Engel, M. S. 2005. **Evolution of the insects**. Cambrige. New Jersey. 788pp.

- Izzo, A.; Wells, M.; Huang Z.; Tibbetts, E. 2010. Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 64:857–864.
- Jacomini, D. L. J.; Pereira, F. D. C.; Pinto, J. R. A. S.; Santos, L. D.; Neto, A. J. S.; Giratto, D. T.; Palma, M. S.; Zollner, R. L.; Braga, M. R. B. 2013. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v.64, 70-80.
- Kempf, W. W. 1972. Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, 15: 1-344.
- Khidr, S. K.; Linforth, R. S. T.; Hardy, I. C. W. 2013. Genetic and environmental influences on the cuticular hydrocarbon profiles of *Goniozus* wasps. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 147: 175–185.
- Lima, P. R. M.; Brochetto-Braga, M. R. 2003. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.9, p.149-162.
- Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. 1991. **Infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules**. Academic Press, San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto, p. 156.
- Macalintal, E. A., Starr, C. K. 1996. Comparative morphology of the stinger in the social wasp genus *Ropalidia* (Hymenoptera: Vespidae). **Memoirs of the Entomological Society of Washington**, 17:108-150.
- Manly, Bryan J. F. 2008. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução**, 3<sup>a</sup> edição, Porto Alegre: Bookman.
- Manzoli-Palma, M. S. C.; Gobbi, N. 1997. Muscles-bearing of sting apparatus in social wasp and their relationship with the autotomy (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae). **Journal of Advanced Zoology**, v.18, 1-6.
- Marques, O. M.; Viana, C. H. P.; Kamoshida, M.; Carvalho, C. A. L.; Santos, G. M. M. 1995. Hábitos de nidificação e alimentares de *Ectatomma quadridens* (Fabricius, 1793) (Hymenoptera, Formicidae) em Cruz das Almas-Bahia. **Insecta**, v. 4, 1-9.
- Mateus, S. 2011. Observations on forced colony emigration in *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini): New nest site marked with sprayed venom. **Psyche: A Journal of Entomology (Cambridge)**, 1-8.

- Menezes, M. C.; Furtado, M. F.; Travaglia-Cardoso, S. R.; Camargo, A. C. M.; Serrano, S. M. T. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon** **47**, 304–312.
- Neves, E. F.; Andrade, L. H. C.; Suarez, Y. R.; Lima, S. M.; Antonialli-Junior, W. F. 2012. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.3, 1891-1898.
- Neves, E. F.; Montagna, T. S.; Andrade, L. H. C.; Suarez, Y. R.; Lima, S. M.; Antonialli-Junior, W. F. 2013. Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.86, n.1, 69-77.
- Overall, W. L. 1986. Recrutamento e divisão de trabalho em colônias naturais da formiga *Ectatomma quadridens* (Fabr.) (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi (Zoologia)**, v. 2, 113-135.
- Palma M.S. 2006. **Insect Venom Peptides**. In: *Kastin A.J. (Org.)*. The Handbook of Biologically Active Peptides. Oxford: Ed. Academic Press, 409–416.
- Pinto, J. R. A. S.; Santos, L. D.; Arcuri, H. A.; Dias, N. B.; Palma, M. S. 2012. Proteomic characterization of the hyaluronidase (E.C. 3.2.1.35) from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Protein & Peptide Letters**, v.19, 625-635.
- Prezoto, F.; Santos-Prezoto, H. H.; Machado, V. L. L.; Zanuncio, J. C. 2006. Prey captured and used in *Polistes versicolor* (Olivier) (Hymenoptera: Vespidae) Nourishment. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 5, 707-709.
- Quinn, G. P.; Keough, M. J. 2002. **Experimental design and data analysis for biologists**. Cambridge University Press, Cambridge, 530p.
- Resende, J. J.; Santos, G. M.; Bichara Filho, C. C.; e Gimenes, M. 2001. Atividade diária de busca de recursos pela vespa social *Polybia occidentalis occidentalis* (Oliver, 1791) (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 3, n. 1, 105–115.
- Richards, O. W. 1978. **The social wasps of America excluding the Vespinae**. London, British Museum (Natural History), 580 p.
- Santos, L. D.; Menegasso, A. R. S.; Pinto, J. R. A. S.; Santos, K. S.; Castro, F. M.; Kalil, J. E.; Palma, M. S. 2011. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Proteomics**, v.11, 1403-1412.

- Savitzky, A.H.; Mori, A.; Hutchinson, D.A.; Saporito, R.A.; Burghardt, G.M.; Lillywhite, H.B.; Meinwald, J. 2012. Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. **Chemoecology**, v.22, 141–158.
- Singer, T. L.; Espelie, K. E.; Gamboa, G. J. 1998. Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: Vander Meer, R. K. et al. (eds.). **Pheromone communication in social insects**, Westview, Boulder, 104-125.
- Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. 2002. **Princípios de análise instrumental**. 5a edição. Porto Alegre: Editora Bookman.
- Smith, B. C. 1999. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach**. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Souza, B. M.; Marques, M. R.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Palma, M. S. 2004. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n.18, 1095-1102.
- Tsai, H. I.; Wang, Y. M.; Chen, Y. H.; Tsai, T. S.; Tu, M. C. 2004. Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Biochemical Journal**, 377, 215–223.
- Wenzel, J. W. 1998. A generic key to the nests of hornets, yellowjackets, and paper wasps worldwide (vespidae: Vespinae, Polistinae). **American Museum novitates**, n. 3224, p. 1-39.
- Wilson, E. O. 1971. **The insect societies**. Cambridge, Belknap Press, 548p.

## CAPÍTULO II

### Variação intra e interespecífica dos venenos de duas espécies de vespas sociais do gênero *Polybia* (Hymenoptera: Vespidae) pela técnica de FTIR-PAS

Angélica Mendonça<sup>1\*</sup>; Rafaella Caroline Bernardi<sup>2</sup>, Wedson Desidério Fernandes<sup>1</sup>; William Fernando Antonialli-Junior<sup>1, 2, 3</sup>; Sandro Marcio Lima<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

<sup>3</sup>Centro Integrado de Análise e Monitoramento Ambiental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 79804-970 Dourados-MS, Brasil.

\*Endereço para correspondência: angel\_biol@yahoo.com.br

#### Resumo

As vespas são capazes de sintetizar compostos tóxicos conhecidos como “venenos” que representam parte de um mecanismo para sobrepujar presas e também defender suas colônias. O estudo dos compostos que constituem estas substâncias são de extrema relevância para entender como evoluiu este mecanismo de defesa, uma vez que há indícios de que eles podem variar de forma intra e interespecífica. Estes estudos tem utilizado a cromatografia líquida e gasosa como técnica confiável para a análise destes compostos. No entanto, uma proposta recente é analisar o veneno por meio da técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as diferenças intra e interespecífica dos venenos das vespas *Polybia paulista* e *Polybia occidentalis* pela técnica de FTIR-PAS. As colônias foram coletadas em três municípios de Mato Grosso do Sul, em diferentes tipos de ambientes. Para cada local e tipo de ambiente foram avaliadas amostras de veneno de diferentes colônias. De cada colônia foram realizadas leituras de em média 20 a 75 indivíduos. Os resultados demonstram que a composição de veneno das espécies *P. paulista* e *P. occidentalis* são significativamente diferentes. Além disso, as diferenças intraespecíficas da composição de veneno de *P. paulista* estão relacionadas ao tipo de ambiente onde estavam nidificadas as colônias, independentemente das distâncias geográficas entre elas. Desta forma, os resultados



demonstram que as variações interespecíficas da composição de veneno de vespas, são, de fato, devido as diferenças genéticas, no entanto, o componente ambiental é decisivo nas diferenças intraespecíficas encontradas entre diferentes populações de uma espécie. Além disto, a técnica de FTIR-PAS provou se confiável e eficaz para avaliar as variações da composição de veneno em vespas sociais.

**Palavras-chave:** Epiponini, Variação populacional, Glândula de veneno, Infravermelho médio, Componentes exógenos.

### **Intra and interspecific variation in venoms of two social wasps species of the genus *Polybia* (Hymenoptera: Vespidae) by FTIR-PAS technique**

#### **Abstract**

The wasps are able to synthesize toxic compounds known as "venoms" that represent part of a mechanism to overcome prey and also defend their colonies. The study of the compounds that constitute these substances are of the utmost importance to understand how this defense mechanism evolved, since there are indications that they may vary intra and interspecifically. These studies have used liquid and gas chromatography as reliable techniques for the analysis of these compounds. However, a recent proposal is to analyze the venom by the Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy (FTIR-PAS) technique. Thus, this work aimed to evaluate intra and interspecific differences of the venoms of wasps *Polybia occidentalis* and *Polybia paulista* by FTIR-PAS technique. The colonies were collected in three municipalities of Mato Grosso do Sul, in different types of environments. For each site and type of environment venom samples from different colonies were evaluated. 20 to 75 individuals on average from each colony were analyzed. The results demonstrate that the venom composition of the species *P. paulista* and *P. occidentalis* are significantly different. In addition, the intraspecific differences in the venom composition of *P. paulista* relate to the kind of environment where the colonies were nested, regardless of geographical distances

between them. Thus, the results show that the interspecific variations in the venom composition of wasps are indeed due to the genetic differences, although, the environmental component is decisive in intraspecific differences found among different populations of a species. Also, the FTIR-PAS technique proved to be reliable and effective to evaluate the variations in the composition of venom in social wasps.

**Key-words:** Epiponini, Populational variation, Venom gland, Spectroscopy, Exogenous components.

## INTRODUÇÃO

*Polybia* são vespas eussociais neotropicais de grande abundância e, de acordo com a classificação de Carpenter e Marques (2001) pertencem a família Vespidae, subfamília Polistinae e tribo Epiponini. Estas vespas são eussociais por apresentarem as três características que definem a eussocialidade: divisão de trabalho, cuidado cooperativo com a prole e sobreposição de gerações (Wilson, 1971).

Vespas eussociais podem exibir dois tipos de fundação: fundação independente e fundação por enxameagem (Jeanne, 1991). Em grupos com fundação por enxameamento, como *Polybia*, uma ou mais rainhas são acompanhadas por várias operárias estéreis num enxame, as quais fundam uma nova colônia, sendo que a rainha é responsável apenas pela oviposição.

Em colônias de vespas eussociais há uma divisão de trabalho que é um traço importante que as levaram ao sucesso ao longo da evolução, uma vez que apresentam capacidade de coordenar as colônias para as mais diversas tarefas, como reprodução, alimentação, limpeza e defesa do ninho (Garcia e Noll, 2013). Todas estas tarefas dependem de diferentes castas, que podem ser determinadas pela idade, na qual operárias mais jovens estão envolvidas em tarefas na colônia, como limpeza e cuidado com a prole; as operárias com idades intermediárias executam tarefas como construção e reparação do ninho; enquanto que as mais velhas da colônia atuam como forrageiras, trazendo materiais de construção, água e alimento, além de defender a colônia (O'Donnell 2001; Garcia e Noll, 2013).

Para coordenar estas atividades as vespas sociais são capazes de sintetizar substâncias químicas, chamadas de feromônios que permitem mediar as interações entre companheiras de colônia (Izzo et al. 2010; Khidr et al. 2013).

Dentre os feromônios destacam-se alguns tipos como: o feromônio sexual para atrair parceiros durante a cópula; feromônio de alarme que tem a função de informar a aproximação de um inimigo; feromônio de defesa que serve para avisar aos indivíduos da colônia que devem atacar o intruso; feromônio de agregação que atrai os membros da colônia para uma fonte de alimento ou novo local para nidificação e o feromônio de marcação de trilha que demarca o caminho até uma fonte de alimento (Billen e Morgan, 1998). e feromônios de superfície que atua como uma assinatura característica para cada espécie, colônia e casta (Antonialli- Junior et al., 2007, 2008; Neves et al., 2012, 2013)

Vespas também são capazes de sintetizar outros compostos com função de sobrepujar presas e também defender suas colônias denominados venenos; principalmente durante a fase da vida em que os insetos sociais deixam os trabalhos no interior do ninho e passam a realizá-los fora, expondo-se frequentemente a situações de perigo (Ortiz e Camargo-Mathias, 2006).

Além disso, em trabalho realizado por Mateus (2011) com *Parachartergus fraternus*, o autor observou que vespas do gênero *Parachartergus* utilizam o veneno para marcar um novo local para a fundação da colônia, antes do início da migração, assim o veneno também é utilizado na comunicação entre os indivíduos.

Estudo dos compostos que constituem estas substâncias são de extrema relevância para entender como evoluiu este mecanismo importante para sobrevivência das colônias destes insetos, uma vez que há indícios de que eles podem variar de forma intra e interespecífica em diferentes organismos (Hannan et al., 1986; Mulfinger et al., 1986; Owen e Sloley, 1988; Chippaux et al., 1991; Daltry et al., 1997; Omran e McVean, 2000; Binford, 2001; Orivel e Dejean, 2001; Pimenta et al., 2003; Badhe et al., 2006; Menezes et al, 2006; Abdel-Rahman et al., 2009, 2010, 2011).

Dentre os fatores que podem influenciar as diferenças na composição do veneno dos animais em geral, prevalece na literatura aqueles decorrentes de variações geográficas, genéticas, ambientais (clima, altitude, solo), sexuais, idade e sazonais (Daltry et al., 1997; Badhe et al., 2006; Abdel-Rahaman et al., 2009); além da possibilidade da variação ter influência da dieta (Abdel-Rahman et al., 2009 e 2010).

A variação dos compostos que constituem os venenos pode ser interpretada pelas diferentes reações causadas pelas ferroadas dos Hymenoptera (Pinto et al. 2012). Uma das reações mais comuns dos venenos é a alérgica, que estimula o sistema imune a produzir anticorpos com alta especificidade desencadeando vários tipos de reações (Aalberse, 2000).

O veneno de vespas sociais é composto por aminas biogênicas, peptídeos básicos e proteínas de elevada massa molecular, principalmente enzimas (Castro et al., 1994). Estudos mostram que as principais proteínas alergênicas do veneno de vespas são fosfolipases, hialuronidases, antígeno 5 (King et al., 1996; Kolarich et al., 2005 e Santos et al., 2010) e serino-proteases. Contudo, a qualidade e quantidade de compostos devem variar, de fato, dentro de uma espécie e, sobretudo, entre as espécies.

A composição de veneno já foi investigada em algumas espécies de vespas dentre as quais cabe ressaltar os trabalhos com *Polybia paulista* (Souza et al. 2004, 2005; Paula et al. 2006; Rocha et al. 2007; Brigatte et al. 2011; Pinto et al. 2012; Jacomini et al. 2013), *Polybia occidentalis* (Mortari et al. 2007a, b; Czaikoski et al. 2010), *Polistes versicolor* (Castro et al. 1993, 1994), *Polistes dominulus* (Bruschini et al. 2008), *Vespa* (*V. affinis*, *V. analis*, *V. basalis*, *V. ducalis*, *V. mandarinia*, *V. velutina flavitarsus*) (Lin et al. 2011) e *Protonectarina sylveirae* (Brigatte et al. 2011).

Estes estudos que avaliaram a composição de veneno de vespas têm utilizado as técnicas de Cromatografia líquida e gasosa para identificar compostos (Santos et al., 2011; Pinto et al., 2012; Cologna et al., 2013; Jacomini et al., 2013). Esta técnica demonstra ser confiável e fornecem boas análises qualitativas e quantitativas, entretanto, é um método que exige diversas etapas de preparação da amostra, além do processo para obtenção dos resultados exigir uma quantidade de tempo consideravelmente elevada, quando se compara a outras técnicas, e no caso do veneno para se fazer uma análise são necessários um grande número de amostras.

Por outro lado, outra técnica confiável que vem sendo utilizada para avaliar compostos químicos em sistemas biológicos, em específicos himenópteros sociais (Antonialli- Junior et al., 2007, 2008; Neves et al., 2012, 2013) é a Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, “Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy”).

Esta técnica é uma medida da radiação, na faixa espectral do infravermelho médio, absorvida pela amostra, que apresenta como vantagens a aplicação em materiais de grande fragilidade como materiais biológicos, podendo ser empregada em medidas

de amostras com dimensões reduzidas e em relativamente pouco tempo, comparada a outras técnicas para este fim, já que esta técnica não emprega métodos ópticos dispersivos na sua varredura espectral, de forma que a obtenção dos espectros pode ser realizada em poucos minutos, permitindo a análise de um grande número de amostras (Greene et al., 1992).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças intra e interespecífica dos venenos das vespas *Polybia paulista* e *Polybia occidentalis* por meio da técnica FTIR-PAS.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Coleta dos dados*

Foram coletadas no total 9 colônias de *P. paulista* de três municípios de Mato Grosso do Sul (2 no município de Mundo Novo, 5 em Dourados e 2 em Nova Alvorada do Sul). De *P. occidentalis* foram coletadas 4 colônias, uma no município de Mundo Novo e 3 em Dourados (tabela 1). As colônias foram coletadas em cada um destes municípios, em três tipos de ambientes que foram categorizados em:

Área rural: localizada entre 3 e 15 km do perímetro urbano. Esta área era composta predominantemente por poucas construções, plantações de eucalipto e de cana de açúcar, além de criações de gado. O tráfego de pessoas é reduzido. As colônias foram coletadas na parte abaxial de folhas de coqueiro, em galhos de limoeiros e uma colônia foi coletada em uma edificação abandonada.

Área urbana: localizada nas áreas centrais das respectivas cidades, predominando neste ambiente construções humanas, sendo que as áreas adjacentes são predominantemente gramadas ou cobertas por calçadas com vegetação escassa. O tráfego de pessoas e veículos é intenso durante todo o ano. Todas as colônias deste tipo de ambiente estavam nidificadas em galhos de árvores.

Área intermediária: ambiente que encontra-se em uma condição de transição entre o rural e o urbano, neste caso, conhecida como “Cidade Universitária” no campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, também com predomínio de edificações com seu entorno ocorrendo gramíneas e espécies arbustivas, numa diversidade e abundância relativamente maior que a área urbana. Neste local o trânsito

de pessoas e veículos também é intenso ao longo de todo o ano, entretanto nas propriedades ao redor do campus há o predomínio de pastagens e plantações.

**Tabela 1.** Municípios de coleta, número de colônias coletadas e as respectivas distâncias entre as cidades. **DDS:** Dourados; **MN:** Mundo Novo e **NAS:** Nova Alvorada do Sul.

<i>P. paulista</i>		<i>P. occidentalis</i>		Distâncias entre os municípios		
Local de Coleta	Número de colônias	Local de coleta	Número de colônias	DDS x MN	DDS x NAS	MN x NAS
Dourados	5	Dourados	3			
Mundo Novo	2	Mundo Novo	1	242 km	110 km	339 km
Nova Alvorada do Sul	2					

Para a coleta das colônias foram utilizados sacos plásticos que envolvia todo o ninho, que em seguida era desprendido do substrato no qual estavam fixados.

Todas as vespas coletadas foram acondicionadas em recipientes plásticos e posteriormente em eppendorfs, os quais foram etiquetados com as informações de coordenadas, data de coleta e outras informações que foram consideradas relevantes para a posterior categorização do local. Em seguida, todas as amostras foram sacrificadas e preservadas por congelamento até a realização das análises.

As análises foram realizadas em duas etapas: na primeira a composição de veneno das duas espécies foram avaliadas e comparadas entre si. Na segunda, foram avaliadas as diferenças intraespecíficas entre a composição do veneno de *P. paulista*, uma vez que foi a espécie, cujo número de colônias de diferentes populações foi maior.

#### ***Técnica de FTIR-PAS***

As análises da composição do veneno das duas espécies foram realizadas pela técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS). Os indivíduos foram dissecados com auxílio de lupa e pinças, na qual as

glândulas e seus reservatórios de armazenamentos foram extraídos puxando se o ferrão, em seguida este foi colocado em um suporte característico da célula fotoacústica, imediatamente após a extração para evitar a degradação proteica.

O FTIR-PAS foi realizado com um Espectrofotômetro Thermo-Nicolet Nexus 670, combinado com um detector Fotoacústico (MTEC-300). Esta técnica mede a radiação absorvida pela amostra e convertidas em calor, o processo é realizado na região espectral do infravermelho médio que compreende de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , abrange a região conhecida como impressão digital (na faixa de 1500 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Esta região é sensível as vibrações e rotações de grupos químicos moleculares, o que possibilita identificar e distinguir radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas nas respectivas amostras, sendo este, o aspecto mais vantajoso desta técnica (Smith 1999); além de ser relativamente rápida e de fácil manuseio (Skoog et al., 2002).

Foram comparadas as diferenças inter e intraespecíficas da composição de veneno das colônias nidificadas nas três diferentes áreas. Para cada área foram tomadas amostras de todas as colônias coletadas, somando 15 leituras para cada área, sendo que cada leitura era a soma de 5 glândulas e os reservatórios de venenos das operárias. Estas glândulas foram dispostas lado a lado no centro do suporte da célula fotoacústica, com uma leve sobreposição entre elas, de modo a preencher o maior espaço possível, sendo pressionadas levemente no suporte até expelir o seu conteúdo, otimizando assim o sinal captado. De cada colônia foram realizadas leituras de em média 20 a 75 indivíduos.

A célula fotoacústica foi purgada com gás hélio antes de cada leitura com o objetivo de maximizar o sinal fotoacústico, retirando o  $\text{CO}_2$  e vapor de água do interior do espectrofotômetro.

O espectro resultante de cada análise foi obtido pela média de 128 varreduras (“scans”) com resolução espectral de 16  $\text{cm}^{-1}$ . Antes da leitura dos espectros das amostras, foi utilizada uma amostra preta de carbono como referência (“background”) para a normalização da intensidade espectral, de modo que novos espectros de referência foram realizados a cada 100 minutos.

Após a obtenção de todos os espectros estes foram normalizados, a fim de possibilitar uma análise comparativa.

### **Análise estatística**

Os dados foram processados com o auxílio do Software Origin 8, sendo que as diferenças inter e intraespecíficas da composição de veneno foram avaliadas pela função discriminante (DFA – *Discriminant Function Analysis*), indicada porque revela um conjunto de variáveis que melhor diferenciam os grupos avaliados (Quinn e Keough, 2002).

Nesta análise a variável Wilks's Lambda é utilizada como medida da diferença entre os grupos, sendo que valores próximos a zero indicam que os grupos não se sobrepõem, enquanto, valores próximos a 1 indicam elevada sobreposição entre os grupos e conseqüente inexistência de diferença significativa entre eles (Manly, 2008).

A distância de Mahalanobis ao quadrado foi utilizada para percepção das diferenças entre as regiões e áreas coletadas.

Estas análises estatísticas foram computadas pelos programas Statistica 7 e Systat 12.

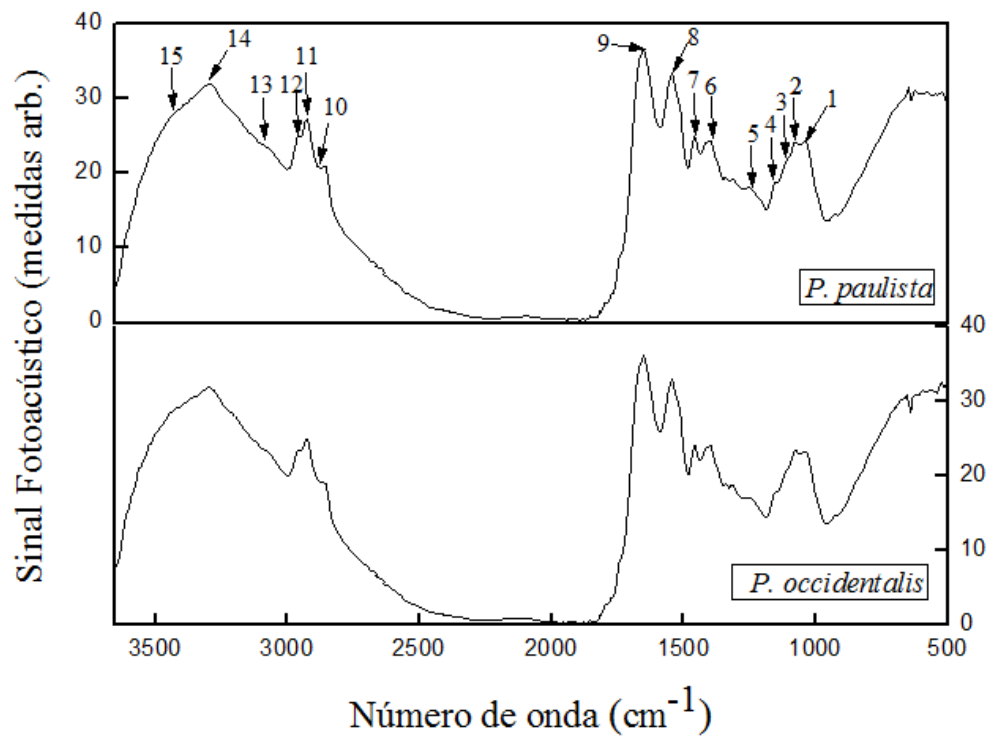
Para análise das diferenças dos compostos químicos do veneno referente as populações de *P. paulista*, coletadas em diferentes regiões e tipos de ambiente, foi aplicado um método de agrupamento utilizando a distância euclidiana e o método de ligação UPGMA para elaboração de um dendrograma de similaridade, usando o programa estatístico R.

Para avaliar se o dendrograma refletia a matriz de similaridade da composição de veneno utilizou-se o coeficiente de correlação cofenética, sendo definido o valor mínimo de 0.75 como medida de qualidade de ajuste do dendrograma (MacGarigal et al., 2000).

## **RESULTADOS**

Os espectros dos venenos de *P. paulista* e *P. occidentalis* por FTIR-PAS estão apresentados na figura 1. A partir desta análise foram avaliados que há 15 grupos funcionais, de maior relevância, listados na tabela 2 no qual também constam seus números de onda e modos vibracionais correspondentes, identificados a partir de dados reportados na literatura para estes compostos (Lin-vien et al., 1991; Smith, 1999).





**Figura 1.** Espectros médios obtidos da leitura das glândulas e reservatórios de veneno de *P. paulista* e *P. occidentalis* gerados por FTIR-PAS, com a indicação dos 15 picos de maior relevância para as análises estatísticas.

**Tabela 2.** Relação dos 15 principais grupos funcionais e seus respectivos modos de vibração selecionados para análise estatística. \* picos significativos para separação das espécies *P. paulista* e *P. occidentalis*. # picos significativos para separação das populações de *P. paulista*.

Pico	Número de Ondas (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Modo vibracional
1	1041	CH	Dobramento no plano
2*#	1079	CH	Dobramento no plano
3*	1110	CH	Dobramento no plano
4	1157	CH	Dobramento no plano
5*#	1241	CH <sub>3</sub> -CO	Estiramento Simétrico
6*	1396	O-CH <sub>2</sub>	Torção fora do Plano
7	1457	O-CH <sub>2</sub>	Tesoura
8	1542	NH e ou CN (Amida II)	Torção no Plano e/ou Estiramento assimétrico
9	1650	C=N (Amida I)	Estiramento
10*#	2877	CH <sub>3</sub>	Estiramento Simétrico
11*#	2931	CH <sub>2</sub>	Estiramento Assimétrico
12	2962	CH <sub>3</sub>	Estiramento Assimétrico
13*	3093	NH	Flexão harmônica
14*	3293	NH	Estiramento
15*	3425	OH	Estiramento

Por meio de inspeção visual dos espectros médios, obtidos das duas espécies, não é possível detectar diferenças significativas entre eles. Contudo, as diferenças entre a composição de veneno das duas espécies foram significativas com Wilk's Lambda = 0.021, F = 5.295 e p<0.001. Os resultados revelam que a primeira raiz canônica explica 80.6% desta distinção. Sendo que os picos mais significativos para separação dos grupos correspondem aos picos 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14 e 15 (figura 1 e tabela 1).

Os valores de p<0.001 obtido para todas as áreas avaliadas revelam que existem diferenças significativas entre as espécies, desta forma foi realizada a análise da

distância de Mahalanobis ao quadrado (tabelas 3 e 4), a qual revela que a composição de veneno das espécies difere estatisticamente.

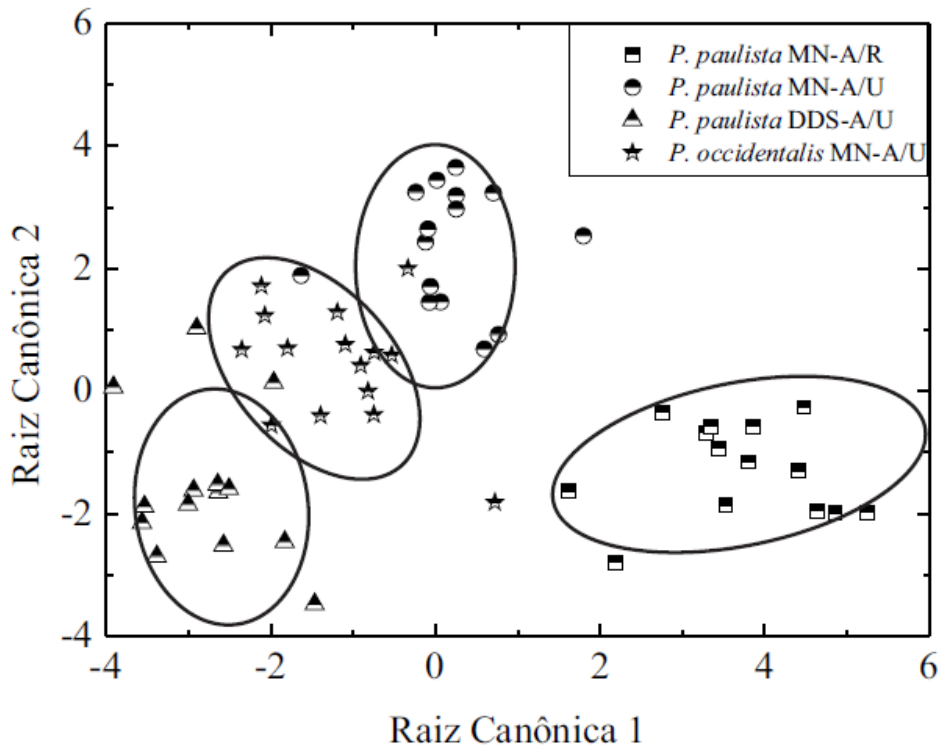
As análises revelam que a composição de veneno das colônias de *P. paulista* nidificadas em áreas urbanas são mais próximas as de *P. occidentalis* nidificadas na mesma área, comparadas as colônias da mesma espécie que ocorrem em áreas diferentes (tabela 3 e figura 2). O mesmo ocorre quando se compara a composição de veneno das duas espécies que estavam nidificadas nas áreas consideradas intermediárias (tabela 4 e figura 3).

**Tabela 3.** Distâncias de Mahalanobis ao quadrado entre os grupos de *P. paulista* e *P. occidentalis*, comparando a composição de veneno de colônias nidificadas nas mesmas áreas. **MN:** Mundo Novo; **DDS:** Dourados; **A/R:** área rural; **A/U:** área urbana.

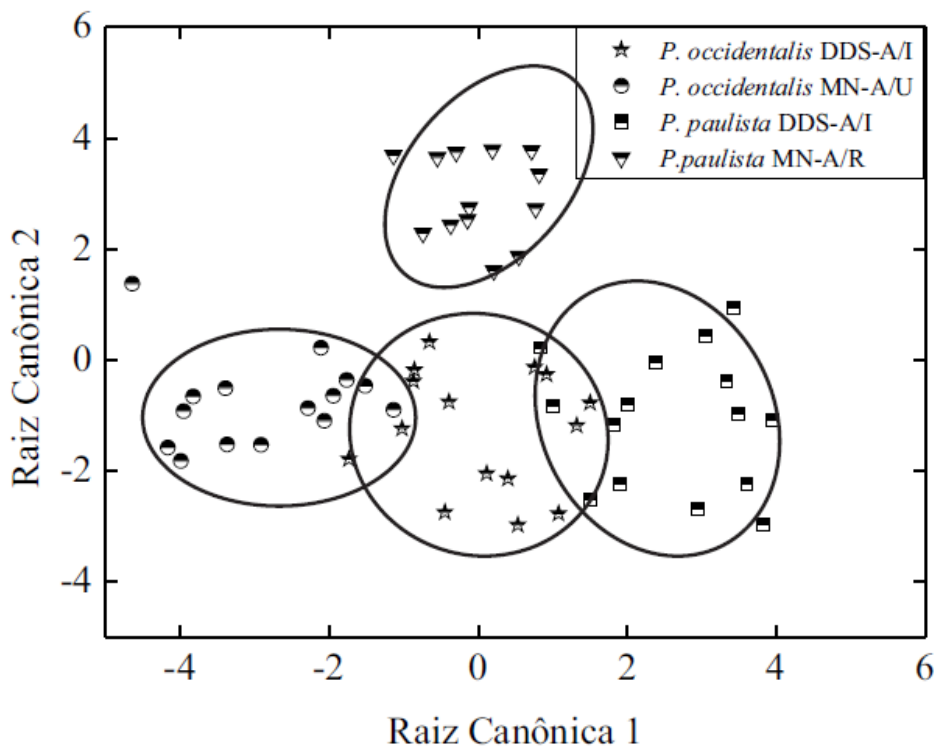
	<i>P. paulista</i>	<i>P. paulista</i>	<i>P. paulista</i>	<i>P. occidentalis</i>
	MN-A/U	MN-A/R	DDS-A/U	MN-A/U
<i>P. paulista</i> MN-A/U	0.000	16.792	14.354	12.384
<i>P. paulista</i> MN-A/R	16.792	0.000	21.520	17.395
<i>P. paulista</i> DDS-A/U	14.354	21.520	0.000	10.470
<i>P. occidentalis</i> MN-A/U	12.384	17.395	10.470	0.0000

**Tabela 4.** Distâncias de Mahalanobis ao quadrado entre os grupos de *P. paulista* e *P. occidentalis*, comparando a composição de veneno de colônias nidificadas nas áreas intermediárias. **MN:** Mundo Novo; **DDS:** Dourados; **A/R:** área rural; **A/U:** área urbana e **A/I:** área intermediária.

	<i>P. paulista</i>	<i>P. paulista</i>	<i>P. occidentalis</i>	<i>P. occidentalis</i>
	MN-A/R	DDS-A/I	DDS-A/I	MN-A/U
<i>P. paulista</i> MN-A/R	0.000	17.1549	17.4854	17.3957
<i>P. paulista</i> DDS-A/I	17.154	0.000	12.990	13.756
<i>P. occidentalis</i> DDS-A/I	17.485	12.990	0.000	15.440
<i>P. occidentalis</i> MN-A/U	17.395	13.756	15.440	0.000

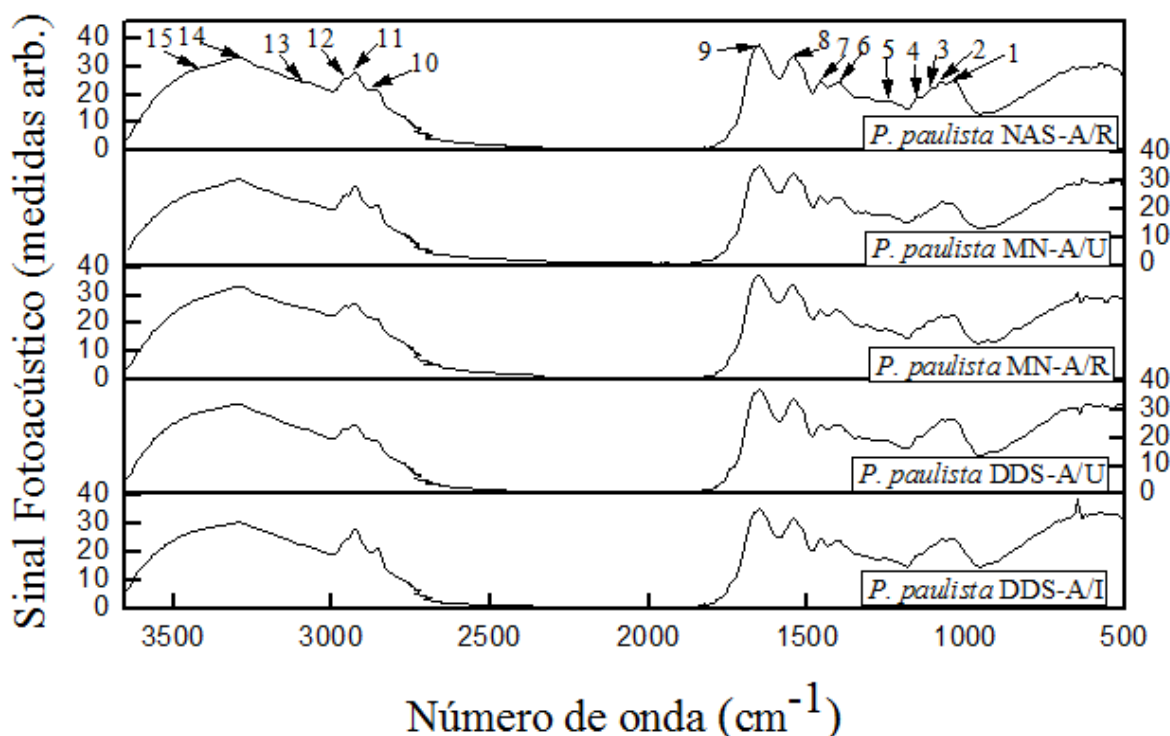


**Figura 2.** Gráfico de dispersão mostrando a diferenciação da composição de veneno entre as colônias de *P. paulista* e *P. occidentalis* nidificadas na área urbana.



**Figura 3.** Gráfico de dispersão mostrando a diferenciação da composição de veneno entre as colônias de *P. paulista* e *P. occidentalis* nidificadas na área intermediária.

Os espectros médios referentes as leituras da composição do veneno de colônias de *P. paulista* nidificadas em diferentes áreas, estão apresentados na figura 4. Os mesmos 15 picos foram selecionados como mais relevantes para as análises estatísticas.



**Figura 4.** Espectros médios obtidos da leitura das glândulas e reservatórios de veneno de *P. paulista* gerados por FTIR-PAS, com a indicação dos 15 picos de maior relevância para as análises estatísticas. **NAS:** Nova Alvorada do Sul; **MN:** Mundo Novo; **DDS:** Dourados; **A/R:** área rural; **A/U:** área urbana e **A/I:** área intermediária.

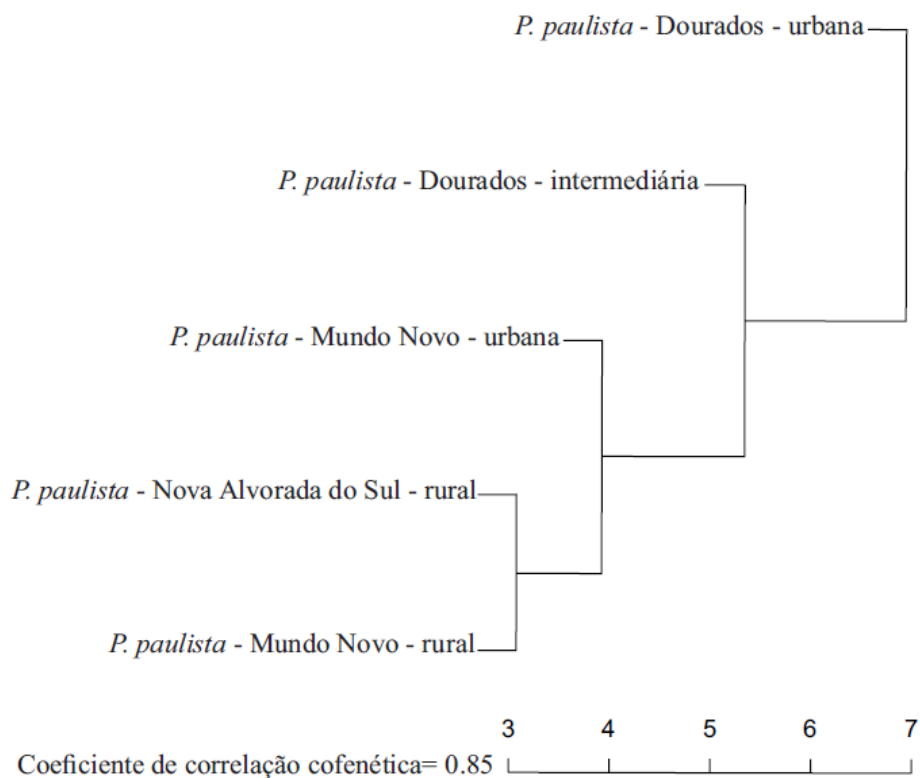
A inspeção visual destes espectros não permite visualizar diferenças significativas entre eles. Por outro lado, a análise discriminante demonstra que há, de fato, diferenças significativas entre a composição de veneno das colônias nidificadas nas diferentes áreas com Wilks's Lambda= 0.042; F=4.612 e  $p < 0.001$  (figura 5). Os resultados mostram que a primeira raiz canônica explica 88.2% desta diferenciação.

Nesta análise, dos 15 picos de maior relevância, 4 foram mais significativos para separação dos grupos correspondendo aos picos 2, 5, 10 e 11 (tabela 2 e figura 4) respectivamente.

Analisando os resultados da distância de Mahalanobis ao quadrado (tabela 5) e o dendrograma de similaridade (figura 5) observa-se que os agrupamentos ocorreram de acordo com o tipo de área onde estavam nidificadas as colônias, independentemente das distâncias geográficas entre elas. Entretanto, ao observar a distância de Mahalanobis ao quadrado para as colônias de Nova Alvorada do Sul área rural, nota-se uma menor distância com as colônias de Dourados na área intermediária e urbana, seguida das colônias de Mundo Novo na área rural.

**Tabela 5.** Distância de Mahalanobis ao quadrado entre os grupos de *P. paulista*, comparando a composição de veneno de colônias nidificadas nas áreas. **NAS:** Nova Alvorada do Sul; **MN:** Mundo Novo; **DDS:** Dourados; **A/R:** área rural; **A/U:** área urbana e **A/I:** área intermediária.

	<i>P. paulista</i> NAS-A/R.	<i>P. paulista</i> MN-A/U.	<i>P. paulista</i> MN-A/R.	<i>P. paulista</i> DDS-A/U.	<i>P. paulista</i> DDS-A/I.
<i>P. paulista</i> NAS-A/R.	0.000	12.343	9.946	9.187	7.4743
<i>P. paulista</i> MN-A/U.	12.343	0.000	20.783	13.512	8.499
<i>P. paulista</i> MN-A/R.	9.946	20.783	0.000	29.446	20.310
<i>P. paulista</i> DDS-A/U.	9.187	13.512	29.446	0.000	7.338
<i>P. paulista</i> DDS-A/I.	7.474	8.499	20.310	7.338	0.000



**Figura 5.** Dendrograma de similaridade baseado na composição química do veneno das populações da vespa social *P. paulista* coletados em diferentes ambientes, nos municípios de Mato Grosso do Sul.

## DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que há diferenças significativas entre a composição de veneno das duas espécies avaliadas (figura 1; tabelas 3 e 4). Estas diferenças são em parte explicadas pelo componente genético, contudo, uma parte significativa destas diferenças é ambiental, uma vez que a composição do veneno das duas espécies pode ser mais próximas, se as colônias ocorrerem em áreas de ambiente similar.

As diferenças interespecíficas da composição do veneno de espécies de mesmo gênero também foram encontradas por Orivel e Dejean (2001) quando avaliaram a composição de veneno entre 12 espécies da formiga do gênero *Pachycondyla*. Neste trabalho, também identificaram similaridades entre a composição do veneno de espécies que ocorrem em ambientes similares como terrestres e arbóreas, sugerindo que as diferenças e similaridade são devido não só a componentes genéticos, mas também ambientais.

A importância do fator ambiental para a composição do veneno fica mais evidente quando analisamos as diferenças e similaridades encontradas entre as diferentes populações de *P. paulista* (figuras 4 e 5). As análises demonstram que os agrupamentos ocorreram em função do ambiente. Entretanto, os maiores valores da distância de Mahalanobis ao quadrado (tabela 5) foram encontrados entre colônias de Mundo Novo na área rural e Dourados na área urbana, sugerindo que além do fator ambiental o efeito geográfico também é importante.

Por outro lado, em particular aos municípios de Dourados e Nova Alvorada do Sul (tabela 5), a proximidade geográfica pode também explicar suas similaridades, sugerindo neste caso, um agrupamento em função do componente genético sobre estas populações, que devem guardar uma relação mais próxima de parentesco. Cologna et al. (2013) observou em seu estudo que venenos de indivíduos coletados em áreas mais próximas são mais semelhantes do que os coletados em regiões distantes, o que justificaria o fato de Dourados e Nova Alvorada do Sul exibirem menor distância (tabela 5).

De fato, a variação geográfica existe em todas as espécies e tendem a ser ocasionadas pelas adaptações ao ambiente (Ridley, 2006), o que sugere que as condições ambientais são relevantes para análise de diferenças populacionais. A variação intraespecífica da composição de veneno de *P. paulista* corrobora os resultados descritos para formigas (Cologna et al., 2013), escorpiões (Badhe et al., 2006; Abdel-Rahaman et al., 2009) além de serpentes (Tsai et al., 2004), na qual também houve uma variação na composição de veneno entre as populações analisadas.

Entretanto, trabalhos relacionados a variação intra e interespecífica revelam que devido a complexidade dos venenos esta variação não pode ser atribuída a um único fator, mas a junção de diversos fatores (Abdel-Rahaman et al., 2009, 2011).

Para os fatores que influenciam as diferenças na composição do veneno, prevalecem na literatura que estes podem ser decorrentes de variações genéticas, geográficas e, portanto, ambientais, sexuais, idade e sazonais (Abdel-Rahaman, 2008; Abdel-Rahaman et al., 2009; Badhe et al., 2006; Daltry et al., 1997).

Alguns trabalhos realizados com escorpiões (Abdel-Rahaman 2008; Abdel-Rahaman et al., 2009 e 2010), discutem ainda a possibilidade da variação geográfica estar relacionada a dieta; de acordo com os autores essas diferenças podem refletir uma resposta as condições ecológicas locais.



Cabe ainda salientar, que as diferenças climáticas entre diferentes locais podem resultar em uma distribuição distinta das espécies de presas e conseqüentemente, influenciar na dieta dos organismos (Abdel-Rahaman et al., 2009). No caso das vespas, a proteína animal é utilizada na alimentação das larvas, sendo os carboidratos importantes tanto para os adultos quanto para as larvas.

Entretanto, Canevazzi e Noll (2011) observaram em seu trabalho com *P. paulista* que esta espécie coleta grande quantidade de néctar, o qual é utilizado na dieta dos adultos, além disso, alguns autores (Andrade e Prezoto, 2001; Resende et al. 2001; e Elisei et al. 2008) relatam que este é o componente mais coletado nos diversos períodos do ano. Isto sugere que as diferenças climáticas podem influenciar na vegetação, a qual pode ser composta por espécies vegetais distintas, podendo desta forma, influenciar na alimentação das vespas, tanto através dos recursos florais, como pelas suas respectivas presas que utilizam a vegetação como fonte de alimento.

Aliado a isso, estudos revelaram que as defesas químicas são comuns entre os animais, visto que, os compostos podem ser sintetizados a partir de precursores ou são sequestrados do ambiente pelos organismos para compor seu veneno (Savitzky et al., 2012), de modo que, os fatores ambientais influenciam significativamente na composição de veneno de vespas e outros animais peçonhentos.

O sequestro de substâncias por animais já foi descrito por Santoro et al. (1999) relatando o fenômeno em serpentes; além de Saporito et al. (2007) e Savitzky et al. (2012) que observaram resultados similares em anfíbios os quais utilizam o sequestro de substâncias para compor seu próprio veneno. Além disto, Santoro et al. (1999) também concluiu que a origem geográfica também pode explicar as diferenças de veneno, reforçando a ideia de que o veneno sofre interferência ambiental na determinação de sua composição.

No entanto, ainda há relatos na literatura (Tsai et al., 2004) de que a variação do veneno dentro das populações poderia ser explicada por uma distinta expressão do conjunto de genes, os quais estariam respondendo as condições ecológicas e ontológicas do ambiente onde está inserida a espécie.

Assim, fatores genéticos bem como os ambientais, principalmente a dieta, estariam provavelmente influenciando de forma significativa a variação da composição de veneno entre espécies e populações destas duas espécies de vespas avaliadas.

## CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que há variação entre a composição de veneno das espécies *P. paulista* e *P. occidentalis*. Parte destas diferenças deve ser por conta do componente genético, uma vez que são espécies diferentes, contudo, o componente ambiental, como já relatado na literatura, demonstra ser efetivo, pois populações que ocorrem em ambientes similares, mesmo em locais geográficos diferentes tende a ter a composição do veneno mais próxima aquelas nidificadas em áreas de ambientes similares. A importância do ambiente na composição de veneno é destacada quando se avalia a variação intraespecífica na composição do veneno de *P. paulista*, na qual as maiores sobreposições e, portanto, similaridades são encontradas entre as colônias nidificadas em um mesmo tipo de ambiente. Baseado também nestes resultados, podemos concluir que a técnica de FTIR-PAS é confiável para este tipo de análise podendo ser considerada, a partir de agora como uma ferramenta auxiliar, sobretudo para análises que possam requerer um número reduzido de amostras, uma vez que a técnica usual, a cromatografia requer um número de amostras maior, levando em alguns casos, à necessidade de somar amostras de mais de uma colônia, de uma dada população, o que pode impossibilitar por vezes uma análise estatística mais refinada.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a CAPES pela concessão da bolsa de metrado ao primeiro autor, ao CNPq pela concessão da bolsa de produtividade de William Fernando Antonialli-Junior, ao Dr. Orlando Tobias Silveira do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pela confirmação das espécies de vespas e a UEMS pelo suporte técnico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalberse, R.C. 2000. Structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 106, 228-238.
- Abdalla, F. C.; Jones, G. R.; Morgan, E. D.; da Cruz-Landim, C. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier,

- 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. **Genetics and Molecular Research**, 2: 191-199.
- Abdel-Rahman, M. A. 2008. Intraspecific diversity of scorpions venom and its implication in the pathophysiological effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.14, n.1, 191-192.
- Abdel-Rahman, M.A.; Omran, M.A. A.; Abdel-Nabi, I. M.; Ueda, H.; Mcvean, A. 2009. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. **Toxicon**, v.53, 349–359.
- Abdel-Rahman, M. A.; Omran, M. A.A.; Abdel-Nabi, I. M.; Nassier, O. A; Schemerhorn, B. J. 2010. Neurotoxic and cytotoxic effects of venom from different populations of the Egyptian *Scorpio maurus palmatus*. **Toxicon**, v.55, 298–30.
- Abdel-Rahman, M. A.; Abdel-Nabi, I. M.; El-Naggar, M. S.; Abbas, O. A.; Strong, P. N. 2011. Intraspecific variation in the venom of the vermivorous cone snail *Conus vexillum*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 154, 318–325.
- Andrade, F. R.; Prezoto, F. 2001. Horários de atividade forrageadora e material coletado por *Polistes ferreri* Saussure 1853 (Hymenoptera, Vespidae), nas diferentes fases de seu ciclo biológico. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 3, n. 1, 117–128.
- Antonialli- Junior, W.F.; Lima, S.M.; Andrade, L.H.C.; Suárez, Y.R. 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 492-499.
- Antonialli- Junior, W.F.; Suarez, Y.R.; Izida, T.; Andrade, L.H.C.; Lima, S.M. 2008. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 559–66.
- Badhe, R.V.; Thomas, A.B.; Harer, S.L.; Deshpande, A.D.; Salvi, N., Waghmare, A., 2006. Intraspecific variation in protein of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, Coconsis, Pocock) venoms from Western and Southern India. **Journal of**

**Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.4, 612–619.

- Billen, J.; Morgan, E. D. 1998. Pheromone communication in social insects: sources and secretions. Cap. 1, 3-33. In: Meer, R. K. V.; Breed, M. D.; Espelie, K. E.; Winston, M. L. **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. Westview Press, 388p.
- Binford, G.J. 2001. An analysis of geographic and intersexual chemical variation in venoms of the spider *Tegenaria agrestis* (Agelenidae). **Toxicon**, v.39, 955–968.
- Brigatte, P.; Cury, Y.; Souza, B. M.; Baptista-Saidemberg, N. B.; Saidemberg, D. M.; Gutierrez, V. P.; Palma, M. S. 2011. Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of honeybee (*Apis mellifera*) and neotropical social wasps (*Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae*). **Amino Acids**, v.40, 101-111.
- Bruschini, C.; Cervo, R.; Protti, I.; Turillazzi, S. 2008. Caste differences in venom volatiles and their effect on alarm behaviour in the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ). **The Journal of Experimental Biology**, v.211, 2442-2449.
- Canevazzi, N. C. S.; Noll, F. B. 2011. Environmental factors influencing foraging activity in the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini). **Psyche: A Journal of Entomology**, 1-8.
- Carpenter, J. M.; Marques, O. M. 2001. Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta; Hymenoptera; Vespoidea, Vespidae). Universidade Federal da Bahia. **Série publicações digitais**, v. 02.
- Castro, F. F. M.; Palma, M. S.; Braga, M. R. B.; Malaspina, O.; Lazaretti, J.; Baldo, M. A. B.; Antila, M. A.; Zuppi, L. J.; Cossermelli, W.; Croce, J. 1993. Caracterização dos componentes dos venenos de abelhas (*Apis mellifera*) e vespas (*Polistes versicolor*) e estudo da reatividade antigênica cruzada. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.16, n.4, 128-133.
- Castro, F.F.; Palma, M.S.; Brochetto-Braga, M.R.; Malaspina, O.; Lazaretti, J.; Baldo, M.A.; Antila, M.A.; Zuppi, L.J.; Croce, J.; Cossermelli, W. 1994. Biochemical properties and study of antigenic cross-reactivity between Africanized honey bee and wasp venom. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v.4, n.1, 37-41.

- Chippaux, J.P.; Williams, V.; White, J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v.29, 1279–1303.
- Cologna, C. T.; Cardoso, J. S.; Jourdan, E.; Degueldre, M.; Upert, G.; Gilles, N.; Uetanabaro, A. P. T.; Neto, E. M. C.; Trovatti, P.; Pauw, E.; Quinton, L. 2013. Peptidomic comparison and characterization of the major components of the venom of the giant ant *Dinoponera quadriceps* collected in four diferente areas of Brazil. **Journal of proteomics**, n. 94, 413-422.
- Czaikoski, P. G.; Menaldo, D. L.; Marcussi, S.; Baseggio, A. L. C.; Fuly, A. L.; Paula, R. C.; Quadros, A. U., Romão, P. R. T.; Buschini, M. L. T. Cunha, F. Q.; Soares, A. M.; Monteiro, M. C. Anticoagulant and fibrinolytic properties of the venom of *Polybia occidentalis* social wasp. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 21, n.7, 653-659.
- Daltry, C.J.; Wuster, W.; Thorpe, S.R. 1997. The role of ecology in determining venom variation in the Malayan pitviper, *Calloselasma rhodostoma*. **Symposium of the Zoological Society of London**, v.70, 155–171.
- Elisei, T.; Ribeiro, C.; Guimarães, D. L.; Prezoto, F. 2005. Foraging activity and nesting of swarm-founding wasp *Synoeca cyanea* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). **Sociobiology**, v. 46, n. 2, 317–327.
- Garcia, Z. J.; Noll, F. B. 2013. Age and Morphological Changes in the Epiponini Wasp *Polybia paulista* Von Ihering (Hymenoptera: Vespidae). **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 293–299.
- Greene, R.V.; Gordon, S.H.; Jackson, M.A.; Bennett, G.A. 1992. Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, 1144-1149.
- Hannan, C.; Stafford, C.; Rhoades, R.; Wray, B.; Bear, H.; Anderson, M. 1986. Seasonal variation in antigens of the imported fire ant *Solenopsis invicta*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.78, n.2, 331–336.
- Izzo, A.; Wells, M.; Huang Z.; Tibbetts, E. 2010. Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 64:857–864.
- Jacomini, D. L. J.; Pereira, F. D. C.; Pinto, J. R. A. S.; Santos, L. D.; Neto, A. J. S.; Giratto, D. T.; Palma, M. S.; Zollner, R. L.; Braga, M. R. B. 2013. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista*

- (Hymenoptera: Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v.64, 70-80.
- Jeanne, R. L. 1991. "The swarm-founding Polistinae," in **The social Biology of Wasps**, K. G. Ross and R. W. Matthews, Eds., pp. 191–231, Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Khidr, S. K.; Linforth, R. S. T.; Hardy, I. C. W. 2013. Genetic and environmental influences on the cuticular hydrocarbon profiles of *Goniozus* wasps. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 147: 175–185.
- King, T.P.; Lu, G.; Gozalez, M.; Quian, N.F.; Soldatova, L. 1996. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic-cross reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 98, 588-600.
- Kolarich, D.; Léonard, R.; Hemmer, W.; Altmann, F. 2005. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidase and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. **FEBS Journal**, 272, 5182-5190.
- Lin, C.H.; Tzen, J. T.C.; Shyu, C. L.; Yang, M. J.; Tu, W.C. 2011. Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan. **Peptides**, v.32, 2027-2036.
- Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W.G.; Grasselli, J.G. 1991. **Infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules**. Academic Press, San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto, p. 156.
- MacGarigal, K., Cushman, S. A.; Stafford, S. G. 2000. **Multivariate statistics for Wildlife and Ecology Research**. Nova York: Springer-Verlag.
- Manly, Bryan J. F. 2008. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução**, 3ª edição, Porto Alegre: Bookman.
- Mateus, S. 2011. Observations on forced colony emigration in *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini): New nest site marked with sprayed venom. **Psyche: A Journal of Entomology (Cambridge)**, 1-8.
- Menezes, M.; Furtado, M.; Travaglia-Cardoso, S.; Camargo, A.; Serrano, S. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteenth *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v.47, n.3, 304–312.
- Mortari, M. R. Cunha, A. O. S.; Carolino, R. O. G.; Coutinho-Netto, J.; Tomaz, J. C.; Lopes, N. P.; Coimbra, N. C.; Santos, W. F. 2007b. Inhibition of acute

- nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, 860–869.b
- Mortari, M. R.; Cunha, A. O. S.; Oliveira, L.; Vieira, E. B.; Gelfuso, E. A.; Coutinho-Netto, J.; Santos, W. F. 2007a. Anticonvulsant and behavioural effects of the denatured venom of the social wasp *Polybia occidentalis* (Polistinae, Vespidae). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.97, 289–295.a
- Mulfinger, L.; Benton, A.; Guralnick, M.; Wilsom, R. 1986. A qualitative and quantitative analysis of proteins found in vespid venoms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.77, n.5, 681-686.
- Neves, E. F.; Andrade, L. H. C.; Suarez, Y. R.; Lima, S. M.; Antonialli-Junior, W. F. 2012. Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.3, 1891-1898.
- Neves, E. F.; Montagna, T. S.; Andrade, L. H. C.; Suarez, Y. R.; Lima, S. M.; Antonialli-Junior, W. F. 2013. Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.86, n.1, 69-77.
- O'Donnell, S. 2001. Worker age, ovary development, and temporal polyethism in the swarm-founding wasp *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Insect Behavior**, v.14, n.2, p.201–213
- Omran, M.A.; McVean, A. 2000. Intraspecific variation in scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom collected from Egypt (Sinai and Aswan deserts). **Journal of Toxicology Toxin Reviews**, v.19, n.3–4, 247–264.
- Orivel, J.; Dejean, A. 2001. Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae). **Toxicon**, 39, 195-201
- Ortiz, G.; Camargo-Mathias, M. I. 2006. Venom gland of *Pachycondyla striata* worker ants (Hymenoptera: Ponerinae). Ultrastructural characterization. **Micron**, 37: 243-248.
- Owen, M.; Sloley, B. 1988. 5-Hydroxytryptamine in the venom of the honey bee (*Apis mellifera*): variation with season and with insect age. **Toxicon**, v. 26, n.6, 577-581.
- Paula, L.; Santos, W. F.; Malheiro, A.; Carlos, D.; Faccioli, L. H. 2006. Differential modulation of cell recruitment and acute edema in a model of *Polybia paulista*

- venom-induced inflammation. **International Immunopharmacology**, n.6, 182–189.
- Pimenta, A.M.; De Marco Almeida, F.; Delima, M.E.; Martin Eauclaire, M.E.; Bougis, P.E. 2003. Individual variability in *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.17, n.5, 413–418.
- Pinto, J. R. A. S.; Santos, L. D.; Arcuri, H. A.; Dias, N. B.; Palma, M. S. 2012. Proteomic characterization of the hyaluronidase (E.C. 3.2.1.35) from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Protein & Peptide Letters**, v.19, 625-635.
- Quinn, G. P.; Keough, M. J. 2002. **Experimental design and data analysis for biologists**. Cambridge University Press, Cambridge, 530p.
- Resende, J. J.; Santos, G. M.; Bichara Filho, C. C.; e Gimenes, M. 2001. Atividade diária de busca de recursos pela vespa social *Polybia occidentalis occidentalis* (Oliver, 1791) (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 3, n. 1, 105–115.
- Ridley M. 2006. **Evolução**. 3a edição. Porto Alegre: Armed. Cap 13.
- Rocha, T.; Souza, B. M.; Palma, M. S.; Cruz-Höfling, M. A. 2007. Myotoxic effects of mastoparan from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Epiponini) wasp venom in mice skeletal muscle. **Toxicon**, v. 50, 589-599.
- Santoro, M. L.; Sousa-e-Silva, M.C.C.; Gonçalves, L.R.C.; Almeida-Santos, S.M.; Cardoso, D.F.; Laporta-Ferreira, I.L.; Saiki, M.; Peres, C.A.; Sano-Martins, I.S. 1999. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 122, 61-73.
- Santos, L. D.; Menegasso, A. R.S.; Pinto, J. R. A. S.; Santos, K. S.; Castro, F. M.; Kalil, J. E.; Palma, M. S. 2011. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Proteomics**, v.11, 1403-1412.
- Santos, L.D.; Santos, K.S.; Pinto, J.R.A.S.; Dias, N.B.; Souza, B.M.; Santos, M.F.; Perales, J.; Domont, G.B.; Castro, F.M.; Kalil, J.E.; Palma, M.S. 2010. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: A clue to



- understand the envenoming mechanism. **Journal of Proteome Research.**, 9, 3867-3877.
- Saporito, R.A.; Donnelly, M.A.; Norton, R.A.; Garraffo, H.M.; Spande, T.F.; Daly, J.W. 2007. Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.21, 8885–8890.
- Savitzky, A.H.; Mori, A.; Hutchinson, D.A.; Saporito, R.A.; Burghardt, G.M.; Lillywhite, H.B.; Meinwald, J. 2012. Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. **Chemoecology**, v.22, 141–158.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. 2002. **Princípios de análise instrumental**. 5a edição. Porto Alegre: Editora Bookman.
- Smith, B.C. 1999. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach**. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Souza, B. M.; Marques, M. R.; Tomazela, D. M.; Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Palma, M. S. 2004. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n.18, 1095-1102.
- Souza, B. M.; Mendes, M. A.; Santos, L. D.; Marques, M. R.; César, L. M. M.; Almeida, R. N. A.; Pagnocca, F. C.; Konno, K.; Palma, M. S. 2005. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, n.26, 2157–2164.
- Tsai, H. I.; Wang, Y. M.; Chen, Y. H.; Tsai, T. S.; Tu, M. C. 2004. Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Biochemical Journal**, 377, 215–223.
- Wilson, E. O. 1971. **The insect societies**. Cambridge, Belknap Press, 548p.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que formigas e vespas apresentam diferenças na composição de seus venenos, mesmo entre amostras do mesmo ambiente. Portanto, o componente genético parece ser preponderante para determinar os compostos encontrados em uma e outra espécie. Isto prova que a composição de veneno varia de uma família para outra nos Hymenoptera e pode, portanto, ser usado de certa forma como ferramenta taxonômica auxiliar.

No entanto, a composição de veneno varia entre indivíduos do mesmo gênero, havendo variação intra e interespecífica entre as vespas *Polybia*. Sendo que, estas diferenças são atribuídas parte a componentes genéticos, uma vez que são espécies diferentes, contudo, o componente ambiental, também demonstrou ser efetivo neste estudo, já que populações que ocorrem em ambientes similares, mesmo em locais geográficos diferentes apresentaram a composição do veneno mais próxima aquelas nidificadas em áreas de ambientes similares. E de certa forma, a influência ambiental na composição do veneno se destacou melhor quando se avaliou a variação intraespecífica entre populações de *P. paulista*.

Baseado nestes resultados, pode-se concluir que a técnica de FTIR-PAS, assim como em trabalhos com compostos químicos cuticulares, mostrou-se confiável para avaliar diferenças inter e intraespecífica da composição de veneno de Hymenoptera sociais, podendo ser considerada, a partir de agora como uma ferramenta auxiliar para a análise da composição de veneno, sobretudo para análises que possam requerer um número reduzido de amostras, uma vez que a técnica mais usual, a cromatografia, requer um número maior de amostras maior.