



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DÂNYA BANDEIRA LIMA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIPARASITÁRIO DO VENENO DA
*Dinoponera quadriceps***

FORTALEZA

2014

DÂNYA BANDEIRA LIMA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIPARASITÁRIO DO VENENO DA
*Dinoponera quadriceps***

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

L697p	Lima, Danya Bandeira. Potencial antimicrobiano e antiparasitário do veneno da <i>Dinoponera quadriceps</i> / Danya Bandeira Lima. – 2014. 88 f. : il.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2014.	
Área de concentração: Biologia para Saúde. Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.	
1. Venenos de Formiga. 2. Anti-Infecciosos. 3. Antiparasitários. I. Título. CDD 615.94	

DÂNYA BANDEIRA LIMA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIPARASITÁRIO DO VENENO DA
Dinoponera quadriceps

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha mãe que sempre me apoiou em todas as coisas que já quis na vida, e que mesmo com todas as dificuldades de criar sozinha duas filhas, nunca deixou de me incentivar a estudar e sempre esteve ao meu lado.

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins e Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira por todas as lições valiosas que me ensinaram para minha profissão e para a vida.

À Profa. Dra. Renata de Sousa, que sempre esteve disponível para os trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, sempre com excelentes contribuições.

À Dra. Alba Fabíola e futura Dra. Ticiana Praciano pela ajuda intelectual que sempre me proporcionaram durante a realização deste trabalho.

À Andréa Bessa, que foi fundamental na minha época de IC no Laboratório de Microbiologia, onde aprendemos muitas coisas juntas, nos tornamos amigas e hoje somos colegas de Pós-Graduação.

Em especial à Clarissa Perdigão e Ramon Róseo, que me ajudaram desde a realização dos experimentos até em puxar minhas orelhas na hora que julgavam necessário. Não sei se teria conseguido sem vocês!

À Tiago Sampaio, Louise Donadello, Jáder Canuto, Lívia Fernandes, Paloma Leão, Izabel Cristina, Isabel Cristina, Andressa Hellen, Gleilton e Andréa pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

À todos os meus outros colegas do LCC pela parceria e compreensão.

Aos meus amigos pessoais Layla, Waldir, Natacha, Erlane, Isabel, Marcela, Aline Marinho, Aline Parente, Geysa, Jardel, Letícia que sempre me aguentaram.

RESUMO

As toxinas animais podem ser fonte de modelos moleculares para o desenho de novos fármacos. Este trabalho objetivou estudar o potencial antimicrobiano e tripanocida do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* (VDq) visando à descoberta de substância de valor terapêutico. Foi realizado o ensaio de microdiluição em caldo, onde foi determinado a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* sorotipo *choleraesuis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231 e duas cepas *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA), *S. aureus* ATCC 33591 e *S. aureus* CCBH 5330. CIM e CLM de VDq foram respectivamente 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL para *S. aureus* ATCC 6538P, 3,12 µg/mL e 3,12 µg/mL para *E. coli*, 12,5 µg/mL e 12,5 µg/mL para *P. aeruginosa*, 12,5 µg/mL e 25 µg/mL para *S. choleraesuis*, 25 µg/mL e 50 µg/mL para *C. albicans*, 12,5 µg/mL e 50 µg/mL para *S. aureus* CCBH 5330 e 100 µg/mL e 100 µg/mL para *S. aureus* ATCC 33591. Em seguida foram realizados experimentos de mecanismo de ação para a cepa de *S. aureus* ATCC 6538P Sensível à Meticilina (MSSA), onde se verificou alteração na permeabilidade da membrana bacteriana de *S. aureus* tratado com concentrações bacteriostáticas e bactericidas de VDq através do ensaio do cristal violeta e do ensaio de liberação de material genético. Uma menor CIM foi encontrada quando pHs alcalinos foram utilizados no teste (7,5-9,0). Uma completa inibição de crescimento foi observada após 4 h de incubação com CLM de VDq. A morfologia bacteriana foi avaliada por microscopia de força atômica após exposição da bactéria à CIM e CIM/2 de VDq durante 4 h, mostrando o dano de membrana. Nos ensaios antiparasitários, foram observados os efeitos citotóxicos do veneno sobre formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Nas formas epimastigotas, a citotoxicidade foi avaliada em 24 e 48 h, com IC₅₀ de 28,32 µg/mL e IC₅₀= 20,67 µg/mL, respectivamente. O mecanismo de morte celular foi avaliado por citometria de fluxo e revelou envolvimento necrótico e apoptótico no efeito do VDq sobre formas epimastigotas, além do aparecimento de células marcadas duplamente com PI e anexina V-FITC, indicando a ocorrência de apoptose tardia. A citotoxicidade foi avaliada sobre formas tripomastigotas encontrando uma IC₅₀ de 1,978 µg/mL e sobre células RAW 264.7 uma IC₅₀ de 32,44 µg/mL. O veneno apresentou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* MSSA e MRSA, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *E. coli* e *C. albicans*, sugerindo lise de membrana em *S. aureus*.

ATCC 6538P. Adicionalmente, apresentou potencial citotóxico sobre as formas epimastigota e tripomastigota de cepa Y de *T. cruzi*.

Palavras chaves: Venenos de Formiga; Anti-Infecciosos; Antiparasitários.

ABSTRACT

Animal toxins can be a source of molecular models for the design of new drugs. This study investigated the antimicrobial and trypanocidal potential from *Dinoponera quadriceps* ant venom (DqV) aiming to discover therapeutic value substances. We conducted the microdilution test, where it was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Lethal Concentration (MLC) over *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P , *Escherichia coli* ATCC 10536 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 , *Salmonella subsp choleraesuis choleraesuis serotype choleraesuis* ATCC 10708 and *Candida albicans* ATCC 10231 strains and two microbial strains of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *S. aureus* ATCC 33591 and *S. aureus* CCBH 5330. MIC and MLC of DqV were respectively 6.25 µg/mL and 12.5 µg/mL for *S. aureus* ATCC 6538P, 3.12 µg/mL and 3.12 µg/mL for *E. coli*, 12.5 µg/mL and 12.5 µg/mL for *P. aeruginosa*, 12.5 µg/mL and 25 µg/mL for *S. choleraesuis*, 25 µg/mL and 50 µg/mL for *C. albicans*, 12.5 µg/mL and 50 µg/mL for *S. aureus* CCBH 5330 and 100 µg/mL and 100 µg/mL for *S. aureus* ATCC 33591. Mechanism of action experiments were performed for the strain of *S. aureus* ATCC 6538P methicillin-susceptible (MSSA), that changes in the permeability of the bacterial membrane of *S. aureus* treated with bacteriostatic and bactericidal concentrations of DqV was observed by the crystal violet assay and release of genetic material assay. A lowest MIC was observed when alkaline pH broth was used (7,5-9,0). Complete bacterial growth inhibition was observed after 4 h of incubation with the MLC of DqV. Bacterial morphology was analyzed by atomic force microscopy after exposure of bacteria to the CIM and CIM /2 of DqV for 4 hours, showing membrane damage. In antiparasitic assays, we determined the cytotoxic effects of the venom on epimastigote and trypomastigote forms of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. In epimastigotes, cytotoxicity was evaluated at 24 and 48 h, finding IC50 of 28.32 µg/mL and 20.67 µg/mL, respectively. The mechanism of cell death was assessed by flow cytometry and revealed the presence of necrotic and apoptotic involvement in the cytotoxic effect of DqV over epimastigote form, in addition, the appearance of double labeled cells with PI and Annexin V-FITC, indicating the occurrence of late apoptosis. Cytotoxicity was evaluated over trypomastigote finding an IC50 of 1.978 µg/mL and over RAW 264.7 cells finding an IC50 of 32.44 µg/mL. The venom showed antibacterial activity against *S. aureus* MSSA and MRSA, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *E. coli* and *C. albicans*, suggesting membrane damage in *S.*

aureus ATCC 6538P. Additionally, showed cytotoxic potential on epimastigote and tripomastigote forms of Y strain of *T. cruzi*.

Keywords: Ant venoms; Anti-infectives; Antiparasitics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	<i>Dinoponera quadriceps.</i>	16
Figura 2-	Transmissão vetorial e ciclo de vida do <i>Tripanosoma cruzi</i> .	25
Figura 3-	Sinal de Romanã.	26
Figura 4-	Características morfológicas da apoptose e da necrose.	28
Figura 5-	Desenho esquemático das metodologias de determinação da CIM e CLM.	39
Figura 6-	Desenho esquemático do ensaio do cristal violeta.	40
Figura 7-	Desenho esquemático do ensaio de Liberação de Material Genético.	41
Figura 8-	Desenho esquemático da tecnologia de Microscopia de Força Atômica.	42
Figura 9-	Desenho esquemático da citotoxicidade em formas epimastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i> .	43
Figura 10-	Desenho esquemático da determinação da integridade da membrana.	44
Figura 11-	Desenho esquemático de infecção e citotoxicidade de formas tripomastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i> .	45
Figura 12-	Desenho esquemático de ensaio de toxicidade pelo MTT.	46
Figura 13-	Efeito antimicrobiano do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA).	50
Figura 14-	Efeito antimicrobiano do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> CCBH 5330 (MRSA).	50
Figura 15-	Efeito antimicrobiano do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P (MSSA).	51
Figura 16-	Efeito antimicrobiano do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536.	51
Figura 17-	Efeito antimicrobiano do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre <i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> sorotipo <i>choleraesuis</i> ATCC 10708.	52
Figura 18-	Efeito antimicrobiano do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	52
Figura 19-	Efeito antimicrobiano do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre <i>Candida albicans</i> 10231.	53
Figura 20-	Efeito do tempo de exposição ao veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre a viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.	54
Figura 21-	Percentual de captação de cristal violeta por <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	55

	6538P de grupos tratados com veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> .	
Figura 22-	Liberação de material genético em sobrenadantes de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P tratados com 6,25; 12,5 and 25 µg/mL de veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> .	56
Figura 23-	Imagens de Microscopia de Força Atômica de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P exposto e não exposto ao veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> .	57
Figura 24-	Efeito do veneno da formiga <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre a viabilidade de formas epimastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i> no período de incubação de 24 horas.	58
Figura 25-	Efeito do veneno da formiga <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre a viabilidade de formas epimastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i> no período de incubação de 48 horas.	59
Figura 26-	Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre formas epimastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i> após 24 horas de incubação.	60
Figura 27-	Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre formas epimastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i> após 24 horas de incubação.	60
Figura 28-	Efeito do veneno da formiga <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i> no período de incubação de 24 horas.	61
Figura 29-	Efeito do veneno da formiga <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre a viabilidade de macrófagos murinos RAW 264.7, ensaio com MTT.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> .	17
Tabela 2-	Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do veneno total da <i>Dinoponera quadriceps</i> sobre diferentes cepas de	

referência.	49
Tabela 3- Influência do pH na Concentração Inibitória Mínima do veneno de <i>Dinoponera quadriceps</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P.	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Venenos de insetos	14
1.2 <i>Dinoponera quadriceps</i>	16
1.3 Potencial terapêutico de venenos animais	18

1.4	Doenças infecciosas e resistência a antimicrobianos	21
1.5	Doença de Chagas	24
1.6	Mecanismos de morte celular e citometria de fluxo	27
2.	JUSTIFICATIVA	32
3.	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Obtenção do veneno	37
4.2	Ensaios Microbiológicos	37
4.2.1	<i>Cepas Microbianas</i>	37
4.2.2	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM</i>	37
4.2.3	<i>Determinação da Concentração Letal Mínima – CLM</i>	38
4.2.4	<i>Ensaio de sensibilidade ao pH</i>	39
4.2.5	<i>Efeito do tempo de exposição ao VDq sobre a viabilidade bacteriana</i>	39
4.2.6	<i>Ensaio do Cristal Violeta</i>	40
4.2.7	<i>Ensaio de Liberação de Material Genético</i>	41
4.2.8	<i>Microscopia de Força Atômica</i>	42
4.3	Ensaios Antiparasitários	43
4.3.1	<i>Cultivo das formas epimastigotas de cepa Y de Trypanosoma cruzi</i>	43
4.3.2	<i>Efeito citotóxico sobre formas epimastigotas de cepa Y Trypanosoma cruzi</i>	43
4.3.3	<i>Determinação da integridade da membrana</i>	44
4.3.4	<i>Cultivo de formas tripomastigotas de cepa Y de Trypanossoma cruzi</i>	44
4.3.5	<i>Efeito citotóxico sobre formas tripomastigotas de cepa Y de Trypanossoma cruzi</i>	45
4.4	Ensaio de Toxicidade	46
5.	Análise estatística	47
6.	Resultados	49
6.1	Ensaios Microbiológicos	49
6.1.1	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM)</i>	49
6.1.2	<i>Efeito do pH na atividade antimicrobiana do VDq</i>	53
6.1.3	<i>Efeito do tempo de exposição ao VDq sobre a viabilidade bacteriana</i>	54
6.1.4	<i>Ensaio do Cristal Violeta</i>	55

6.1.5	<i>Ensaio de Liberação de Material Genético</i>	56
6.1.6	<i>Microscopia de Força Atômica</i>	57
6.2	Ensaios Tripanocidas	58
6.2.1	<i>Efeito citotóxico sobre formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi</i>	58
6.2.2	<i>Determinação da integridade da membrana</i>	59
6.2.3	<i>Efeito citotóxico sobre formas tripomastigotas de Trypanossoma cruzi</i>	61
6.3	Ensaio de Toxicidade	62
7.	Discussão	64
8.	Conclusão	72
	Referências	74

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Venenos de insetos

Os insetos de importância médica são membros da classe *Insecta* e da ordem *Hymenoptera*, e estão inclusos em três famílias: *Apoidea* (abelhas com ~ 20.000 espécies), *Vespoidae* (vespas, marimbondos e coletes amarelos com ~ 15.000 espécies) e *Formicidae* (formigas com ~ 15.000 espécies) (STEEN *et al.*, 2005; FITZGERALD; FLOOD, 2006).

Venenos de himenópteros são ricas misturas bioquímicas de compostos que paralisam a presa, provocam dor em grandes predadores, ou agem como agentes tóxicos. Provavelmente menos de uma centena destes compostos foram identificados, enquanto muitos outros ainda precisam ser descobertos e caracterizados. Há três categorias gerais de componentes de venenos: (1) moléculas não proteicas com peso molecular inferior a 300 Da; (2) peptídeos com peso molecular entre 1.500-4.000 Da; e (3) grandes proteínas e enzimas com pesos moleculares acima de 10.000 Da. Compostos da primeira categoria incluem histamina, serotonina e catecolaminas, que induzem prurido, dor imediata, vermelhidão e mudanças na permeabilidade capilar. A segunda categoria inclui peptídeos, tais como hemolisinas, que destroem as células vermelhas do sangue e causam dor, neurotoxinas e outros compostos indutores de dor, como cininas. A terceira categoria (proteínas maiores e enzimas), em geral não causa dor, mas auxilia na propagação e atividade de outros componentes do veneno. Um exemplo comum é a hialuronidase, que facilita a propagação de componentes tóxicos através dos tecidos. As exceções são fosfolipases que são tóxicas, rompem as membranas celulares e causam a liberação de agentes indutores de dor (AKRE; REED, 2002).

Os venenos de himenópteros possuem uma grande variedade de funções para paralisia da presa e para defesa sobre predadores, possuindo também poderosos fatores antimicrobianos ou citotóxicos, evitando assim, infestações microbianas no ninho ou nas presas para ovoposição (RATCLIFFE *et al.*, 2011; MOREAU, 2013).

Venenos de vespas sociais apresentam em sua constituição aminas biologicamente ativas, tais como a serotonina, a histamina, tiramina, e catecolaminas, as quais tendem a produzir dor. Acetylcolina tem sido relatada na composição dos venenos de algumas espécies de *Vespa*. No entanto, o principal causador de dor são as cininas. Além disso, os venenos contêm peptídeos degranuladores de mastócitos chamados mastoparanos que causam a

liberação de histamina. Venenos de vespas solitárias são compostos por histamínicos, poliaminas, e substâncias como bradicinina que causam contração dos músculos lisos. Alguns de seus venenos também contêm grande quantidade de acetilcolina, como no caso da vespa *Philanthus triangulum* (AKRE; REED, 2002).

O veneno de abelhas é uma mistura complexa de proteínas, peptídeos e pequenas moléculas orgânicas (AKRE; REED, 2002) e contém mais de 20 substâncias, incluindo melitina, apamina, adolapina, peptídeo degranulador de mastócitos, fosfolipase A, histamina, catecolaminas, hialuronidase e serotonina (LIBERSAT, 2003). Os componentes mais tóxicos para os seres humanos são fosfolipases e hialuronidase. Indivíduos podem tornar-se sensibilizados para estas substâncias e, posteriormente, até mesmo morrer de uma reação alérgica grave. Veneno de abelha contém grandes quantidades de um potente agente lítico chamado melitina, que torna membranas extremamente suscetíveis ao ataque de fosfolipases. Melitina também provoca dor, aumenta o fluxo sanguíneo capilar e permeabilidade celular, desencadeia a lise das células vermelhas do sangue, e aumenta a difusão de toxinas. Os efeitos da melitina, fosfolipase e o peptídeo degranulador de mastócitos são a liberação de histamina e serotonina pelas células vermelhas do sangue e mastócitos (AKRE; REED, 2002). Outro componente do veneno da abelha melífera é uma neurotoxina chamada apamina, que é permeável à barreira hemato-encefálica, causando efeitos sobre o SNC por várias vias de administração. Ela provoca efeitos neurotóxicos na coluna vertebral de mamíferos, produzindo hiperatividade e convulsões em ratos (PALMA, 2006).

Venenos de formiga servem para um variedade de funções, incluindo a defesa, captura de presas, comunicação social (COLOGNA *et al.*, 2005), marcação de trilha, alarme e afastar os invasores (AKRE; REED, 2002). Os venenos de formigas são uma mistura complexa de compostos de baixo peso molecular ou predominantemente compostos por proteínas e peptídeos (PALMA, 2006).

O veneno das formigas de fogo (*Solenopsis* e *Wasmannia* spp.), por exemplo, em grande parte é composto de alcalóides (95%), com apenas um pequeno conteúdo proteico (0,1-1%). Os alcalóides causam a maioria das reações no local picada, enquanto que as proteínas contêm antígenos alergênicos ativos. Os alcalóides são citotóxicos, hemolíticos, fungicidas, inseticidas e bactericidas. A necrose cutânea característica que se torna evidente no local da picada é devido a estes alcalóides (AKRE; REED, 2002).

As espécies de formiga das subfamílias Ponerinae, Myrmiciinae, Pseudomyrmecinae e Ecitonina geralmente contêm veneno rico em proteínas e peptídeos (PALMA, 2006). A subfamília Ponerinae é um grupo primitivo de formigas encontradas em

ambientes tropicais, sendo um dos quatro maiores grupos de formigas (Myrmicinae, Formicinae, Ponerinae, Dolichoderinae). O gênero *Dinoponera*, pertencente à subfamília Ponerinae, apresenta formigas de grande tamanho (~3,0 cm), abrigando apenas seis espécies (*D. quadriceps*, *D. australis*, *D. gigantea*, *D. longipes*, *D. lucida*, *D. mutica*), conhecidas como falsas tocandiras (TORRES *et al.*, 2013).

Estudos com o veneno das formigas do gênero *Dinoponera* mostram a presença de fosfolipase A, hialuronidase e lipase, além de proteínas de peso molecular entre 24kDa e 75kDa, como no veneno da falsa tocandira *Dinoponera grandis* (de fato *D. gigantea*) (SCHMIDT; BLUM; OVERAL, 1986; LELUK; SCHMIDT; JONES, 1989). Previamente, foi observado que o conteúdo protéico do veneno de *Dinoponera australis* foi investigado, revelando mais de 75 componentes protéicos com uma grande variedade de propriedades, que variam em tamanho, hidrofobicidade e abundância global. Seis dos peptídeos mais abundantes deste veneno foram reportados como dinoponeratoxinas (JOHNSON *et al.*, 2010).

1.2. *Dinoponera quadriceps*

A espécie *Dinoponera quadriceps* (Santsch, 1921) (Figura 1) é uma formiga primitiva de grande tamanho distribuída no nordeste brasileiro (PAIVA; BRANDÃO, 1995). As colônias do gênero *Dinoponera* tem uma pobre organização social, formando pequenas colônias que não possuem rainha. Ao contrário da maioria das espécies de formigas, todas as operárias da colônia de *Dinoponera* possuem capacidade reprodutora (MONNIN; PEETERS, 1998; ARAÚJO; JAISSON, 1994). As formigas do gênero *Dinoponera* são, em sua maioria, predadoras, alimentando-se de pequenos e médios artrópodes, que são paralizados pela sua picada (ARAUJO; RODRIGUES, 2006).

Figura 1- *Dinoponera quadriceps*



Fonte: www.antweb.org (acesso em 24 nov. 2013).

Acidentes com formigas do gênero *Dinoponera* são raros e múltiplos ataques são pouco prováveis, pois estas formigas são caçadoras solitárias. A picada destas formigas é extremamente dolorosa e pode provocar manifestações sistêmicas como febre, sudorese fria, náuseas, vômitos, linfadenopatia e aritmias cardíacas (HADDAD JR *et al.*, 2005).

O efeito marcante do veneno de formigas deste gênero em seres humanos sugere a presença de peptídeos bioativos que podem fornecer uma fonte valiosa de candidatos à novas ferramentas terapêuticas.

Recentemente, estudamos a composição do veneno de *D. quadriceps* através da análise do transcriptoma da glândula de veneno. A tabela 01 mostra a composição proteica do veneno de *D. quadriceps*.

Tabela 01- Composição proteica do veneno de *Dinoponera quadriceps*.

Classe de proteína	% da composição
Sem homologia	38,2
Dinoponeratoxinas	26,8
Fosfolipase A1	0,8
Outras enzimas	6,2
Bloqueadores de canais iônicos	2
Proteínas de função desconhecida	11
Microrganismos simbiontes	4
Proteínas estruturais	2
Peptídeos alérgenos	9

Fonte: Adaptado de Torres *et al.* (2013).

Torres *et al.* (2013) observou que parte dos transcritos da glândula de veneno de *D. quadriceps* representam proteínas envolvidas no metabolismo, como transferases, ATP-sintase, desidrogenases, proteínas ribossomais e citocromo C. Um número significante de transcritos não mostraram similaridades com as sequências conhecidas no banco de dados utilizado e foram classificadas como proteínas de função desconhecida ou sem homologia (sem homólogos correspondentes no banco de dados).

Como visto na tabela acima, as toxinas mais abundantes foram as dinoponeratoxinas (DnTx), correspondendo a 26,8% dos clones analisados. As sequências de aminoácidos deduzidas (DnTx01 e DnTx02), correspondentes a duas isoformas de cDNA precursor do transcriptoma de *D. quadriceps*, apresentam semelhança a três peptídeos do

veneno de *D. australis* (DnTx_Da-3105, DnTx_Da-3177 e TX01_DINAS), que apresentam similaridade com peptídeos antimicrobianos encontrados em outra espécie de formiga (TORRES *et al.*, 2013).

1.3. Potencial terapêutico de venenos animais

Apesar dos vários relatos sobre os efeitos tóxicos de venenos animais, estes também têm sido amplamente reconhecidos como uma das principais fontes de moléculas biologicamente ativas (PIMENTA; LIMA, 2005). O estudo do potencial terapêutico das toxinas vem cada vez mais conquistando espaço e despertando grandes interesses da comunidade científica, como fonte de modelos moleculares para o desenho de novos fármacos (HARVEY *et al.*, 1998; MORTARI *et al.*, 2007).

Dentre as moléculas que podem ser encontradas em venenos de animais, muitas delas têm ações a nível molecular relacionados à receptores e enzimas, que constituem dois dos principais alvos para a ação de fármacos (SWINDELLS; OVERINGTON, 2002).

Venenos ofídicos são uma fonte abundante de anticoagulantes e trombolíticos, que incluem desintegrinas, inibidores diretos da trombina, compostos fibrinolíticos e ativadores de plasminogênio. Integrilin®, cujo princípio ativo é o eptifibatide, foi obtido a partir do veneno da cascavel Pigmeu (*Sistrurus miliarus barbouri*), é uma desintegrina que inibe agregação plaquetária por ligação com alta afinidade ao receptor fibrinogênio (integrina $\alpha IIb\beta 3$) através de um reconhecimento da sequência Lys-Gly-Asp. Ela foi aprovada em 1998 por Food and Drug Administration para uso como anticoagulante em pacientes com síndrome coronariana aguda e para os pacientes submetidos à angioplastia. Vários outros fármacos anticoagulantes também foram obtidos através do veneno de serpentes como Salmosin (*Agkistrodon halys brecavicaudus*), Crotavirin (*Crotalus viridis*), Drenoaspín (*Dendroaspis jamesoni kaimose*), dentre outros (BEETON; GUTMAN; CHANDY, 2006).

Do veneno da serpente *Bothrops jararaca* foi isolado o peptídeo potencializador de bradicinina, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) que origina angiotensina II, um hormônio que causa vasoconstrição e aumento da pressão arterial. Este peptídio inibidor se liga ao sítio ativo da ECA da mesma forma como substratos naturais e reduzem pressão arterial. O captopril, que é amplamente utilizado para tratar a hipertensão, foi desenvolvido após estudos de modelagem molecular a partir deste peptídeo isolado (CUSHMAN; ONDETTI, 1999).

Alguns componentes de venenos de serpentes têm efeito antinociceptivo. Previamente foi demonstrado que a crotamina, isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, produz efeito analgésico em pequenas doses, sem qualquer aparente toxicidade *in vivo*. Seu efeito analgésico é cerca de 30 vezes mais potente do que o da morfina (RAJENDRA; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2004).

Peptídeos natriuréticos também são bastante estudados em venenos de serpentes. Três peptídeos natriuréticos (TNP-a, TNP-b, e TNP-c) foram isolados do veneno da cobra *Oxyuranus microlepidotus*, e TNP-c foi equipotente ao Peptídeo Natriurético Atrial (FRY *et al.*, 2005). Anteriormente, foi isolado um novo peptídeo no veneno de *Crotalus durissus cascavella* com ação diurética e possível ação vasoativa (EVANGELISTA *et al.*, 2008).

O efeito antiparasitário de venenos de serpentes foi demonstrado em vários trabalhos. Os venenos da *B. jararaca* (GONÇALVES *et al.*, 2002), *Bothropoides lutzi* (MENEZES *et al.*, 2012), *Crotalus viridis viridis* (ADADE *et al.*, 2011) são capazes de inibir o crescimento do parasita *Trypanosoma cruzi*. Enzimas, componentes dos venenos de serpentes, tais como as L-aminoácido oxidases (LAAOs), apresentam ação bactericida, leishmanicida, tripanocida, citotóxica contra células tumorais, efeitos na agregação plaquetária (STABÉLI *et al.*, 2004). As LAAO isoladas dos venenos da *B. moojeni* (TEMPONE *et al.*, 2001) e da *B. pirajai* (IZIDORO *et al.*, 2006) apresentaram atividade leishmanicida.

Outros animais peçonhentos também apresentam substâncias de interesse, como alguns sapos do gênero *Rana* que secretam veneno através de sua pele. Alguns peptídeos isolados da pele desses anfíbios tem ação hipotensora, tornando-se promissores para o desenho de novos fármacos. Estudos prévios demonstram ação antimicrobiana de uma variedade de peptídeos isolados do veneno de sapos deste mesmo gênero, como tigerinin, japonicin-2, esculentin-1, brevinin-1, brevinin-2, temporin L, que possuem ação antimicrobiana para bactérias Gram-positivo, Gram-negativo e *Candida albicans*. Foi descrito um análogo da esculentin-1 que não possui atividade hemolítica e é muito potente contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, e *C. albicans* (BEETON; GUTMAN; CHANDY, 2006).

Substâncias obtidas de venenos de animais marinhos também apresentam grande potencial terapêutico, como algumas anêmonas do mar que têm sido uma rica fonte de peptídeos que bloqueiam os canais Kv1.3 e KCaS.1 em células T humanas, alvos terapêuticos para doenças auto-imunes (CHANDY *et al.*, 2004). A neurotoxina ω -conopeptideo MVIIA isolada do molusco marinho *Conus magus* e seu equivalente sintético ziconotida, bloqueiam canais de cálcio sensíveis à voltagem tipo-N em neurônios sensoriais de dor de mamíferos e,

portanto, possui potente ação anti-nociceptiva em condições em que a morfina é pouco ou não ativa. Ziconotida (Prialt ®) foi aprovado para o tratamento da dor crônica severa por infusão intratecal pela Food and Drug Administração, em 2004 (BEETON; GUTMAN; CHANDY, 2006).

Outra fonte de substâncias com potencial terapêutico são os venenos de invertebrados. Relata-se o isolamento de peptídeos com atividade antimicrobiana de diversas espécies de escorpiões, como *Opistophthalmus carinatus*, *Parabuthus schlechteri*, *Pandinus imperator*, que poderão ajudar no combate à resistência a anticrobianos (DU PLESSIS; ELGARA; DU PLESSIS, 2008).

O veneno da abelha *Apis mellifera* também é composto por algumas substâncias com potencial terapêutico, como o Peptídeo Degranulador de Mastócitos que, no cérebro, se liga a canais de potássio voltagem-dependentes (KONDO *et al.*, 1992) e em baixas concentrações induz degranulação e liberação de histamina em mastócitos, enquanto em altas concentrações na presença de IgE, inibe a liberação de histamina (BUKU *et al.*, 2005). Apamina, que possui capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, causa hiperexcitação, podendo ser utilizada no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de distrofia muscular, demência e depressão (SON *et al.*, 2007). Também foi observado que a melitina, componente do veneno da *Apis mellifera*, possui propriedades contra células cancerosas e atividades antiinflamatória (RATCLIFFE *et al.*, 2011), antibacteriana, antifúngica, antiviral (CONLON; KOLODZIEJEK; NOWOTNY, 2004), tripanocida (ADADE *et al.*, 2013) e leishmanicida (PÉREZ-CORDERO *et al.*, 2011). Bombolitininas, que são estruturalmente e biologicamente similares à melitina, têm mostrado atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas Gram-positivo e Gram-negativo e fungos patogênicos de plantas (CHOO *et al.*, 2010).

Venenos de vespa também são bastante estudados. Quatro peptídeos bradicinina-like, incluindo o mais comumente relatado Thr⁶-bradicinina, foram reportados do veneno da vespa solitária *Cyphononyx fulvognathus* (PICOLLO *et al.*, 2010). A Thr⁶-bradicinina, isolada do veneno da vespa social *Polybia occidentalis*, apresenta atividade antinociceptiva duas vezes mais potente que a morfina (MORTARI *et al.*, 2007). Este veneno também inibiu várias etapas das vias intrínseca e extrínseca da coagulação, bem como a agregação plaquetária e a degradação de fibrinogênio plasmático (CZAIKOSKI *et al.*, 2010). Peptídeos potencialmente antimicrobianos, os mastoparanos, são os componentes mais abundantes em venenos de vespa (RATCLIFFE *et al.*, 2011).

Embora o veneno de formigas seja pouco estudado em relação a abelhas e vespas, vários peptídeos foram descobertos no veneno da formiga arbórea *Pachycondyla goeldii* (subfamília Ponerinae) que mostraram diversificado e seletivo espectro antibacteriano (ORIVEL *et al.*, 2001).

Peptídeos antimicrobianos isoladas do veneno da formiga *Myrmecia pilosula*, conhecido como pilosulins, possuem amplo espectro antibacteriano e antifúngico, e tiveram efeito hemolítico reduzido após modificação molecular (BEETON; GUTMAN; CHANDY, 2006; ZELEZETSKY *et al.*, 2005). Além de seu potencial como antimicrobianos, modificação em canais iônicos tem sido observado em dois peptídeos do veneno de formiga: poneratoxina (de *Paraponera clavata*, subfamília Paraponerinae) e ectatomina (de *Ectatomma tuberculatum*, subfamília Ectatomminae). Poneratoxina é neurotóxica e interage com canais de sódio voltagem-dependente (PIEK *et al.*, 1991). Ectatomina é um potente inibidor das correntes de cálcio em miócitos ventriculares de ratos (PLUZHNIKOV *et al.*, 1999).

Existem poucos estudos sobre os efeitos biológicos do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps*. Foi demonstrado efeito antinociceptivo em modelos químicos, mecânicos e térmicos de indução de dor em camundongos (SOUZA *et al.*, 2012). Recentemente, nosso grupo de pesquisa também demonstrou potencial anticonvulsivante e neuroprotetor em modelos de convulsão induzidos por pentilenotetrazol (LOPES *et al.*, 2013).

1.4. Doenças infecciosas e resistência a antimicrobianos

Alguns dos mais graves problemas de saúde enfrentados na atualidade são os quadros infecciosos, tanto em ambiente hospitalar quanto comunitário. As principais infecções registradas são as infecções dos tratos intestinal e urinário (SHARIFI *et al.*, 2013; ABOUTALEB *et al.*, 2014).

A diarréia infecciosa é a maior causa de morbidade e mortalidade em todo mundo, particularmente em crianças abaixo de 5 anos e idosos. Embora nos últimos anos, tenham aumentado as pesquisas focadas no tratamento e prevenção deste tipo de infecção, as infecções entéricas continuam sendo a maior praga mundial. As taxas de infecção causadas por *Campylobacter spp.* e *Vibrio parahaemolyticus* aumentaram nos últimos anos, ao passo que a incidência de infecções causadas por *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli* produtora de Shiga-toxina e *Cryptosporidium sp.* continuaram inalterados (ABOUTALEB *et al.*, 2014).

As infecções do trato urinário (ITU) também ocupam importante lugar nas estatísticas epidemiológicas, geralmente ocasionadas por bactérias da microbiota intestinal. Na maioria dos casos, o agente etiológico é a *Escherichia coli*, seguido por *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.* Coagulase negativa, *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.* (FRASER; SPITERI, 2011).

Além de infecções do trato urinário, *Candida spp.* também é um dos patógenos mais encontrados em pacientes com infecções da corrente sanguínea adquiridas em ambientes hospitalares e está associada a um grande aumento na mortalidade, sendo responsável por até 17% de todas as infecções adquiridas na UTI (TIMSIT *et al.*, 2013). Além de infecções na corrente sanguínea, *C. albicans* também provoca infecções na pele e membranas mucosas, como faringite, esofagite e vaginites (EGGIMANN *et al.*, 2013).

Em ambiente hospitalar, os pacientes internados ficam suscetíveis à infecção por causa de sua doença subjacente e intervenções médicas, como a cirurgia, intubação ou uso de antibiótico, e também a sua exposição a microrganismos através de outros pacientes, do ambiente hospitalar ou dos funcionários do hospital. Uma média de 5-10% dos pacientes internados tem uma infecção hospitalar, com taxas mais elevadas em unidades cirúrgicas e UTIs. A maioria destas infecções está dentro de uma de cinco categorias: infecções doença-associadas e bacteremia, infecção da ferida cirúrgica, pneumonia hospitalar, ITU associada a cateter e infecção gastrointestinal (BREATHNACH, 2009; BREATHNACH, 2013).

O uso indiscriminado de antimicrobianos e os mecanismos de transferência genética utilizados pelos patógenos levam ao aparecimento de cepas resistentes aos antimicrobianos disponíveis no arsenal terapêutico. A resistência aos antimicrobianos possui uma origem principalmente genética. As alterações genéticas que podem conferir resistência às cepas podem ser cromossomais ou extracromossomais (quando envolvem alterações no material genético de plasmídeos) (TENOVER, 1996; D'COSTA *et al.*, 2011).

Além das mutações que ocorrem de forma natural em microorganismos, outras alterações genéticas, tanto cromossomais quanto plasmideais, podem ser transferidas de um microorganismo para outro por diferentes vias, como transdução, onde a informação genética de resistência é transferido de um microorganismo a outro, através de um bacteriófago (MORSE, 1969), transformação, onde fragmentos de DNA de uma bactéria lisada são transferidos para outra, sendo incorporado ao genótipo da célula receptora (BRIGULLA; WACKERNAGEL, 2010) e conjugação, onde ocorre transferência de plasmídeos de uma

bactéria doadora para uma receptora, através de uma estrutura denominada pelo ou pili, expressa pelo fator F no microrganismo doador (FROST; KORAIMMAN, 2010).

A partir da transferência desse material genético, algumas alterações fisiológicas importantes são observadas em determinadas cepas, conferindo resistência a diferentes antimicrobianos (MANTEN, 1963).

Os principais mecanismos bioquímicos de resistência adquiridos em bactérias são a inativação enzimática do fármaco, como em cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA) (GOULD *et al.*, 2012) e em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapanemases (KPCs) (ZACHARCZUK *et al.*, 2010), bomba de efluxo, como em cepas de *Streptococcus* sp capazes de diminuir a concentração intracelular de macrolídeos (KHAN *et al.*, 2011) e a alteração da estrutura-alvo, como alterações na proteína ligadora de penicilina (PBP) em cepas Gram-positivo (PANGERCIĆ *et al.*, 2010).

MRSA é uma das principais bactérias patogênicas multi-resistentes, causando complicadas infecções na pele e em estruturas da pele e sérias infecções hospitalares, especialmente as infecções da corrente sanguínea e pneumonia associada à ventilação mecânica. Em geral, estima-se que MRSA causa 171200 infecções associadas aos cuidados com saúde na Europa a cada ano, o que corresponde a 44 % de todas as infecções associadas aos cuidados de saúde. Estima-se também 5.400 mortes adicionais atribuíveis ao MRSA e mais de um milhão de dias extras de hospitalização associados com estas infecções (GOULD *et al.*, 2012). Em estudos realizados no Brasil, das infecções hospitalares causadas por *S. aureus*, 65,38% foram causadas por MRSA (SILVA *et al.*, 2013).

Além do MRSA, várias outras bactérias multi-resistentes são encontradas em infecções no sangue, como *S. aureus* intermediários e resistentes à vancomicina, *Enterococcus spp.* vancomicina resistentes, *Streptococcus pneumoniae* penicilina resistentes, *Enterobacteriaceae* (ex. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) resistentes à terceira geração das cefalosporinas, *Enterobacteriaceae* (ex. *K. pneumoniae*), carbapenem resistentes e bacilos Gram-negativo não fermentadores (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumanii*) carbapenem resistentes (ECDC, 2009; LEE *et al.*, 2013).

Uma das principais abordagens de pesquisas biológicas é a descoberta de novas opções terapêuticas para o tratamento de infecções microbianas causadas por bactérias multirresistentes (KANETI *et al.*, 2013), pois, atualmente, o desenvolvimento de novos agentes capazes de atuar como ferramentas farmacológicas, não acompanha a velocidade do aparecimento de cepas multirresistentes.

1.5. Doença de Chagas

A doença de Chagas é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas no mundo. Esta infecção é causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida : Trypanosomatidae) e foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) (COURA; VIÑAS, 2010). A distribuição geográfica da Doença de Chagas, incluindo dos seus reservatórios e vetores, estende-se desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile. De acordo com estimativas da Organização Pan-Americana de Saúde e da OMS, 7,7-10 milhões de pessoas estão cronicamente infectados com o *T. cruzi* e entre 10.000 e 14.000 mortes são atribuídas à doença de Chagas por ano (RASSI *et al.*, 2012).

O parasita é transmitido ao homem pela picada do inseto vetor (Hemiptera: Reduviidae), o triatomíneo conhecido popularmente como barbeiro, e por formas não vetoriais, tais como transfusões de sangue, através da placenta ou durante o parto, transplantes de órgãos, ingestão de alimento ou líquido contaminado, contato ou criação de animais infectados, e acidentes de laboratório (MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

Durante os últimos anos, a Doença de Chagas tem recebido atenção crescente como um problema emergente na América do Norte e Europa, devido à migração de pessoas de países endêmicos da América Latina para países não endêmicos, incluindo o Canadá, Espanha, França, Japão e Austrália (GASCON *et al.*, 2010; SCHMUNIS; YADON , 2010). Além da transmissão congênita, esses países têm pouca experiência com Doença de Chagas em relação à vigilância de doadores de sangue e cuidados médicos para pacientes chagásicos (COURA; VIÑAS, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010).

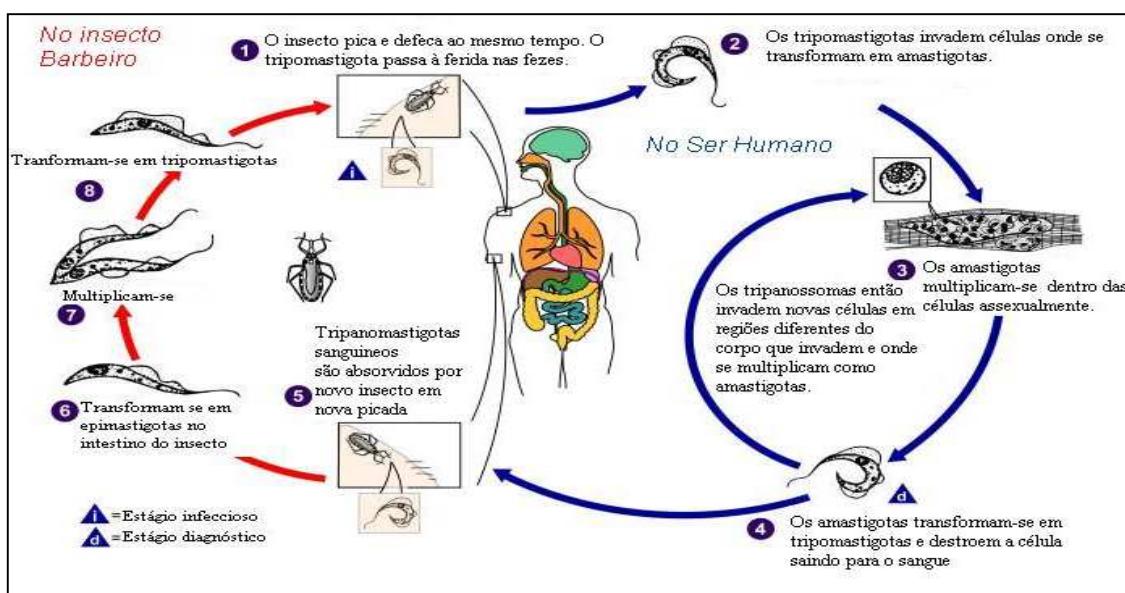
No Brasil, após significante redução do vetor e de transmissão transfusional do *T. cruzi*, o número de casos com a forma aguda da Doença de Chagas foi reduzido drasticamente (SILVEIRA, 2011). Entretanto, estimativas recentes apontam que existem de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas no Brasil (DIAS, 2007; RAMOS JR *et al.*, 2010), com aproximadamente 6000 mortes por ano (MARTINS MELO *et al.*, 2012). De acordo com Martins Melo *et al.* (2013), a prevalência da Doença de Chagas no estado do Ceará é de 4,2%.

O *T. cruzi* possui um ciclo heteroxêmico, no qual a infecção ocorre no momento da picada, quando o inseto defeca no hospedeiro, e o ato de coçar o local, estimulado por uma substância irritante liberada pelo barbeiro, provoca a inoculação das formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* no hospedeiro (CESTARI, 2006). No organismo (SILVA *et al.*, 2007), o parasita invade o citoplasma de algumas células nucleadas, como macrófagos, e se

converte na sua forma reprodutiva, chamada amastigota. Após vasta reprodução no interior dessas células, os protozoários retomam a forma de tripomastigota e rompem a célula hospedeira, voltando para a circulação. A transmissão ocorre quando um triatomíneo se alimenta de sangue contaminado e pica outro indivíduo, reiniciando o ciclo (CESTARI, 2006). Uma representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi* é representada na figura 2.

A Doença de Chagas possui duas fases clínicas definidas. A fase aguda apresenta elevada parasitemia e, em muitos casos, ausência de sintomas. Os casos sintomáticos apresentam sinais no local da infecção, como chagoma de inoculação e sinal de Romanã (Figura 3), febre, adenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos graves. Após esse quadro, a doença evolui para a fase crônica, que pode manifestar-se em algumas formas principais, como indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista (COURA, 2007).

Figura 2- Transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi, (acesso em 03 jan. 2014).

Figura 3- Sinal de Romanã.



Fonte: <http://www.medfoco.com.br>, (acesso em 03 jan. 2014)

Na forma crônica indeterminada, grande parte dos pacientes é assintomática e não apresenta alterações para eletrocardiograma e exames radiológicos no coração, esôfago e colôn. Apesar disso, exames sorológicos e xenodiagnóstico podem aparecer repetidamente positivos por períodos de tempo que podem variar de meses a anos (LESCURE *et al.*, 2010).

A forma cardíaca é a mais comum e mais grave manifestação da fase crônica da Doença de Chagas. Geralmente, aparece entre os 20 e 40 anos, cerca de 5 a 15 anos após a contaminação com o *T. cruzi*. Os principais sinais e sintomas característicos dessa forma clínica são arritmia, falência cardíaca, bloqueio atrioventricular e tromboembolismo (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

Na fase crônica digestiva, as manifestações clínicas observadas são devido a alterações na peristalse, levando ao aumento de estruturas como o esôfago (megaesôfago) e colôn (megacolôn) (MATSUDA *et al.*, 2009).

Atualmente, existem apenas dois medicamentos eficazes para o tratamento de pacientes com Doença de Chagas: benzonidazol e nifurtimox. Ambos levam a morte do patógeno por liberação peróxido de hidrogênio, mas possuem alta toxicidade para o paciente, apresentando diversos efeitos colaterais, como a agranulocitose, púrpura trombocitopênica, depressão da medula óssea, polineuropatias, parestesias e polineurites de nervos periféricos (VIOTTI *et al.*, 2009).

No Brasil, o tratamento com o nifurtimox deixou de ser adotado devido alta toxicidade e por provocar severos efeitos colaterais (CANÇADO, 2002). O benzonidazol é o tratamento adotado pelo Ministério da Saúde, todavia possui eficácia limitada e também

desencadeia muitos efeitos colaterais (BRENER; FILARDE, 1984; COURA *et al.*, 1997; ABE *et al.*, 2002b; CANÇADO, 2002; PE'REZ-AYALA, *et. al.*, 2011).

Embora o Benzonidazol ainda seja utilizado no tratamento da Doença de Chagas, este medicamento é limitado por causa de sua toxicidade e por raramente surtir efeitos benéficos durante a fase crônica da doença, além disso, este tratamento só cura cerca de 20% de todos os pacientes (URBINA; DOCAMPO, 2003).

Estas limitações encorajam a busca por novas alternativas de compostos sintéticos ou naturais eficazes para o tratamento clínico de Doença de Chagas (ADADE *et al.*, 2012).

1.6. Mecanismos de morte celular e citometria de fluxo

Estudos recentes buscam encontrar novas ferramentas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas, procurando, em produtos naturais, substâncias capazes de inibir o crescimento do *Trypanossoma cruzi*. Estes estudos também investigam o mecanismo de morte celular, onde idealiza-se mecanismos de morte celular programada, que tornam as substâncias testadas promissoras (DEOLINDO *et al.*, 2005; DEOLINDO *et al.*, 2010; ADADE *et al.*, 2012; ADADE *et al.*, 2013).

O processo de morte celular corresponde à perda de funções celulares, provenientes de alterações morfológicas, bioquímicas e/ou moleculares e ocorrendo através de motivos accidental (ou seja, passivo, sem uso de energia) ou programado (ou seja, ativo, com uso energia) (SLOVITER, 2002).

O processo conhecido como necrose é um processo passivo de morte celular de caráter degenerativo, decorrente de eventos como lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento, levando a alterações na integridade de membrana citoplasmática, aumento do volume celular, colapso da produção de ATP e perda das demais funções biológicas (YU; CHOI, 2000). Esse mecanismo constitui uma forma accidental de morte celular cujas principais características morfológicas são aumento do volume celular, agregação de cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática, lise celular precoce (Figura 4) com consequente liberação do conteúdo citoplasmático causando dano às células vizinhas além de uma reação inflamatória local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

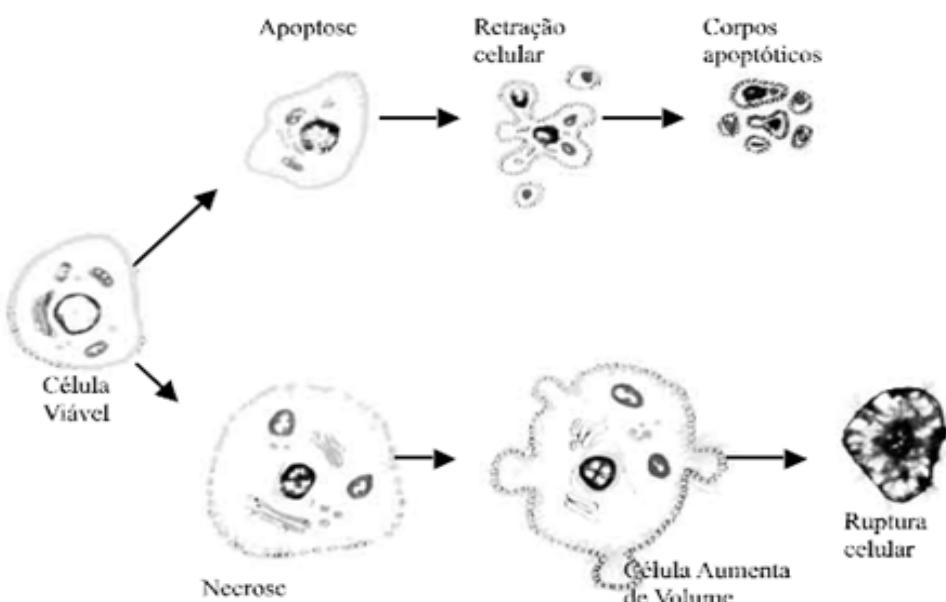
A morte celular programada é um processo ativo regulado geneticamente e é fundamental para a homeostase dos organismos metazoários, desempenhando um papel

fundamental na morfogênese, fisiologia e defesa do hospedeiro contra diferentes patógenos, inclusive evitando uma resposta inflamatória (GUIMARÃES; LINDEN, 2004). Com base em critérios de morfologia e nas condições ambientais, a morte celular programada tem sido caracterizada em diferentes tipos, tais como apoptose e autofagia (KROEMER *et al.*, 2009).

Uma vez desencadeada, a apoptose é principalmente caracterizada pela retração citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA cromossômico, inchaço mitocondrial com alterações no potencial de membrana e permeabilidade, exposição de resíduos de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, ativação de caspases, formação de protuberâncias da membrana plasmática e a embalagem de constituintes intracelulares em vesículas apoptóticas (GUIMARÃES; LINDEN, 2004).

Esta forma de morte celular tem como principais características a ausência de liberação de conteúdo celular, a ausência de reação inflamatória local e dano às células vizinhas e redução do volume celular (KERR; WYLLIE; DURRIE, 1972). Dessa forma, funciona como um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual regulada por proteínas que são expressas pelas próprias células durante o processo de injúria (ANAZETTI; MELO, 2007).

Figura 4- Características morfológicas da apoptose e da necrose.



Fonte: GRIVICICH *et al.*, 2007.

Em contraste, a autofagia é uma complexa via de sinalização envolvendo mais de 30 proteínas que funciona para remoção e/ou remodelação de estruturas celulares danificadas. É morfologicamente caracterizado pela formação de autofagossomo (vesículas de membrana dupla) que é responsável por englobamento dos constituintes citoplasmáticos, estruturas de membranas concêntricas no citoplasma e organelas ao redor e danos nucleares limitados (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2005; MEIJER *et al.*, 2007).

Qualquer tipo de injúria celular pode desencadear uma variedade de respostas de adaptação, reparação, proliferação ou morte celular programada ou não programada. Pesquisas experimentais com cultura de células evidenciaram que a exposição destas a um mesmo agente tóxico, como um pro-oxidante, por exemplo, pode desencadear morte celular das mesmas por necrose ou apoptose, a depender da dose e do tempo de exposição ao agente indutor (DYPBUKT, *et al.*, 1994; BONFOCO *et al.*, 1995).

Diferentes morfologias entre células necróticas e apoptóticas podem ser detectadas por análise de propriedades de dispersão de luz em citometria de fluxo. A dispersão de luz frontal é comumente utilizada para distinguir células de tamanho aproximado. A quantidade de dispersão lateral da luz geralmente se correlaciona com o grau de granulosidade de uma célula. O Citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) pode analisar pelo menos cinco parâmetros diferentes: (I) dispersão frontal de luz (FSC, indica o tamanho da célula), (II) dispersão lateral de luz (SSC, indica granulosidade), (III) FL1 (fluorescência verde, usado para os marcadores FITC, R123, GFP), (IV) FL2 (fluorescência vermelha; usado para os marcadores PI, CMTMros , PE), e (V) FL3 (fluorescência vermelha extrema, usado para os marcadores PI , Cy-Chrome). Assim, tamanho e granulosidade celular podem ser estudados em combinação com marcadores de integridade da membrana (KRYSKO *et al.*, 2008).

Células marcadas com PI (fluorocromo que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável) podem ser detectadas no parâmetro FL2 ou FL3 (Citômetro de fluxo FACSCalibur, Becton Dickinson), indicando células em possível processo necrótico. A detecção de células apoptóticas pode ser realizada pela dosagem de fosfatidilserina (PS). PS é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Nas células no início da apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. O aparecimento de PS na superfície celular é reconhecido pelos fagócitos, que captam este sinal e removem a célula que sinalizou seu “suicídio” ao ambiente.

Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e possui alta afinidade por PS na presença íons de cálcio. Mudanças nesta assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana. A Anexina V conjugada ao FITC pode ser detectada no parâmetro FL1. Desse modo, corar células simultaneamente com Anexina V-FITC (fluorescência verde) e com o corante PI (fluorescência vermelha) permite a discriminação de células intactas, viáveis (FITC - PI -), no início de apoptose (FITC + PI -) e células tardivamente apoptóticas ou necróticas (FITC + PI +) (KRYSKO *et al.*, 2006).

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos vários relatos sobre os efeitos tóxicos de venenos animais, estes também têm sido amplamente reconhecidos como uma das principais fontes de moléculas biologicamente ativas (PIMENTA; LIMA, 2005). As substâncias bioativas derivadas de produtos animais são focos atuais da ciência na busca de novos medicamentos e aplicações em biotecnologia (HARVEY *et al.*, 1998; MORTARI *et al.*, 2007; SANCHEZ; EBLE, 2009), pois possuem estruturas com grande diversidade química, especificidade bioquímica, e outras propriedades moleculares que os tornam favoráveis como substâncias que conduzem à descoberta de novos fármacos (ALTMANN, 2001).

A busca de novas substâncias com possível ação microbicida é de grande importância, uma vez que a resistência antimicrobiana é uma preocupação global para o tratamento de doenças infecciosas nos últimos anos. As infecções causadas por microrganismos resistentes, muitas vezes não respondem ao tratamento convencional, resultando em prolongamento da doença e maior risco de morte (ZASLOFF, 2002; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2013).

As doenças parasitárias também necessitam de fundamental atenção, tanto devido ao aumento significativo da resistência dos parasitos aos agentes terapêuticos disponíveis, como ao fato de serem comumente classificadas como doenças negligenciadas, as quais afigem preferencial ou exclusivamente países em desenvolvimento e possuem pouco incentivo para a pesquisa, para o desenvolvimento tecnológico e para inovação geradora de produtos necessários à saúde das populações desfavorecidas.

A Doença de Chagas é uma parasitose causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Esta doença é endêmica de controle prioritário no mundo. No contexto epidemiológico, o Nordeste brasileiro ocupa importância acentuada. Os medicamentos utilizados para o tratamento dessas doenças possuem limitada eficácia (CANÇADO, 2002; MCKERROW *et al.*, 2009) e efeitos colaterais importantes (SOUZA JUNIOR *et al.*, 2009). Assim, o atual cenário farmacológico aplicado à Doença de Chagas chama a atenção para a necessidade da busca de fármacos mais eficazes e com menos efeitos colaterais. Dentro deste contexto, substâncias bioativas de origem animal podem servir de modelos para serem utilizadas como fármacos na terapêutica.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar o potencial antimicrobiano e antiparasitário do veneno da *Dinoponera quadriceps* visando à descoberta de uma ferramenta farmacológica e/ou substância de valor terapêutico.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima do veneno sobre cepas microbianas de referência;
- Determinar a concentração letal mínima do veneno sobre cepas microbianas de referência;
- Avaliar o efeito do pH na atividade antibacteriana do veneno de *D. quadriceps* sobre *S. aureus* ATCC 6538P;
- Estudar o efeito do tempo de exposição ao veneno sobre a viabilidade de *S. aureus* ATCC 6538P;
- Avaliar a ação do veneno de *D. quadriceps* na alteração da permeabilidade da membrana celular de *S. aureus* ATCC 6538P;
- Avaliar alterações na morfologia de *S. aureus* ATCC 6538P causadas pelo veneno de *D. quadriceps*;
- Avaliar o potencial citotóxico do veneno sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de cepa Y de *Trypanossoma cruzi*;
- Avaliar o efeito do veneno de *D. quadriceps* sobre a integridade de membrana e a externalização de fosfatidilserina em formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Avaliar a toxicidade do veneno em estudo sobre macrófagos RAW 264.7.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do veneno

As formigas *Dinoponera quadriceps* foram coletadas na serra de Maranguape-CE e na Reserva Natural Serra das Almas, Crateús-CE, com autorização do IBAMA/SISBIO – licença Nº 28794-1. Após a identificação do ninho, o mesmo foi escavado e todos os exemplares encontrados foram coletados com auxílio de pinças e levadas ao Laboratório de Biologia de Insetos Sociais/UECE para criação, extração da peçonha e dissecção da glândula de veneno sob a orientação do Prof. Yves Patric Quinet.

4.2 Ensaios Microbiológicos

4.2.1 Cepas Microbianas

Foram utilizadas nos ensaios microbiológicos sete cepas microbianas de referência, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (MSSA), *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA), *S. aureus* CCBH 5330 (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* sorotipo *choleraesuis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231, mantidas no Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada.

4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

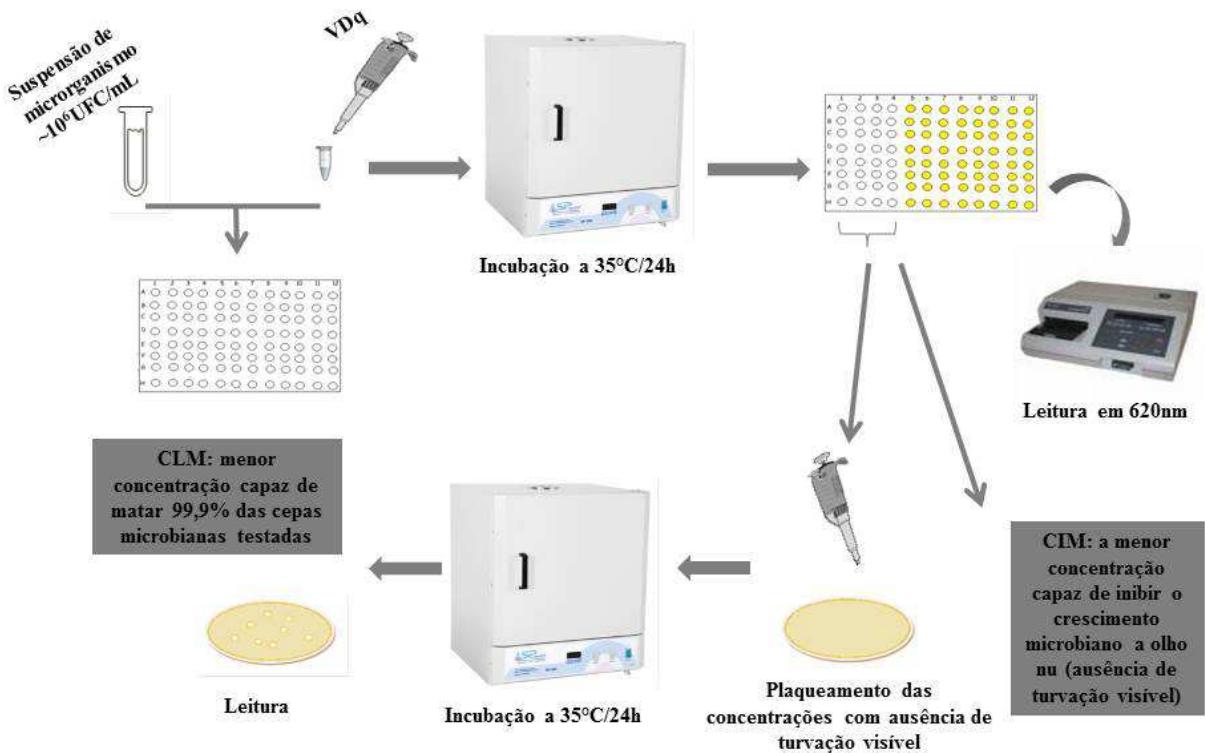
A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo de cultura (CLSI, 2003). Para isso, foram utilizadas microplacas com 96 poços de fundo redondo e estéreis. Culturas microbianas puras mantidas em ágar estoque sob refrigeração, foram repicadas para caldo Infusão de Cérebro e Coração (Caldo BHI, Merck) e incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (6-8h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turvação visível equivalente à do tubo 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde a uma suspensão microbiana contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL. A suspensão obtida foi diluída 100 vezes, em solução salina 0,85% estéril, resultando em uma cultura com aproximadamente 10^6 UFC/mL. Alíquotas 100µL dessa suspensão foram adicionadas a cada

poço, já preenchidos com 80 μ L de caldo BHI ou caldo Sabouraud (Merck). Em seguida, alíquotas de 20 μ L de do veneno da *Dinoponera quadriceps* (VDq) ou antimicrobiano, em diferentes concentrações foram adicionadas, totalizando um volume final de 200 μ L por poço. Como controle positivo (inibição do crescimento microbiano) foram utilizados antimicrobiano e antifúngico de uso comercial (amicacina para bactéria e cetoconazol para levedura) e como controle negativo (não-inibição do crescimento microbiano) Tampão Fosfato em Salina (PBS). As placas, fechadas por tampas apropriadas e esterilizadas, foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C. Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano e a leitura das absorbâncias em leitora de Elisa Bio-Tek a 620nm. A Concentração Inibitória Mínima foi considerada a menor concentração do VDq capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, mediante inspeção a olho nu (ausência de turvação visível). Os valores de absorbância foram utilizados para corrigir erro de turvação da substância. A determinação da população microbiana presente no inóculo inicial foi realizada por contagem em meio sólido (Ágar Plate-Count, Merck). Os experimentos foram realizados em triplicata (Figura 5).

4.2.3. Determinação da Concentração Letal Mínima – CLM

A determinação da Concentração Letal Mínima foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Baron, Peterson, Finegold (1994). Alíquotas de 5 μ L foram retiradas, de forma asséptica, dos poços usados para determinar a CIM, que não apresentarem turvação visível e foram semeadas pelo método da gota, na superfície no Ágar Plate- Count (Merck) (ROMEIRO, 2007). Após incubação durante 24 horas a 35°C foi realizada a contagem das colônias crescidas sobre a superfície do meio sólido. Aquela concentração onde o crescimento microbiano nas placas de Petri foi inferior a 0,1% do inóculo inicial foi considerada como a CLM. Os experimentos foram realizados em triplicata (Figura 5).

Figura 5- Desenho esquemático das metodologias de determinação da CIM e CLM.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4 Ensaio de sensibilidade ao pH

O efeito do pH sobre a atividade antibacteriana de VDq sobre *S. aureus* ATCC 6538P foi avaliado como descrito por Gonçalves *et al.* (2012). Tubos contendo caldo Mueller-Hinton foram ajustados para os pH de 5,5.; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 usando 0,1 N HCl e NaOH 5M. A CIM foi determinada para cada diferente pH.

4.2.5 Efeito do tempo de exposição ao VDq sobre a viabilidade bacteriana

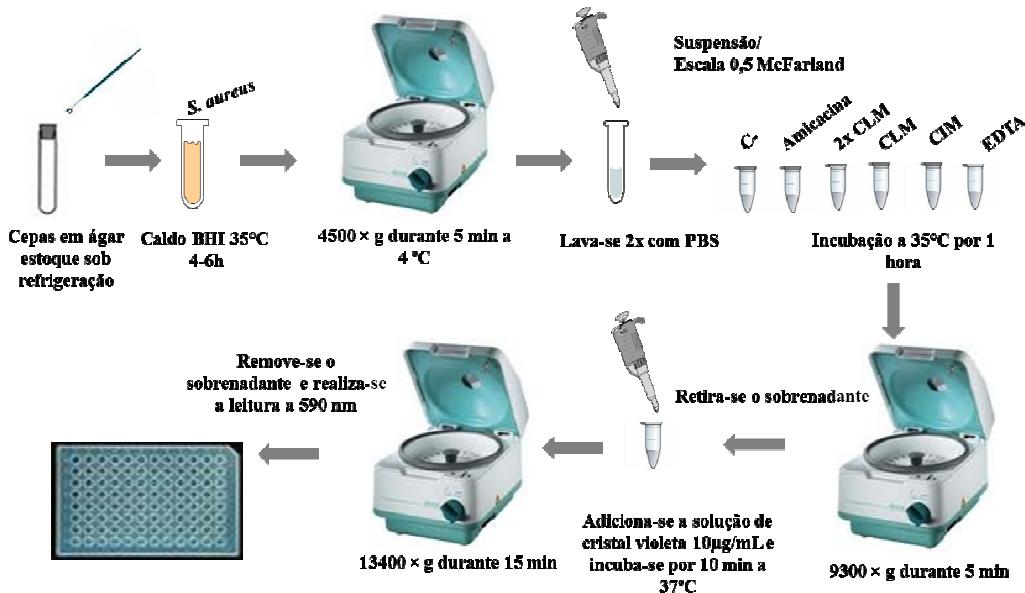
O efeito do tempo de exposição ao VDq sobre a viabilidade bacteriana foi avaliada como descrito por Gonçalves *et al.* (2012). Suspensões microbianas foram ajustadas a uma concentração de 10⁶ UFC/mL. Aliquotas de grupos experimentais tratados e não tratados foram removidos em intervalos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 h depois da adição de concentração equivalente à CLM de VDq e incubadas a 37 °C. Diluições seriadas foram plaqueadas em Agar Plate Count para a contagem de células viáveis. Os resultados foram expressos como log de UFC por mL (log UFC / mL).

4.2.6 Ensaio do Cristal Violeta

A alteração na permeabilidade da membrana foi detectada pelo ensaio do cristal violeta (DEVI *et al.*, 2010). Suspensões da cepa foram preparadas em caldo BHI e suas turvações ajustadas à escala de McFarland 0,5. As suspensões foram centrifugadas a $4500 \times g$ durante 5 min a 4 °C. As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS (pH 7,4). Concentrações do VDq equivalentes a CIM, CLM e 2 x CLM foram adicionadas à suspensão bacteriana e incubadas a 37 °C durante 30 min. EDTA (0,25M) foi utilizado como controle positivo. As amostras de controle negativo foram preparadas de forma semelhante, sem tratamento. As células foram centrifugadas em $9300 \times g$ durante 5 min. Depois, as culturas foram ressuspensas em PBS contendo 10 µg/mL de cristal de violeta. A suspensão bacteriana foi incubada durante 10 min a 37 °C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a $13.400 \times g$ durante 15 min e a absorbância do sobrenadante foi mensurada por espectrofotômetro a 590nm (Figura 6). Os experimentos foram realizados em triplicata. O valor médio da solução de cristal violeta que foi utilizada no ensaio foi considerada 100%. A percentagem de captação de cristal violeta de todas as amostras foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$(\text{ABS}_{590\text{nm}} \text{ da amostra} / \text{ABS}_{590\text{nm}} \text{ da solução de cristal violeta}) \times 100.$$

Figura 6- Desenho esquemático do ensaio do cristal violeta.

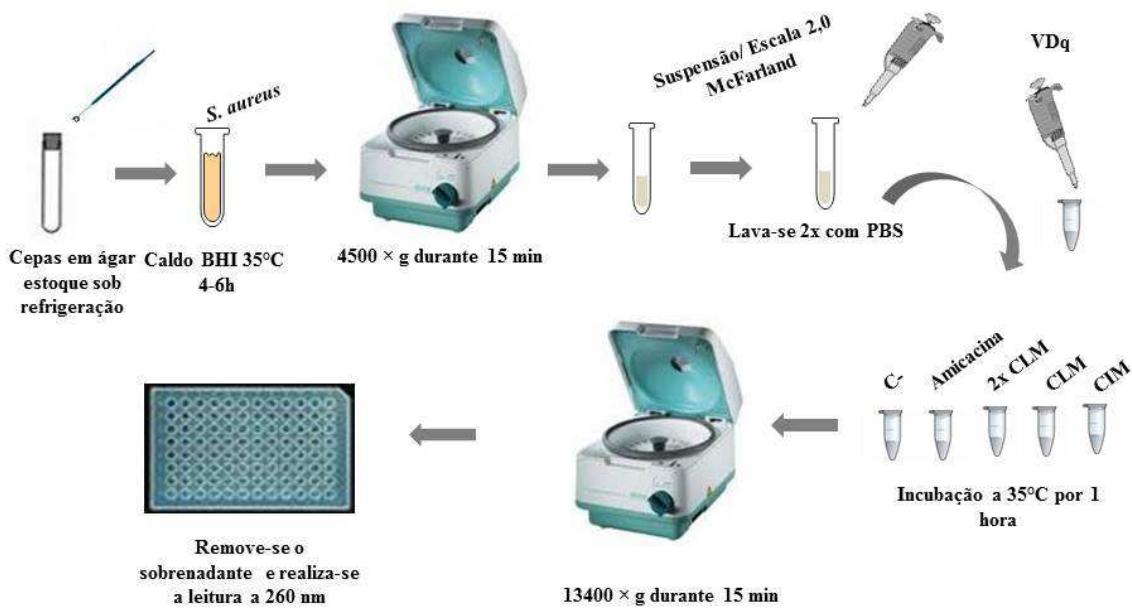


Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.7 Ensaio de Liberação de Material Genético

Suspensões bacterianas foram preparadas em caldo BHI e suas turvações ajustadas à escala de McFarland 2,0. As culturas foram centrifugadas a 400 x g durante 15 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado duas vezes e depois ressuspenso em PBS (pH 7,4). Concentrações equivalentes à CIM, CLM e 2 x CLM de VDq foram adicionados à suspensão de células. Amicacina foi utilizada como controle. O experimento foi realizado em triplicata. Células sem tratamento foram utilizadas como controle. Todas as amostras foram incubadas a 37 °C durante 60 min. Após tratamento, as suspensões foram centrifugadas a 13.400 x g durante 15 min e o valor da absorbância do sobrenadante foi mensurada por espectrofotômetro a 260nm, correspondendo à liberação de material genético (Figura 7). Os experimentos foram realizados em triplicata (DEVI *et al.*, 2010).

Figura 7- Desenho esquemático do ensaio de Liberação de Material Genético.

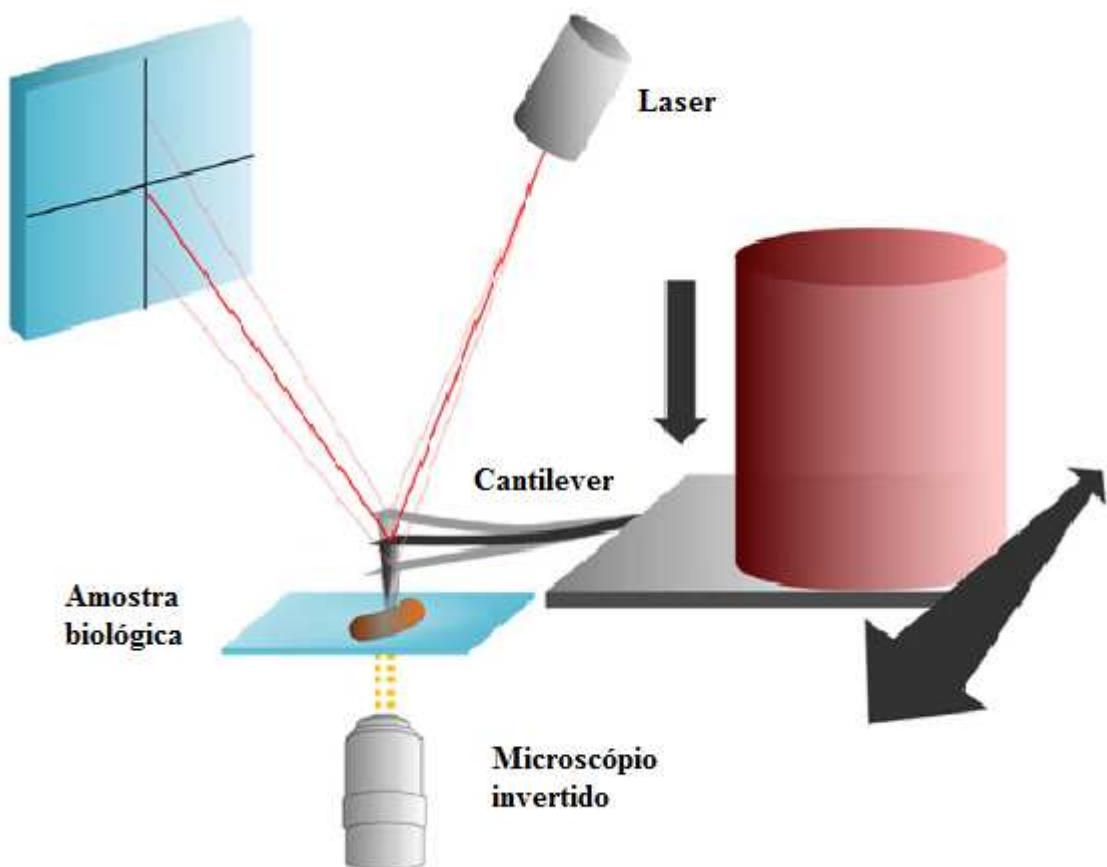


Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.8 Microscopia de Força Atômica

Alterações na morfologia bacteriana causada pelo VDq foram analisadas por microscopia de força atômica (MFA). Suspensões de culturas foram incubadas na presença de diferentes concentrações veneno (CIM e $\frac{1}{2}$ x CIM) por 4 horas a 37°C. As suspensões foram centrifugadas a 4.500 x g por 5 min a 4°C e lavadas duas vezes em PBS. Uma alíquota da suspensão foi colocada sobre uma lamínula circular e fixada ao ar por 15 minutos. As amostras foram examinadas através de um Nanoscópio Microscópio de Força Atômica Multimode III-A (Digital Instruments, Santa Bárbara) usando um cantilever de silício cristalino com uma mola constante nominal 40Nm-1 e frequência de ressonância de 242,38 kHz. Culturas não tratadas foram usadas como controle negativo (BRAGA; RICCI, 1998).

Figura 8- Desenho esquemático da técnica de Microscopia de Força Atômica.



Fonte: Pillet *et al.* (2013).

4.3. Ensaios Antiparasitários

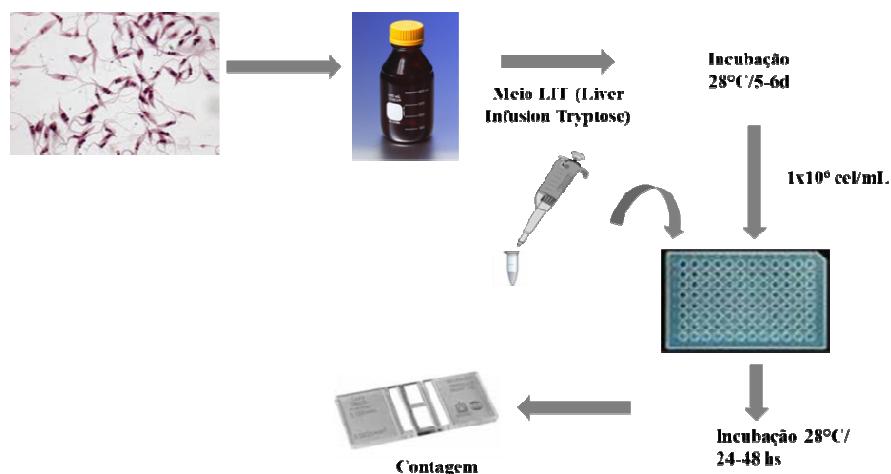
4.3.1. Cultivo das formas epimastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (liver infusion tryptose) de acordo com o procedimento descrito por Camargo (1964). Os parasitos foram mantidos a 28°C e repicados a cada 5-6 dias quando a concentração de parasitos na fase logarítmica atinge a densidade de 5×10^7 a 10×10^8 parasitos/mL. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer, após diluição em meio LIT.

4.3.2 Efeito citotóxico sobre formas epimastigotas de cepa Y *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram subcultivadas, em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^6 parasitos/mL e incubadas a 28°C em estufa de B.O.D. em meio LIT enriquecido com antibióticos e 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). As alíquotas de diferentes concentrações do VDq foram adicionadas à suspensão de parasitos. A placa foi incubada, em diferentes intervalos de tempo (24 e 48 horas) nas condições de cultivo. Neste ensaio tivemos como controle negativo PBS estéril (pH 7.4) (ABE, 2002a; GONÇALVES *et al.*, 2002), sendo a inibição do crescimento determinada por quantificação em câmara de Neubauer. As culturas sem tratamento foram consideradas 100% de crescimento e a IC50 foi determinada de acordo com o modelo PROBIT de análise de regressão.

Figura 9- Desenho esquemático da citotoxicidade em formas epimastigotas de *Trypanossoma cruzi*.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Determinação da integridade da membrana

As formas epimastigotas na concentração de 10^6 células/mL foram incubadas com a IC₅₀ de VDq e PBS (controle negativo) durante 24 horas em placas de 24 poços. Em seguida as células foram centrifugadas a 3000 RPM por 5 minutos. O precipitado obtido foi lavado 2 vezes com PBS e ressuspenso em 490 μ L de tampão de ligação (Hepes/NaOH 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4). As suspensões foram tratadas com 5 μ L de solução de Anexina V-FITC e 5 μ L de solução de PI (BD Pharmigen®, ambos na concentração final de 5 μ g/mL) por 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em 500 μ L de tampão de ligação e analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmigen) para contagem de células não-marcadas, marcadas unicamente com PI ou anexina V-FITC ou marcadas duplamente (DE LIMA, 2005; DEOLINDO *et al.*, 2005).

Figura 10- Desenho esquemático da determinação da integridade da membrana.



Fonte: Elaborada pela autora

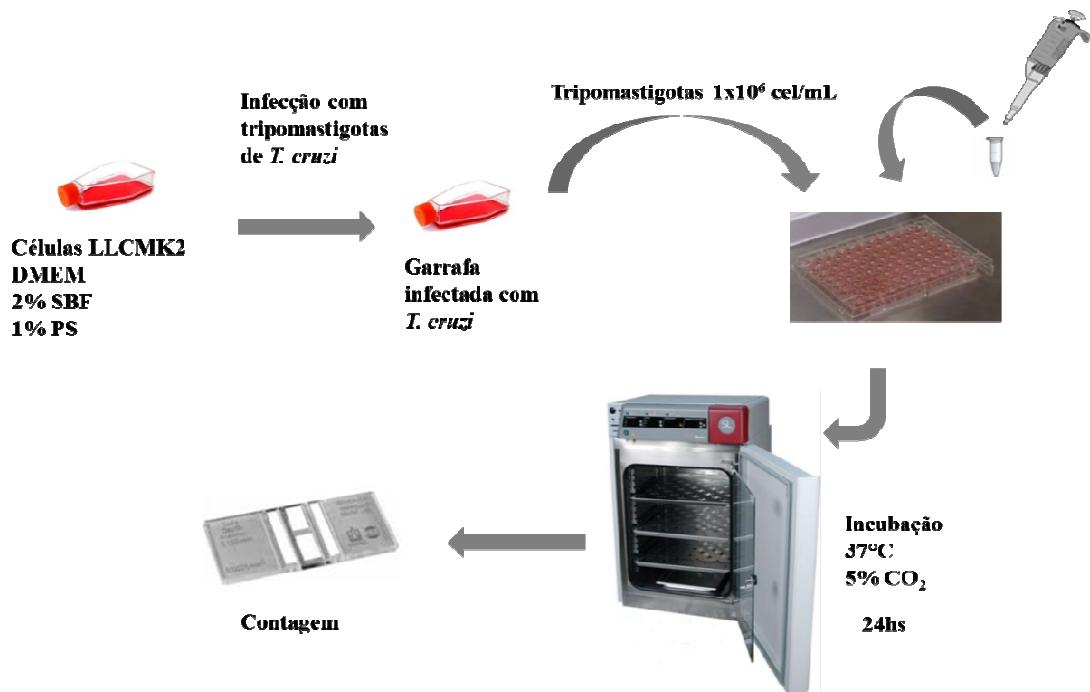
4.3.4 Cultivo de formas tripomastigotas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de células LLCMK2 infectadas, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) enriquecido com antibióticos e 2% de SBF, em atmosfera com 5% de CO₂ (APARICIO *et al.*, 2004).

4.3.5 Efeito citotóxico sobre formas tripomastigotas de cepa Y de *Trypanossoma cruzi*

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas através da infecção de células LLCMK2 foram subcultivadas, em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^6 parasitos/mL e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ em meio DMEM enriquecido com antibióticos e 2% de SBF. As alíquotas de diferentes concentrações do VDq foram adicionadas à suspensão de parasitos. A placa foi incubada durante 24 horas nas condições de cultivo. Neste ensaio teremos como controle negativo PBS estéril (pH 7.4). O movimento dos parasitos foi observado em microscópio invertido (100x) (ABE, 2002a; GONÇALVES *et al.*, 2002), sendo a inibição do crescimento determinada por quantificação em câmara de Neubauer. As culturas sem tratamento representaram 100% de crescimento e a IC50 foi determinada de acordo com o modelo PROBIT de análise de regressão.

Figura 11- Desenho esquemático de infecção e citotoxicidade de formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi*.

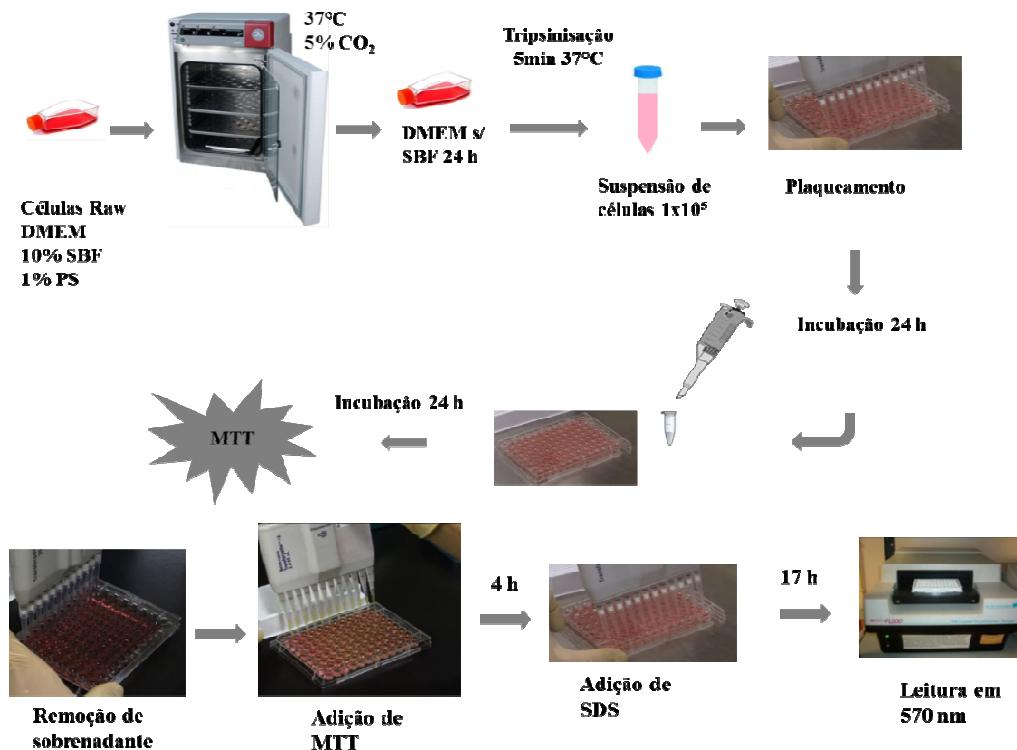


Fonte: Elaborada pela autora.

4.4. Ensaio de Toxicidade

As linhagens de macrófagos Raw 264.7 foram subcultivados em placas de microcultura ($\sim 1 \times 10^5$ céls/mL) em meio DMEM enriquecido com 10% de SBF e penicilina/estreptomicina, a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 2h para permitir a adesão das células. As células foram tratadas com diferentes concentrações do veneno nas condições de cultivo. A viabilidade dos macrófagos foi determinada utilizando o ensaio com MTT (MOSMANN, 1983). Após os períodos de 24 e 48 horas de incubação adicionou-se a solução de MTT (2,5mg/mL em PBS) em cada poço (10µL) por 4 horas nas mesmas condições e então adicionou-se 90 µL/poço de SDS (10%) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram incubadas por 17h e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro (570nm). Culturas de macrófagos sem nenhum tratamento foram consideradas como 100% de viabilidade.

Figura 12- Desenho esquemático de ensaio de toxicidade pelo MTT.



Fonte: Elaborada pela autora.

5. Análise Estatística

O efeito de diferentes concentrações de VDq na atividade antimicrobiana, no ensaio liberação de material genético e na captação de cristal violeta foram analisadas por Análise de Variância One-Way (ANOVA) e pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$. Para os demais experimentos, as médias obtidas foram analisadas por ANOVA e pós-teste de Dunnet, * $p < 0,05$.

Resultados

6. Resultados

6.1. Ensaios Microbiológicos

6.1.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM)

O veneno de *Dinoponera quadriceps* foi testado em diferentes concentrações (em µg/mL: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78) sobre as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *S. aureus* CCBH 5330, *S. aureus* ATCC 33591, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* sorotipo *choleraesuis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os meios de cultura utilizados foram Caldo Muller-Hinton para as bactérias e Caldo Sabouraud para a levedura. Os resultados obtidos foram comparados com um controle positivo (amicacina ou cetoconazol) e um controle negativo (PBS).

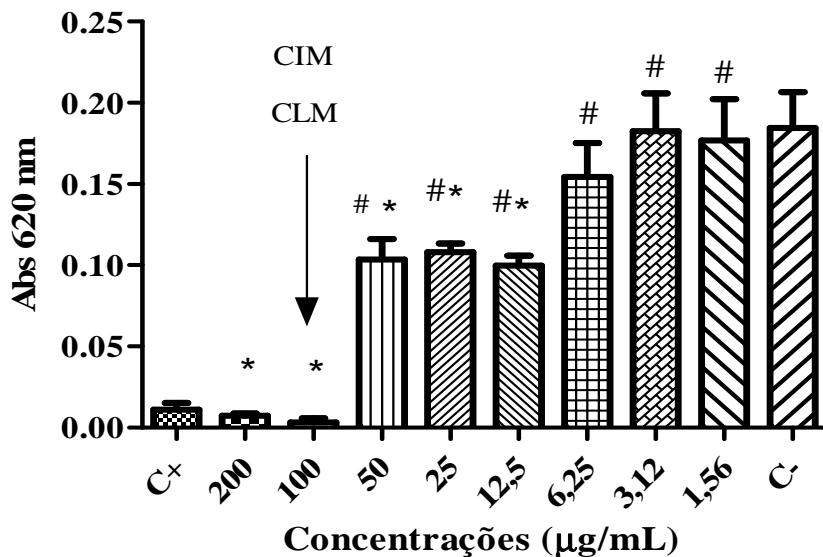
O veneno mostrou um efeito antimicrobiano sobre as cepas testadas (Tabela 2), inclusive sobre a cepa de levedura, mostrando amplo espectro de ação. O veneno mostrou maior potência contra *S. aureus* ATCC 6538P (figura 15) e *E. coli* ATCC 10536 (figura 16), demonstrando, inclusive, efeito contra *S. aureus* ATCC 33591 (figura 13) e *S. aureus* CCBH 5330 (figura 14), que são cepas Meticilina Resistentes.

Tabela 02- Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) do veneno total da *Dinoponera quadriceps* para cepas de referência.

Cepa	CIM (µg/mL)	CLM (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	6,25	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> CCBH 5330	12,5	50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	12,5	12,5
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i> sorotipo <i>choleraesuis</i> ATCC 10708	12,5	25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	3,12	3,12
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	25	50

Figura 13- Efeito antimicrobiano do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 (MRSA).

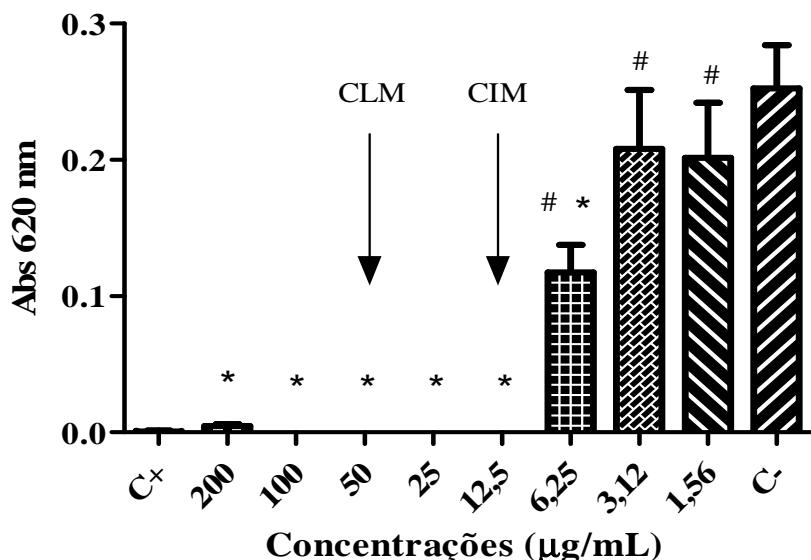
S. aureus 33591 x VDq



Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), *p<0,05 comparando com o (C-), #p<0,05 comparando com (C+). (C+) = Amicacina; (C-) = PBS.

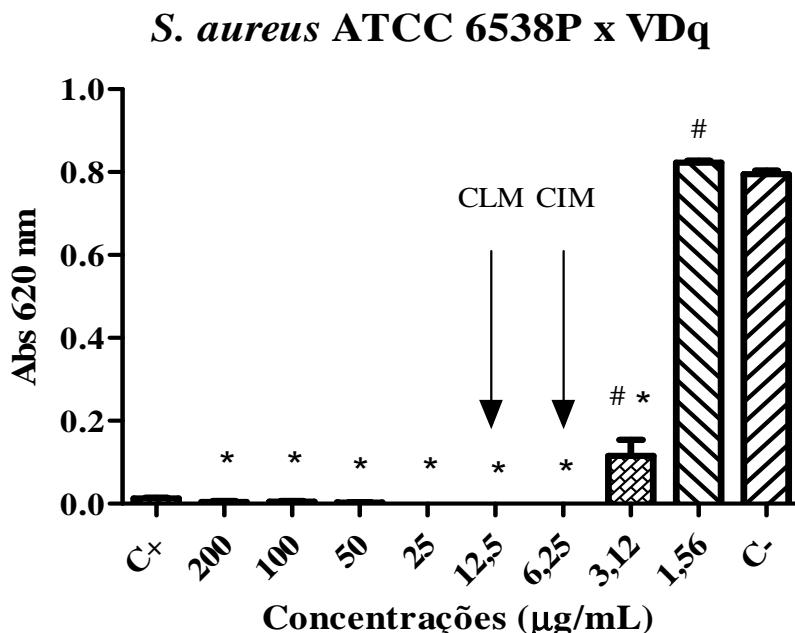
Figura 14- Efeito antimicrobiano do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre *Staphylococcus aureus* CCBH 5330 (MRSA).

S. aureus 5330 x VDq



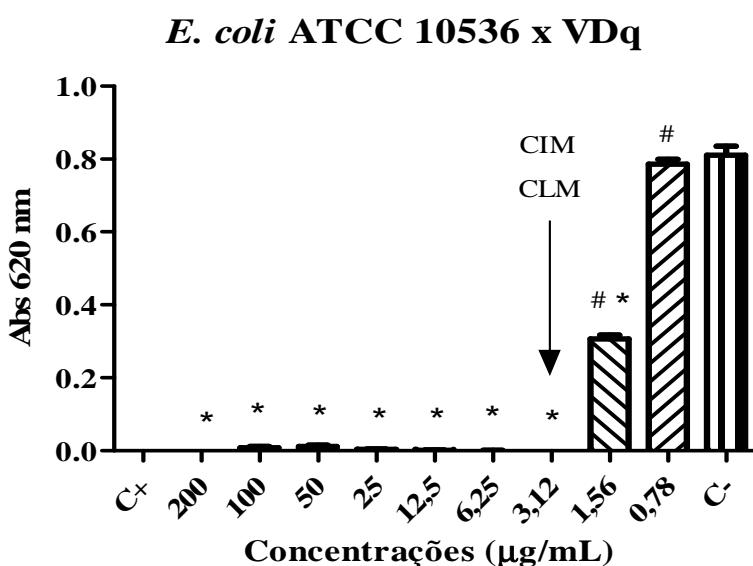
Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), *p<0,05 comparando com o (C-), #p<0,05 comparando com (C+). (C+) = Amicacina; (C-) = PBS.

Figura 15- Efeito antimicrobiano do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (MSSA).



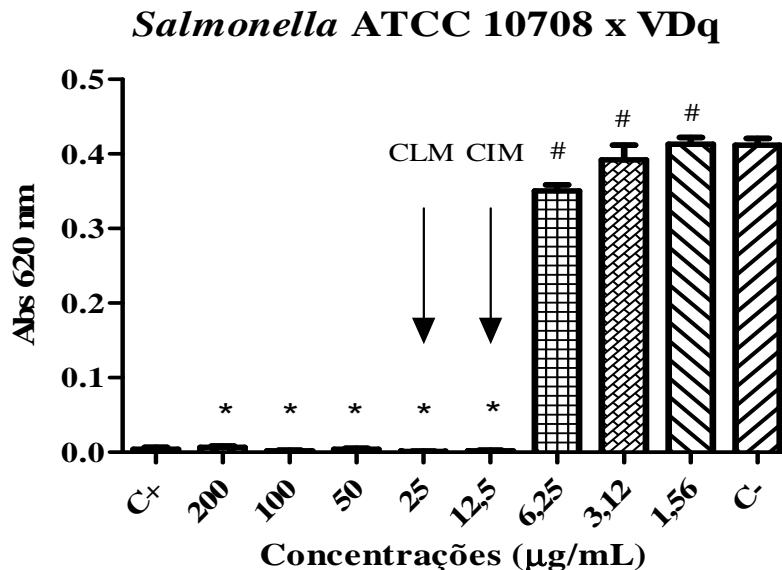
Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), *p<0,05 comparando com o (C-), #p<0,05 comparando com (C+). (C+) = Amicacina; (C-) = PBS.

Figura 16- Efeito antimicrobiano do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre *Escherichia coli* ATCC 10536.



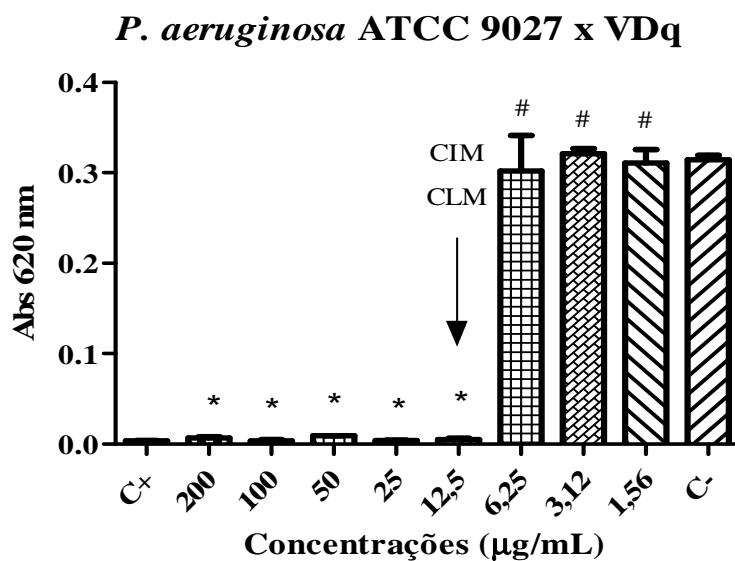
Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), *p<0,05 comparando com o (C-), #p<0,05 comparando com (C+). (C+) = Amicacina; (C-) = PBS.

Figura 17- Efeito antimicrobiano do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* sorotipo *choleraesuis* ATCC 10708.



Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), * $p<0,05$ comparando com o ($\text{C}-$), # $p<0,05$ comparando com ($\text{C}+$). ($\text{C}+$) = Amicacina; ($\text{C}-$) = PBS.

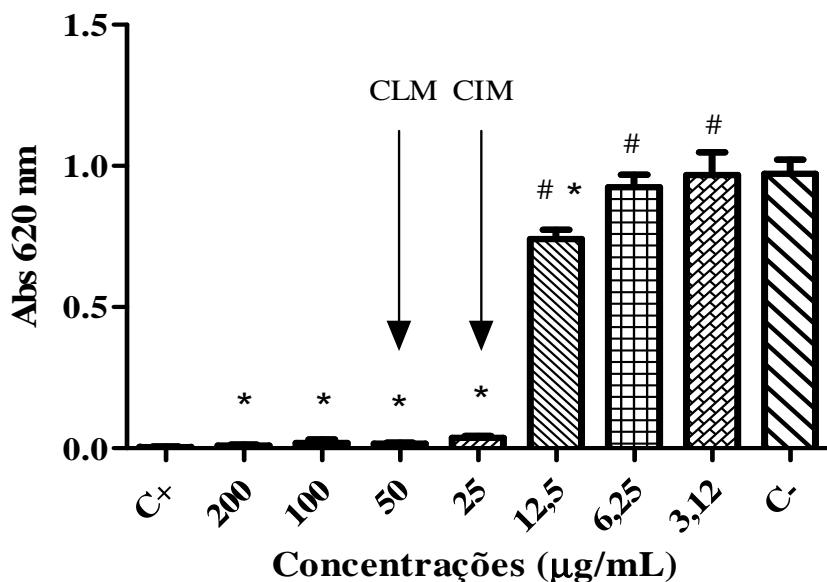
Figura 18- Efeito antimicrobiano do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.



Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), * $p<0,05$ comparando com o ($\text{C}-$), # $p<0,05$ comparando com ($\text{C}+$). ($\text{C}+$) = Amicacina; ($\text{C}-$) = PBS.

Figura 19- Efeito antimicrobiano do veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre *Candida albicans* 10231.

***C. albicans* ATCC 10231 x VDq**



Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$). Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), * $p<0,05$ comparando com o (C-), # $p<0,05$ comparando com (C+). (C+) = Cetoconazol; (C-) = PBS.

6.1.2 Efeito do pH na atividade antimicrobiana do VDq

O ensaio de sensibilidade ao pH foi realizado para a cepa de *S. aureus* 6538P. O ensaio do pH demonstrou um efeito inibitório de VDq sobre *S. aureus* pH-dependente. Nos pHs ácidos a neutros (5,0 - 7,0), observou-se uma CIM maior, como visto na tabela 03.

Tabela 03- Influência do pH na Concentração Inibitória Mínima do veneno de *Dinoponera quadriceps* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

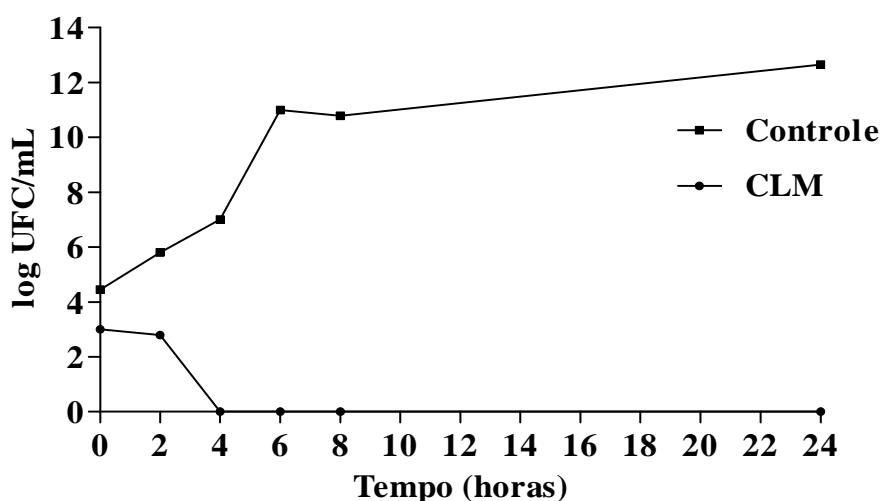
pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
VDq CIM ($\mu\text{g/mL}$)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	6,25	6,25	6,25	6,25

VDq= veneno de *Dinoponera quadriceps*; CIM = Concentração Inibitória Mínima

6.1.3. Efeito do tempo de exposição ao VDq sobre a viabilidade bacteriana

O efeito do tempo de exposição sobre a viabilidade da cepa de *S. aureus* 6538P para os tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. O tratamento com a concentração equivalente à CLM de VDq (12,5 µg/ml) foi capaz de matar todas as bactérias após 4h de incubação, como mostrado na Figura 20.

Figura 20- Efeito do tempo de exposição ao veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.

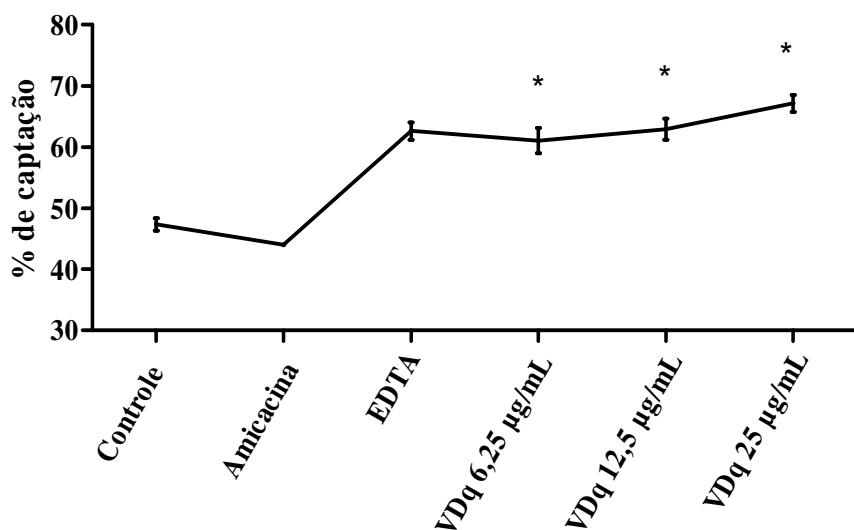


(CLM= Concentração Letal Mínima do veneno de *Dinoponera quadriceps*; Controle= Culturas bacterianas não tratadas).

6.1.4 Ensaio do Cristal Violeta

A alteração na permeabilidade da membrana foi avaliada utilizando a cepa de *S. aureus* 6538P pelo método de captação do cristal violeta. A captação de violeta de cristal por *S. aureus* ATCC 6538P foi de 47% na ausência de VDq, mas aumentou para 60-68% após o tratamento com o CIM (6,25 µg/mL), CLM (12,5 µg/mL) e 2 x CLM (25 µg/mL) de VDq, comparável com o agente quelante (EDTA dissódico, 0,25 M), cujo grupo experimental aumenta a captação para 60-65%. A amicacina não mostrou nenhum efeito, demonstrando que esta não altera a permeabilidade da membrana (Figura 21).

Figura 21- Percentual de captação de cristal violeta por *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P de grupos tratados com veneno de *Dinoponera quadriceps*.

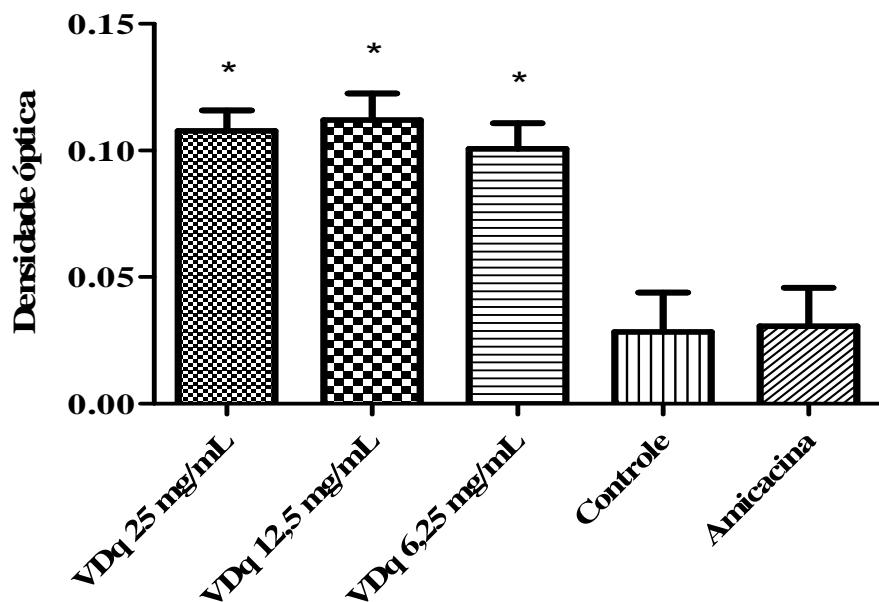


(VDq = Veneno de *Dinoponera quadriceps*; Controle = células tratadas com PBS; EDTA = células tratadas com EDTA dissódico 0,25 M; Amicacina = células tratadas com amicacina 3,12 ug / ml). Os dados são expressos por média ± EPM de três experimentos em triplicata. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), *p<0.05.

6.1.5 Ensaio de Liberação de Material Genético

A alteração na permeabilidade da membrana também foi avaliada pelo ensaio de liberação de material genético utilizando a cepa de *S. aureus* ATCC 6538P. Após o tratamento da suspensão de *S. aureus* com CIM (6,25 µg/mL), CLM (12,5 µg/mL) e 2 x CLM (25 µg/mL) de VDq, a densidade óptica na absorbância de 260 nm aumentou significantemente em todas as concentrações. Estes resultados sugerem que VDq causa danos à membrana citoplasmática, provocando a liberação de material genético (Figura 22).

Figura 22. Liberação de material genético de *Staphylococcus aureus* 6538P tratados com veneno de *Dinoponera quadriceps*.

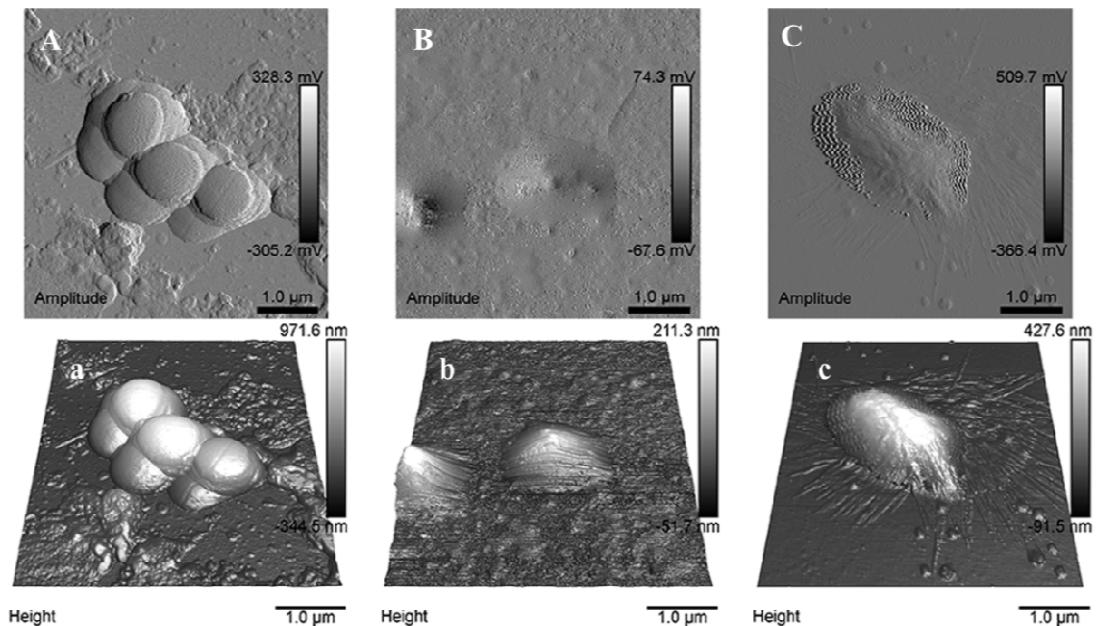


(Controle= células tratadas com PBS; Amicacina= celulas tratadas com amicacina 3,12 µg/mL). Os dados são expressos por média ± EPM de três experimentos em triplicata. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Tukey), *p<0.05.

6.1.6 Microscopia de Força Atômica

Alterações na morfologia bacteriana causada pelo VDq em *S. aureus* ATCC 6538P foram analisadas por microscopia de força atômica. De acordo com a Microscopia de Força Atômica, a morfologia de *S. aureus* não tratado com VDq é regular e lisa, com a parede celular intacta e arranjo característico semelhante a “cachos de uva”. As figuras 23B e 23C mostram a perda da integridade do envoltório celular após 4 horas de incubação com CIM (6,25 µg/mL) e CIM/2 (3,12 µg/mL) de VDq (Figura 23).

Figura 23- Imagens de Microscopia de Força Atômica de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P exposto e não exposto ao veneno de *Dinoponera quadriceps*.



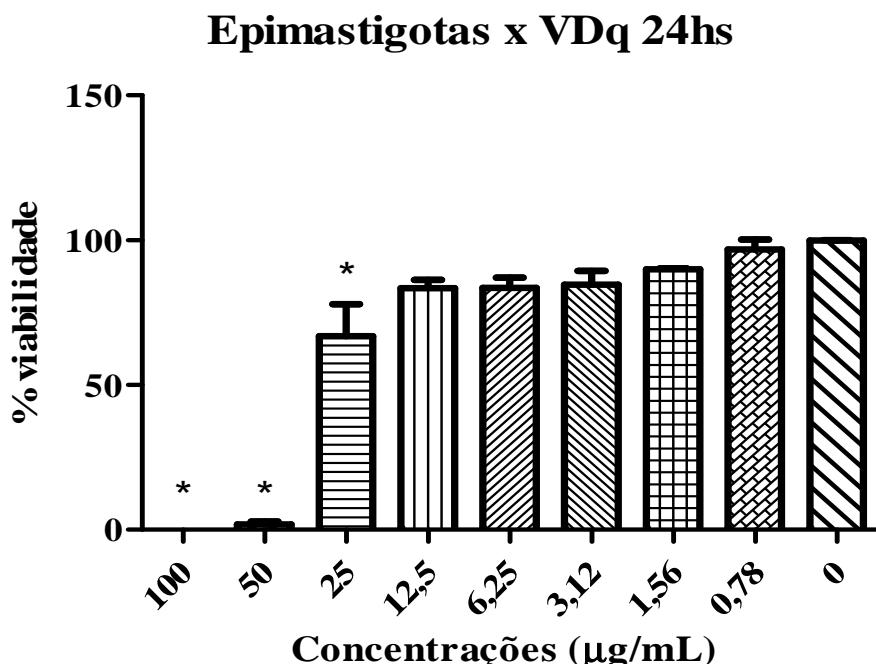
Imagens de Microscopia de Força Atômica de *S. aureus* ATCC 6538P sem exposição ao veneno de *D. quadriceps* (A e a), após a exposição à concentração de 6,25 µg/mL do veneno de *D. quadriceps* (B e b) e após a exposição à concentração de 3,12 µg/mL do veneno de *D. quadriceps* (C e c). Imagens de amplitude mostram a morfologia das células em A, B e C. A barra de escala em volts corresponde a mudanças na oscilação do cantilever livre. O aspecto tridimensional dos grupos é mostrado em a, b e c.

6.2 Ensaios Tripanocidas

6.2.1 Efeito citotóxico sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

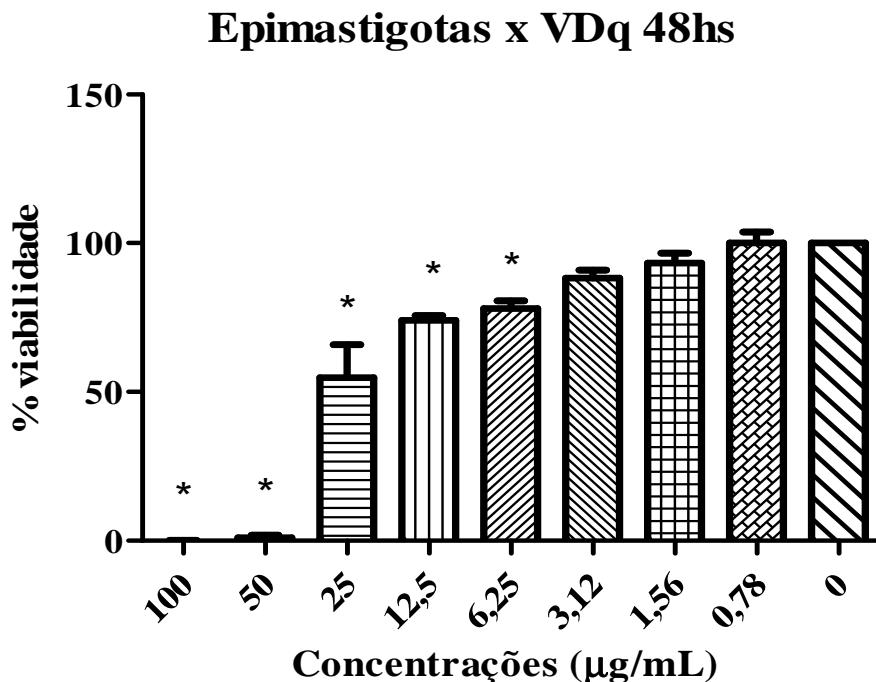
A citotoxicidade do veneno da *Dinoponera quadriceps* foi avaliado em formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações do veneno (em $\mu\text{g/mL}$: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78). A quantificação foi feita em câmaras de Neubauer e foram encontadas $\text{IC}_{50}= 28,32 \mu\text{g/mL}$ para o período de incubação de 24 horas e $\text{IC}_{50}= 20,67 \mu\text{g/mL}$ para o período de incubação de 48 horas. As figuras 24 e 25 representam a percentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja quantificação foi considerada 100%.

Figura 24- Efeito do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *Trypanossoma cruzi* no período de incubação de 24 horas.



Os dados são expressos por média \pm EPM da quantificação e representam o percentual de células viáveis. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), * $p<0,05$.

Figura 25- Efeito do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *Trypanossoma cruzi* no período de incubação de 48 horas.

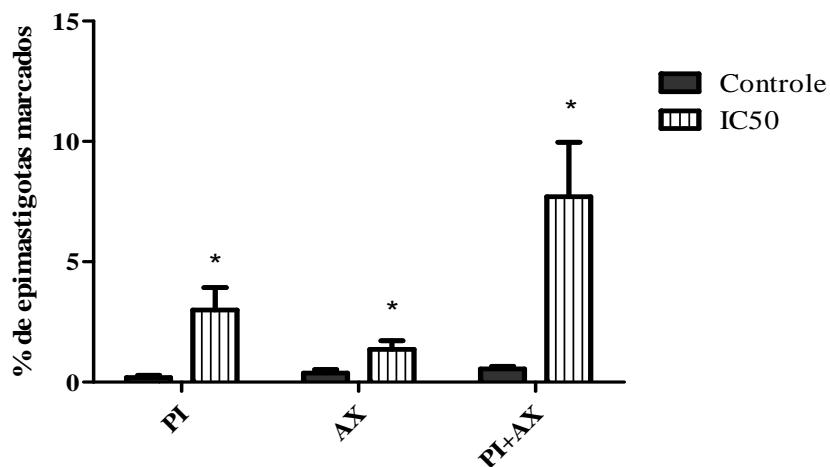


Os dados são expressos por média \pm EPM da quantificação e representam o percentual de células viáveis. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), * $p<0.05$.

6.2.2 Determinação da integridade da membrana

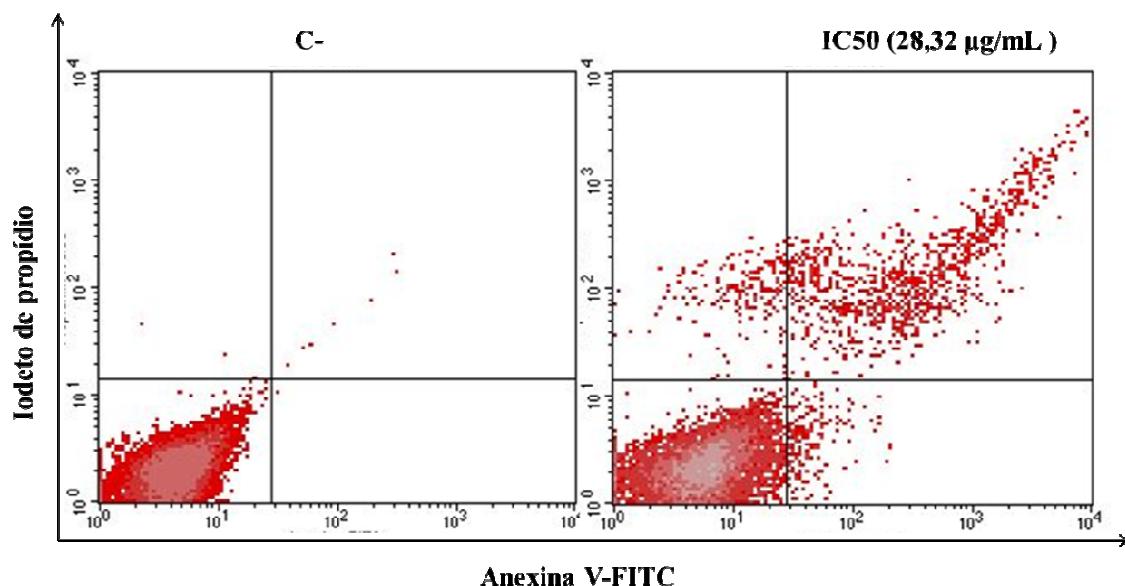
Com o objetivo de identificar alterações celulares indicativas de necrose e/ou apoptose induzidas por VDq, as células tratadas por 24 horas foram submetidas ao protocolo de marcação por iodeto de propídio (PI) e anexina V -FITC. No ensaio realizado com VDq, os resultados encontrados indicam a ocorrência discreta de eventos necróticos e apoptóticos, principalmente representados por células na fase de apoptose tardia, conforme demonstrado nas figuras 26 e 27.

Figura 26- Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre formas epimastigotas de *Trypanossoma cruzi* após 24 horas de incubação.



Os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$), e os dados expressos como percentagem de eventos \pm EPM. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet, * $p<0,05$ vs. grupo controle. (Controle= Células tratadas com PBS; IC50= Células tratadas com IC50 de 24 horas; PI=Iodeto de propídeo; AX=Anexina-FITC).

Figura 27- Avaliação do tipo de morte celular envolvido no efeito veneno de *Dinoponera quadriceps* sobre formas epimastigotas de *Trypanossoma cruzi* após 24 horas de incubação.

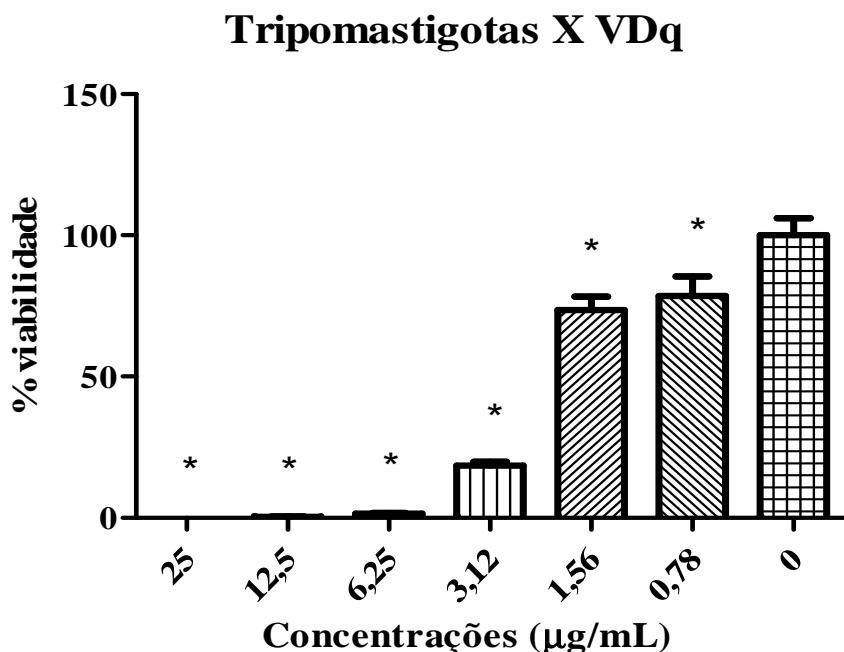


Representação da marcação simultânea de Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI). Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com PI; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com PI e Anexina V-FITC.

6.2.3 Efeito citotóxico sobre formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi*

A citotoxicidade do veneno da *Dinoponera quadriceps* foi avaliado em formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de exposição a diferentes concentrações do veneno (em $\mu\text{g/mL}$: 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78). A quantificação foi feita em câmaras de Neubauer e foi encontrada $\text{IC}50 = 1,978 \mu\text{g/mL}$. A figura 28 representa a percentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja quantificação foi considerada 100%.

Figura 28- Efeito do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi* no período de incubação de 24 horas.

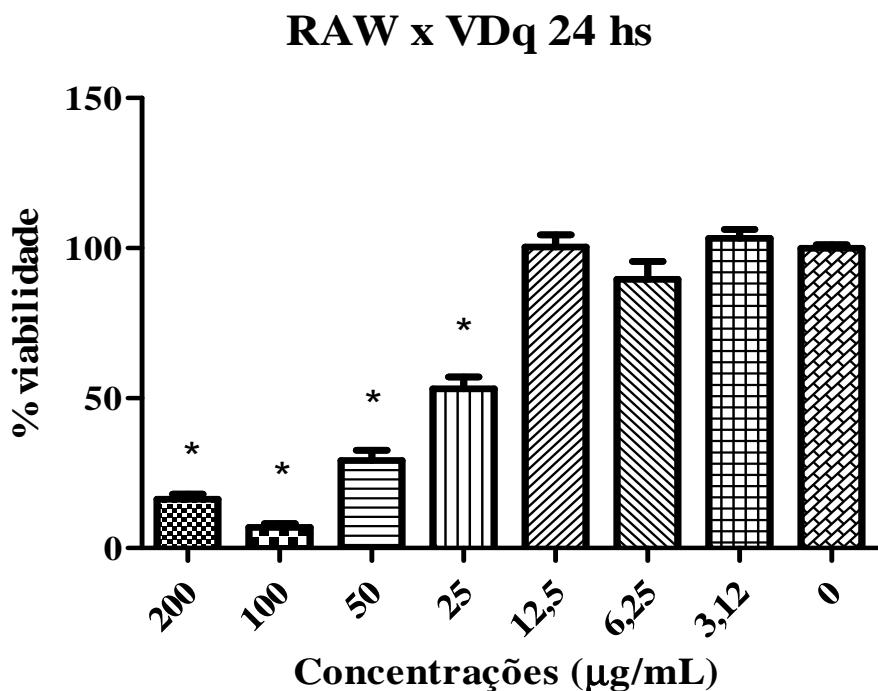


Os dados são expressos por média \pm EPM da quantificação e representam o percentual de células viáveis. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), * $p < 0,05$.

6.3 Ensaio de Toxicidade

A citotoxicidade do veneno da *Dinoponera quadriceps* foi avaliado em macrófagos murinos RAW 264.7 após 24 e 48 horas de exposição a diferentes concentrações do veneno (em $\mu\text{g/mL}$: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12). No ensaio com o MTT, o qual detecta viabilidade celular com base no metabolismo oxidativo, foi possível observar que o veneno de *D. quadriceps* induziu morte celular significativa até a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, com IC₅₀= 32,44 $\mu\text{g/mL}$. A figura 29 representa a percentagem de viabilidade celular em relação ao controle, cuja absorbância foi considerada 100%.

Figura 29- Efeito do veneno da formiga *Dinoponera quadriceps* sobre a viabilidade de macrófagos murinos RAW 264.7, ensaio com MTT.



Os dados são expressos por média \pm EPM da absorbância e representam o percentual de células viáveis. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett), *p<0,05.

Discussão

7. Discussão

Produtos naturais e os seus derivados representam mais de 30% dos produtos farmacêuticos atualmente no mercado e são as principais fontes de agentes terapêuticos inovadores (ADADE *et al.*, 2013).

Venenos de serpentes têm sido estudados quanto as suas propriedades antimicrobianas. Previamente foi observado que os venenos de *Bothropoides lutzi* (MENEZES *et al.*, 2012) e *Bothrops leucurus* (TORRES *et al.*, 2010a) possuem efeito bactericida sobre cepas de *S. aureus* e o veneno de *Bothrops marajoensis* sobre cepas de *S. aureus*, *C. albicans* e *P. aeruginosa* (TORRES *et al.*, 2010b). Alguns componentes têm sido relatados com atividade antimicrobiana, como Fosfolipase A₂ (PLA₂), metaloproteinases, L-Aminoácido oxidases (LAAOs) e peptídeos antimicrobianos (DE OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2013). Foi relatado efeito antimicrobiano de PLA₂ de venenos de serpentes como *Protobothrops mucrosquamatus*, *Bungarus fasciatus* sobre cepas Gram-positivo e Gram-negativo (WEI *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2007). Metaloproteinases isoladas de veneno da serpente *Akgistrodon halys* e LAAOs isoladas de *Bothrops mattogrossensis* e *Bothrops marajoensis* também apresentaram efeito sobre cepas Gram-positivo e Gram-negativo, bem como peptídeos antimicrobianos como cathelicidin-BF isolado de *Bungarus fasciatus* e PepBj isolado de *Bothrops jararaca* apresentam amplo espectro de ação antibacteriana (TORRES *et al.*, 2010b; DE OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2013).

Peptídeos antimicrobianos também foram isolados em venenos de vários outros animais, como escorpiões. Quatro peptídeos foram isolados a partir do veneno de *Heterometrus spinifer*, os quais não apresentam homologia com nenhum peptídeo conhecido, representando uma nova classe de peptídeos antimicrobianos de escorpião, com efeito sobre bactérias Gram-negativo, Gram-positivo e fungos (NIE *et al.*, 2012). Peptídeos isolados a partir de venenos dos escorpiões *Urodacus yaschenkoi* *Opistophthalmus carinatus* e *Parabuthus schlechteri* também mostraram atividade contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (MOERMAN *et al.*, 2002; REMIJSEN *et al.*, 2010; LUNA-RAMÍREZ *et al.*, 2013).

Várias frações com propriedades antimicrobianas têm sido isoladas de venenos de Hymenopteros. Dois peptídeos (Protonectina e Agelaia-MP) foram isolados do veneno da vespa social de *Agelaia pallipes pallipes*. Protonectina é um peptídeo não hemolítico quimiotático para leucócitos polimorfonucleares e ação potente antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivo e bactérias Gram-negativo. Agelaia-MP foi caracterizado como uma toxina

hemolítica degranuladora de mastócitos, com pobre ação antimicrobiana e não apresenta efeito quimiotático para leucócitos polimorfonucleares (MENDES *et al.*, 2004).

Melectina, sintetizada a partir do veneno da abelha *Melecta albifrons* e halictines, isolados do veneno da abelha *Halictus sexcinctus* também exibiram atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (CEROVSKÝ *et al.*, 2008; MONINCOVÁ *et al.*, 2010). Do veneno da vespa *Pteromalus puparum* foi identificado um peptídeo com grande semelhança à abaecina (peptídeo antimicrobiano encontrado no veneno da abelha melífera) com atividade contra bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, mas não contra fungos (SHEN *et al.*, 2010a).

No veneno da vespa *Nasonia vitripennis* foi encontrado um peptideo defensina-símile com potente efeito antimicrobiano sobre cepas de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo e fungos (YE *et al.*, 2010). Polybia-MP1 e polybia-CP, sintetizados a partir do veneno da vespa *Polybia paulista*, possuem uma potente atividade antibacteriana sobre cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis*. Polybia-CP também demonstrou atividade contra *P. aeruginosa*, o que não foi evidenciado por Polybia-MP1 (WANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013b).

No presente trabalho verificou-se o efeito antimicrobiano do veneno de *D. quadriceps* sobre cepas microbianas de *Staphylococcus aureus* Meticilina-Sensível (MSSA) e Meticilina-Resistente (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* utilizando a metodologia de microdiluição em caldo de cultura, onde observou-se efeito mais potente sobre a cepa de *S. aureus* MSSA e *E. coli*, com concentrações inibitórias de 6,25 e 3,12 µg/mL respectivamente.

Vários estudos têm procurado encontrar novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais. Quinet *et al.* (2012) demonstraram atividade antimicrobiana do veneno de formiga *Crematogaster pygmaea* sobre cepas Gram-positivo (*Enterococcus faecalis* e *S. aureus*) e Gram-negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Peptídeos antimicrobianos, chamados ponericinas, foram purificados do veneno de *Pachycondyla goeldii* e foram classificados em três famílias: ponericina G (sete peptídeos), W (seis peptídeos), e L (dois peptídeos). Ponericinas G1 e G3 tem um amplo espectro antibacteriano e anti-fúngico. Com exceção de W6, ponericins W são ativas contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo e levedura, e possuem expressivas ações hemolítica e inseticida. Ponericina L2 possui atividade contra bactéria, mas não contra fungos (ORIVEL *et al.*, 2001). Recentemente, seis peptídeos (dinoponeratoxinas) foram isolados do veneno

de *Dinoponera australis*. Dois deles (Da-3105 e Da-3177) mostraram 92,9% de similaridade com ponericina G2 (JOHNSON *et al.*, 2010).

Alcalóides do veneno da formiga *Solenopsis invicta* e peptídeos antimicrobianos (pilosulins) que foram encontrados no veneno da formiga *Myrmecia pilosula* também exibiram atividade sobre cepas bacterianas Gram-negativo e Gram-positivo (JOUVENAZ *et al.*, 1972; INAGAKI *et al.*, 2004).

Em um trabalho recente com o veneno de *D. quadriceps* foram identificados e sintetizados peptídeos antimicrobianos separados em 3 subfamílias de acordo com a homologia com outros peptídeos antimicrobianos previamente caracterizados, os similares à Temporinas, Demaseptinas e Ponercinas. Os peptídeos da subfamília similares às temporinas mostram 46% de homologia com a temporina K da secreção da pele do sapo *Rana temporaria* e 43,7% de similaridade com temporina-CG1 (*Amolops chunganensis*), Temporina-PRb e Temporina-PRa (*Rana pretiosa*) e Temporina-SHb (*Pelophylax saharica*) (COLOGNA *et al.*, 2013). As temporinas, que foram primeiramente isoladas da secreção da pele do sapo *Rana temporaria*, são uma vasta família de peptídeos antimicrobianos com atividade sobre bactérias Gram-positivo (SIMMACO *et al.*, 1996). Os peptídeos da subfamília dos similares às dermaseptinas também apresentaram alta similaridade com dinoponeratoxinas isoladas do veneno de *D. australis*. As dermaseptinas são uma superfamília de peptídeos antimicrobianos com um amplo espectro de ação, isolados da pele de sapos dos gêneros Hylidae e Ranidae (NICOLAS; AMRI, 2009; JOHNSON *et al.*, 2010; COLOGNA *et al.*, 2013). Os peptídeos da subfamília dos similares a ponercinas também possuem alta homologia com dinoponeratoxinas e com as ponericinas-G2 e G3. Estes últimos apresentaram efeito antimicrobiano sobre cepas Gram-positivo (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*), Gram-negativo (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*), cepas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotonda mucilaginosa*) e do fungo *Cladosporium cucumerinum* (COLOGNA *et al.*, 2013).

Cologna *et al.* (2013) também demonstraram grandes variações na composição de venenos de formigas de diferentes localidades, mostrando que as características ambientais, como dieta, clima, dentre outras, influenciam bastante na composição do veneno (UÇKAN *et al.*, 2006; FERREIRA JUNIOR *et al.*, 2010). O estudo de Torres *et al.* (2013) com formigas pertencentes à região serrana do Ceará encontrou uma composição diferente da caracterizada por Cologna *et al.* (2013) que estudou o veneno de formigas de diferentes cidades da Bahia. O veneno usado neste estudo foi caracterizado por Torres *et al.* (2013), apresentando como componente majoritário as dinoponeratoxinas.

Embora o veneno de *D. quadriceps* não possua em sua composição metaloproteinases e LAAOs, possui efeito antimicrobiano, provavelmente pela presença de grande quantidade de dinoponeratoxinas em sua composição. De acordo com Torres *et al.* (2013), as dinoponeratoxinas presentes neste veneno apresentam grande semelhança com as encontradas no veneno de *D. australis* (Da-3105 e Da-3177), que apresentam grande homologia com ponericinas, reportadas como peptídeos antimicrobianos.

Neste estudo, foi demonstrado o efeito antimicrobiano do veneno de *D. quadriceps* sobre cepas Gram-positivo, Gram-negativo e de levedura. Após a determinação do efeito antimicrobiano de todas as cepas testadas, realizaram-se ensaios de mecanismo de ação com a cepa de *S. aureus* MSSA ATCC 6538P, sobre a qual o veneno apresentou potente efeito, apresentando também efeito sobre cepas de *S. aureus* MRSA.

A maior susceptibilidade de *S. aureus* em pHs neutros a alcalinos é uma característica valiosa, representando possivelmente uma maior efetividade inibindo o crescimento em regiões como o intestino e o sangue. Além disso, este veneno é capaz de matar completamente a bactéria em estudo em um curto tempo exposição (4 horas), sugerindo um rápido mecanismo de ação, como ruptura de membrana.

Estudos com produtos naturais tem descrito atividade antimicrobiana por dano na membrana usando os ensaios de cristal e violeta e liberação de material genético (DEVI *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012). Para determinar o efeito do veneno de *D. quadriceps* na membrana bacteriana, foram feitos os ensaios de captação do cristal violeta e liberação de componentes intracelulares. O método de cristal violeta demonstrou um aumento na permeabilidade da membrana através da maior captação após a incubação com o veneno. Cristal violeta tem baixa penetrabilidade em células normais, mas se acumula em microrganismos e outras células com membrana lesionada. A liberação de conteúdo intracelular foi determinado pelo aumento da absorbância de 260 nm em sobrenadantes de culturas incubadas com o veneno de *D. quadriceps* durante 30 minutos. O veneno de *D. quadriceps* causa uma aparente alteração na estrutura da membrana de *S. aureus*, mostrado pelo aumento da captação de cristal violeta e pela liberação de ácidos nucléicos. Estes efeitos sugerem que este veneno causa ruptura ou formação de poros na membrana de *S. aureus*. Amicacina, um antimicrobiano sem ação na membrana, não mostrou nenhum efeito nesses experimentos.

Neste estudo, as imagens obtidas pela microscopia de força atômica confirmaram que o veneno de *D. quadriceps* causou importantes mudanças na estrutura da membrana de *S. aureus*. A microscopia de força atômica tem sido extensivamente utilizada no estudo de

amostras biológicas, tanto para estudos microbiológicos, quanto farmacológicos. Imagens de Microscopia de força atômica podem comprovar alterações na morfologia, bem como dano em membranas, de células de mamíferos, bactérias e fungos induzidas por substâncias. As imagens obtidas podem ajudar a um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação (BRAGA; RICCI, 1998; DEVI *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012; PILLET *et al.*, 2013)

Peptídeos antimicrobianos isolados de venenos de Hymenopteros, como Melitina (LEE *et al.*, 2013), Polybia-MPI (WANG *et al.*, 2013b) Polybia-CP (WANG *et al.*, 2012) e Protonectin (WANG *et al.*, 2013a) também mostram importantes efeitos em membranas celulares.

Geralmente, 50% ou mais dos aminoácidos dos peptídeos antimicrobianos são hidrofóbicos, um fato que reflete na interação desses peptídeos com membranas bacterianas como parte de seu mecanismo de ação (HANCOCK; DIAMOND, 2000; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Peptídeos antimicrobianos apresentam certas características que os tornam atraentes como alternativas aos fármacos convencionais, incluindo a seu rápido modo de ação, baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência e capacidade de agir em conjunto com antimicrobiano existente (ZASLOFF, 2002). Peptídeos antimicrobianos mostram um nível elevado de toxicidade contra ambas as bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, bem como fungos, vírus, parasitas metazoários e mesmo células cancerosas (ZASLOFF, 2002; HOSKIN e RAMAMOORTHY, 2008).

Estruturalmente diversos peptídeos antimicrobianos de uma ampla gama de organismos tem atividade *in vitro* sobre espécies de *Leishmania* e *Trypanossoma* atuando principalmente rompendo a superfície de membrana. Em alguns casos, também podem afetar os níveis de cálcio intracelular, função mitocondrial e induzir a autofagia, necrose e apoptose desses parasitas (MCGWIRE; KULKARNI, 2010).

Neste trabalho também foi observado o efeito tripanocida sobre cepa Y de *T. cruzi*. Avaliou-se o mecanismo de morte celular através de citometria de fluxo nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, observando-se dano na membrana e distintos mecanismos de morte celular, sugerindo a ocorrência discreta de eventos necróticos e apoptóticos em formas epimastigotas de *T. cruzi*, marcadas com PI e Anexina V-FITC.

Um trabalho semelhante com o veneno da abelha *Apis mellifera* mostrou também efeito tripanocida (ADADE *et al.*, 2012), afetando o crescimento, viabilidade e estrutura de todas as formas de desenvolvimento de *T. cruzi*, incluindo as formas amastigotas em concentrações menores que as que causam efeitos tóxicos em células de mamíferos.

Diferentes tipos de morte celular foram sugeridos, observando-se estruturas autofágicas em formas epimastigotas, estruturas apoptóticas em formas tripomastigotas e nas formas amastigotas observou-se mecanismo de morte celular heterogêneo, onde a apoptose parece ser predominante. Na citometria de fluxo, Adade *et al.* (2012) também sugeriu danos na membrana e perda de células viabilidade com mecanismos distintos de morte celular, na análise de citometria de fluxo, utilizando marcação com PI em formas epimastigotas tratadas com IC₅₀. Em um trabalho posterior, Adade *et al.* (2013) atribuiu todos os efeitos acima relatados à um peptídeo antimicrobiano que existe no veneno de *Apis mellifera*, correspondendo de 40-50% do seu peso seco, a melitina.

Estudos com atividade antiparasitária de venenos de invertebrados são escassos na literatura, que mostra vários estudos com venenos de serpentes, que são exibidos como potencialmente úteis como modelo para obtenção de substâncias para o tratamento de doenças negligenciadas causadas por parasitas, como o veneno de *Bothrops moojeni* que apresentou efeito sobre formas promastigotas de *Leishmania spp.* (TEMPONE *et al.*, 2001), o veneno de *B. lutzi* e *B. leucurus* que mostraram efeito sobre formas promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* (TORRES *et al.*, 2010a; MENEZES *et al.*, 2012) e *B. marajoensis* que mostrou efeito sobre formas promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (TORRES *et al.*, 2010b).

O veneno de *B. jararaca*, também amplamente utilizado em estudos de atividade biológica, inibiu o crescimento de *T. cruzi* e *L. major* (GONÇALVES *et al.*, 2002), sugerindo mecanismo de morte celular programada para formas epimastigotas de *T. cruzi* (DEOLINDO *et al.*, 2005), efeito que foi posteriormente atribuído à sua fração LAAO (DEOLINDO *et al.*, 2010).

Estudos indicam um importante papel da apoptose na infecção pelo *T. cruzi*, mostrando que esta provavelmente contribui para o controle da parasitemia e do parasitismo tissular na fase aguda. Por isso a importância da busca de substâncias com potencial apoptótico para o tratamento da Doença de Chagas (ANDRADE, 2003).

Embora apresentem potencial terapêutico, produtos naturais podem apresentar toxicidade, o que os tornam menos promissores como modelos para ferramenta farmacológica. A citotoxicidade sobre células de mamíferos também foi avaliada neste trabalho, onde utilizou-se macrófagos murinos RAW, observando-se toxicidade em concentrações superiores às com potencial terapêutico evidenciado no presente estudo e menor quando comparados com citotoxicidade de venenos outros de Hymenopteros, como do veneno da vespa *Polybia paulista* sobre células MDCK (VINHOTE *et al.*, 2011).

Assim, o presente estudo abre perspectivas para futuros trabalhos na busca de modelos moleculares para tratamento de doenças infeciosas e Doença de Chagas.

Conclusão

8. Conclusão

O veneno de *Dinoponera quadriceps* apresentou atividade antimicrobiana de rápida ação e amplo espectro de ação, mostrando melhor efeito em pHs alcalinos e sugerindo lise do envoltório celular como mecanismo de ação sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Adicionalmente, apresentou potencial citotóxico sobre as formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, envolvendo mecanismo de morte necrótico e apoptótico.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of Aristolochia taliscana. **Biol Pharm Bull**, v.25, n.9, p.1188-1191, 2002a.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; NAGAO, T.; KINJO, J.; OKABE, H.; HIGO, H.; AKAHANE, H. Ursolic acid as a trypanocidal constituent in Rosemary. **Biol Pharm Bull**, v.25, n.11, p.1485-1487, 2002b.
- ABOUTALEB, N.; KUIJPER, E. J., VAN DISSEL, J. T. Emerging infectious colitis. **Curr Opin Gastroenterol.**, v.30, n.1, p.106-15, 2014.
- ADADE, C. M.; CHAGAS, G. S.; SOUTO-PADRÓN, T. Apis mellifera venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v.11, p.1444-61, 2012.
- ADADE, C. M.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Effect of *Crotalus viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v.138, n.1, p.46-58, 2011.
- ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I. R.; PAIS, J. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v.69, p.227-39, 2013.
- AKRE, R. D.; REED, H. C. Ants, wasps and bees (*Hymenoptera*). **Medical and Veterinary Entomology**, p.383-408, 2002.
- ALTMANN, K. H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Curr Opin Chem Biol**, v.5, p.424-431, 2001.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, O. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.
- ANDRADE, S. G. Apoptose e sua importância no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de patologia tropical**, v.32, n.2, p.163-173, 2003.
- APARICIO, I. M.; SCHAFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infection and Immunity**, v.72, n.10, p.5892-5902, 2004.
- ARAUJO, A.; RODRIGUES, Z. Foraging behavior of the queenless ant *Dinoponera quadriceps* Santschi (Hymenoptera, Formicidae). **Neotrop Entomol**, v.35, n.2, p.159-64, 2006.
- ARAÚJO, C. Z. D.; JAISSON, P. Modes de fondation dês colonies chez La fourmi sans reine *Dinoponera quadriceps* Santschi (Hymenoptera, Formicidae, Ponerinae). **Actes de Colloques Insects Sociaux**, v.9, p.79-88, 1994.

BANDYOPADHYAY, S.; LEE, M.; SIVARAMAN, J.; CHATTERJEE, C. Model membrane interaction and DNA-binding of antimicrobial peptide Lasioglossin II derived from bee venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.430, p.1–6, 2013.

BARON, E. J.; PETERSON, L. R. FINEGOLD, S. M. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 9 ed. Saint Louis: Mosby – Year Book, 1994. p362-385.

BEETON, C.; GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G. Targets and Therapeutic Properties of Venom Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides**, p.403-414, 2006.

BONFOCO, E.; KRAINC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.7162–7166, 1995.

BRAGA, P. C., RICCI, D. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.18–22, 1998.

BREATHNACH, A. S. Nosocomial infections and infection control. **Medicine**, v.41, n.11, p.649-653, 2013.

BREATHNACH, A. S. Nosocomial infections. **Medicine**, v.37, n.10, p.557-561, 2009.

BRENER, Z; FILARDE L.S. A rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. **Mem Inst Oswaldo Cruz (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)**. v.79, p.221-5, 1984.

BRIGULLA, M.; WACKERNAGEL, W. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.86, n.4, p.1027-41, 2010.

BUKU, A.; CONDIE, B. A.; PRICE, J. A.; MEZEI, M. [Ala12]MCD peptide: a lead peptide to inhibitors of immunoglobulin E binding to mast cell receptors. **J Pept Res.**, v.66, n.3, p.132-7, 2005.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of matacyclic trypanosome liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.6, p.93-100, 1964.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.44, p.29-37, 2002.

CEROVSKÝ, V.; HOVORKA, O.; CVACKA, J.; VOBURKA, Z.; BEDNÁROVÁ, L.; BOROVICKOVÁ, L.; SLANINOVÁ, J.; FUCÍK, V. Melectin: a novel antimicrobial peptide from the venom of the cleptoparasitic bee *Melecta albifrons*. **Chembiochem.**, v.9, p.2815-21, 2008.

CESTAR, I. S. *Trypanosoma cruzi e o Sistema Complemento*: mecanismos de ativação e o papel do gene CRIT (Complement C2 Receptor Inhibitor Trispaning) na resistência à lise de cepas de classe I e II. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

CHANDY, K. G.; WULFF, H.; BEETON, C.; PENNINGTON, M. W.; GUTMAN, G. A.; CAHALAN, M. D. K^+ channels as targets for specific immunomodulation. **Trends in pharmacological sciences**, v.25, n.5, p.280-289, 2004.

CHOO, Y. M.; LEE, K. S.; YOON, H. J.; JE, Y. H.; LEE, S. W.; SOHN, H. D.; JIN, B. R. Molecular cloning and antimicrobial activity of bombolitin, a component of bumblebee *Bombus ignitus* venom. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.**, v.156, n.3, p.168-73, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7. Wayne, Pennsylvania, USA.

COLOGNA, C. T.; BARBOSA, D. B.; SANTANA, F. A.; RODOVALHO, C. de M; OLIVEIRA, L. A.; BRANDEBURGO, M. A. M. Estudo da peçonha de *Dinoponera australis* – Roger, 1861 (*Hymenoptera, Ponerinae*). In: V Encontro interno de Iniciação científica, Convênio CNPq/UFU, Uberlândia, 2005.

COLOGNA, C. T.; CARDOSO, J. D. O. S. S.; JOURDAN, E.; DEGUELDRÉ, M.; UPERT, G.; GILLES, N.; UETANABARO, A. P.; COSTA NETO, E. M.; THONART, P.; DE PAUW, E.; QUINTON, L. 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.**, v.94, p.413-22, 2013.

CONLON J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: Taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. **Biochimica et biophysica acta**, v.1696, n.1, p.1-14, 2004.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, p.113-122, 2007.

COURA, J. R., ABREU, L. L., WILLCOX, H. P. F., PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. I. Avaliação preliminar. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.30, p.139-144, 1997.

COURA, J. R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v.465, n.7301, S6-7, 2010.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v.115, p.5–13, 2010.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nat Med**, v.5, p.1110-3, 1999.

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 fibrinogenolytic properties of

the venom of *Polybia occidentalis* social wasp. **Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis.** 2010 Jul 30. [Epub ahead of print].

D'COSTA, V. M.; KING, C. E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W. W.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G. B.; POINAR, H. N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v.477, n.7365, p.457-61, 2011.

DE LIMA, T. M. **Citometria de fluxo.** In.: Como cultivar células. PERES, C. M.; CURI, R. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

DE MENEZES, R. R.; TORRES, A. F.; DA SILVA, T. S.; DE SOUSA, D. F.; LIMA, D. B.; NORJOSA, D. B.; NOGUEIRA, N. A.; OLIVEIRA, M. F.; DE OLIVEIRA, M. R.; MONTEIRO, H. S.; MARTINS, A. M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothropoides lutzi* venom. **Nat Prod Commun.**, v.7, n.1, p.71-4, 2012.

DE OLIVEIRA JUNIOR, N. G.; E SILVA CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. **Cell Mol Life Sci.**, v.70, n.24,p.4645-58, 2013.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**, v.56, n.6, p.944-55, 2010.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; MELO, E. J. T.; ARNHOLDT, A. C. V.; DE SOUZA, W.; ALVES, E. W.; DAMATTA, R. A. Programmed cell death in *Trypanossoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.1, p.33-38, 2005.

DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, R.; PANDAIN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, p.107–115, 2010.

DIAS, J. C. Globalization, inequity and Chagas disease. **Cad. Saude Publica**, v.23, n.1, S13–S22, 2007.

DU PLESSIS, L. H.; ELGARA, D.; DU PLESSIS, J. L. Southern African scorpion toxins: An overview. **Toxicon**, v.51, p.1–9, 2008.

DYPBUKT, J. M.; ANKARCRONA, M.; BURKITT, M.; SJOHOLM, A.; STROM, K.; ORRENIUS, S.; NICOTERA, P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.30553-30560, 1994.

ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control. The bacterial challenge: time to react, 2009. Disponível em: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf. Acesso em 01 fev. 2014.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect Dis.**, v.3, n.11, p.685-702, 2003.

- EVANGELISTA, J. S.A.M.; MARTINS, A.M.C.; NASCIMENTO, N. R.F.; SOUSA, C. M.; ALVES. R. S.; TOYAMA. D. O.; TOYAMA, M. H.; EVANGELISTA, J.J.F.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E. A.; MONTEIRO, H. S.A. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v.52, n.7, p.737-744, 2008.
- FERREIRA JUNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO JR, A.; ORSI, R. O.; BARRAVIEIRA, B. et al. Africanized honey bee (*Apismellifera*) venom profiling: seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. **Toxicon**, v.56, n.3, p.355–62, 2010.
- FITZGERALD, K. T.; FLOOD, A. A. *Hymenoptera* stings. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.21, n.4, p.194–204, 2006.
- FRASER, G.; SPITERI, G. (Coord.). Surveillance report: Annual epidemiological report Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data, 2011. Disponível em:http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf. Acesso em 29 jan., 2014.
- FROST, L.S.; KORAIMANN, G. Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. **Future Microbiol.**, v.5, n.7, p.1057-71, 2010.
- FRY, B. G.; WICKRAMARATANA, J. C.; LEMME, S.; BEUVE, A.; GARBERS, D.; HODGSON, W. C.; ALEWOOD, P. Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*): Isolation, chemical and biological characterisation. **Biochemical and biophysical research communications**, v.327, n.4, p.1011-1015, 2005.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United Statesand other non-endemic countries. **Acta Trop.** v.115, p.22–27, 2010.
- GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitol Res**, v.88, p.598-602, 2002.
- GONÇALVES, T. B.; BRAGA, M. A.; DE OLIVEIRA, F. F.; SANTIAGO, G. M.; CARVALHO, C. B.; BRITO E CABRAL, P.; DE MELO SANTIAGO, T.; SOUSA, J. S.; BARROS, E. B.; DO NASCIMENTO, R. F.; NAGAO-DIAS, A. T. Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae*. **Phytomedicine**, v.19, p.962-8, 2012.
- GOULD, I. M.; DAVID, M. Z.; ESPOSITO, S.; GARAU, J.; LINA, G.; MAZZEI, T.; PETERS, G. New insights into meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. **Int J Antimicrob Agents**. v.2, p.96-104, 2012.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.
- GUIMARÃES, C. A.; LINDEM, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal of Biochemistry**, v.271, p.1638–1650, 2004.

HADDAD JR, V.; CARDOSO, J. L. C.; MORAES, R. H. P. Description of an injury in a human caused by a false tocandira (*Dinoponera gigantea*, Perty, 1833) with a revision on folkloric, pharmacological and clinical aspects of the giant ants of the genera *Paraponera* and *Dinoponera* (sub-family ponerinae). **Rev Inst Med Trop**, v.47, n.4, p.235-38, 2005.

HANCOCK, R.E.W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiol.**, v.8, p.402–410, 2000.

HARADA, K.; ASAI, T. Role of Antimicrobial Selective Pressure and Secondary Factors on Antimicrobial Resistance Prevalence in *Escherichia coli* from Food-Producing Animals in Japan. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010. [Article in press]

HARVEY, A. L; BRADLEY, K. N.; COCHRAN, S. A.; ROWAN, E. G.; PRATT, J. A.; QUILLFELDT, J. A.; JERUSALINSKY, D. A. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v.36, n.11, p.1635-1640, 1998.

HOSKIN, D.W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.**, v.1778, p.357–375, 2008.

INAGAKI, H.; AKAGI, M.; IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; KUBO, T. Molecular cloning and biological characterization of novel antimicrobial peptides, pilosulin 3 and pilosulin 4, from a species of the Australian ant genus *Myrmecia*. **Arch Biochem Biophys**, v.428, p.170-178, 2004.

IZIDORO, L. F.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg Med Chem.**, v.14, n.20, p.7034-43, 2006.

JOHNSON, S. R.; COPELLO, J. A.; EVANS, M. S.; SUAREZ, A. V. A biochemical characterization of the major peptides from the Venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. **Toxicon**, v.55, n4, p702-10, 2010.

JOUVENAZ, D. P.; BLUM, M. S.; MACCONNELL, J. G. Antibacterial activity of venom alkaloids from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.2, p.291–293, 1972.

KANETI, G.; SARIG, H.; MARJIEH, I.; FADIA, Z.; MOR, A. Simultaneous breakdown of multiple antibiotic resistance mechanisms in *S. aureus*. **FASEB J.** Aug 22. [Epub ahead of print] 2013.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, n.26, p.239-257, 1972.

KHAN, A.S.; WALSH, A.; CROWLEY, B. Role of Efflux in Macrolide Resistance in Beta Haemolytic Streptococci Groups A, B, C & G in St. James' Hospital, Dublin. **J Med Microbiol.**, v.60, p.262-4, 2011.

KONDO, T.; IKENAKA, K.; FUJIMOTO, I.; AIMOTO, S.; KATO, H.; ITO, K.; TAGUCHI, T.; MORITA, T.; KASAI, M.; MIKOSHIBA, K. K⁺ channel involvement in induction of synaptic enhancement by mast cell degranulating (MCD) peptide. *Neurosci Res.*, v.13, n.3, p.207-16, 1992.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, v.16, p.3–11, 2009.

KRYSKO, D. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis.*, v.10, p.1709-26, 2006.

KRYSKO, D. V.; VANDEN BERGHE, T.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.*, v.44, n.3, p.205-21, 2008.

LEE, H. G; JANG, J.; CHOI, J. E.; CHUNG, D. C. HAN, J. W.; WOO, H.; JEON, W.; CHUN, B. C. Blood Stream Infections in Patients in the Burn Intensive Care Unit. *Infect Chemother.*, v.45, n.2, p.194-201, 2013.

LELUK, K.; SCHMIDT, J.; JONES, D. Comparative studies on the protein composition of hymenoptera venom reservoirs. *Toxicon*, v.27, n.1, p.105-114, 1989.

LESCURE, F.X.; LOUP, G.L.; FREILIJ, H.; DEVELOUX, M.; PARIS, L.; BRUTUS, L.; PIALOUD, G. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect.*, v.10, p.556–70, 2010.

LIBERSAT, F. Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, v.189, n.7, p.497-508, 2003.

LOPES, K. S.; RIOS, E. R.; LIMA, C. N.; LINHARES, M. I.; TORRES, A. F. C.; HAVT, A.; QUINET, Y. P.; FONTELES, M. M.; MARTINS, A. M. The effects of the Brazilian ant *Dinoponera quadriceps* venom on chemically induced seizure models. *Neurochemistry International*, v.63, p.141–145, 2013.

LUNA-RAMÍREZ, K.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; VARGAS-JAIMES, L.; BATISTA, C. V.; WINKEL, K. D.; POSSANI, L. D. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. *Toxicon*, v.63, p.44-54, 2013.

MANTEN, A. The non-medical use of antibiotics and the risk of causing microbial drug-resistance. *Bull World Health Organ.*, v.29, p.387-400, 1963.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 2013 [Epub ahead of print]

- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR., A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v.6, p.817–824, 2012.
- MATSUDA, N.M.; MILLER, S.M.; EVORAI, P.R.B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v.64, n.12, p.1219-24, 2009.
- MCGWIRE, B. S.; KULKARNI, M. M. Interactions of antimicrobial peptides with Leishmania and trypanosomes and their functional role in host parasitism. **Experimental Parasitology**, v.126, p.397–405, 2010.
- MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; ENGEL, J. C.; PODUST, L. M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I. D.; BRINEN, L. S.; CRAIK, C. S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, p.263-269, 2009.
- MEIJER, W. H.; VAN DER KLEI, I. J.; VEENHUIS, M.; KIEL, J. A. ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. **Autophagy**, v.3, p.106–116, 2007.
- MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v.44, p.67-74, 2004.
- MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOFS, L.; THEVISSEN, K.; TYTGAT, J.; VAN ELDERE, J.; VAN DER WALT, J.; VERDONCK, F. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. **Eur J Biochem.**, v.269, n.19, p.4799-810, 2002.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, p.17–30, 2009.
- MONINCOVÁ L., BUDESÍNSKÝ M., SLANINOVÁ J., HOVORKA O., CVACKA J., VOBURKA Z., FUCÍK V., BOROVICKOVÁ L., BEDNÁROVÁ L., STRAKA J., CEROVSKÝ V. Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Halictus sexcinctus* (Hymenoptera: Halictidae) and their analogs. **Amino Acids**, v.39, n.3, p.763-75, 2010.
- MONNIN, T., PEETERS, C. Monogyny and regulation of worker mating in the queenless ant *Dinoponera quadriceps*. **Animal Behaviour**, v.55, n.2, p.299-306, 1998.
- MOREAU, S. J. "It stings a bit but it cleans well": venoms of Hymenoptera and their antimicrobial potential. **J Insect Physiol.**, v.59, n.2, p.186-204, 2013.
- MORSE, S.I. The role of bacteriophages in bacterial resistance to antimicrobials. **Annu Rev Med.** V.20, p.357-62, 1969.
- MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O.; FERREIRA, L. B.; DOS SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacol Ther**, v.114, n.1, p.171-183, 2007.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and citotoxicity. **J Immunol Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MYLES, D. C. Novel biologically active natural and unnatural products. **Current opinion in biotechnology**, v.14, n.6, p.627–633, 2003.
- NICOLAS, P.; AMRI, C. E. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**, v.1788, p.1537–50, 2009.
- NIE, Y.; ZENG, X. C.; YANG, Y.; LUO, F.; LUO, X.; WU, S.; ZHANG, L.; ZHOU, J. A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer*. **Peptides**, v.38, p.389–394, 2012.
- ORIVELL, J.; REDEKER, V.; CAER, J. P.; KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A.; LONGEON, A.; CHAFFOTTE, A.; DEJEAN, A.; ROSSIER, J. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. **J Biochem Chem**, v.286, p.17823-17829, 2001.
- PAIVA, R.V.S., BRANDÃO, C.R.F. Nests, worker population, and reproductive status of workers, in the giant queenless ponerine ant *Dinoponera Roger* (Hymenoptera: Formicidae). **Ethol. Ecol. Evol.**, v.7, p.297–312, 1995.
- PALMA, M. S. Insect Venom Peptides. **Handbook of Biologically Active Peptides**, p.389-396, 2006.
- PANGERCIĆ, A.; BUKOVSKI-SIMONOSKI, S.; BARSIĆ, B. Lipopeptides and oxazolidinones--novel antibiotics in MRSA infection treatment. **Lijec Vjesn.**, v.132, n.1, p.11-3, 2010.
- PE'REZ-AYALA, A.; P'EREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; NAVARRO, M.; MONGE-MAILLO, B.; DI'AZ-MENE'NDEZ, M.; PERIS-GARCI'A, J.; FLORES, M.; CANAVATE, C.; LO'PEZ-VE'LEZ, R. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish chanllenge. **Tropical and parasitic diseases**, ed 17, p.1108-1113, 2011.
- PÉREZ-CORDERO, J. J.; LOZANO, J. M.; CORTÉS, J.; DELGADO, G. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. **Peptides**, v.32, p.683–690, 2011.
- PICOLO, G.; HISADA, M.; MOURA, A. B.; MACHADO, M. F.; SCIANI, J. M.; CONCEIÇÃO, I. M.; MELO, R. L.; OLIVEIRA, V.; LIMA-LANDMAN, M. T.; CURY, Y.; KONNO, K.; HAYASHI, M. A. Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. **Biochem Pharmacol.**, v.79, n.3, p.478-86, 2010.
- PIEK, T.; DUVAL, A.; HUE, B.; KARST, H.; LAPIED, B.; MANTEL, P.; NAKAJIMA, T.; PELHATE, M.; SCHMIDT, J.O. Poneratoxin, a novel peptide neurotoxin from the venom of the ant, *Paraponera clavata*. **Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology**, v.99, n.3, p.487–495, 1991.

- PILLET, F.; CHOPINET, L.; FORMOSA, C.; DAGUE, E. Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology. **Biochim Biophys Acta**, v.1840, n.3, p.1028-1050, 2013.
- PIMENTA, A. M. C.; LIMA, M. E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science**, v.11, p.670–676, 2005.
- PLUZHNIKOV, K.; NOSYREVA, E.; SHEVCHENKO, L.; KOKOZ, Y.; SCHMALZ, D.; HUCHO, F.; GRISHIN, E. Analysis of ectatomin action on cell membranes. **European journal of biochemistry / FEBS**, v.262, n.2, p.501–506, 1999.
- QUINET, Y.; VIEIRA, R. H. S. F.; SOUSA, M. R.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; CARVALHO, F. C. T.; GUEDES, M. I. F.; ALVES, C. R.; DE BISEAU, J. C.; HEREDIA, A. Antibacterial properties of contact defensive secretions in neotropical Crematogaster ants. **JVAT**, v.18, p.441-445, 2012.
- RAJENDRA, W.; ARMUGAM, A; JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon**, v.44, n.1, p.1-17, 2004.
- RAMOS JR., A. N.; MARTINS-MELO, F. R.; BARBOSA, J. C.; HEUKELBACH, J. The role of operational research and the challenges for integration of care and control of Chagas disease in the Brazilian Unified Health System. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.43, n.2, p.12–17, 2010.
- RASSI JR., A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v.26, p.275–291, 2012.
- RATCLIFFE, N. A.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; BUTT, T. M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.41, n.10, p.747-769, 2011.
- REMIJSEN, Q.; VERDONCK, F.; WILLEMS, J. Parabutoporin, a cationic amphipathic peptide from scorpion venom: much more than an antibiotic. **Toxicon**, v.55, p.180-5, 2010.
- ROMEIRO, R. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão: UFV Viçosa 2007.
- SANCHEZ, E. F.; EBLE, A. J. P-III metalloproteinase (leucurolysin-B) from *Bothrops leucurus* venom: isolation and possible inhibition. In: *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors*, Supuran C., Winum JY (Eds), Chapter 30, John Wiley and Sons, Inc., pp. 789-812, 2009.
- SCHMIDT, J. O.; BLUM, M. S.; OVERAL, W. L. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, v.24, n.9, p.907–921, 1986.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop.**, v.115, p.14–21, 2010.
- SHARIFI, Y.; HASANI, A.; GHOTASLOU, R.; NAGHILI, B.; AGHAZADEH, M.; MILANI, M.; BAZMANY, A. Virulence and Antimicrobial Resistance in Enterococci Isolated from Urinary Tract Infections. **Adv Pharm Bull.**, v.3, n.1, p.197-201, 2013.

SHEN X, YE G, CHENG X, YU C, ALTOSAAR I, HU C. Characterization of an abaecin-like antimicrobial peptide identified from a *Pteromalus puparum* cDNA clone. **J Invertebr Pathol.**, v.105, n.1, p.24-9, 2010a.

SHEN X, YE G, CHENG X, YU C, YAO H, HU C. Novel antimicrobial peptides identified from an endoparasitic wasp cDNA library. **J Pept Sci.**, v.16, n.1, p.58-64, 2010b.

SILVA, C. F.; MEUSER, M.B.; DE SOUZA, E. M.; MEIRELLES, M. N.; STEPHENS, C. E.; SOM, P.; BOYKIN, D. W.; SOEIRO, M. N. Celular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.51, p.3803-3809, 2007.

SILVA, P. M. F.; FEITOSA, R. J. P.; PIMENTEL, M. C.; PEREIRA, H. S.; CATÃO, R. M. R. Prevalence of hospital-acquired infections caused by *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profile. **Journal of Nursing UFPE on line**, v.7, n.8, 2013.

SILVEIRA, A.C. New challenges and the future of control. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, v.44 (Suppl. 2), p.122–124, 2011.

SIMMACO, M.; MIGNOGNA, G.; CANOFENI, S.; MIELE R, MANGONI ML, BARRA D. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. **Eur J Biochem**, v.242, n.3, p.788–92, 1996.

SLOVITER, R. S. Apoptosis: a guide for the perplexed. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, p.19–24, 2002.

SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H. S.; LEE, C. K.; HONG, J. T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacol Ther.**, v.115, n.2, p.246-70, 2007.

SOUZA JUNIOR, A. S.; COELHO, H.L.L; FONTELES, M.M.F; OLIVEIRA, M. F. Problemas relacionados a medicamentos em pacientes com doença de Chagas durante tratamento com benzonidazol em Fortaleza CE. **Cadernos Saúde Coletiva (UFRJ)**, vXVII, p.893-910, 2009.

SOUZA, P. L.; QUINET, Y. P.; PONTE, E. L.; VALE, J. F.; TORRES, A. F. C.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. S. Venom's antinociceptive property in the primitive ant *Dinoponera quadriceps*. **J. Ethnopharmacol.**, v.144, p.213–216, 2012.

STABÉLI, R. S.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B. *et al.* Platelet aggregation and antibacterial effects an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v.12, p.2881-2886, 2004.

STEEN, C. J., JANNIGER, C. K., SCHUTZER, S. E., SHUWARTZ, R. A. Insect sting reactions to bees, wasps and ants. **Int. J.Dermatol.** v.44, p.91-94, 2005.

SWINDELLS, M. B.; OVERINGTON, J. P. Prioritizing the proteome: identifying pharmaceutically relevant targets. **Drug discovery today**, v.7, n.9, p.516–521, 2002.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Prog. Lipid Res.**, v.51, p.149–177, 2012.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. Bothrops moojeni venom kills Leishmania spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.280, p.620–624, 2001.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Infect Control**, 34(5 Suppl 1):S3-10, 64-73, 2006.

TIAN, C.; GAO, B.; FANG, Q. YE, G.; ZHU, S. Antimicrobial peptide-like genes in *Nasonia vitripennis*: a genomic perspective. **BMC Genomics**, v.19; p.11-187, 2010.

TIMSIT, J. F.; AZOULAY, E.; CORNET, M.; GANGNEUX, J. P.; JULLIEN, V.; VÉSIN, A.; SCHIR, E.; WOLFF, M. EMPIRICUS micafungin versus placebo during nosocomial sepsis in Candida multi-colonized ICU patients with multiple organ failures: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v.14, n.399, p.1-9, 2013.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; MENEZES, R. R. P. P. B.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; OLIVEIRA, M. F.; NOGUEIRA, N. A. P.; OLIVEIRA, M. R.; MONTEIRO, H. A. S.; MARTINS, A. M. C. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.16, p.614-622, 2010a.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; QUEIROZ, M. G. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; OLIVEIRA, M. R.; TOYAMA, D. O.; MONTEIRO, H. A. S.; MARTINS, A. M. C. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v.55, p.795-804, 2010b.

TORRES, A. F. C.; QUINET, Y. P.; HAVT, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MARTINS, A. M. C. (2013) Molecular pharmacology and toxynology of venom from ants. In: Rádis-Baptista G editor. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: An Integrated view of the molecular recognition and toxinology – From analytical procedures to biomedical applications. ISBN 978-953-51-1151-1 pp. InTech, DOI: 10.5772/53539. Available: <http://www.intechopen.com/books/an-integrated-view-of-the-molecular-recognition-and-toxinology-from-analytical-procedures-to-biomedical-applications/molecular-pharmacology-and-toxinology-of-venom-from-ants>. Accessed in 14 August 2013.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**, v.12, p.1528–1534, 2005.

UÇKAN, F.; ERGIN, E.; RIVERS, D. B.; GENÇER, N. Age and diet influence the composition of venom from the endoparasitic wasp *Pimplaturonellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). **Arch Insect Biochem Physiol**, v.63, p.177–87, 2006.

URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol**, v.19, p.495–501, 2003.

VINHOTE, J. F. C.; TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; PRACIANO, T. P.; MENEZES, R. R. P. P. B.; SOUSA, D. F.; BRITO, T. S.; LIMA, F. J. B.; TOYAMA, M. H.; MAGALHÃES, P. J.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C. Renal- and calcium-dependent vascular

effects of *Polybia paulista* wasp venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, n.2, p.199-208, 2011.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; ALVAREZ, M. G.; PETTI, M.; BERTOCCHI, G.; ARMENTI, A. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.7, n.2, p.157-163, 2009.

WANG, K.; DANG,W.; YAN, J.; CHEN, R.; LIU, X.; YAN, W.; ZHANG, B.; XIE, J.; ZHANG, J.; WANG, R... Membrane perturbation action mode and structure-activity relationships of protonectin, a novel antimicrobial peptide from the venom of neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Antimicrob Agents Chemother**. [Epub ahead of print] 2013a.

WANG, K.; YAN, J.; CHEN, R.; DANG, W.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; SONG, J.; WANG, R. Membrane-active action mode of polybia-CP, a novel antimicrobial peptide isolated from the venom of *Polybia paulista*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, p.3318-23, 2012.

WANG, K.; YAN, J; DANG,W.; LIU, X.; CHEN, R.; ZHANG, J.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; KAI, M.; YAN, W.; YANG, Z.; XIE, J.; WANG, R. Membrane active antimicrobial activity and molecular dynamics study of a novel cationic antimicrobial peptide polybia-MPI, from the venom of *Polybia paulista*.. **Peptides**, v.39, p.80–88, 2013b.

WEI, J. F.; LI, T.; WEI, X. L.; SUN, Q. Y.; YANG, F. M.; CHEN, Q. Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L.; HE, S. H. Purification, characterization and cytokine release function of a novel Arg-49 phospholipase A(2) from the venom of *Protobothrops mucrosquamatus*. **Biochimie**, v.88, n.10, p.1331–1342, 2006.

XU, C.; MA, D.; YU, H.; LI, Z.; LIANG, J.; LIN, G.; ZHANG, Y.; LAI, R. A bactericidal homodimeric phospholipases A2 from *Bungarus fasciatus* venom. **Peptides**, v.28, n.5, p.969–973, 2007.

YE, J.; ZHAO, H.; WANG, H.; BIAN. J.; ZHENG, R.A. defensin antimicrobial peptide from the venoms of *Nasonia vitripennis*. **Toxicon**, v.56, n.1, p.101-6, 2010.

YU, S. P.; CHOI, D. W. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.9360-9362, 2000.

ZACHARCZUK, K.; PIEKARSKA, K.; SZYCH, J.; ZAWIDZKA, E.; SULIKOWSKA, A.; WARDAK, S.; JAGIELSKI, M.; GIERCZYNSKI, R. Emergence of Klebsiella pneumoniae coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. **Antimicrob Agents Chemother**, 18. [Epub ahead of print], 2010.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v.415, p.389–395, 2002.

ZELEZETSKY, I.; PAG, U.; ANTACHEVA, N.; SAHL, H.G.; TOSSI, A. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.434, n.2, p.358–364, 2005.

ZIEGLER, U; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News. Physiol. Sci.**, v.19, p. 124-128, 2004.