



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VENENO DA FORMIGA *Ectatomma brunneum* (FORMICIDAE: ECTATOMMINAE) ANALISADOS PELA TÉCNICA DE FTIR-PAS

Ellen Liciane Barbosa Firmino¹; Rafaella Caroline Bernardi¹; Denise Sguarizi Antônio¹; Angélica Mendonça²

UEMS, Dourados – MS. E-mail: ellen_barbosa16@hotmail.com.

1 Bolsista do programa de pós-graduação em Recursos Naturais na UEMS. 2 Bolsista do programa de pós-graduação em Entomologia na UFGD

RESUMO

O singular domínio dos insetos e de outros artrópodes terrestres pode ser atribuído, em parte, a grande diversidade de mecanismos de defesa químicos presentes em seus corpos. Quanto a mecanismo de proteção, as formigas ganham destaque já que estas apresentam em seus corpos uma grande quantidade de glândulas com função de defesa e predação, entre elas a de veneno. Trabalhos desenvolvidos com animais peçonhentos mostram que os fatores ambientais, sobretudo a dieta, contribuem na construção da composição do veneno, gerando variações nos compostos, mesmo em uma única espécie. Uma vez que, outros trabalhos já demonstraram que fatores exógenos interferem significativamente na composição do veneno de animais peçonhentos e, que pouco se sabe sobre a variação da composição do veneno de formigas, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a variação intraespecífica do veneno de quatro populações em condições ambientalmente distintas da formiga *Ectatomma brunneum*, pela técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier, uma técnica ainda não explorada para este composto. Os resultados mostraram que houve uma diferença significativa entre as populações avaliadas, sendo que a dieta, possivelmente, foi determinante nestas variações. Além disso, a FTIR-PAS se mostrou uma ferramenta bastante útil, principalmente para se somar a técnicas que possam auxiliar nas pesquisas com veneno.

Palavras-chaves: – Peçonha, Ectatomminae, Hymenoptera, FTIR-PAS, Aparelho de Ferrão.

INTRODUÇÃO

O singular domínio dos insetos e de outros artrópodes terrestres pode ser atribuído, em parte, a grande diversidade de mecanismos químicos de defesa e predação produzidos por glândulas específicas destes animais. Entre secreções glandulares, alguns artrópodes desenvolveram um sofisticado sistema de armas químicas, entre eles o desenvolvimento de um mecanismo de injeção e produção de veneno, que representaram atributos evolucionários que contribuíram para o seu sucesso evolutivo (Whitman et al. 1990).

O ferrão, presente em parte das espécies da ordem Hymenoptera, se desenvolveu a partir de uma modificação do aparelho ovipositor (Grimaldi e Engel 2005). Particularmente nesta ordem, as diversas espécies evoluíram seus aparatos de defesa conforme sua biologia e comportamento, sendo o ambiente, com suas variações climáticas e com diferentes tipos de fontes alimentares, um fator determinante neste processo (Whitman et al.1990).

As transformações do aparelho de ferrão e dos compostos venenosos, tanto para defesa como para predação, é uma aquisição biológica importante entre os animais. O veneno pode ser amplamente definido como uma secreção produzida por glândulas especializadas que, quando injetada em um organismo alvo, é capaz de alterar ou interromper processos fisiológicos ou bioquímicos normais, de modo a facilitar a alimentação ou a defesa do animal que o produziu (Casewell et al. 2013).

As formigas, entre os himenópteros, são o grupo que apresentam o veneno menos analisado e descrito em comparação a vespas e abelhas. As espécies de formigas com o veneno mais estudo são as *Solenopsis invicta*, *formiga de fogo*, e *S. saevissima* (Santos et al. 2011).

Ao que se refere à produção de aparatos de defesa, as formigas podem ser comparadas a uma fábrica de materiais químicos, uma vez que estas apresentam distribuídas pelo seu corpo um sistema de mais de cinquenta glândulas exócrinas diferentes (Billen 2004). Devido a sua abundancia, facilidade de manutenção das colônias em laboratório e a variedade de comportamentos, as formigas se tornaram o

principal sistema para o estudo dos aparatos químicos entre os insetos sociais (Martin e Dryjfhout 2009).

Em formigas, o veneno desempenha de três funções principais, defesa contra predadores, captura de presas e comunicação social (Casewell et al. 2013), com a função ofensiva, sem dúvida, desempenhando o papel mais importante em espécies de formigas predadoras (Aird e Silva 1991; Cogo et al. 1993; Daltry et al. 1996). O veneno das formigas, bem como em outros Himenópteros é constituído basicamente de complexos de moléculas orgânicas, proteínas, peptídeos, lipídeos, aminas vasoativas (norepinefrina, histamina e dopamina) e algumas enzimas como fosfolipases, hialuronidases e fosfatases (Lima e Brochetto-Braga 2003; Pinto et al. 2012), mas pode ser descrito como predominantemente constituído por proteínas e peptídeos, ou como uma mistura complexa de compostos de baixa massa molecular (Palma 2006; Casewell et al. 2013).

A composição do veneno pode apresentar variação devido à idade dos indivíduos, ao clima, a sazonalidade e a composição da dieta (Ferreira Jr. et al. 2010). Trabalhos desenvolvidos com animais peçonhentos mostram que os fatores ambientais contribuem na construção da composição do veneno, gerando variações em seus compostos. Esta interferência do meio externo proporciona diferenciação na toxicidade, na concentração e até na especificidade do veneno com determinados tipos de presas (Santoro et al. 1999; Orivel e Dejean 2001; Tsai et al. 2004; Badhe et al. 2006; Saporito et al. 2007). A variação do veneno dentro das populações também pode ser explicada pela expressão diferenciada de um conjunto de genes, em resposta as diferentes condições ecológicas e ontogênicas a que estavam expostos (Tsai et al. 2004).

De fato, a evolução da composição do veneno foi estudada mais extensivamente em cobras. Em um trabalho realizado por Daltry (1996), foi relatado que a variação da composição do veneno entre populações da espécie de cobra *Calloselasma rhodostoma*, esta ligada a dieta local, provavelmente reflexo da seleção natural de compostos eficazes para abater presas locais. Por outro lado, outros estudos também demonstraram que algumas espécies se especializaram no sequestro de substâncias do ambiente para compor e até potencializar seu sistema de defesa (Ruxton et al. 2004; Saporito et al. 2007).

Os fatores que interferem na composição do veneno e sua variação dentro de uma mesma espécie têm sido um ramo ativo nas pesquisas recentes. O interesse do

estudo da variabilidade intraespecífica do veneno tem aumentado, principalmente, devido as graves consequências desta variação na eficácia de soros anti-veneno para humanos (Harrison et al. 2011; Casewell et al. 2013). Há alguns anos o veneno de animais, incluindo as espécies da ordem Hymenoptera, ganhou destaque em relação ao seu potencial farmacológico, (Orivel et al. 2001; Orivel e Dejean 2001; Zelezetsky et al. 2005; Koh et al. 2006; Son et al. 2007, Johnson et al. 2010, Wu et al. 2011, Assodech et al. 2012), sendo que este potencial, possivelmente, também pode sofrer interferência das variações do veneno destas espécies.

A espécie de formiga *Ectatomma brunneum* Smith 1858, apesar de sua ampla ocorrência, ainda pouco se sabe sobre os vários aspectos de sua biologia, sobretudo quanto ao seu veneno. Esta espécie tem uma vasta distribuição na América Latina, ocorrendo do Panamá até a Argentina (Brown 1958). Geralmente se localiza em áreas abertas, tais como bordas de florestas ou clareiras, culturas, pastagens e matas secundárias (Kempf 1972). Assim como outras formigas predadoras, a dieta de *E. brunneum* se baseia principalmente em proteínas e carboidratos (Porter 1989; Evans e Pierce 1995), sendo que sua fonte proteica em geral vem de artrópodes terrestres (Overal 1986; Giannottie Machado 1992; Marques et al. 1995).

Ainda que o veneno de himenópteros sociais seja relatado desde o final do século XIX, o conhecimento da composição do veneno de formigas, e de fato, de toda ordem Hymenoptera, é ainda muito limitada, sendo que pouco se sabe a respeito da influência ambiental sobre estes compostos. Essa escassez de dados está relacionada, principalmente, a grande dificuldade de obtenção de uma quantidade suficiente de amostras de peçonha para realização dos estudos mais completos (Lima e Brocheto 2003; Favrea et al. 2006).

Os métodos mais usuais para avaliar a composição do veneno em formigas, são as análises Cromatográficas. No entanto, nos últimos anos, a técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, *Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy*) tem provado ser bastante confiável para leitura de compostos presentes em insetos sociais, como os Hidrocarbonetos Cuticulares (Antoniali Jr et al. 2007; Antoniali Jr et al. 2008; Neves et al. 2012; Neves et al. 2013), sendo que a efetividade da técnica também foi comprovada em trabalhos envolvendo outros animais, como no estudo com peixes (Almeida et al. 2012).

Devido à versatilidade da sua forma de detecção fotoacústica, que permite a análise de absorção óptica de materiais opacos na região do infravermelho, a FTIR-PAS pode ser aplicada em diferentes sistemas. A faixa de absorção do infravermelho médio é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares e, sendo assim, é capaz de identificar e distinguir radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas em determinada amostra, sendo este o aspecto mais vantajoso dessa técnica (Smith 1999). A radiação de baixa intensidade no qual este método opera, garante uma eficácia na leitura de materiais frágeis, como os materiais biológicos, permitindo que a técnica conserve a amostra, podendo posteriormente ser utilizada para análise em outros procedimentos (Greene et al. 1992). Um dos destaques da técnica, ante outros procedimentos, é a possibilidade de se trabalhar com uma quantidade reduzida de amostra.

Uma vez que, outros trabalhos já demonstraram que fatores ambientais interferem significativamente na composição do veneno de animais peçonhentos e, que pouco se sabe sobre a variação da composição de veneno de formigas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação intraespecífica do veneno da formiga *E. brunneum*, pela técnica de FTIR-PAS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e material de análise. Foram coletadas operárias forrageadoras de 4 populações de *E. brunneum*, três destas de diferentes locais da região de Dourados – Mato Grosso do Sul, e uma de Ilhéus – Bahia, no período de setembro à outubro de 2013. Os pontos selecionados para coleta em Dourados foram uma área de mata semidecídua; na área urbana da cidade, afetada pela ação antrópica; e outra no campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, instalada na área rural da cidade, com predominância de gramíneas, espécies arbustivas, com edificações e circulação de pessoas, que foi chamada neste trabalho como área intermediária. As coletas de Ilhéus foram realizadas em uma área de monocultura de Cacau, onde está localizado o CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira). Portanto os quatro locais de coleta apresentavam diferenças ambientais.

Todo o procedimento de captura dos indivíduos foi realizado por coleta ativa, de forma aleatória, de operárias em atividade de forrageamento. Em todas as áreas de coleta, buscou-se diversificar os locais de captura, a fim de obter uma maior

representação da população local, aumentando a variação genética nas amostragens. De cada uma das áreas, foram recolhidos 75 indivíduos. Logo após as coletas, os indivíduos foram anestesiados, sacrificados e armazenados por congelamento, a fim de preservar as amostras.

A extração do reservatório de veneno ocorreu por dissecação, sendo que todos os filamentos glandulares livres e o ferrão foram removidos. Assim que extraídos, os reservatórios com veneno foram distribuídos e rompidos em um cadinho, para posterior leitura na célula fotoacústica. Todas as análises foram realizadas em no máximo 15 minutos após a dissecação, a fim de prevenir a degradação das toxinas. Foram realizadas em torno de 15 leituras, com cinco amostras cada, para todas as populações analisadas. Tentativas de leitura com um menor número de indivíduos para cada amostragem mostraram um sinal pequeno, dificultando as análises comparativas. Portanto, as cinco amostras foram unidas para aumentar a área de absorção do infravermelho e assim obter resultados mais precisos com a técnica. Para a utilização da técnica de FTIR-PAS não houve nenhum tipo de preparo específico para amostra.

Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier. A FTIR-PAS foi realizada usando um espectrofotômetro ThermoNicoletNexus 670, com detecção fotoacústica, na faixa espectral de 4000-400 cm^{-1} , área que abrange a região conhecida como impressão digital (1500 e 400 cm^{-1}). Durante o experimento, o espectrômetro foi purgado com ar comprimido seco, a fim de remover qualquer vapor de água e CO_2 . A célula fotoacústica foi purgada com gás hélio antes de cada leitura. Como referência para normalização, foi utilizado um corpo de carbono negro para coletar o espectro da fonte de infravermelho, sendo que novos espectros de referência foram realizados a cada 100 minutos. Os espectros foram obtidos com a média de 128 varreduras das amostras, com resolução de 16 cm^{-1} . Para posterior análise comparativa, os espectros foram todos normalizados.

Análise estatística. As possíveis diferenças entre a composição de veneno das diferentes populações foram avaliadas por uma função discriminante (DFA – *Discriminant Function Analysis*), separando como variáveis as intensidades dos picos de absorção espectrais do FTIR-PAS. Este método estatístico encontra uma combinação linear das variáveis que melhor explicam as diferenças entre os grupos analisados. A distância ao quadrado de Mahalanobis foi utilizada para percepção da distância entre cada um dos grupos analisados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros médios obtidos com as quatro populações avaliadas: área mata, urbana e intermediária na região de Dourados e da cidade de Ilhéus, por FTIR-PAS, referentes à composição química do veneno, são apresentados na Figura 1. Foram separados e identificados 15 grupos funcionais de maior relevância, relacionados aos compostos presentes no veneno, na faixa de 3625 a 500 cm^{-1} . Estes picos estão listados na Tabela 1 junto com seus números de onda e modos vibracionais correspondentes, identificados a partir de dados reportados na literatura para o veneno (Smith 1999; Lin-Vien et al. 1991). A identificação visual da distinção entre os espectros nem sempre é evidente, portanto, as intensidades de absorção foram utilizadas na construção de uma matriz para avaliar se há diferenças estatísticas significativas entre elas.

Os resultados gerados pela análise de função discriminante mostram que há uma clara distinção entre as populações (Wilk's lambda = 0.537, F= 4.63 e p <0.001), conforme pode ser notado no gráfico de dispersão mostrado na Figura 2. A primeira raiz canônica explicou 50% desta separação e dos 15 picos selecionados, 8 deles contribuíram para esta distinção, como pode ser visto em destaque na Tabela 2. Entre estes, os picos 1396 e 1650, apresentam os valores mais positivos e negativos para raiz 1 e, para raiz 2, esta maior variação apareceu entre os picos 2931 e 2962. Estes quatro picos são atribuídos aos grupos funcionais, respectivamente, O-CH₂, C=N, CH₂ e CH₃, possivelmente sendo estes, os compostos que apresentaram a maior variação na composição química do veneno entre as quatro populações avaliadas.

As análises mostraram que a composição química do veneno dos diferentes locais de coleta de *E. brunneum*, exceto da área intermediária e urbana, são estatisticamente diferentes. Mesmo entre as espécies coletadas no mesmo município, em Dourados – MS, que contavam com uma maior proximidade geográfica e consequentemente a mesma faixa climática e até uma maior chance de parentesco, foi possível encontrar diferenças significativas. Por outro lado, a sobreposição entre os indivíduos coletados na área intermediária e urbana, provavelmente ocorreu devido às duas áreas apresentarem condições ambientais similares, uma vez que ambas sofrem interferência de ações antrópicas, presença de edificações, com vegetações arbustivas e gramíneas.

Portanto, os resultados demonstram que, ao menos em parte, a composição química do veneno esta atrelada a fatores exógenos do local em que as colônias estão

nidificadas. De fato, as interferências das variações geográficas sobre os aspectos químicos, e até comportamentais dos animais, existem em todas as espécies e tendem a ser ocasionadas pelas adaptações ao ambiente (Ridley 2006), sendo relevantes as diferenças populacionais.

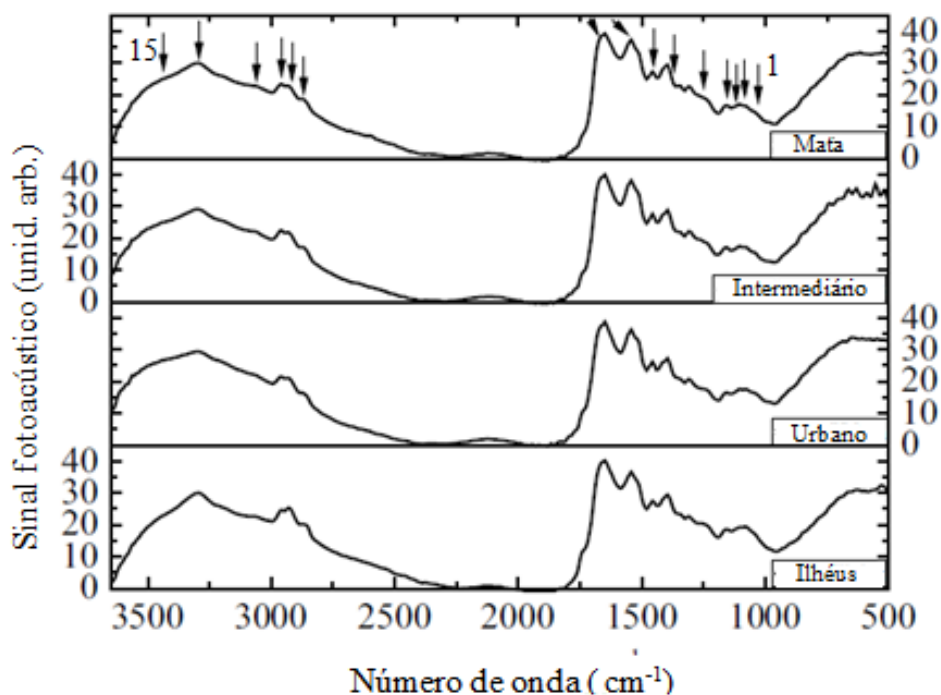


Fig. 1 Espectros de absorção do infravermelho médio do veneno das formigas de quatro populações gerados por FTIR-PAS. As setas estão indicando os 15 picos de maior relevância que foram separadas para as análises estatísticas.

A observação visual do gráfico de dispersão (Figura 2) mostra uma evidente sobreposição entre as populações de área urbana e intermediária de Dourados-MS. O valor de p e F gerado pela análise, entre esses dois ambientes, mostram que os grupos não se distinguem, assim como todas as outras comparações evidenciam que o restante das populações se agrupa conforme a área de coleta. Entre as populações avaliadas, o grupo coletado em Ilhéus e o coletado em mata na região de Dourados-MS mostraram o maior distanciamento, o mesmo pode ser observado na raiz 1 do gráfico de dispersão (Figura 2), onde os pontos centrais das elipses, dos dois grupos destacados, mostram maior espaçamento entre todas as populações avaliadas.

Tabela 1. Relação dos 15 principais grupos funcionais e os respectivos modos de vibração selecionados para a análise estatística.

Pico	Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Modo vibracional
1	1041	C-H	Dobramento no plano
2	1079	C-H	Dobramento no plano
3	1110	C-H	Dobramento no plano
4	1157	C-H	Dobramento no plano
5	1241	CH ₃ -CO	Estiramento simétrico
6	1396	O-CH ₂	Torção fora do plano
7	1457	O-CH ₂	Tesoura
8	1542	NH 3/ou CN (Amida II)	Torção no plano e/ou estiramento assimétrico
9	1650	C=N (Amida I)	Estiramento
10	2877	CH ₃	Estiramento simétrico
11	2931	CH ₂	Estiramento assimétrico
12	2962	CH ₃	Estiramento assimétrico
13	3093	-N-H	Dobramento harmônico
14	3293	-N-H	Estiramento
15	3425	OH	Estiramento

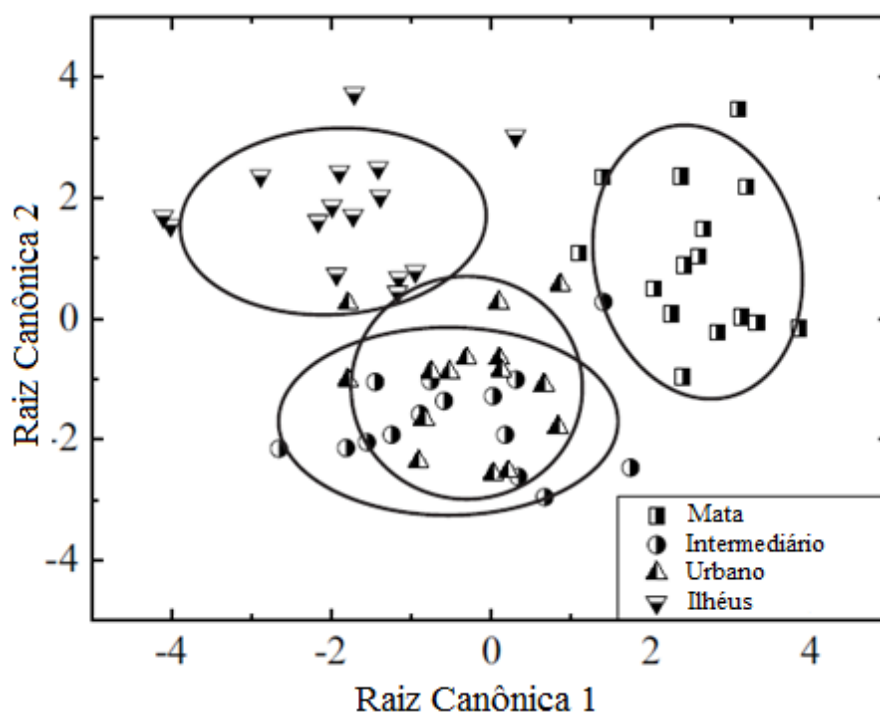


Fig. 2 Dispersão da composição química do veneno de 4 populações de áreas distintas (mata, intermediária, urbana e Ilhéus- monocultura) através da análise dos 15 picos selecionados no espectro de infravermelhos.

Tabela 2. Resultados da DFA a partir das variáveis e picos mais significativos (em destaque) do veneno obtidos por FTIR-PAS das 4 populações de formigas.

Picos	Número de onda (cm ⁻¹)	Wilks's Lambda	F	P	Raiz 1	Raiz 2
1	1041	0.07	2.94	0.004	3.21	-1.39
2	1079	0.06	1.15	0.342	-2.48	0.90
3	1110	0.06	1.47	0.235	-1.66	0.50
4	1157	0.07	3.72	0.018	1.56	-1.45
5	1241	0.06	1.20	0.319	-1.01	0.73
6	1369	0.10	11.96	<0.001	6.08	1.66
7	1457	0.06	2.35	0.086	-1.52	-1.63
8	1542	0.06	2.85	0.048	2.58	0.38
9	1650	0.10	12.04	<0.001	-6.21	-0.83
10	2877	0.06	0.98	0.408	-0.74	1.70
11	2931	0.08	6.31	0.001	2.55	4.66
12	2962	0.07	4.18	0.011	-2.48	-5.77
13	3093	0.06	1.88	0.147	-1.03	0.55
14	3293	0.07	3.50	0.023	2.62	0.03
15	3425	0.06	0.90	0.446	0.43	0.18

A resposta do veneno a fatores exógenos também ocorreu em experimento realizado por Cologna et al. (2013). Estes autores mostraram que a composição do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*, também varia de acordo com o local de coleta. De uma média de 335 compostos do veneno encontrados em cada população, apenas 48 eram compartilhados entre as diferentes populações, sendo esses, provavelmente, os responsáveis pelo perfil químico do veneno desta espécie. Fox et al. (2012) também encontraram diferenças entre a composição do veneno entre populações de *Solenopsis saevissima*. Contudo, os autores atribuíram essas diferenças a análise de possíveis espécies crípticas, ao invés de populações de uma mesma espécie.

A variação da composição do veneno de diferentes locais geográficos, também já foi relatada em outras espécies de animais, sobretudo em cobras e escorpiões. A variabilidade na composição e nas atividades biológicas do veneno de serpentes vem sendo documentadas por inúmeros autores e pode ser observada em diversos níveis, tais

como, variações ontogenéticas, geográficas, sazonais e sexuais (Chippaux et al. 1991; Mendonza et al. 1992, Sanchez et al. 1992; Tan e Ponnururai 1992). Tsai et al. em 2004, por exemplo, mostraram que há diferença entre a fosfolípide A2, presente no veneno da víbora *Trimeresurusstejnegeri*, entre diferentes populações. Segundo estes autores os resultados encontrados ocorreram devido ao isolamento geográfico e o tipo de presas disponíveis em cada população. Santoro *et al.*(1999), por outro lado, encontraram poucas diferenças entre três subespécies de *Crotalusdurissus*, sendo que as maiores diferenças estão associadas as distâncias geográficas entre as populações.

Badhe e colaboradores (2006) mostraram que há diferenças no padrão de proteínas do veneno do escorpião vermelho, *Mesobuthistamulus*, do oeste e sul da Índia, sendo estas diferenças atribuídas a fatores ambientais, como a dieta. Abdel-Rahman et al. (2009), também encontraram variações entre populações de escorpiões de quatro localidades do Egito. Outras espécies peçonhentas de invertebrados também apresentam este tipo de variação da composição de veneno, como em anêmonas do mar (Ortze et al. 2013), caracóis (Romeu et al. 2008) e aranhas (Palagi et al. 2013).

Em himenópteros sociais, Ferreira Jr. et al. (2010) investigaram a diversidade intra-específica de melitina e fosfolipase A2 no veneno de *Apis mellifera* e associaram esta variação com fatores como: idade, variações sazonais e alimentação. As diferenças climáticas, por exemplo, podem resultar em uma distribuição distinta das espécies de presas e condicionalmente, influenciar na alimentação dos organismos (Abdel-Rahaman, 2009). A variação do tipo de solo entre os ambientes, conseqüentemente, também tem potencial nestas distinções, já que influenciará na variação de vegetação, modificando, por conseguinte, espécies de presas de formiga que são consumidoras de plantas específicas.

Cabe aqui, portanto, salientar que as amostragens de *E. brunneum* foram coletadas em uma mesma estação; todos os espécimes pertenciam a mesma casta e estavam em atividade de forrageamento; a quantidade amostrada foi alta, possivelmente minimizando interferências como, as condições de cada indivíduo e também a idade; e pelo menos quanto as populações de Dourados, todas estavam em uma mesma faixa climática

Os resultados indicam que as diferenças locais, como microclima, disponibilidade de presas, entre outros fatores exógenos, foram determinantes para as variações

encontradas. Dentre estes fatores, o tipo de presa pode ser vista com destaque, uma vez que uma das principais funções deste composto é a captura e morte das presas (Airdand Silva 1991; Cogoet al. 1993; Daltry et al. 1996).

Alguns trabalhos mostram a adaptação do veneno a suas principais fontes de alimento. Experimentos realizados com cobras mostram que a variação geográfica e a composição da peçonha refletem a genética e necessidade relacionada à captura da dieta local, produzindo diferentes populações com diferentes relações veneno/presa (Creeret al. 2003; Casewell et al. 2013). Outro exemplo é o do trabalho de Orivel (2001) com 12 diferentes espécies do gênero *Pachycondyla*, ambas predadoras generalistas. Nele encontraram diferenças na potencialidade dos venenos entre as espécies com nidificação em árvores e no solo, sendo que espécies arbóreas, que apresentam maior dificuldade para capturar presa, exibem maior toxicidade em comparação às outras, mostrando assim, que o ambiente está diretamente associado à composição do veneno.

Por outro lado, um trabalho realizado com vespa mantida em cativeiro, foi relatado que a composição da peçonha de *Pimplaturionellae*, uma espécie solitária, não se alterou sob oferta de dieta controlada, apenas mostrando uma interferência de um dos compostos presentes no alimento (Uçkan et al. 2006). Em um trabalho realizado por Daltry et al. (1996), os autores mostraram que o veneno da serpente *C. rhodostoma*, nascidas em cativeiros, apresentaram padrões de composição idênticos aos espécimes selvagens da mesma localidade da origem das suas gerações anteriores. Deduzindo que fatores genéticos também são determinantes na composição do veneno.

No entanto, embora a maior parte dos animais biossintetizem sua defesa química, em alguns casos, os compostos são adquiridos de fontes externas, que podem incluir relações simbióticas com outros organismos ou sequestro de fontes de dieta (Ruxton et al. 2004). A especialização da dieta é comum entre os organismos que compõem seus aparatos químicos a partir da alimentação (Nishida 2002) Alguns trabalhos têm mostrado que espécies de rãs se alimentam de presas específicas, a fim de compor e, ou, potencializar seu veneno. Um trabalho realizado por Saporito (2007) com a espécie *Oophagapumili* mostra que a principal fonte de alcaloides desta espécie é derivada de ácaros Oribatides. Outro trabalho mostra, ainda, que esta espécie de rã apresenta variação dos seus alcaloides “sequestrados” conforme sua região de origem (Saporito 2006). Outros exemplos de sequestro de substâncias do ambiente como forma de compor o veneno são encontrados em insetos fitófagos (Opitz e Muller 2009), grupos

de invertebrados marinhos, como moluscos (McPhaillet al. 2001), cobras natricines (Hutchinson et al. 2007) e pássaros insetívoros, do gênero *Pitohui eIfrita* (Dumbacher et al. 1992; Dumbacher et al. 2000).

Portanto, no caso de *E. brunneum*, os fatores exógenos são determinantes para compor seu veneno, assim como observado em outros inúmeros animais peçonhentos invertebrados ou vertebrados. Destes, de acordo com a literatura, a dieta deve ser preponderante, uma vez que, animais podem sequestrar substâncias do meio para compor a química do veneno.

CONCLUSÃO

Os resultados corroboram com as evidências descritas por outros trabalhos, de que a composição do veneno é determinada não só geneticamente, mas também por compostos obtidos no meio ambiente, principalmente de sua dieta. Estas variações exibidas, no entanto, também são uma resposta às pressões do ambiente, adequando a composição de veneno ao tipo de presas disponíveis. Além disso, a FTIR-PAS se mostrou uma ferramenta bastante útil, principalmente para se somar a técnicas que possam auxiliar nas pesquisas com veneno.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman MA, Omran MAA, Abdel-Nabi IM, Ueda H, Mcvean (2009) A. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio mauruspalmatus* venom collected from different biopes. *Toxicon* 53:349-359.
- Aird, SD, Silva JN (1991) Comparative studies enzymatic of brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *CompBiochemPhysiol B* 99:287-294.
- Almeida FS, Lima SM, Andrade LHC, Suárez YR (2012) Differentiation of Neotropical fish species with statistical analysis of Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy data. *Appl Spectrosc* 66:782-785.
- Antonialli- Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suárez YR (2007) Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics Mol Res* 6:492-499
- Antonialli- Junior WF, Suarez YR, Izida T, Andrade LHC, Lima SM (2008) Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (2008) *Genetics Mol Res* 7:559-566.

Assodech A, Azam AG, Chamani J (2012) Identification and characterization of novel antibacterial peptides from skin secretions of *Euphlyctiscyanophlyctis*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 18:107-115.

Badhe RV, Thomas AB, Harer SL, Deshpande AD, Salvi N, Waghmare A. (2006) Intraspecific variation in protein pattern of red scorpion (*Mesobuthus Tamulus, Coconsis, Pocock*) venoms from western and southern India. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 12:612-619.

Billen J. Morphology of exocrine glands in social insects with special emphasis on the contributions by Italian researchers (2004). *Insect Soc Life* 5:69-75

Brown Junior WR (1958) Contributions toward a reclassification of the Formicidae. II Tribe Ectatomminae (Hymenoptera). *Bull Mus Comp Zool Harvard* 118:175-362.

Casewell NR, Wüster W, Vonk FJ, Harrison RA, Fry BG (2013) Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Cell Press* 28:219–29.

Chippaux JP, William V, White J (1991) Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29:1279-1303.

Cogo JC, Prado-Francischetti J, Cruz-Hofling MA, Corrado AP, Rodrigo-Simioni L (1993) Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. *Toxicon* 31:1237-1247.

Cologna CT, Cardoso JS, Jourdan E, Degueldre M, Uperit NG, Uetanabaro APT, Costa Neto EM, Thonart 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 different areas of Brazil. *J Proteomics* 94:413-422.

Creer S, Malhotra A, Thorpe RS, Stocklin R, Favreau P, Chou WH (2003) Genetic and ecological correlates of intraspecific variation in pit viper venom composition detected using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and isoelectric focusing. *J Mol Evol* 56:317–329.

Daltry JC, Wuster W, Thorpe RS (1996). Diet and venom evolution. *Nature* 379:537-540.

Dumbacher JP, Beehler BM, Spande TF, Garraffo HM, Daly JW (1992) Homobatrachotoxin in the genus *Pitohui*: Chemical defense in birds? *Science* 258:799-801.

Dumbacher JP, Spande TF, Daly JW (2000) Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (*Ifricakowaldi*). *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12970-12975.

Evans JD, Pierce NE (1995) Effects of diet quality and queen number on growth in *Leptothoracine* ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). *J New York Entomol Soc* 103:91-99

Favreau P, Menin L, Michalet S, Perret F, Cheneval O, Stocklin M, Bulet P, Stocklin R (2006) Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case application with single arthropod specimen. *Toxicon* 47:676-687.

Ferreira Junior RS, Sciani JM, Marques-Porto R, Lourenço Jr A, Orsi RO, Barravieira B, Pimenta DC (2010) Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon* 56:355–362.

Fox EGP, Pianaro A, Solis DR, Delabie JHC, Vairo BC, Machado EA, Bueno OC (2012) Intraspecific and Intracolony Variation in the Profile of Venom Alkaloids and Cuticular Hydrocarbons of the Fire Ant *Solenopsis invicta* Smith (Hymenoptera: Formicidae). *Psyche* 1-10.

Giannotti E, Machado VLL (1992) Notes on the foraging of two species of Ponerinae ants: Food and resources and daily hunting activities (Hymenoptera: Formicidae). *Bioikos*, 6:7-17.

Greene RV, Gordon SH, Jackson MA, Bennett GA (1992) Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *J Agric Food Chem* 40:1144-1149.

Grimald D, Engel MS (2005) *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, New York, United States. 755p.

Harrison RA, Cook DA, Renjifo C, Casewell NR, Currier RB, Wagstaff SC (2011) Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress. *J Proteomics* 74:1768–80.

Hutchinson DA, Mori A, Savitzky AH, Burghardt GM, Wu X, Meinwald J, Shroeder FC (2007) Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2265-2270.

Johnson SR, Copello JA, Evans MS, Suarez AV (2010) A biochemical characterization of the major peptides from the venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. *Toxicon* 55:702-710.

Kempf WW (1972) Catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). *Stud Entomol* 15:1-344.

Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci* 63:3030-3041.

Lima PRM, Brochetto-Braga MR (2003) Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 9:149-162.

Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG (1991) *Infrared And Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, San Diego New York Boston London Sydney Tokyo Toronto.

Marques OM, Viana CHP, Kamoshida M, Carvalho CAL, Santos GMM (1995) Hábitos de nidificação e alimentares de *Ectatomma quadridens*(Fabricius, 1793) (Hymenoptera, Formicidae) em Cruz das Almas – Bahia. *Insecta* 4:1-9.

Martin S, Drijfhout F (2009) A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. *J ChemEcol* 35:1151-1161.

McPhail KL, Davies-Coleman MT, Starmer JA (2001) Sequestered chemistry of the arminacean nudibranch *Lemindamillecra* in Algoa Bay, South Africa. *J Nat Prod* 64: 1183-1190.

Mendoza CEC, Bhatti AR (1992) Eletrophoretic analysis of snake venoms. *J Chromatogr*580:355-363.

Neves EF, Andrade LHC, Suarez YR, Lima SM, Antonialli-Junior WF (2012) Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genetics Mol Res* 11:1891-1898.

Neves EF, Montagna TS, Andrade LHC, Suárez YR, Lima SM, Antonialli-Junior WF (2013) Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasp of the *Mischocyttarus*. *J Kansas Entomol Soc*86:69-77.

Nishida R. Sequestration of Defensive Substances from Plants by Lepidoptera (2002) *Annu Rev Entomol* 47:57-92.

Opitz SEW, Müller C (2009) Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology* 19:117–154.

Orts DJB, Peigneur S, Madio B, Cassoli JS, Montandon GG, Pimenta AMC, Bicudo JEPW, Freitas JC, Zaharenko AJ, Tytgat J (2013) Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type 1 potassium toxins from a geographically distant population of *Bunodosomacaisarum*. *Marine Drugs*11:655–79.

Overall WL (1986) Recrutamento e divisão de trabalho em colônias naturais da formiga *Ectatomma quadridens* (Fabr.) (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Boletim do MuseuParaenseEmílioGoeldi (Zoologia)* 2:113-135.

Orivel J, Dejean A (2001) Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera Ponerinae). *Toxicon* 39:195–201.

Orivel J, Redeker V, Le Caer JP, Krier F, Revol-Junelles AM, Longeon A, Chaffotte A, Dejean A, Rossier J (2001) Ponericins New Antibacterial and Insecticidal Peptides from the Venom of the Ant *Pachycondyla goeldii*. *J Biol Chem* 276:17823–17829.

Palagi A, Koh JMS, Leblanc M, Wilson D, Dutertre S, King GK, Graham M. Nicholson (2013) Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (Hexathelidae: Atracinae) using LC-MALDITOF mass spectrometry. *J Proteomics* 80:292–310.

Palma MS (2006) InsectVenomPeptides. In: *Kastin AJ (ed)The Handbook of Biologically Active Peptides*. Oxford: Academic Press, pp 409-416.

Pinto JRAS, Fox EGP, Saidemberg DM, Santos LD, Menegasso ARS, Costa-Manso E, Machado EA, Bueno OC, Palma MS (2012) Proteomic View of the Venom from the Fire Ant *Solenopsisinvicta* Buren. *Journal of Proteome Research* 11:4643-4653.

Porter SD (1989) Effects of diet on the growth of laboratory fire ant colonies (Hymenoptera: Formicidae). *J Kansas EntomolSoc*62:288-291.

Ridley M (2006) *Evolução*. Porto Alegre: Artmed.

Romeo C, Di FL, Oliverio M, Palazzo P, Massilia GR, Ascenzi P, Polticelli F, Schininà ME (2008) Conusventricosus venom peptides profiling by HPLC-MS: a new insight in the intraspecific variation. *J Sep Sci* 31:488–98.

Ruxton GD, Sherratt TN, Speed, MP (2004) *Avoiding attack: the evolutionary ecology of crypsis, warning signals, and mimicry*. Oxford: Oxford University Press.

Sanchez EF, Freitas TV, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, Agostini-Costa G, Diniz CR (1992) Biological activities of venoms from south american snakes. *Toxicon*30:95-103.

Santos LD, Pieroni M, Menegasso ARS, Pinto JRAS, Palma MS (2011) A new scenario of bioprospecting of Hymenoptera venoms through proteomic approach. *The Journal of Venomous animals and Toxins including Tropical Diseases* 17:364-377.

Santoro ML, Sousa-e-Silva MCC, Gonçalves LRC, Santos SMA, Ferreira ILL, Saiki M, Peres CA, Sano-Martins IS (1999) Comparison of the biological activities of three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalusdurissusterrificus*, *Crotalusdurissuscascavella*, *Crotalusdurissuscollilineatus*). *CompBiochemPhysiol* 112:61–73.

Saporito RA, Donnelly MA, Norton RA, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW (2007) Oribatid mites as a major dietary source for alkaloids in poison frogs. *ProcNatlAcadSci USA* 104:8885-8890.

Smith BC (1999) *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong HT (2007) Therapeutic application of anti-arthritis, pain releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *PharmacolTher* 115:246-270.

Tan NH, Ponnudurai GA (1992) Comparative study on the eletrophoretic patterns of snake venoms. *CompBiochem Physiol*102:103-109.

Tsai IH, Wang YM, Chen Y, Tsai TS, Tu MC (2004) Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurusstejnegeri*): molecular characterization , geographic variations and evidence of multiple ancestries. *BiochemicalSociety* 223:215-223.

Veloso HP, Rangel Filho ALR, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.

Whitman DW, Blum MB, Alsop DW (1990) Allomones: Chemicals for Defense. In: Evans DL, Smith J (ed) Insect Defenses. Albany, USA: State University of New York Press, pp 289–351.

Wu J, Liu H, Yang H, Yu H, You D, Ma Y, Ye H, Lai R (2011) Proteomic analysis of skin defensive factors of tree frog *Hyla simplex*. Journal Proteome Research 10:4230-4240.

Uçkan F, Ergin E, Rivers DB, Gençer N (2006) Age and diet influence the composition of venom from the endoparasitic wasp *Pimplaturionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). Arch Insect BiochemPhysiol 63:177–87.

Zelezetskya I, Pagb U, Antchevaa N, Sahlb HG, Tossia A (2005) Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. Arch Biochem Biophys434:358–364.