

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

---

**Bioprospecção e Caracterização Químico-Funcional de  
Compostos Orgânicos de Baixas Massas Moleculares de  
Venenos das Vespas Sociais: *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia  
vicina* e *Polybia paulista* (Hymenoptera - Vespidae)**

**DANIEL MENEZES SAIDEMBERG**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro  
2009

**DANIEL MENEZES SAIDEMBERG**

**Bioprospecção e Caracterização Químico-Funcional de  
Compostos Orgânicos de Baixas Massas Moleculares de  
Venenos das Vespas Sociais: *Agelaia pallipes pallipes*,  
*Agelaia vicina* e *Polybia paulista* (Hymenoptera - Vespidae)**

**Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).

**RIO CLARO  
2009**

**DANIEL MENEZES SAIDEMBERG**

**Bioprospecção e Caracterização Químico-Funcional de  
Compostos Orgânicos de Baixas Massas Moleculares de  
Venenos das Vespas Sociais: *Agelaia pallipes pallipes*,  
*Agelaia vicina* e *Polybia paulista* (Hymenoptera - Vespidae)**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).

Comissão Examinadora

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Rio Claro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**DEDICO ESSE TRABALHO:**

*À minha esposa Nicoli, por  
toda ajuda, amor, carinho e  
compreensão durante a  
elaboração desse trabalho.*

*Aos meus pais, irmãos e  
sobrinha. Sem a ajuda de vocês,  
esta minha trajetória não seria  
possível, pois não existiria  
um começo.*

*A todos os meus amigos,  
sogro e sogra e cunhados.  
Que sempre me deram força  
nos momentos em  
que eu mais precisei*

**AMO TODOS VOCÊS DO FUNDO DO MEU CORAÇÃO!**

## AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiro lugar, a Deus.

Pela orientação, confiança e amizade do prof. Dr. Mario Sergio Palma e também pela excelente e preciosa orientação e toda a formação pessoal que adquiri ao longo desse tempo.

As vespas sociais *Polybia paulista*, *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* abelhas *Apis mellifera* e aos ratos Wistar, que tiveram que ceder suas vidas para o bem da ciência (tentarei fazer com que isso não seja em vão).

Aos colaboradores deste trabalho: Dr. Claudio Francisco Tormena, Dra. Lilian Mari Marcondes Cesar Tognoli, Dr. Luiz Carlos da Silva Filho, Dra. Maria Anita Mendes. Dr. Jaderson Costa da Costa, Dra. Simone Denise Salamoni, Dr. Roberto Rittner, Dra. Patrícia Brigatte.

Com carinho, também importantes,

A Dra. Lucilene D.dos Santos, agradecendo pelo laço de amizade que criamos, Dra. Bibiana Monson de Souza, Dr. Paulo C. Gomes, a Secretária Vanessa A. Alves,. Aos demais alunos, amigos de trabalho: Beto, Nana, Don, Nathy, pelo companheirismo e momentos de descontração.

Ao Sérgio Pascon ou “Sérgião” por haver fornecido um monte de vespas ao laboratório e pelas abelhas que foram usadas nos ensaios.

A minha esposa Nicoli (na verdade, a mais importante de todos heheh), além de companheira de laboratório, minha melhor amiga e cúmplice, por ter trilhado mais este caminho, que apesar dos momentos árduos, ainda sim, foi sempre abençoado!

Ao meu filhote Iofi, nosso cãozinho, que veio aumentar nossa família e aos nossos peixinhos, os mais novos membros da família Saidemberg!

Aos meus pais, Silvio e Marcia, minha “second mother” Rose, meus irmãos Rodrigo e Mayra e minha sobrinha (no passado, sombrinha) Nayara, por terem feito parte do que eu sou hoje.

A todos os funcionários do câmpus, pois sem eles, nenhum trabalho aqui seria possível.

Enfim, a FAPESP e ao BIOprospecTA, pelo fomento.

"Creio que o principal objetivo da educação deve ser encorajar os jovens a duvidarem de tudo aquilo que se considera estabelecido."

"Devemos apoiar-nos em nossos próprios pés e olhar o mundo honestamente - as coisas boas, as coisas más, suas belezas e suas fealdades; ver o mundo como ele é, e não temê-lo. Conquistar o mundo por meio da inteligência, e não apenas abjetamente, subjugados pelo terror que ele nos desperta"

"É importante aprender a não se aborrecer com opiniões diferentes das suas, mas dispor-se a trabalhar para entender como elas surgiram. Se depois de entendê-las ainda lhe parecerem falsas, então poderá combatê-las com mais eficiência do que se você tivesse se mantido simplesmente chocado."

*Bertrand Russell*

## RESUMO

Consideráveis esforços estão sendo feitos no sentido de isolar e identificar compostos neuroativos presentes em secreções de Artrópodes, resultando na descoberta de muitos peptídeos e moléculas pequenas com ação bloqueadora de receptores de glutamato e/ou canais de cálcio. Tendo isso em vista, a secreção de muitos desses animais tornaram-se ferramentas úteis para os estudos fisiológicos de diversas funções neurais, e muitos dos compostos neurotóxicos produzidos por suas secreções agressivas/defensivas podem se tornar modelos estruturais e funcionais para o desenvolvimento racional de agentes neuroprotetores para diversas desordens neurológicas. Assim, os venenos das vespas *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* e *Polybia paulista* foram fracionados em HPLC, e as frações puras, mais abundantes, foram investigadas por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear para elucidação estrutural das mesmas; e posteriormente, estas frações foram submetidas a diversos ensaios para a determinação de suas atividades biológicas, principalmente daquelas atividades relacionadas à neurotoxicidade/neuroproteção, tanto em artrópodes como em mamíferos. Através desta abordagem foi possível identificar alguns dos compostos de baixas massas moleculares mais abundantes nos venenos das vespas sociais citadas acima, como a Histamina, a Serotonina, que são comuns a todos estes venenos e possuem como principal função, a potencialização da dor e inflamação, além de outros efeitos no SNC de vertebrados. Também foi isolado um novo tripeptídeo de sequência Gly-Leu-Leu-OH a partir do veneno da vespa *A. vicina*, cuja função ainda não é conhecida e a síntese e ensaios biológicos do mesmo serão realizados em algumas ramificações dessa tese. A partir do veneno da vespa *P. paulista* foi isolada 2-feniletilamina, um composto do tipo anfetamina, cuja ocorrência é pouco frequente em venenos animais e, que possui efeitos estimulatórios no SNC, principalmente relacionados à neurotransmissão dopaminérgica, apresentando efeitos de paralisia em abelhas africanizadas, provavelmente, por hiper-excitação no SNC desses organismos. Também foram observados efeitos de redução de locomoção e levantamento avaliados em campo aberto em ratos. Também foi isolado e caracterizado um novo composto a partir do veneno de *P. paulista*, denominado de 2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidro-2H-pyran-1-il 3-(1H-imidazolil) propanimidato, ou Polybiosideo, que atua

no hipotálamo, hipocampo, núcleo septal lateral, núcleo paraventricular do hipotálamo e córtex motor do cérebro de ratos, sendo que algumas dessas áreas podem estar relacionadas aos mecanismos de respostas ao estresse e ansiedade. Nestas regiões, o sítio de ação parece estar associado aos receptores de glutamato dos sub-tipos AMPA-GluR<sub>2/3</sub> e NMDA-R<sub>1</sub>. Os ensaios de eletrofisiologia dos efeitos de Polybiosideo sobre neurônios hipocámpais da região CA1, sugerem um caráter neuroprotetor para esse composto. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o Polybiosideo liga-se aos receptores de glutamato do subtipo NMDA. O Polybiosideo tem grande potencial de se tornar um bom modelo de drogas anti-epiléticas, enfatizando a importância de estudos como os realizados até agora.

Palavras-chave: Venenos de vespas sociais, Espectrometria de massas, Ressonância magnética nuclear, Ensaios de neuroatividade, Metabolômica.



## ABSTRACT

Considerable research efforts have been mounted to isolate and identify neuroactive compounds in Arthropods secretions, resulting in the discovery of many peptides and small molecules which block glutamate receptors and/or calcium channels. Thus, the secretion of many of these animals proved to be useful tools for physiological studies of neuronal function, and several of the neurotoxic compounds produced by their defensive/aggressive secretions may become structural and functional models for the rational development of neuroprotective agents for different neurological disorders. Thus, the venoms of *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* e *Polybia paulista* were fractionated in a HPLC system, and the most abundant and pure fractions were investigated by Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance for structural elucidation, and then, these compounds were assayed for biological activity determination, focusing the neuronal activities for these compounds, both in Arthropods and mammals. Considering this approach, it was possible to identify some of the most low molecular mass compounds in the venoms of the social wasps cited above, such as: Histamine and Serotonin, which were common to all of these species, presenting as main function to increase the pain and inflammation, in addition to other effects in the CNS of vertebrates. It was also isolated from the venom of the wasp *A. vicina* a new tripeptide which had its sequence determined as Gly-Leu-Leu-OH, and whose function has not been determined. From the venom of the wasp *P. paulista* it was isolated 2-phenylethylamine, an amphetamine-like compound, whose occurrence is uncommon in animal venoms, and which has stimulatory effects on the CNS, primarily related to dopaminergic neurotransmission. It caused effects of paralysis on Africanized bees, probably by hyper-excitability in the CNS of this organism. We have also observed locomotor activity reduction and lifting in rats evaluated in open field tests. A new compound from the venom of *P. paulista* was also isolated and characterized, which name is 2,3,4-trihydroxy-5-(hidroxymethyl) tetrahydro-2*H*-pyran-1-yl 3-(1*H*-imidazolyl) propanimidate, the Polybioside, which acts in the hypothalamus, hippocampus, lateral septal nucleus, paraventricular nucleus of the hypothalamus and motor cortex of rats brains and some of these areas may be related to response mechanisms to stress and anxiety. In these brain areas, the site of action appears to be associated with glutamate receptors of the AMPA-dependent rGlu<sub>2/3</sub> and NMDA-R1. Assays of

electrophysiology effects of Polybioside on CA1 region hippocampal neurons, suggested a neuroprotective character for this compound. These results indicate that Polybioside binds to glutamatergic NMDA sub type receptors. The possibility of involving the action mapping of Polybioside by immunohistochemical techniques and electrophysiological assays helped to characterize the activity in the CNS of mammals of another chemical compound isolated from the venom of social wasps, and opens the way for further similar studies. The Polybioside has great potential to become a good model of anti-epileptic drugs, which makes such electrophysiology studies very important.

Keywords: Social wasps venoms, Mass spectrometry, Nuclear magnetic resonance, Neuroactivity assays, Metabolomics.

## LISTA DE FIGURAS

	Pags.
<b>Figura 1:</b> Perfil cromatográfico obtido do extrato de veneno bruto da vespa <i>Agelaia pallipes pallipes</i> por RP-HPLC [coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5 µm)], utilizando-se um gradiente linear de acetonitrila entre 5 % a 60 % (v/v) (contendo TFA 0,1% (v/v) ) e monitorado por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.	47
<b>Figura 2:</b> Perfil cromatográfico do refractionamento da fração 1 do veneno da vespa <i>Agelaia pallipes pallipes</i> por RP-HPLC [coluna WAKOSIL SC4 (4,6 x 150 mm)], utilizando-se um gradiente linear de MeCN/H <sub>2</sub> O entre 90% a 4% (v/v) (contendo TFA 0,1% (v/v)) e monitorado por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.	48
<b>Figura 3:</b> Espectro de ESI-MS no modo positivo, do composto isolado da fração 1-4 do veneno da vespa <i>Agelaia pallipes pallipes</i> .	49
<b>Figura 4:</b> Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 1-4 do veneno da vespa <i>Agelaia pallipes pallipes</i> .	49
<b>Figura 5:</b> Espectro de HRMS do composto isolado da fração 1-4 do veneno da vespa <i>Agelaia pallipes pallipes</i> .	50
<b>Figura 6:</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN em D <sub>2</sub> O da fração 1-4, isolada da vespa <i>Agelaia pallipes pallipes</i> .	51
<b>Figura 7:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN em D <sub>2</sub> O da fração 1-4, isolada da vespa <i>Agelaia pallipes pallipes</i> , com sua possível interpretação.	52
<b>Figura 8:</b> Histamina.	52
<b>Figura 9:</b> Perfil cromatográfico do refractionamento da fração 2 do veneno da vespa <i>Agelaia pallipes pallipes</i> por RP-HPLC [coluna YMC C18 (4,6 x 150 mm)], utilizando-se eluição isocrática com MeCN/H <sub>2</sub> O a 7% (v/v) [contendo TFA 0,1% (v/v)]; a eluição foi monitorada por medidas de absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.	54

**Figura 10:** Espectro UV da fração 2 do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*, 55  
obtida no re-fracionamento por RP-HPLC [coluna YMC C18 (4,6 x 150 mm)],  
utilizando-se um isocrático de MeCN/H<sub>2</sub>O de 7% [contendo TFA 0,1% (v/v)],  
mostrando um perfil de espectro UV com valores  $\lambda_{max}$  típicos para o grupo  
hidroxi-indol .

**Figura 11:** Espectro de ESI-MS no modo positivo, do composto isolado da fração 55  
2 do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*.

**Figura 12:** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da 56  
fração 2 do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*, mostrando um padrão de  
fragmentação típico para a serotonina.

**Figura 13:** Estrutura molecular proposta para o composto presente na fração 2 do 56  
veneno de *A. p. pallipes*: Serotonina.

**Figura 14:** Perfil cromatográfico obtido como veneno bruto da vespa *Agelaia vicina* 58  
por RP-HPLC [coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5  $\mu$ m)], utilizando-se um  
gradiente linear de acetonitrila entre 5 % a 60 % (v/v) (contendo TFA 0,1% (v/v) )  
e monitorado por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.

**Figura 15:** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da 59  
fração 7 do veneno da vespa *Agelaia vicina*.

**Figura 16:** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da 60  
fração 7 do veneno da vespa *Agelaia vicina*, mostrando um padrão de  
fragmentação de um peptídeo com uma seqüência de resíduos aminoácidos G-I/L-  
I/L-OH.

**Figura 17:** Perfil cromatográfico obtido do extrato de veneno bruto da vespa 61  
*Polybia paulista* por RP-HPLC [coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5  $\mu$ m)],  
utilizando-se um gradiente linear de acetonitrila entre 5 % a 60 % (v/v) (contendo  
TFA 0,1% (v/v)), monitorada por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.

**Figura 18:** Perfil cromatográfico de refração da Fração 1 em eluição isocrática de 2% MeCN (v/v) [contendo TFA 0,1% (v/v)] obtida por RP-HPLC [coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5 µm)], monitorada por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm. **62**

**Figura 19:** Espectro de massas obtido com o uso de um potencial reduzido no cone de amostra por ESI-MS, no modo positivo da Fração 1A do extrato de veneno da vespa *Polybia paulista*. **63**

**Figura 20:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H a 500 MHz em D<sub>2</sub>O do composto presente na fração 1A do veneno da vespa social *Polybia paulista*. **64**

**Figura 21:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C a 125 MHz em D<sub>2</sub>O do composto presente na fração 1A do veneno da vespa social *Polybia paulista*. **65**

**Figura 22:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (DEPT) 125 MHz em D<sub>2</sub>O do composto presente na fração 1A do veneno da vespa social *Polybia paulista*. **66**

**Figura 23:** Interpretação da estrutura molecular de Polybiosídeo (fração 1A do veneno de *P. paulista*) nas formas α (esquerda) e β (direita). **67**

**Figura 24:** gCOSY- mapa de correlação (correlação homonuclear Próton-Próton) do composto correspondente à fração 1A, do veneno bruto da vespa *Polybia paulista*. **69**

**Figura 25:** gHSQC (correlação heteronuclear a uma ligação Carbono-Hidrogênio) do composto extraído do veneno bruto da vespa *Polybia paulista*. **70**

**Figura 26:** Detalhe do espectro de gHSQC (correlação heteronuclear a uma ligação Carbono-Hidrogênio) do composto extraído do veneno bruto da vespa *Polybia paulista* mostrando as correlações C2-H2 e C5-H5. **71**

**Figura 27:** gHMBC (correlação heteronuclear a múltiplas ligações entre Carbono-Hidrogênio) do composto extraído do veneno bruto da vespa *Polybia paulista*. **72**

**Figura 28:** Espectro de massas seqüenciais do tipo ESI-MS/MS para o composto **73**

de m/z 302,14 Da. Na forma de  $[M + H]^+$ , presente na fração 1A.

**Figura 29:** Marcação da expressão da proteína *c-fos*:- fotomicrografia de campo claro evidenciando células imunoreativas à proteína-*fos* após a administração *icv* do Polybiosideo , e uma representação esquemática ilustrando as áreas que expressaram *fos* após a administração da toxina. Abreviações: PRL- Córtex Pré-Límbico Pir- Córtex Piriforme. Escalas: 100  $\mu$ M. **77**

**Figura 30:** Marcação da expressão da proteína *c-fos*:- fotomicrografia de campo claro evidenciando células imunoreativas à proteína-*fos* após a administração *icv* do Polybiosideo, e uma representação esquemática ilustrando as áreas que expressaram *fos* após a administração da toxina. Abreviações: LS- Núcleo Septal Lateral (Dorsal, intremediário e ventral). Escala: 100  $\mu$ M. **78**

**Figura 31:** Marcação da expressão da proteína *c-fos*:- fotomicrografia de campo claro evidenciando células imunoreativas à proteína-*fos* após a administração *icv* do Polybiosideo e uma representação esquemática ilustrando as áreas que expressaram *fos* após a administração da toxina. Abreviações: AH- Área Hipotalâmica; PVH- Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; LH- Área Hipotalâmica Lateral; f- fórnice; 3V- Terceiro Ventrículo; ox- Quiasma Óptico. Escalas: 200  $\mu$ M. **79**

**Figura 32:** Marcação da expressão da proteína *c-fos*:- fotomicrografia de campo claro evidenciando células imunoreativas à proteína-*fos* após a administração *icv* do Polybiosideo e uma representação esquemática ilustrando as áreas que expressaram *fos* após a administração da toxina. Abreviações: CA1- Região CA1 do Hipocampo; PoDG- Lâmina Polimorfa do Giro Denteado; PVA- Núcleo Paraventricular Talâmico; IMD- Núcleo Intermédio Dorsal do Tálamo; CM- Núcleo Centro Medial; Rh- Núcleo Rombóide; Re- Núcleo Reuniens; CeC- Núcleo Central da Amígdala, divisão capsular; DMD- Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo. Escala:100  $\mu$ M para CeC e DMD e 200 $\mu$ M para CA1/PoDG e PVA/IMD/CM/Rh/Re. **80**

**Figura 33:** Co-localização da proteína *c-fos* e marcadores neuronais: GluR2/3 (figuras A a D); Orexina (figuras E e F); NMDA-R1 (figuras G a J); Tyrosina Hidroxilase-TH (figuras K e L). Fotomicrografias de campo claro evidenciando a dupla marcação *fos*/marcadores neuronais (setas pretas). Essa marcação (pontos escuros) é evidenciada nos núcleos tratados com anticorpos específicos: anti- **83**

GluR2/3; anti-orexina; anti-NMDA-R1 e anti-TH. A: Núcleo Paraventricular hipotalâmico; B: Detalhe da figura A; C: Área Hipotalâmica; D: Detalhe da figura C; E: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; F: Detalhe da figura E; G: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; H: Detalhe da figura G; I: Córtex Piriforme; J: Detalhe da figura I; K: Área Hipotalâmica Lateral; L: Detalhe da figura K. Abreviações: 3V- Terceiro Ventrículo; AH- Área Hipotalâmica; PVH- Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; Pir- Córtex Piriforme; LH- Área Hipotalâmica Lateral. Escala 25um em B/D/F/H/J/L; 100um em A/C/E/G e 50um em K.

**Figura 34:** Ampliação dos detalhes da figura 33 mostrando esquematicamente as regiões duplamente marcadas na representação do centro da figura. **84**

**Figura 35:** Esquema comparativo ilustrando as áreas que expressaram c-fos e dupla marcação, após administração de Polybiosideo. De A a C; Expressão de c-fos (vermelho); de D a F: Co-localização da proteína c-fos com receptores Glu2/3 (amarelo) e de NMDA-R1 (de G a I). **85**

**Figura 36:** Representação das porcentagens de neurônios duplamente marcados encontrados nos animais tratados com Polybiosideo. Abreviações: Pir- Córtex Piriforme; LS- Núcleo Septal Lateral; AH- Área Hipotalâmica; PVH- Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; DMD- Núcleo Dorsomedial; HP- Hipocampo; Re- Núcleo de Reuniens; Rh- Núcleo Rombóide; CM- Núcleo Central Medial; IMD- Núcleo Dorsal Intermedial; PVA- Núcleo Paraventricular do Tálamo; CeC- Núcleo Amigdalóide Central. **86**

**Figura 37 A-** Rato controle: 60 dias de solução salina peso 200g. Variação do potencial de membrana mostrando a viabilidade dos neurônios hipocampais em curva de voltagem x corrente antes e depois do tratamento com 0 – Mg<sup>2+</sup> e aplicação do Polybiosideo em tecido hipocampal de rato. **B** - Registro intracelular do neurônio na presença de solução de Ringer normal contendo Polybiosideo (concentração 1 µM). **89**

**Figura 38:** Registro intracelular dos neurônios hipocampais de CA1 na atividade espontânea, na ausência e presença de Polybioside. **90**

- Figura 39:** Registro intracelular de neurônios hipocâmpais de CA1 na atividade epileptiforme induzida, na ausência e presença de Polybioside. 91
- Figura 40:** Espectro de massas ESI\_MS obtido no modo positivo da Fração 5 do extrato de veneno da vespa social *Polybia paulista*. 94
- Figura 41:** Espectro de massas ESI-MS /MS obtido no modo positivo da Fração 5 do extrato de veneno da vespa social *Polybia paulista*. 94
- Figura 42:** Espectro de RMN- <sup>1</sup>H em D<sub>2</sub>O da fração 5 do veneno da vespa social *Poybia paulista*. 95
- Figura 43:** Ampliação do espectro de RMN- <sup>1</sup>H mostrando dois tripletos em 3,02 e 3,3 ppm. 95
- Figura 44:** Estrutura química proposta para o composto presente na fração 5 do veneno da vespa *P. paulista*: 2-Feniletilamina. 96
- Figura 45:** Principais compostos derivados da 2-feniletilamina (modificado de [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Overview\\_Phenethylamines.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Overview_Phenethylamines.png)). 98
- Figura 46:** Curva de Dose-Efeito (ED<sub>50</sub>) para a 2-PEA em abelhas africanizadas. 100
- Figura 47:** Efeito da 2-feniletilamina sobre a atividade locomotora dos ratos 30 minutos após a administração i.p.; \* p< 0,05 em relação ao grupo tratado com salina (controle). 102
- Figura 48:** Efeito da 2-feniletilamina sobre a atividade de levantamento corporal dos ratos 30 minutos após a administração i.p.; \* p< 0,05 em relação ao grupo tratado com salina (controle). 102
- Figura 49:** Efeito da 2-feniletilamina sobre o tempo de imobilidade dos ratos 30 minutos após a administração i.p.; \* p< 0,05 em relação ao grupo tratado com salina (controle). 103



## LISTA DE FIGURAS DO ANEXO

	<b>Pgs.</b>
<b>Figura A1:</b> Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 1 do veneno da vespa <i>A. vicina</i> .	<b>123</b>
<b>Figura A2:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN em D <sub>2</sub> O da fração 1, isolada da vespa <i>A. vicina</i> , com sua possível interpretação.	<b>123</b>
<b>Figura A3:</b> Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 5 do veneno da vespa <i>A. vicina</i> .	<b>124</b>
<b>Figura A4:</b> Espectro UV da fração 5 do veneno da vespa <i>A. vicina</i> , obtida no re-fracinamento por RP-HPLC [coluna YMC C18 (4,6 x 150 mm)], utilizando-se um isocrático de MeCN/H <sub>2</sub> O de 7% [contendo TFA 0,1% (v/v)], mostrando um perfil de espectro UV com valores $\lambda_{\max}$ típicos para o grupo hidroxí-indol.	<b>124</b>
<b>Figura A5:</b> Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 2 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> .	<b>125</b>
<b>Figura A6:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN em D <sub>2</sub> O da fração 2, isolada da vespa <i>P. paulista</i> .	<b>125</b>
<b>Figura A7-</b> Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 2 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> .	<b>126</b>
<b>Figura A8-</b> Espectro UV da fração 2 do veneno da vespa <i>P. paulista</i> , obtida no re-fracinamento por RP-HPLC [coluna YMC C18 (4,6 x 150 mm)], utilizando-se um isocrático de MeCN/H <sub>2</sub> O de 7% [contendo TFA 0,1% (v/v)], mostrando um perfil de espectro UV com valores $\lambda_{\max}$ típicos para o grupo hidroxí-indol.	<b>126</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

	<b>Pgs.</b>
<b>Esquema 1:</b> Representação da fragmentação da Histamina.	<b>53</b>
<b>Esquema 2:</b> Interpretação do padrão de fragmentação obtido o composto presente na fração 2 do veneno de <i>A. p. pallipes</i> , por ESI-MSMS.	<b>56</b>
<b>Esquema 3:</b> Esquema de fragmentação para o Polybiosideo mostrada na figura 23.	<b>73</b>
<b>Esquema 4-</b> Esquema de fragmentação da 2-Feniletilamina obtida da fração 5 do veneno da vespa social <i>Polybia paulista</i> .	<b>96</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pgs.</b>
<b>Tabela 1:</b> Assinalamento dos sinais obtidos nas análises de RMN - <sup>1</sup> H (1D e 2D) para o Polybiosideo nas formas $\alpha$ e $\beta$ .	<b>67</b>
<b>Tabela 2:</b> Principais sinais obtidos nas análises de RMN - <sup>13</sup> C para o composto presente na fração 1A do veneno da vespa <i>Polybia paulista</i> na forma $\alpha$ .	<b>68</b>
<b>Tabela 3:</b> Principais sinais obtidos nas análises de RMN - <sup>13</sup> C para o composto presente na fração 1A do veneno da vespa <i>Polybia paulista</i> na forma $\beta$ .	<b>68</b>
<b>Tabela 4:</b> Número de células (média +/- SEM) Mostrando as células fos- imunoreativas de ratos submetidos ao tratamento com salina [0,9% (m/V)] e com a Polybioside (0,1ug/uL).	<b>81</b>
<b>Tabela 5:</b> Porcentagem de neurônios duplamente marcados <i>fos/rGlu<sub>2/3</sub></i> , <i>fos/NMDA-R1</i> , <i>fos/TH</i> e <i>fos-orexina</i> .	<b>86</b>
<b>Tabela 6:</b> Resultado da determinação da dose letal para 50% (DL <sub>50</sub> ) em um período de 48 horas para o microcrustáceo <i>D. similis</i> .	<b>101</b>

## LISTA DE ABREVIações

AH	Área Hipotalâmica Anterior
AMPA	Receptor do ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AMPA-Glu <sub>r2/3</sub>	Receptor Glutamatérgico do subtipo AMPA Glu <sub>r2/3</sub>
ANOVA	Análise de Variância
Bregma	Ponto onde se reúnem as suturas anteriores do crânio parietais e frontal
CA1	Região Hipocampal
Candy	Mistura de mel e açúcar
CeC	Núcleo Amigdalóide Central
CM	Núcleo Central Medial
DAB	Diamino Benzidina
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL50	Dose Letal para 50% dos indivíduos
DMD	Núcleo Dorsomedial
ED <sub>50</sub>	Dose com Efeito para 50% dos indivíduos
e.p.m	Erro Padrão Médio
ESI	Ionização por "Eletrospray"
f	Fórnice
2-FEA	2-Feniletilamina
GABA	Ácido gama-amino-butírico
gCOSY	Correlação Homonuclear Próton-Próton
gHMBC	Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações entre Carbono-Hidrogênio
gHSQC	Correlação Heteronuclear a Uma Ligação Carbono-Hidrogênio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (monoisotópica)
i.p.	Injeção intraperitoneal
<i>icv</i>	Injeção intracerebroventricular
IMD	Núcleo Intermédio Dorsal do Tálamo
KPBS	Tampão Fosfato de Potássio em Salina
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas
LH	Área Hipotalâmica Lateral
LS	Núcleo Septal Lateral
MAO	Enzima Monoamino-Oxidase
MeCN	Acetonitrila
MS	Análise por Espectrometria de Massas
MS/MS	Análise por Espectrometria de Massas <i>in tandem</i>
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMDA-R <sub>1</sub>	Subunidade R1 do Receptor de N-Metil-D-Aspartato
ox	Quiasma Óptico
Pir	Córtex Piriforme
PoDG	Lâmina Polimorfa do Giro Denteado
PRL	Córtex Pré-Límbico
PVA	Núcleo Paraventricular Talâmico

PVH	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
PWTX-I	<i>Parawixia</i> Toxin I
Re	Núcleo de Reuniens
Rh	Núcleo Rombóide
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-HPLC	HPLC sob fase reversa
SNC	Sistema Nervoso Central
3V	Terceiro Ventrículo
TFA	Ácido Trifluoracético
TH	Tirosina Hidroxilase
TMS	Tetrametilsilano
Triton X-100	t-octilfenoxipolietanol
UV	Ultra Violeta

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	23
<b>2. OBJETIVOS</b>	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
3.1 Material biológico	33
3.2 Extração e Liofilização do Veneno	33
3.3 Cromatografia Líquida de Fase Reversa	34
3.4 Espectrometria de Massas	34
3.5 Ressonância Magnética Nuclear	36
3.6 Bioensaios de Atividades Tóxicas em <i>Apis mellifera</i>	37
3.7 Bioensaios de Atividades Tóxicas em <i>Daphnia similis</i>	38
3.8 Avaliação das Toxinas no Sistema Nervoso Central de Ratos por Injeção Intracerebroventricular.	38
3.9 Neurotoxicidade/Neuroproteção em Ratos Wistar	42
3.10 Avaliação da atividade da atividade geral motora de Ratos Wistar por campo aberto	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	46
<b>4.1 PARTE I - <i>Agelaia pallipes pallipes</i></b>	47
Análise dos compostos de baixas massas moleculares	
4.1.1 FRAÇÃO 1	48
4.1.2 FRAÇÃO 2	54
<b>4.2 PARTE II – <i>Agelaia vicina</i></b>	58
Análise dos compostos de baixas massas moleculares	
4.2.1 FRAÇÃO 1 e 5	59
4.2.2 FRAÇÃO 7	59
<b>4.3 PARTE III - <i>Polybia paulista</i></b>	61
Análise dos compostos de baixas massas moleculares	
4.3.1 FRAÇÃO 1	62

Determinação da atividade biológica do composto obtida da fração 1A do veneno da vespa social <i>Polybia paulista</i>	
4.3.1.1 Bioensaios das atividades tóxicas de Polybioside em abelhas <i>Apis mellifera</i>	75
4.3.1.2 Mapeamento e determinação dos tipos neuronais ativados pelo polybioside no encéfalo de ratos	75
Expressão de <i>c-Fos</i>	75
Análise das duplas marcações	82
4.3.1.3 Ensaios de neurotoxicidade de neuroproteção do Polybiosideo em Ratos Wistar	88
4.3.2 FRAÇÃO 2	93
4.3.3 FRAÇÃO 5	93
Determinação da atividade biológica do composto obtido da fração 5 do veneno da vespa social <i>Polybia paulista</i>	
4.3.3.1 Determinação da atividade biológica do composto obtido da fração 5 (2-feniletilamina) do veneno da vespa social <i>Agelaia vicina</i> : ensaio de toxicidade em abelha	100
4.3.3.2 Bioensaios das atividades tóxicas da feniletilamina em microcrustáceos <i>Daphnia similis</i>	101
4.3.3.3 Avaliação da atividade motora geral de ratos Wistar por campo aberto após injeção de 2-FEA	102
4.3.4 FRAÇÃO 6	104
<b>5 CONCLUSÕES</b>	105
<b>6 BIBLIOGRAFIA</b>	107
<b>7 ANEXOS</b>	123

## 1 INTRODUÇÃO

Hoje, os produtos naturais são, cada vez mais freqüentemente, o ponto de partida para pesquisas de novas drogas. Alguns dos focos dessas pesquisas estão nos venenos de artrópodes, pois, estes são ricas fontes de drogas para o tratamento de diversas desordens neurológicas (KOBAYASHI et al.,1992).

O gigantesco potencial das moléculas presentes nos venenos de artrópodes já está sendo explorado por várias empresas particulares, como a NPS Pharmaceuticals Inc. que, em 1993, assinou um contrato com uma agência científica de Madagascar para a investigação dos usos medicinais de compostos-líderes extraídos de toxinas encontradas em insetos venenosos e aracnídeos (GARCIA, 1993).

Outro exemplo é a gigante Pfizer, Inc. que assinou um acordo de 50 milhões de Dólares Americanos com a Neurogen Corp. em 1992 para a pesquisa de drogas para o tratamento da ansiedade e firmou também, nesse mesmo ano, um acordo com a Natural Product Sciences, Inc. para a pesquisa de compostos baseados em venenos de aranhas, com o intuito de desenvolver drogas para terapia de desordens neuropsiquiátricas e derrames (BERNSTEIN, 1992)

Porém, alguns aspectos devem ser levados em consideração quando se fala em química de produtos naturais, como a perda de espécies devido às mudanças ambientais, pois muitas espécies, além de fundamentais para os ecossistemas, podem ser a chave para o tratamento de diversas doenças (HARVEY, 2000). Por essa razão, a síntese dos compostos para estudos de atividades biológicas mais aprofundadas torna-se fundamental ao se considerar os estudos com produtos naturais.

Uma curiosidade sobre moléculas orgânicas produzidas por animais é que algumas delas podem estar relacionadas, até mesmo, ao isolamento reprodutivo de algumas espécies, através de estímulos químicos que podem agir à distância, o que, além dos outros isolamentos, pode gerar especiação em diversos grupos. Como evidência deste isolamento químico pode-se citar as mariposas fêmeas, que logo ao eclodirem podem atrair machos de sua espécie a distâncias de centenas

---



de metros, além de diversos outros trabalhos sobre a natureza química de odores de atração sexual (MAYR, 1977).

Uma função também muito importante dessas moléculas está relacionada à defesa química. Um dos mais notáveis exemplos de defesa química em artrópodes, descrito por Attygale et al., (1993), é o da pupa do besouro de feijões mexicanos, “ladybird beetle”, *Epilachna varivestis*, que por ser imóvel, pode passar por inofensiva à primeira vista, mas uma análise microscópica mais detalhada revela que na superfície desta pupa há uma densa camada de pêlos glandulares, que produzem uma secreção repelente contendo alguns alcalóides que evitam a predação por formigas.

O sistema de defesa da borboleta monarca é um dos mais conhecidos, principalmente entre os etólogos, como um excelente exemplo de comportamento aprendido em animais. Esta espécie utiliza-se de uma associação de cores aposemáticas e substâncias tóxicas, obtidas em sua alimentação larval e concentradas em suas asas na vida adulta para, literalmente, “educar” seus predadores naturais, os pássaros, a rejeitar qualquer outra borboleta que tenha as mesmas cores (BROWER, 1988; ALCOCK, 1998).

Outro exemplo de defesa química em artrópodes é o sistema defensivo do pseudo-escorpião *Mastigoproctus giganteus*, que esguicha uma mistura de ácido acético e ácido caprílico contra seus inimigos, onde a função do ácido caprílico é de agente lipofílico, sobre a epicutícula (recoberta de lipídeos) do inseto-agressor, facilitando o transporte do ácido acético através de seu escudo de defesa, causando sua morte (EISNER et al., 1961).

Encontram-se também na natureza, diversos exemplos de Artrópodes que produzem substâncias para capturar presas, para matá-las e/ou paralisá-las, como no caso da vespa solitária *Anoplius samariensis*, que utiliza seu veneno para produzir uma notável paralisia não letal e permanente em aranhas que serão usadas como alimento para suas larvas (HISADA et al., 2005).

As aranhas são grandes especialistas em capturar suas presas (que na grande maioria dos casos são insetos), através da ação de seus venenos nos sistemas nervosos dessas presas. Pode-se afirmar ainda que estes animais, sem sombra de

---

dúvida, matam insetos com maior eficiência que os inseticidas comerciais, devido à menor chance de desenvolvimento de resistência (QUICKE, 1988; CESAR et al., 2005a).

Essa grande especialidade das aranhas em paralisarem presas, é em grande parte devido à presença de compostos de baixas massas moleculares encontrados nos venenos das mesmas, os quais geralmente são bloqueadores específicos de canais iônicos, importantes para diversas funções neurais (PALMA et al., 1998; HORNÍ et al., 2000), podendo atuar tanto como agonistas ou antagonistas de receptores destes canais (DAVIES et al., 1992; JACKSON; USHERWOOD, 1998).

Os venenos de aranhas geralmente são constituídos de misturas complexas de toxinas biologicamente ativas, que podem ser divididas em 3 maiores classes de componentes de acordo com sua natureza química: proteínas de altas massas moleculares ( $M_w > 10$  kDa), peptídeos ( $M_w 3-10$  kDa) e compostos de baixas massas moleculares ( $M_w < 1$  kDa) (KAWAY; NAKAJIMA, 1993); esta última classe, por sua vez, pode ser dividida em outras sub-classes de acordo com a natureza química destas toxinas (MARQUES et al., 2004).

Nas frações de baixas massas moleculares dos venenos das aranhas pode-se encontrar: ácidos livres, como o cítrico e láctico; glicose, amino-ácidos livres; aminas biogênicas como: diaminopropano, putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e neurotransmissores como: glutamato, aspartato serotonina, histamina, ácido butírico, dopamina e epinefrina (PALMA; NAKAJIMA, 2005).

Duas das mais importantes subclasses de neurotoxinas de baixas massas moleculares no veneno das aranhas são as acilpoliaminas, que são neurotoxinas que atuam como antagonistas de diferentes classes de receptores ionotrópicos de glutamato e as tetrahydro- $\beta$ -carbolinas que foram isolados do veneno da aranha social *Parawixia bistriata* por Cesar et al. (2000) e são análogos naturais da tripargina, usados para matar/paralisar presas por essas aranhas (PALMA; NAKAJIMA, 2005; CESAR et al., 2005a, CESAR et al., 2005b). Recentemente, foi descrito por Saidemberg et al. (2009) o efeito de inibição de enzimas Mono Amino Oxidases (MAOs) pelos enantiômeros da PWTX-I, uma dessas tetrahydro- $\beta$ -

---

carbolinas, revelando um potencial efeito contra diversas disordens no SNC, incluindo diversos quadros de depressão e doença de Parkinson.

Todos os outros animais venenosos, também produzem seus venenos com diversas finalidades, tais como: ataque, captura, digestão do alimento, ou mesmo defesa contra predadores, mas na imensa variedade de animais venenosos, os artrópodes estão envolvidos em um número maior de acidentes humanos, que todos os outros filos somados (RUSSEL, 1996; RODRIGUES, 1999).

Se considerarmos o filo Arthropoda, pode-se dizer que dentro deste, os insetos são os animais terrestres mais numerosos e amplamente distribuídos do planeta (EISNER; WILSON, 1997); eles reinam sobre todas as terras continentais com supremacia, sobrevivendo por ao menos 300 milhões de anos (CHAUD-NETTO et al., 1994). Foi estimado que existem em torno de 200 milhões de insetos para cada ser humano vivo (MEINWALD; EISNER, 1995).

Um fator que contribuiu muito para o sucesso evolutivo desse grupo animal, além de suas adaptações morfológicas e estruturais, é a sua extraordinária versatilidade química (MEINWALD; EISNER, 1995).

Os insetos produzem substâncias químicas para os mais diversos propósitos: como venenos para matar presas, substâncias irritantes para afugentar possíveis inimigos, repelentes e feromônios para os mais diversos tipos de comunicação química (MEINWALD; EISNER, 1995; MEINWALD, 2000; MCCORMIC; MEINWALD, 1993).

Como os insetos são formidáveis engenheiros químicos, diversas respostas para os mais variados aspectos enfrentados no dia-a-dia pelas indústrias e pelos cientistas, como a descoberta de fármacos mais eficientes, inseticidas seguros, repelentes e infinitas outras aplicações, podem estar contidas nestes fantásticos animais, aguardando por nossas descobertas.

Dentre todos os tipos de venenos animais já descritos, aqueles dos insetos da Ordem Hymenoptera já são conhecidos há mais de 4,5 mil anos, pois há relatos de que o Faraó Menes, do antigo Egito, foi fatalmente ferroadado por vespas. Os insetos dessa ordem, também, eram muito conhecidos entre os hebreus (SPRADBERY, 1973).

---

Mesmo com tanta história, ainda se sabe muito pouco a respeito da composição, propriedades farmacológicas, mecanismos de ação e alergenicidade de suas toxinas (PALMA; BRAGA, 1994), tornando esse grupo de insetos muito interessante para estudos, principalmente ao se considerar o grupo das vespas (superfamília Vespoidea), já que o Brasil possui cerca de quinhentas espécies de vespas sociais e mais de duas mil espécies de vespas solitárias, sendo que somente uma pequena fração destas foi estudada (MALASPINA et al., 1999).

De acordo com Wilson (1971), as espécies de vespas são interessantíssimas do ponto de vista comportamental, visto que elas mostram claramente a transição entre o modo de vida “solitário” e um avançado modo de vida “eusocial”, onde, há uma divisão reprodutiva do trabalho com sobreposição de gerações.

As vespas *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* e *Polybia paulista*, pertencem à família Vespidae, considerada como a família das verdadeiras vespas sociais, ou seja, as que habitam uma colônia fundada por apenas uma rainha (EVANS; EBERHARD, 1970; HERMANN; BLUM, 1981; WILSON, 1971).

Essas espécies são muito comuns no estado de São Paulo, principalmente em áreas urbanizadas, podendo ser encontradas ao longo do ano todo, principalmente nas épocas mais quentes.

Um fato interessante sobre estas vespas sociais é que ao contrário das vespas solitárias que utilizam seus aparelhos de ferroar para injetar seus venenos e paralisar suas presas, as vespas sociais utilizam seu aparelho de ferroar somente para defesa ativa, já que suas presas são capturadas basicamente com as mandíbulas (EVANS, 1958; EVANS; EBERHARD, 1970), ou seja, elas provavelmente desenvolveram seus venenos visando manter distantes os animais que geralmente são uma ameaça aos seus ninhos; isso inclui principalmente vertebrados predadores como os mamíferos (SCHIMIDT, 1990).

Até agora, sabe-se que os venenos de vespídeos são misturas complexas de compostos biologicamente ativos, tais como: aminas biogênicas, peptídeos e enzimas (OLIVEIRA; PALMA, 1998; KONNO et al., 2000) e que de acordo com Ederly et al., (1978 e 1972) podem apresentar os seguintes sintomas quando injetados na sua forma bruta em camundongos: dispnéia, tontura, paralisia dos

---

nervos motores, diarreia, hematúria, torpor, perda dos reflexos, anafilaxia, morte, além de dor e inflamação.

Somente a partir da década de 80, toxinas animais de baixas massas moleculares começaram a ser descritas na literatura. Estas primeiras toxinas foram as acilpoliaminas, cuja principal característica é serem altamente polares, contendo um grupo acil aromático (USHERWOOD; BLACKBROUGH, 1991; MOE et al., 1998).

Dentre todos os outros compostos de baixas massas moleculares já identificados até agora em vespídeos, estão: histamina, octopamina, GABA, espermidina, espermina, serotonina, lisina, arginina, acetilcolina, dopamina, nicotina, tiramina, adenosina, alanina, ácido glutâmico, putrescina, cadaverina, adrenalina, noradrenalina, além de outros compostos (HISADA et al., 2005; MURATA et al., 2001; MANN, 1994). Essas toxinas de baixas massas moleculares, na maioria dos casos, são neurotransmissores, agonistas e/ou antagonistas de canais iônicos (JACKSON; USHERWOOD, 1998).

Estes compostos são usados pelas vespas solitárias para modular a neurotransmissão em insetos-presa levando-os à paralisia (MURATA et al., 2001; NAKAJIMA, 1984) e pelas vespas sociais como neurotoxinas contra diversos predadores, já que estas utilizam seus venenos somente para defesa ativa (EVANS, 1958; EVANS; EBERHARD, 1970; SCHIMIDT, 1990).

Considerando-se os potentes efeitos desses compostos no SNC de mamíferos, deve-se levar em consideração para a caracterização da função de suas funções que a epilepsia é a segunda desordem neurológica mais comum seguida do derrame, afetando aproximadamente 1% da população mundial (BLUM, 1998).

A epilepsia é causada por uma descarga excessiva de neurotransmissores, causando diversos danos aos portadores dessas condições, principalmente crianças e idosos, sendo controlada, em alguns casos, pela administração crônica de drogas antiepilépticas, que possuem diversos e severos efeitos colaterais (MORTARI et al., 2007).

Por essa razão, o estudo de novos compostos que atuem como antiepilépticos no SNC é de fundamental importância.

---

Acredita-se que transmissores simples como Glutamato e GABA estejam envolvidos na grande maioria das sinapses do Sistema Nervoso Central. Os neurônios glutamatérgicos estão amplamente distribuídos pelo SNC e incluem tanto interneurônios curtos como longas vias de projeções.

Os neurônios corticofugais do córtex motor cerebral até a corda espinal inferior liberam glutamato e estão entre os maiores neurônios do corpo humano. Uma vez liberado, o glutamato causa despolarização e, portanto a excitação por despolarização dos neurônios, porém isso ocorre via uma variedade de receptores como os de N-Metil-D-Aspartato NMDA (STONE, 1995).

Esse neurotransmissor é o agonista principal do receptor de glutamato e pertence a uma sub-família ligada a canais iônicos de íons sódio e cálcio, sendo que esses canais ligados ao receptor de glutamato, do subtipo NMDA, são parcialmente bloqueados por íons magnésio de uma maneira voltagem-dependente, ou seja, esse bloqueio é reduzido quando os neurônios são despolarizados por outras maneiras, como será explicado a seguir:

Sob condições normais, glutamato excita as células principalmente pelos receptores AMPA e Cainato. Se a despolarização é grande ou prolongada, o bloqueio por íons magnésio é reduzido e esses receptores passam a exercer uma função cada vez maior na transmissão sináptica (STONE, 1995).

A grande variedade de compostos neuroativos presentes nos venenos das vespas podem ser muito úteis nos estudos sobre neurotransmissão glutamatérgica excessiva mediada pelo de receptor de glutamato do sub-tipo NMDA, que é letal para os neurônios em um grande número de desordens neurológicas (SKAPER et al., 2001).

Levando-se em consideração a importância desse estudo, como saber previamente se um composto é ativo nas regiões de interesse através de determinados tipos de receptores neuronais? Uma das formas de se mapear a atividade de substâncias no sistema nervoso de mamíferos é a administração icv. com o objetivo de que essas substâncias possam ser captadas, por meio dos mecanismos de difusão específicos, pelas células neuronais, desencadeando repostas bioquímicas e/ou funcionais para estudos comportamentais,

---

farmacológicos, fisiológicos, neuroendócrinos e neuroanatômicos. Porém, deve-se levar em consideração que no sistema nervoso adulto, as características enzimáticas e estruturais das células endoteliais e as camadas das células gliais que cercam as estruturas neurais, exercem uma função de barreira impedindo a passagem de diversas substâncias do líquido cefalorraquidiano para o tecido nervoso (VASCONCELOS et al., 2007).

Sinais extrínsecos podem modular a função celular por diversas maneiras. Sinais externos podem afetar o funcionamento celular através da regulação da expressão de genes, moléculas que podem passar facilmente através de membranas podem modificar diretamente a expressão gênica pela interação com receptores nucleares e substâncias que interagem com receptores na membrana celular podem alterar os níveis de mensageiros celulares secundários e subseqüentemente, podem induzir indiretamente a expressão de genes específicos. Substâncias que não podem passar a membrana celular interagem com receptores localizados na superfície celular induzindo uma série de modificações dentro da célula como: alterações na concentração intracelular de mensageiros secundários que podem modular as taxas de fosforilação de diferentes proteínas, alteração no influxo de íons como  $Ca^{2+}$  e modificações em canais iônicos, existindo apenas algumas poucas mudanças que podem ocorrer por estimulação celular por sinais extrínsecos. Os genes que são ativados rapidamente por estimulação celular e aqueles cuja expressão não pode ser prevenida por inibidores de síntese proteica são os genes de expressão imediata (IEGs) e esses IEGs são responsáveis pela produção de fatores de transcrição que modificarão a resposta de outros genes conhecidos como genes-alvo e genes de resposta tardia (HERRERA; ROBERTSON, 1996).

Entre esses IEGs, inclui-se o c-Fos que é um *proto-oncogene* que expressa a proteína c-fos, quando induzido por estímulos extracelulares, e essa proteína forma um complexo que, associado a elementos de controle do processo de transcrição, exerce função de mediador de respostas celulares de longo prazo. O uso da análise da expressão de fatores de transcrição como a proteína c-Fos é muito útil para a análise da ativação neuronal após a aplicação de um estímulo

---

(neurotransmissores, fatores tróficos, entre outros). Essa ativação neuronal gera, pela ação de segundos mensageiros intracelulares, a expressão de genes específicos que determinarão o início de eventos bioquímicos, como síntese de neurotransmissores e proteínas e/ou modulação de canais iônicos. Assim, o neurônio poderá apresentar respostas específicas aos estímulos recebidos (VASCONCELOS et al, 2007).

Devido ao fato de que as toxinas abordadas nesse trabalho são de compostos de baixas massas moleculares, a quantidade de material biológico que constituem tais toxinas em venenos de vespas, se torna um aspecto importante para ser levado em consideração. As metodologias exigem um trabalho minucioso, que por sua vez depende de um intenso treinamento de recursos humanos especializados, e os equipamentos necessários a estudos estruturais geralmente são muito sofisticados.

A separação, purificação e caracterização de compostos de origem natural são processos de extrema importância para numerosas aplicações em bioquímica e em química de produtos naturais (MENDES et al., 2004) e a cromatografia líquida de alta resolução sob fase reversa (RP- HPLC) tem sido a principal técnica de separação utilizada. Porém essa técnica deve ser utilizada de forma combinada com técnicas espectroscópicas (ESI-MS, ESI-MS/MS e Ressonância Magnética Nuclear), para resolver os problemas de análise estrutural exigidos pela biotecnologia analítica moderna (HEATH; GIORDANI, 1993; MENDES et al., 2004), principalmente quando os compostos-alvo ocorrem em misturas complexas (MENDES et al., 2004).

---



## 2 OBJETIVOS

O presente projeto visou alcançar alguns objetivos relacionados às metas do Programa BIOprospecTA/FAPESP, através da identificação e caracterização de alguns compostos naturais de baixas massas moleculares, presentes nos venenos de espécies de vespas sociais, autóctones da fauna do Estado de São Paulo.

Dessa forma, o objetivo desta tese foi a purificação, determinação estrutural e caracterização funcional dos compostos biologicamente ativos de baixas massas moleculares, mais abundantes nos venenos das vespas sociais, *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* e *Polybia paulista* e que possuam efeitos no sistema nervoso de vertebrados e/ou invertebrados.

Para isto, foi utilizada uma combinação de técnicas analíticas avançadas, tais como: cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), espectrometria de massas ESI-MS, espectrometria de massas seqüenciais (ESI-MS/MS), ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$ ), carbono ( $^{13}\text{C}$ ), além de análises de RMN em duas dimensões (gCOSY, gHSQC e gHMBC).

O objetivo do trabalho também incluiu a determinação das áreas neuronais, de cérebros de ratos, ativadas por alguns desses compostos através de aplicações icv combinadas a protocolos de imunohistoquímica para monitoramento da expressão de c-Fos e para detecção de alguns receptores neuronais específicos.

A caracterização biológica desses compostos também foi realizada através de estudos de mecanismos de ação por ensaios de eletrofisiologia em preparações de sistema nervoso central de ratos para a determinação de atividade neurotóxica/neuroprotetora, além de ensaios envolvendo determinação de toxicidade em abelhas africanizadas, microcrustáceos e de ensaios de atividade geral em ratos.

---

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material Biológico

Os ninhos das vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae) *Agelaia pallipes pallipes*, *Agelaia vicina* e *Polybia paulista* que foram utilizadas no estudo foram coletados na região de Rio Claro, Estado de São Paulo; todas as coletas foram geo-referenciadas (*P. paulista* – (S22°23'42.9''; W047°32'32.5''); *A. p. pallipes* – (S22°23'49.7''; W047°32'54''); *A. vicina* – (S22°25'25.4''; W047°34'48.2'')). Em seguida à coleta iniciou-se a extração e liofilização dos venenos dessas vespas. Foram utilizados para os experimentos os reservatórios de veneno de ~3000 vespas de cada espécie (quantidade geralmente encontrada em apenas um ninho). As abelhas (*Apis mellifera*) foram obtidas junto ao apiário do IBRC – UNESP em Rio Claro – SP e foram utilizadas para teste da ação inseticida do veneno, pois são de fácil obtenção e já são utilizadas com sucesso para ensaios de inseto-toxicidade (MANZOLI-PALMA et al., 2003). Os ratos Wistar utilizados nos experimentos de icv e de atividade geral foram obtidos através do biotério central da UNESP, e mantidos no biotério do IBRC – UNESP em Rio Claro – SP sob condições especificadas na metodologia.

#### 3.2 Extração e Liofilização do Veneno

Os reservatórios de veneno foram extraídos com auxílio de pinças. Estes reservatórios foram comprimidos com auxílio de um bastão de ponta arredondada na presença de Acetonitrila (MeCN), grau HPLC, 50% (v/v) (Mallinkrodt); em seguida, foram centrifugadas em micro centrífuga (Centrífuga Eppendorf - Centrifuge 5415D) de alta rotação a 8 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Esse veneno foi liofilizado através de um liofilizador “Centrivap Concentrator” (Labconco) acoplado a um condensador de solvente “Centrivap Ultra Low Cold Trap” (Labconco). Foram obtidos aproximadamente ~300 mg de peso seco para cada um dos venenos brutos estudados.

---

### 3.3 Cromatografia Líquida de Alta Resolução de Fase Reversa

As amostras foram solubilizadas em solução de acetonitrila 50% (v/v) em água ultrafiltrada por osmose reversa, e então, purificadas por cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (RP-HPLC), em HPLC de marca SHIMADZU - Modelo LC-AD 10, acoplado a uma coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5 µm), sendo a eluição realizada com o uso de um gradiente linear de acetonitrila de 5 a 60 % (v/v) [contendo 0,1 % (v/v) de TFA] em 60 min, e monitorada por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm. Para o re-fracionamento da Fração 1 obtida do veneno bruto da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* foi utilizado um HPLC da marca SHIMADZU – Modelo LC 6A, acoplado a uma coluna WAKOSIL SC4 da marca WAKOPAK (4,6 x 150 mm, 5 µm), sob gradiente de MeCN/H<sub>2</sub>O de 98% a 4% (v/v) [contendo 0,1 % (v/v) de TFA] em 20 minutos e monitorada por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.

### 3.4 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas foi utilizada no controle de homogeneidade das purificações e na caracterização estrutural dos compostos purificados, e também como parte da estratégia experimental para determinação de suas estruturas químicas.

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados num espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo (resolução = 4000), modelo QUATTRO II (marca Micromass, Altrincham, UK), equipado com fonte de ionização electrospray (ESI), que permite a realização de fragmentações sucessivas obtendo-se, assim, tanto espectros MS quanto MS/MS. Cada composto teve sua massa molecular determinada pela técnica ESI-MS e posteriormente foi fragmentado pela técnica de ESI-MS/MS, para se obter informações detalhadas sobre sua estrutura molecular, com o espectrômetro ajustado para formar picos, com largura à meia-altura, de uma unidade de massa. A voltagem entre o *skimmer* e o cone de

---

amostra, que controla a transferência dos íons ao analisador de massas, foi tipicamente ajustada para 30 V.

Cerca de 30 pmol (10  $\mu$ L) de cada amostra foram injetados na sonda *electrospray* e transportado pelo solvente até o interior do espectrômetro de massas. Para os experimentos de MS no modo positivo, o solvente utilizado foi acetonitrila 50% (v/v) contendo ácido fórmico 0,1% (v/v); e quando realizado no modo negativo, acrescido de  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% (v/v), espectros ESI foram obtidos no modo de aquisição contínua, varrendo num intervalo de massas de m/z 50 a 500, com tempo de varredura de 2 segundos.

Os protocolos experimentais de espectrometria de massas foram realizados de acordo com Mendes et. al., (2004). As amostras foram injetadas a um fluxo de 4  $\mu$ L/min, com auxílio de micro-seringas acopladas a uma micro-bomba de infusão (KD SCIENTIFIC). Durante todos os experimentos, a temperatura da fonte foi mantida a 80 °C e a voltagem na agulha a ~3,5 kV, aplicando-se um fluxo de gás secante (nitrogênio) de 200 L/h e um fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 15 L/h, adquiridos direto de um gerador de nitrogênio modelo NITROX N2 UHPLCMS 18 (DOMINICK HUNTER), acoplado ao espectrômetro. O espectrômetro foi calibrado com os íons do envelope gerado pela mioglobina de coração de cavalo e Iodeto de Sódio (Sigma Chem. Co), a uma voltagem do cone de amostra típica para calibração.

As análises de HRMS foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Norberto P. Lopes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Departamento de Física e Química da USP-RP. Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de Massas modelo: ultrOTOFG - ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). Condições do Experimento: Bomba de Infusão, Fluxo 150 $\mu$ l/h, Fase Móvel para a Solubilização: H<sub>2</sub>O:MeCN(50:50). O Modo de Detecção foi Positivo e Negativo para as Amostras. O Aparelho é de Alta Resolução (resolução  $\geq 20.000$ ), necessitando de calibração interna e externa, antes de realizar as análises. Usa-se para calibração interna uma solução de Na-TFA a 10mg/ml com uma relação das condições do aparelho com

---

os seguintes valores: End Plate: 3500 Volts; Capillary: 4000 Volts; Capillary Exit: 300 Volts; Skimmer 1: 50 Volts; Skimmer 2: 25 Volts.

### 3.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As amostras para obtenção de espectros de RMN foram preparadas dissolvendo-se cerca de 3 mg dos compostos em 0,7 mL de solvente deuterado. As amostras foram filtradas antes de se adquirir os espectros para obter uma melhor resolução digital, pois a ausência de partículas sólidas facilita o ajuste da homogeneidade do campo magnético “shim”.

Os espectros foram obtidos utilizando-se TMS como referência para as medidas de deslocamento químico de hidrogênio e carbono e o sinal do deutério do solvente como “trava do campo-externo” (lock) e também para o ajuste da homogeneidade do campo. Estes espectros foram obtidos utilizando-se as seqüências de pulso padrão da Bruker; a escolha dessas seqüências de pulso foi dependente do tipo de análise necessária para a elucidação estrutural. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão relatados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. As análises foram realizadas em dois institutos diferentes:

As análises de RMN do composto Polybiosideo, foram realizadas junto ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UNICAMP. Foram obtidos para o composto espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT (em uma dimensão 1D), bem como mapas de contorno em duas dimensões (gHSQC e gHMBC). As análises de RMN foram realizadas a 25°C, num espectrômetro Bruker DRX 500 operando a 500.11 MHz para  $^1\text{H}$  e 125.08 MHz para  $^{13}\text{C}$ .

Os experimentos de RMN para todos os outros compostos foram realizados no Departamento de Química da Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, os espectros de ressonância foram obtidos em um aparelho Bruker AVANCE DRX 500 spectrometer (5 mm z-gradient BBI probe) operando a 500.13 MHz ( $^1\text{H}$ ) ou 125.78 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). E em um Bruker AVANCE DPX 300 spectrometer (5 mm dual probe) operando a 300.13 MHz ( $^1\text{H}$ ) ou 75.61 MHz

---

( $^{13}\text{C}$ ). Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ , 300 MHz) foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX-300 (dual probe e os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ , 400 MHz) em um espectrômetro Bruker DRX-400. Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ , 75 MHz) foram obtidos em um espectrômetro Bruker DPX-300 e os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz) em um espectrômetro Bruker DRX-400 e foram traçados de acordo com a conveniência, utilizando-se as seguintes técnicas:  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  – Carbono totalmente desacoplado de hidrogênio; DEPT - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

### 3.6 Bioensaios das Atividades Tóxicas em *Apis mellifera*

Os bioensaios realizados com abelhas foram feitos de acordo com protocolo descrito por Manzoli-Palma et al., 2003.

Para a realização destes bioensaios foram utilizadas abelhas da espécie *Apis mellifera* recém emergidas, que ainda não possuem capacidade de voar e seus aparelhos de ferroar ainda não estão completamente desenvolvidos. Estes animais foram escolhidos por serem de fácil obtenção e possuírem um sistema nervoso central complexo.

As diferentes dosagens dos compostos foram calculadas através de através da relação dose/peso do inseto-modelo e o composto foi solubilizado em salina e as seguintes concentrações foram utilizadas para esse ensaio: 110 ng/mg, 70 ng/mg, 50ng/mg, 30 ng/mg, 10 ng/mg e grupo controle somente com salina.

As abelhas foram cuidadosamente imobilizadas com as mãos e as diferentes concentrações do composto foram injetadas com uma micro-seringa Hamilton de 10 $\mu\text{L}$  na hemocele das abelhas, na tentativa de se avaliar a toxicidade e estabelecer o valor da dose letal ( $\text{DL}_{50}$ ) ou simplesmente dose/efeito ( $\text{ED}_{50}$ ).

Os insetos foram separados em 5 grupos amostrais com 6 indivíduos em cada grupo e um controle; a seguir estes indivíduos foram colocados em placas de Petri

---

(10 cm de diâmetro), contendo alimento elaborado a partir de uma mistura de mel e sacarose (“candy”).

O comportamento das abelhas foi observado durante 24 horas, tendo por objetivo tentar observar as seguintes respostas ao composto: animal ativo, movimentos lentos, paralisia e morte, conforme descrito por Zlotkin, (1983).

### **3.7 Bioensaios das Atividades Tóxicas em *Daphnia similis***

Os bioensaios realizados com microcrustáceos foram realizados segundo adaptação de ensaio retirado da norma CETESB L5.0018 e NBR ABNT 12713 (2004) (1991). Os microcrustáceos são comumente utilizados como biomarcadores de poluição ambiental, devido à sua grande sensibilidade desses animais em relação a toxinas no meio aquático. Sendo úteis, portanto, para a avaliação de DL<sub>50</sub> de compostos que apresentam baixa toxicidade em outros organismos mais complexos.

As diferentes dosagens dos compostos foram calculadas através de através da relação dose/volume do meio de cultura, e o composto foi solubilizado no próprio meio de cultura e as seguintes concentrações foram utilizadas para esse ensaio: 70 µg/mL, 50 µg/mL, 30 µg/mL, 10 µg/mL e grupo controle somente com meio de cultura.

Os microcrustáceos foram separados em 4 grupos amostrais com 10 indivíduos em cada grupo; a seguir estes indivíduos foram colocados em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura com a concentração desejada de composto. A letalidade foi observada durante 48 horas, tendo por objetivo a determinação da dose letal para 50 % dos indivíduos (DL<sub>50</sub>).

### **3.8 Avaliação das Toxinas no Sistema Nervoso Central de Ratos por Injeção Intracerebroventricular.**

Para determinar o efeito dos compostos no Sistema Nervoso Central de ratos, as mesmas foram perfundidas intracerebroventricularmente (*icv*), de acordo

---

com o protocolo descrito por Cesar-Tognoli (2005); Os animais utilizados nestes experimentos foram ratos Wistar machos adultos com 60 dias e peso aproximado de 250 a 300g, trazidos para o biotério de experimentação do LBEZ-CEIS/IB da Unesp de Rio Claro, sendo alojados dois animais por gaiola com ração e água *ad libitum* e permanecendo em um ciclo claro/escuro de 12:12 horas a partir das 7:00 hs em temperatura ambiente de 21°C e umidade relativa do ar de 55%. Os experimentos foram conduzidos em conformidade com as normas do Instituto Nacional de Normas de Saúde e Cuidados na Utilização de Animais de Laboratório (1996) e da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista.

A cânula foi implantada no ventrículo lateral (AP= -0,4; ML= -1,4; DV= -3,4) sob ação anestésica de cetamina (5mg/100g), xylazina (1mg/100g) e acepromazina (0,2mg/100g) sete dias antes da injeção do composto em estudo. Durante o período que antecedeu o experimento, os animais foram manipulados pelo experimentador pelo menos duas vezes ao dia, durante 10 minutos, para evitar que o estresse causado pela manipulação no momento da injeção icv pudesse interferir nos resultados finais. Para a injeção icv, a cânula de injeção foi introduzida pela cânula guia, cerca de duas horas antes do experimento, a fim de minimizar qualquer efeito da manipulação durante este procedimento. Os grupos de ratos utilizados foram comparados a grupos controles, nos quais foi injetado apenas o veículo (solução salina 0,9% [m/V])

Nos experimentos de injeção icv das toxinas em estudo, estas foram administradas em dois grupos distintos. O primeiro grupo (n=6) recebeu cerca de 10 uL de solução contendo a toxina na concentração de 0,1 ug/uL. Nos animais dos grupos controle (n=6) desses experimentos, injetou-se apenas o veículo, 10µL de solução salina [0,9% (m/V)] (CESAR, 2000).

Após duas horas decorridas da injeção da toxina, tempo em que a marcação da proteína c-Fos mostrou-se mais efetiva (CESAR, 2000), os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca, primeiramente com solução salina 0,9% (m/V) (c.a de 75mL), seguida pelo fixador de paraformaldeído a 4% (m/V) a 4°C (c.a de 750 a 800 mL) durante 25 minutos.

---



Os encéfalos foram retirados e colocados em solução fixadora de paraformaldeído a 4% (m/V), contendo 10% (m/V) de Sacarose para crioproteção e pós-fixados por 4 horas, sendo em seguida transferidos para uma solução salina de KPBS contendo 10 % de Sacarose por cerca de 18 horas. Os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelamento com 30  $\mu$ m de espessura no plano coronal em 4 séries (bregma 2.70 mm,- 0.30 mm, - 1.80 mm e - 3.14 mm) e armazenados a -20°C em solução anticongelante de Etileno-Glicol/Glicerol.

Uma série de cortes do encéfalo de cada um dos animais utilizados nos experimentos foi usada para a marcação imuno-histoquímica. Os cortes foram tratados com 0,3% de Peróxido de Hidrogênio em solução de KPBS mais 0,3% de Triton por c.a. de 30 minutos, sendo em seguida incubados em anticorpo primário anti-*fos* (Calbiochem Ab5) feito em coelho, na concentração de 1:20000 e 3% de soro normal de cabra em KPBS mais 3% de Triton X-100, por 18 horas a temperatura ambiente, sob constante agitação e no escuro. Os cortes foram então lavados em KPBS e incubados por 1 hora em anticorpo secundário biotilado, feito em cabra contra coelho (Jackson Labs 1:1000) e por mais uma hora em complexo de avidina-biotina (vector 1:500). Após esses procedimentos, os cortes foram reagidos com DAB (Sigma) e 0,01% de Peróxido de Hidrogênio dissolvidos em KPBS. Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 3 minutos e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS (GERFEN; SAWCHENCO, 1984; SHU et al., 1988; SITA et al., 2003). Uma vez ocorrida a reação para a marcação de *fos* os cortes foram montados em lâminas e osmificados em solução de oxido de ósmio 0,005% (m/v) para intensificar a reação imunohistoquímica.

Para investigar a neuroquímica dos neurônios que expressam *fos* após a administração da toxina, foram realizadas técnicas dupla imunohistoquímica e dupla imunofluorescência (somente no caso da Tirosina hidroxilase).

Nas reações de dupla imunohistoquímica, 4 séries de cortes foram tratadas com 0,3% de Peróxido em solução tampão de KPBS mais 0,3% de Triton, por cerca de 30 minutos, sendo em seguida incubados em anticorpo primário anti-*fos* (Calbiochem Ab5) feito em coelho na concentração 1:20000 e 3% de soro normal

---

de cabra em KPBS mais 3% de Triton X-100, por 18 horas a temperatura ambiente, sob constante agitação e no escuro. Os cortes foram então lavados em KPBS e incubados por 1 hora em anticorpo secundário biotilado, feito em cabra contra coelho (Jackson Labs 1:1000) e por mais uma hora em complexo de avidina-biotina (vector 1:500). Após esses procedimentos, os cortes foram reagidos com DAB (Sigma) e 0,01% de Peróxido de Hidrogênio dissolvidos em KPBS. Em seguida, os cortes foram lavados e cada uma das séries foi incubada em KPBS mais 3% de Triton X-100 e um dos seguintes anticorpos: Anti-rGlu<sub>2/3</sub> (1:500); anti-NMR<sub>1</sub> (1:1000); anti-Tirosina Hidroxilase (1:1000) e anti-Orexina (1:5000), sendo incubados por 18 horas a temperatura ambiente sob constante agitação. Os cortes foram lavados em solução de KPBS e incubados em solução contendo anticorpo secundário biotilado, feito em cabra contra coelho (Jackson Labs 1:1000) e por mais uma hora em complexo de avidina-biotina (vector 1:500). Após esses procedimentos, os cortes foram reagidos com DAB (Sigma) e 0,01% de Peróxido de Hidrogênio dissolvidos em KPBS. Os cortes permaneceram reagindo por cerca de 3 minutos e para cessar as reações foram realizadas lavagens sucessivas com KPBS (GERFEN; SAWCHENCO, 1984; SHU et al., 1988; SITA et al., 2003). E os cortes montados em lâminas gelatinizadas.

Para a dupla imunofluorescência uma série de cortes foi incubada em anticorpo primário policlonal anti-fos feito em coelho (Calbiochem Ab5), na concentração de 1:1000 e 1% de BSA em solução de KPBS e 0,3% de Triton X-100 por 18 horas a temperatura ambiente. Os cortes foram em seguida lavados em KPBS e incubados em anti-corpo secundário conjugado de fluoresceína (FITC) anti-coelho feito em mula (Jackson Labs) na concentração de 1:200 por 1 hora. Em seguida os cortes foram incubados em anti-corpo policlonal anti-TH (Tirosina Hidroxilase) feito em ovelha (Chemicon) na concentração de 1:5000 e 1% de BSA em KPBS e 0,3% de Triton X-100 por 18 horas a temperatura ambiente. Após serem lavados por KPBS, os cortes foram incubados em anti-corpo Cy3 secundário conjugado anti-ovelha feito em mula (Jackson Labs) na concentração de 1:200 por 1 hora. Em seguida os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com tampão glicerol (pH 8,5).

---

As fotomicrografias foram adquiridas por meio de uma câmera digital adaptada a um microscópio e a um computador. Para a aquisição utilizou-se o software ADOBE Photoshop 5.0. As imagens foram trabalhadas usando o programa Corel Draw 11 e apenas ajustes finos como brilho, contraste e balanço de cores foram utilizados.

Para a análise quantitativa de células imunoreativas a c-Fos foram escolhidos 5 cortes representativos de cada uma das regiões cerebrais de interesse, 12 áreas foram incluídas nas análises. Em cada um dos cortes, o número de células foi contado numa área tecidual de  $0,2\text{mm}^2$  (para os núcleos: Paraventricular do Hipotálamo, Septal Lateral, Dorsomedial, Centro Lateral, Centro Medial, Paracentral, Reuniens e para o córtex sensorial) ou  $1\text{mm}^2$  (Área Hipotalâmica Lateral, Área Perifornical, Área Pré-óptica, Hipocampo e Zona Incerta). A análise estatística foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Beck e Fibiger (1995), sendo o teste T utilizado para comparar os grupos controle e da toxina com nível de significância da ordem de  $p < 0,05$ .

### **3.9 Neurotoxicidade / Neuroproteção em Ratos**

Para melhor compreensão do mecanismo de ação de alguns dos compostos em cérebros de ratos (neurotoxicidade e neuroproteção) foram feitos experimentos com eletrofisiologia e, esses experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa no Instituto de Pesquisas Biomédicas da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Detalhes deste experimento foram descritos por Cesar-Tognoli (2005) e podem ser resumidos da seguinte maneira: durante cada experimento foram utilizados oito ratos da linhagem Wistar, machos com 35 dias pesando cerca de 200g. Os animais foram mantidos num alojamento climatizado, com comida e água à vontade e ciclo claro-escuro de 12 horas. Para decapitação, os animais foram anestesiados com Tiopental (40mg/Kg) intraperitonealmente, seus cérebros foram retirados e submetidos a cortes coronais de 400  $\mu\text{m}$  de espessura. As fatias que contiveram o hipocampo foram isoladas e permaneceram em solução de Ringer normal (LCRa

---

contendo em mM: NaCl 130; NaHCO<sub>3</sub> 24; D-glicose 10; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,3; KCl 3,5; Mg<sup>2+</sup> 2; CaCl<sub>2</sub> 2; pH entre 7,0 e 7,4), por 1 hora, com constante oxigenação.

Para o estudo de ação de alguns desses compostos sobre os neurônios hipocâmpais de CA1, uma série de 4 fatias foi perfundida em Ringer normal por 10 minutos. Decorrido esse tempo, em duas dessas fatias, a droga em estudo foi administrada com auxílio de uma bomba pneumática ejetora (PV830, Pneumatic PicoPump WPI). A micropipeta contendo a solução da droga foi posicionada próxima ao eletrodo de registro intracelular na região de CA1 do hipocampo. Em ambos procedimentos a concentração final será de 1 µM e durante todo o registro eletrofisiológico foi observado o padrão de descargas.

A fim de estudar o efeito dos compostos na atividade epileptiforme induzida, foi utilizado o modelo de perfusão das fatias de hipocampo com solução de Ringer (sem íons magnésio), contendo: NaCl 130 mM; NaHCO<sub>3</sub> 24 mM; D-glicose 10 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,3 mM; KCl 3,5 mM; CaCl<sub>2</sub> 2 mM; o pH foi ajustado para 7,2. Durante a manifestação dessa atividade o(s) composto(s) foram aplicado(s) sobre as fatias de hipocampo numa concentração de 1 µM, com auxílio de uma bomba pneumática ejetora, posicionada próxima à região hipocâmpal de CA1, da mesma maneira descrita para Ringer normal.

Para os registros eletrofisiológicos, o meio de incubação para as fatias de cérebro incluiu oxigenação (O<sub>2</sub> 95 % e CO<sub>2</sub> 5 %) a temperatura de 34°C em pH 7,4. Os parâmetros de viabilidade neuronal foram verificados a partir de suas características elétricas, tais como: capacitância, resistência da membrana celular e amplitude do potencial de ação.

Os registros foram realizados em células-alvo da camada de CA1 dos hipocâmpos, com auxílio de microeletrodos de borossilicato, preenchidos com Acetato de Potássio 3 M para registros intracelulares (IC) (80-100 MΩ) e com Ringer normal (5-10 MΩ) para registros extracelulares (EC); a micropipeta contendo a droga em estudo foi posicionada próxima ao eletrodo de registro intracelular.

O potencial de membrana foi determinado após a penetração do microeletrodo na célula, 10 minutos após seu empalamento. Para essa avaliação aplicou-se

---

corrente com variações de 0,1 nA num intervalo de -0,7 até 0,7 nA, utilizando o AxoClamp 2B. Além dessas verificações, o potencial de membrana também foi avaliado antes e após o tratamento com Ringer 0 -  $Mg^{2+}$ , com objetivo de caracterizar a viabilidade das células em estudo durante todo o processo. Como critérios eletrofisiológicos de um neurônio viável, foram considerados apropriados para o estudo, somente os neurônios que apresentaram potenciais de membrana inferiores a -50 mV e potenciais de ação superiores a 50 mV.

Os protocolos de estimulação para clameamento de corrente foram desenvolvidos num sistema de registro eletrofisiológico *in vitro* dentro de uma gaiola de Faraday, para isolamento da interferência eletromagnética. Os seguintes equipamentos foram utilizados para esse registro: câmara de perfusão e registro de corrente (current clamp) AxoScope 2B (Axon Instruments). Os dados foram monitorados e armazenados em PC, com programa Axonscope e posteriormente analisados com o “software” Origin 5.0.

### **3.10 Avaliação da Atividade Geral de Ratos Wistar**

Para a avaliação da atividade geral dos ratos foi utilizado o método do Campo Aberto (BROADHURST, 1960). O campo aberto consiste em uma arena de cartolina plastificada, com formato cilíndrico. O corpo do cilindro tem 32,5 cm de altura e base circular de 97 cm de diâmetro, pintada de branco.

O chão da arena é subdividido em 19 regiões aproximadamente iguais, demarcadas por 3 circunferências concêntricas, intersectadas por segmentos de retas radiais.

Para esse ensaio foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 160-180 g. Os animais foram colocados individualmente na arena e observados por um período de nove minutos. Os parâmetros avaliados após injeção ip. de concentrações variando de 1 a 8  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  foram:

a) frequência de locomoção (LO): cada unidade de medida corresponde ao ato de o animal penetrar, com as 4 patas, em uma das divisões do chão da arena;

---

b) frequência de levantar (LE): cada unidade de medida corresponde à postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto.

---

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão foram divididos em ordem alfabética em três partes:

**4.1 PARTE I – Compostos de Baixas Massas Moleculares Isolados do Veneno de *Agelaia pallipes pallipes*.**

**4.2 PARTE II – Compostos de Baixas Massas Moleculares Isolados do Veneno de *Agelaia vicina*.**

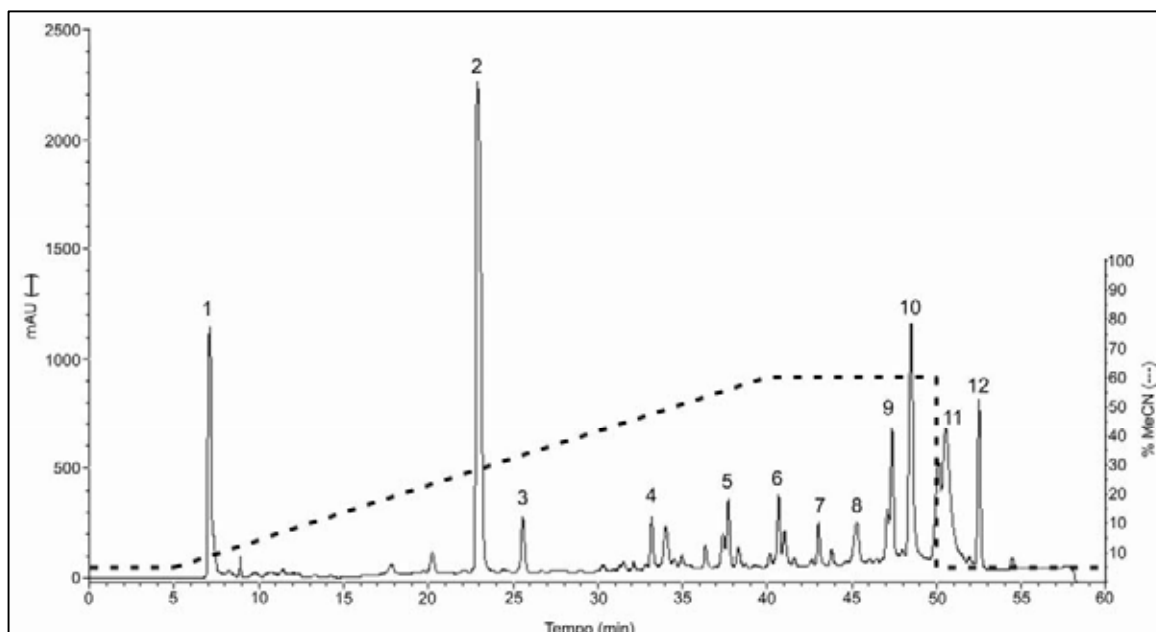
**4.3 PARTE III – Compostos de Baixas Massas Moleculares Isolados do Veneno de *Polybia paulista*.**

---

#### 4.1 PARTE I - Compostos de Baixas Massas Moleculares Isolados do Veneno de *Agelaia pallipes pallipes*

##### Análise dos Compostos de Baixas Massas Moleculares

O fracionamento do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes* foi realizado em HPLC, sob fase reversa, com coluna C18, utilizando-se um gradiente linear de MeCN. O perfil deste cromatograma está apresentado na figura 1, onde se observa que foram eluídas 12 frações principais. Os compostos de baixas massas moleculares podem ser encontrados nesse cromatograma através de espectrometria de massas nas frações com tempos de retenção variando entre 0 a 30 minutos. Os compostos com maior tempo de retenção constituem-se de peptídeos.

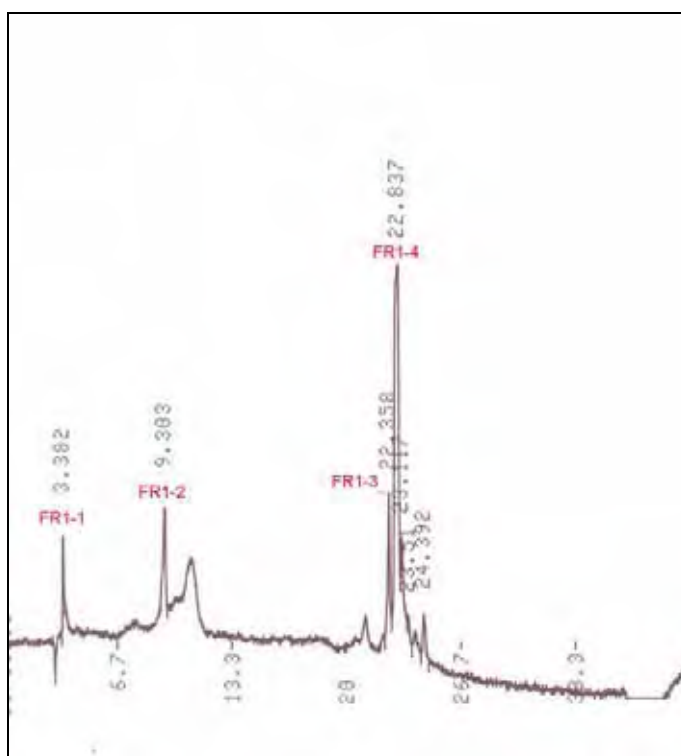


**Figura 1:** Perfil cromatográfico obtido do extrato de veneno bruto da vespa *Agelaia pallipes pallipes* por RP-HPLC [coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5 µm)], utilizando-se um gradiente linear de acetonitrila entre 5 % a 60 % (v/v) (contendo TFA 0,1% (v/v) ) e monitorado por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.



#### 4.1.1 FRAÇÃO 1

Dentre essas 12 frações, a fração 1 foi refractionada em uma coluna de fase reversa C4, visando separar melhor as frações aí contidas, resultando em quatro novas sub-frações, que foram denominadas FR1-1, FR1-2, FR1-3 e FR1-4 cujos tempos de retenção foram: 3,38; 9,30; 22,35 e 22,83 min, respectivamente (figura 2).

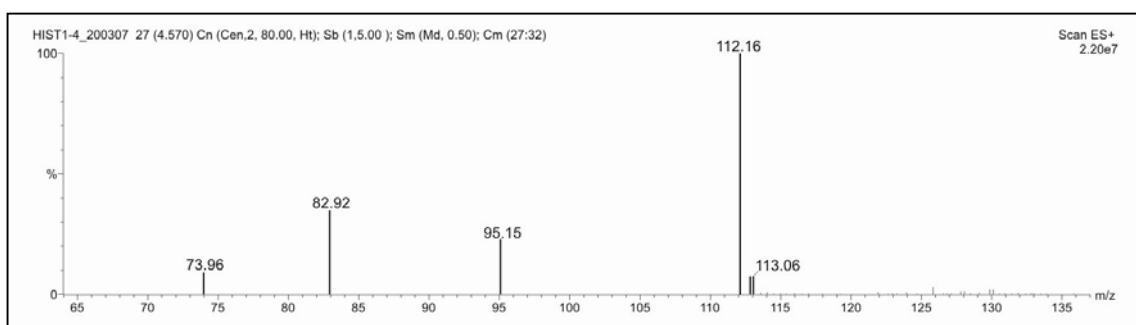


**Figura 2:** Perfil cromatográfico do refractionamento da fração 1 do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes* por RP-HPLC [coluna WAKOSIL SC4 (4,6 x 150 mm)], utilizando-se um gradiente linear de MeCN/H<sub>2</sub>O entre 90% a 4% (v/v) (contendo TFA 0,1% (v/v)) e monitorado por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.

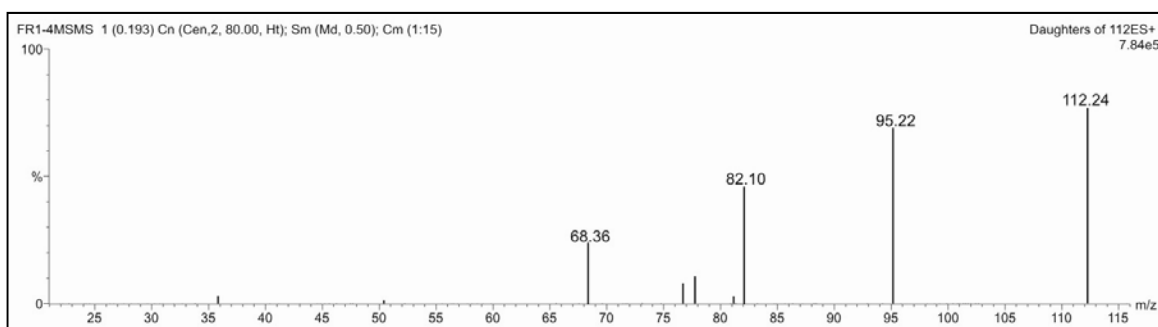
Dentre essas quatro frações, a fração FR1-4 (3 mg totais) foi a única que foi identificada como aparentemente pura e em maior abundância após as análises de ESI-MS no modo positivo. Desta maneira, foram iniciadas as análises para a elucidação estrutural inicial desta fração por análises de ESI-MS, MS/MS, HRMS e RMN.

Através da técnica de ESI-MS foi determinado que o composto de interesse apresenta  $m/z$  de 112,1 na forma de  $[M+H]^+$  (figura 3). A fragmenção do composto

em estudo, através da técnica ESI-MS/MS revelou os ions-fragmentos de  $m/z$  : 94,6; 82,5 e 67,5, como pode ser verificado pelo espectro de MS/MS (figura 4).



**Figura 3:** Espectro de ESI-MS no modo positivo, do composto isolado da fração 1-4 do veneno da vespa *Agelaia pallipes*.



**Figura 4:** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 1-4 do veneno da vespa *Agelaia pallipes*.

Realizaram-se também análises de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), onde se observou que a massa do composto em questão é igual a 112,0853 Da na forma de  $[M + H]^+$  (Figura 5).

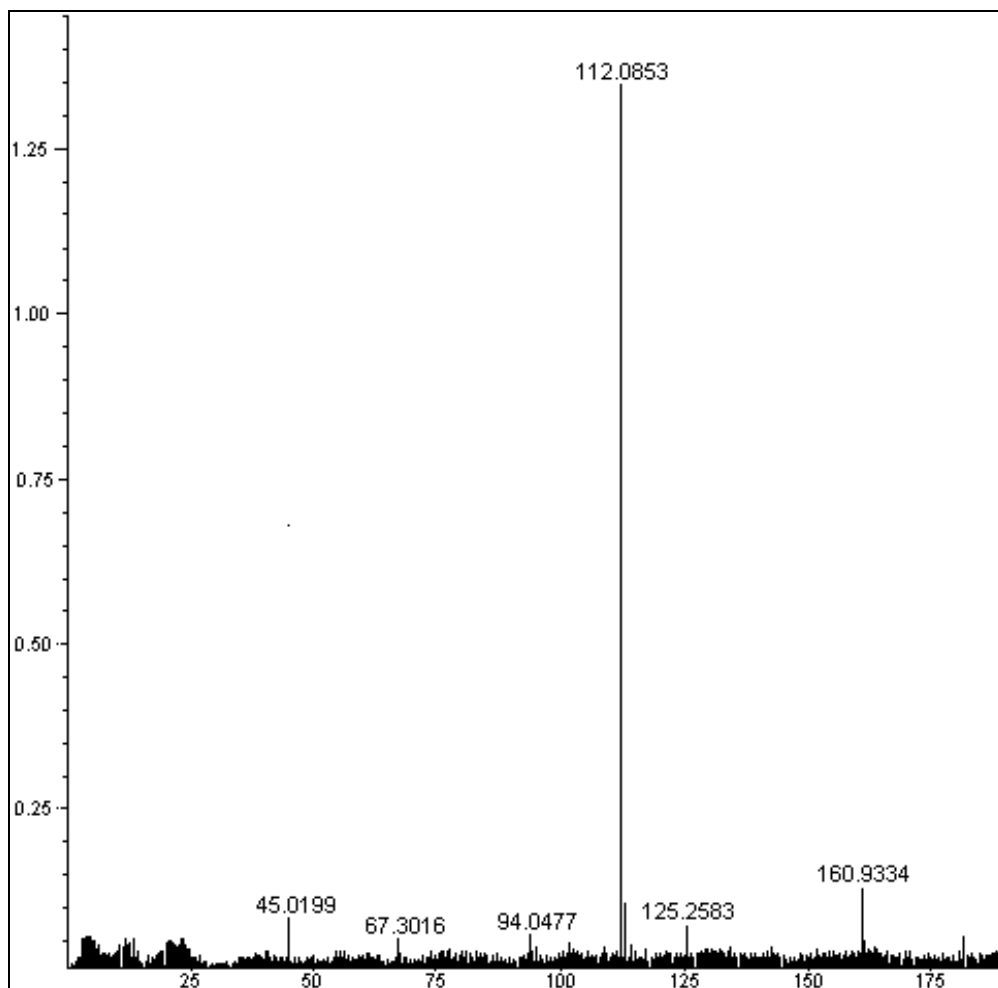


Figura 5: Espectro de HRMS do composto isolado da fração 1-4 do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*.

Através dos espectros em D<sub>2</sub>O de <sup>13</sup>C-RMN (figura 6) e <sup>1</sup>H-RMN (figura 7) verificou-se a presença dos seguintes sinais:

#### Espectro de RMN-<sup>13</sup>C

- CH em 134,3 ppm;
- C em 128,8 ppm;
- CH em 117,3 ppm;
- CH<sub>2</sub> em 38,3 ppm;
- CH<sub>2</sub> em 22,5 ppm.

#### Espectro de RMN-<sup>1</sup>H

- singleto em 8,50 ppm;
- singleto em 7,23 ppm;
- tripleto em 3,19 ppm, com  $J = 7,2$  Hz;
- tripleto em 3,00 ppm, com  $J = 7,2$  Hz.

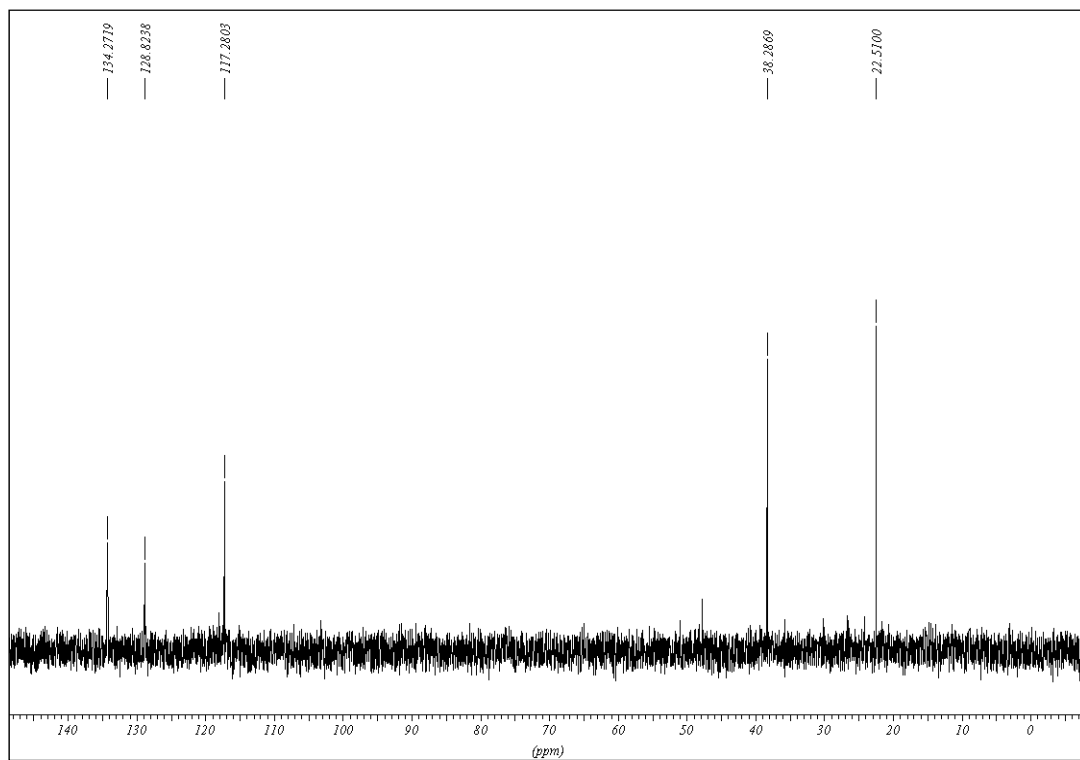
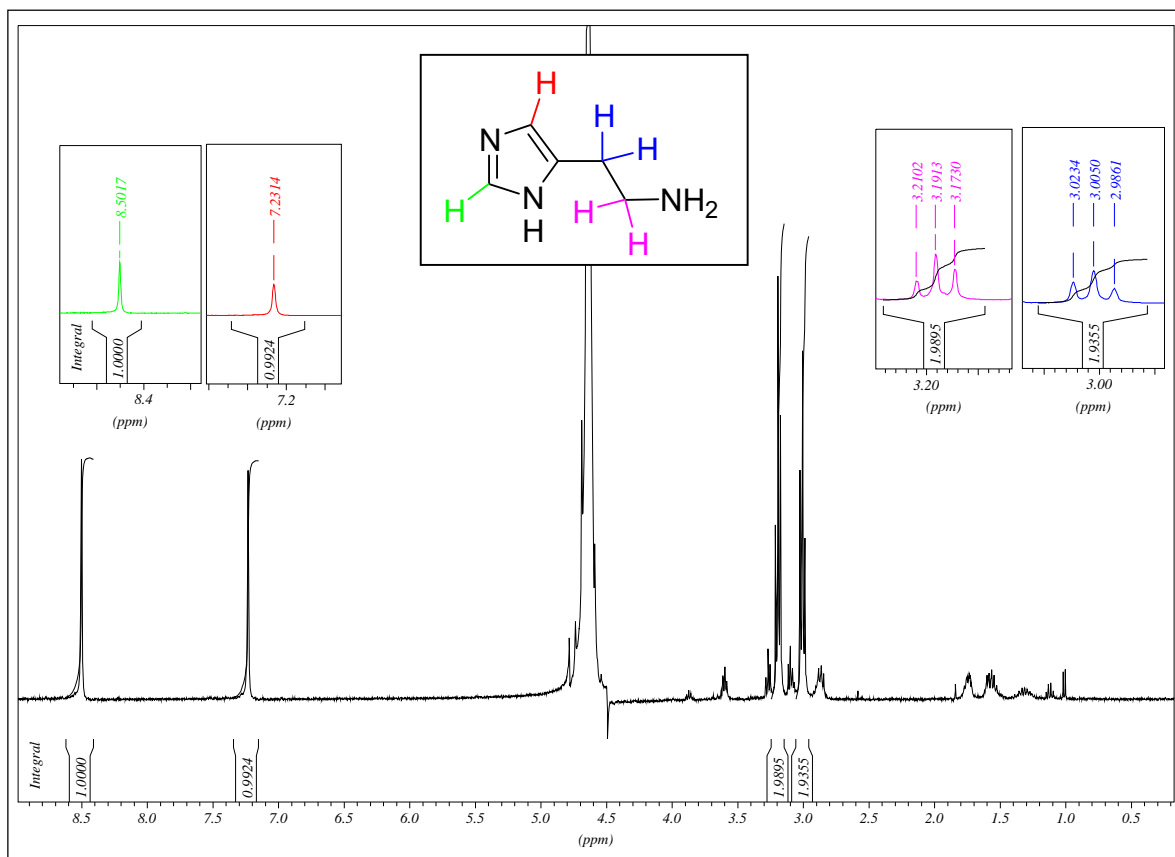
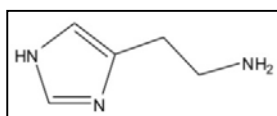


Figura 6: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN em  $\text{D}_2\text{O}$  da fração 1-4, isolada da vespa *Agelaia pallipes pallipes*.



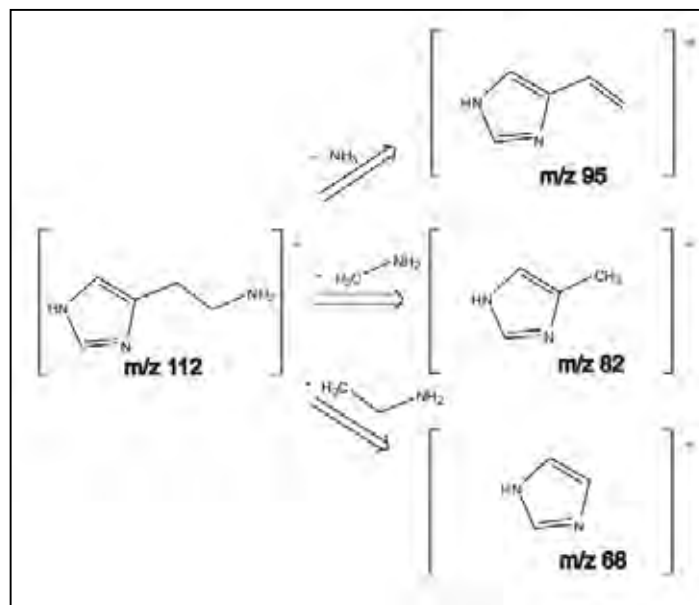
**Figura 7:** Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  da fração 1-4, isolada da vespa *Agelaia pallipes pallipes*, com sua possível interpretação.

Com base na interpretação destes resultados, concluí-se que o composto isolado da fração 1 do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes* é a histamina (Figura 8).



**Figura 8-** Histamina

No esquema 1, estão mostrados alguns possíveis fragmentos obtidos nas análises de ESI-MS/MS desta fração, que corroboram a interpretação da estrutura proposta para a fração 1-4.



Esquema 1- Representação da fragmentação da Histamina.

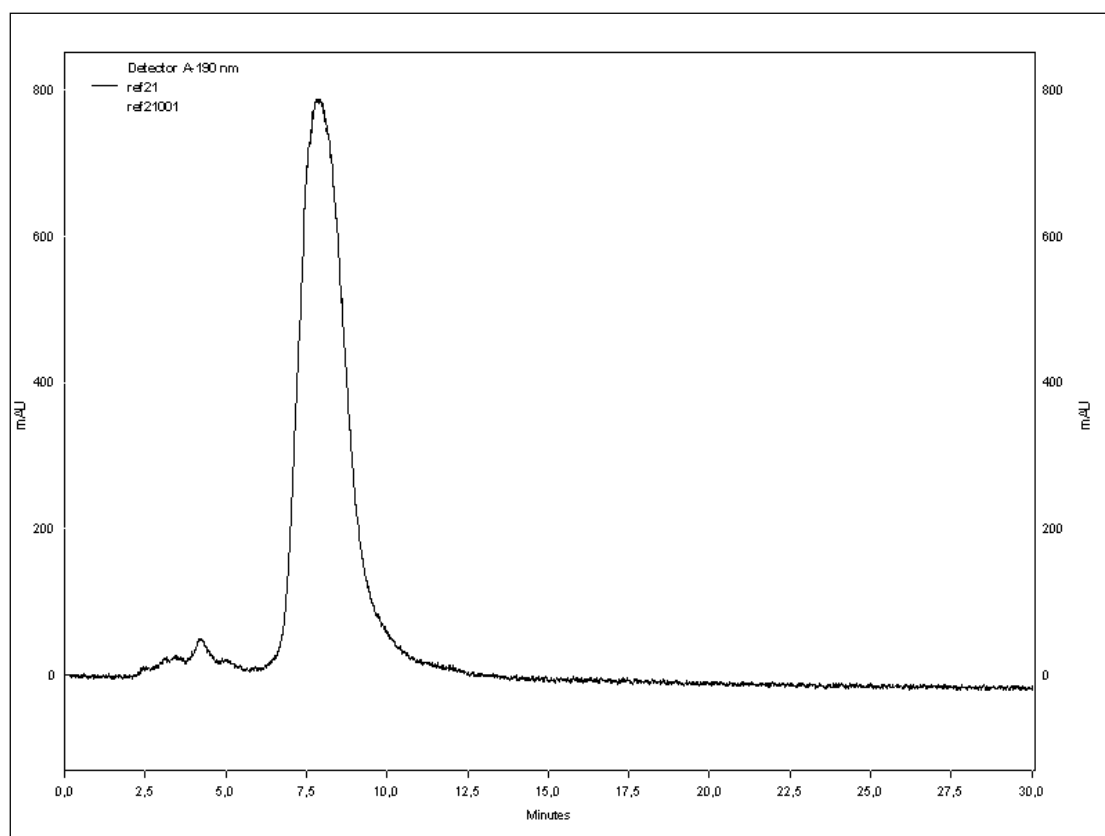
Outro dado importante para a identificação da histamina foi a comparação da massa molecular obtida por HRMS, com a massa calculada para a molécula de histamina, onde a massa obtida por alta resolução foi de 112,0853 Da e a massa calculada de 112,0875 Da, valores muito próximos entre si para a molécula na forma  $[M+H]^+$ . E, também, pode-se confirmar esta estrutura através comparação com os dados de  $^1\text{H-RMN}$  obtidos na literatura (GOVINDARAJU et al., 2000).

A Histamina é uma amina biogênica que está envolvida em respostas imunes locais, e também age farmacologicamente mudando a permeabilidade do endotélio, como regulador do trato gastrointestinal e neurotransmissor, sendo produzida através do metabolismo da histidina. Existem relatos na literatura (NAKAJIMA, 1986) da presença de histamina no veneno de outras vespas sociais e também em vespas solitárias, como estratégia para potencialização dos processos inflamatórios causados pela inoculação dos venenos dessas vespas, pois esta molécula possui um papel central nas respostas alérgicas primárias, como a inflamação, principalmente através do receptor histamínico do tipo H1 que é importante para o processo inflamatório ocasionado pelo veneno, atraindo leucócitos por quimiotaxia para o local da ferroad. Além disso, a histamina também aumenta a

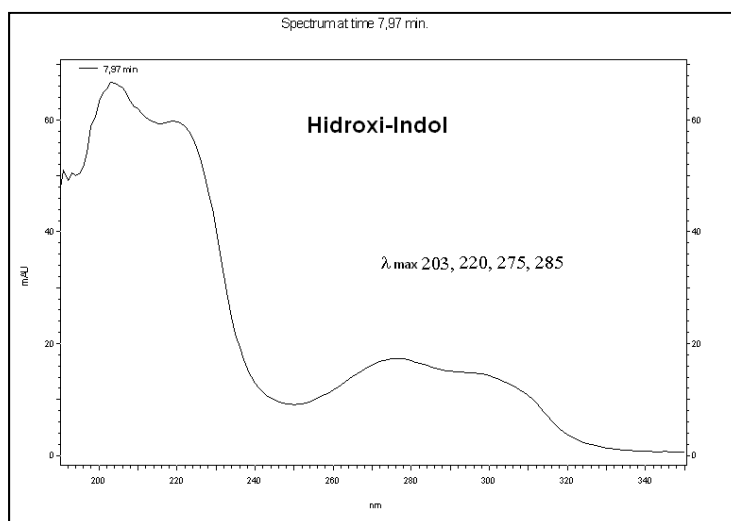
permeabilidade do tecido endotelial dos vasos sanguíneos das mucosas e é broncoconstritora (GELFAND, 2005).

#### 4.1.2 FRAÇÃO 2

A fração 2 (25 mg totais) do veneno de *A. p. pallipes* (figura 1) foi re-fracionada (figura 9) e teve seu espectro de absorção no UV analisado (figura 10), revelando valores  $\lambda_{\text{max}}$  de 203, 220, 275 e 285 nm, característicos do grupo Hidroxi-Indol, conforme comparação com os espectros UV obtidos por Adams et al. (1989) e Toki et al. (1988).

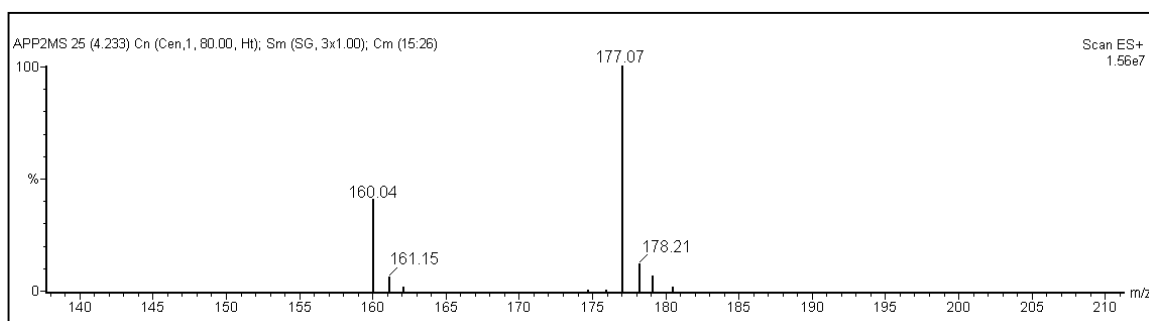


**Figura 9:** Perfil cromatográfico do refractionamento da fração 2 do veneno da vespa *Agelais pallipes pallipes* por RP-HPLC [coluna YMC C18 (4,6 x 150 mm)], utilizando-se eluição isocrática com MeCN/H<sub>2</sub>O a 7% (v/v) [contendo TFA 0,1% (v/v)]; a eluição foi monitorada por medidas de absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.



**Figura 10:** Espectro UV da fração 2 do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*, obtida no re-fracionamento por RP-HPLC (ver referência na figura 9), mostrando um perfil de espectro UV com valores  $\lambda_{max}$  típicos para o grupo hidroxi-indol.

O espectro ESI-MS, no modo positivo, para o composto presente na fração 2, revelou um valor de  $m/z$  177, na forma  $[M+H]^+$  (figura 11).

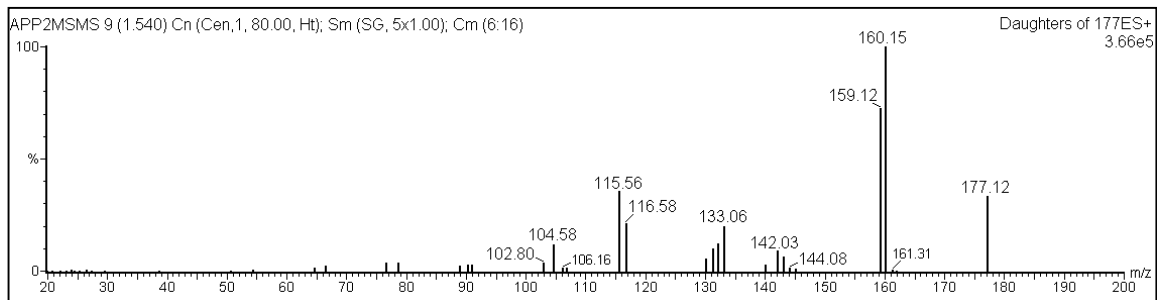


**Figura 11:** Espectro de ESI-MS no modo positivo, do composto isolado da fração 2 do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*.

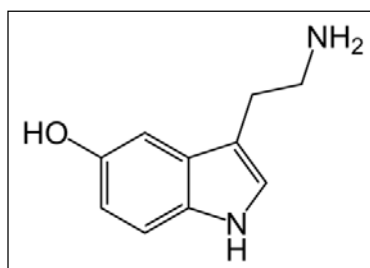
O espectro de massas no modo MS/MS (figura 12), quando interpretado (Esquema 2) e comparado os dados disponíveis no banco de dados do “Human Metabolomic Database”

([http://hmdb.ca/scripts/show\\_card.cgi?METABOCARD=HMDB00259.txt](http://hmdb.ca/scripts/show_card.cgi?METABOCARD=HMDB00259.txt)), e ainda considerando-se a possível presença do grupo Hidroxi-Indol (conforme já discutido acima), indicam que o composto presente na fração 2 trata-se da Serotonina (figura 13).

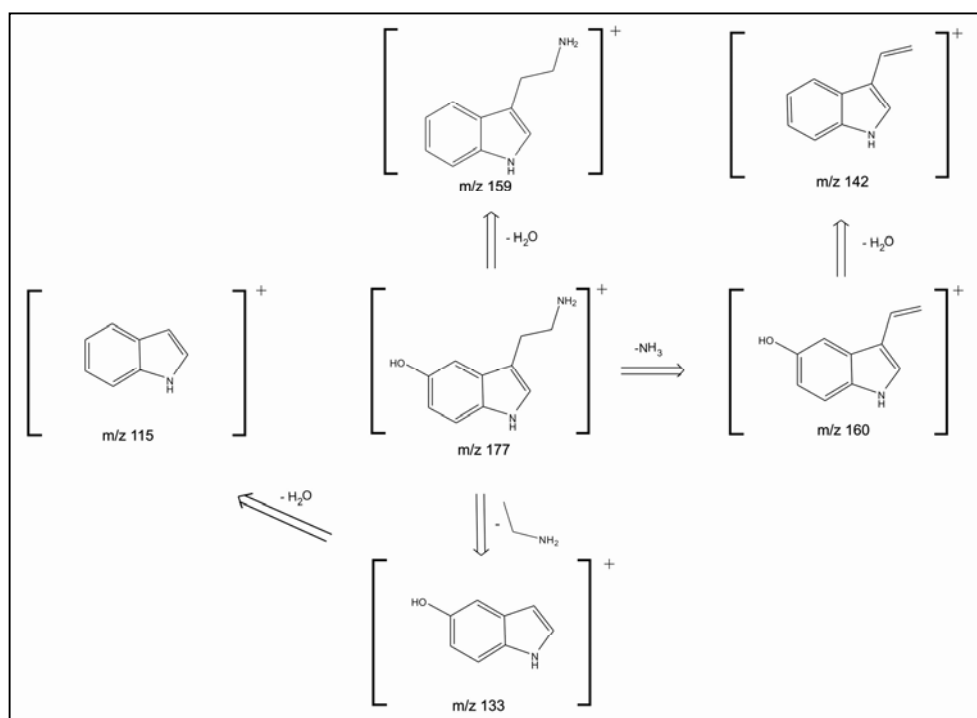




**Figura 12:** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 2 do veneno da vespa *Agelais pallipes pallipes*, mostrando um padrão de fragmentação típico para a serotonina.



**Figura 13:** Estrutura molecular proposta para o composto presente na fração 2 do veneno de *A. p. pallipes*: Serotonina.



**Esquema 2:** interpretação do padrão de fragmentação obtido o composto presente na fração 2 do veneno de *A.p. pallipes*, por ESI-MSMS.

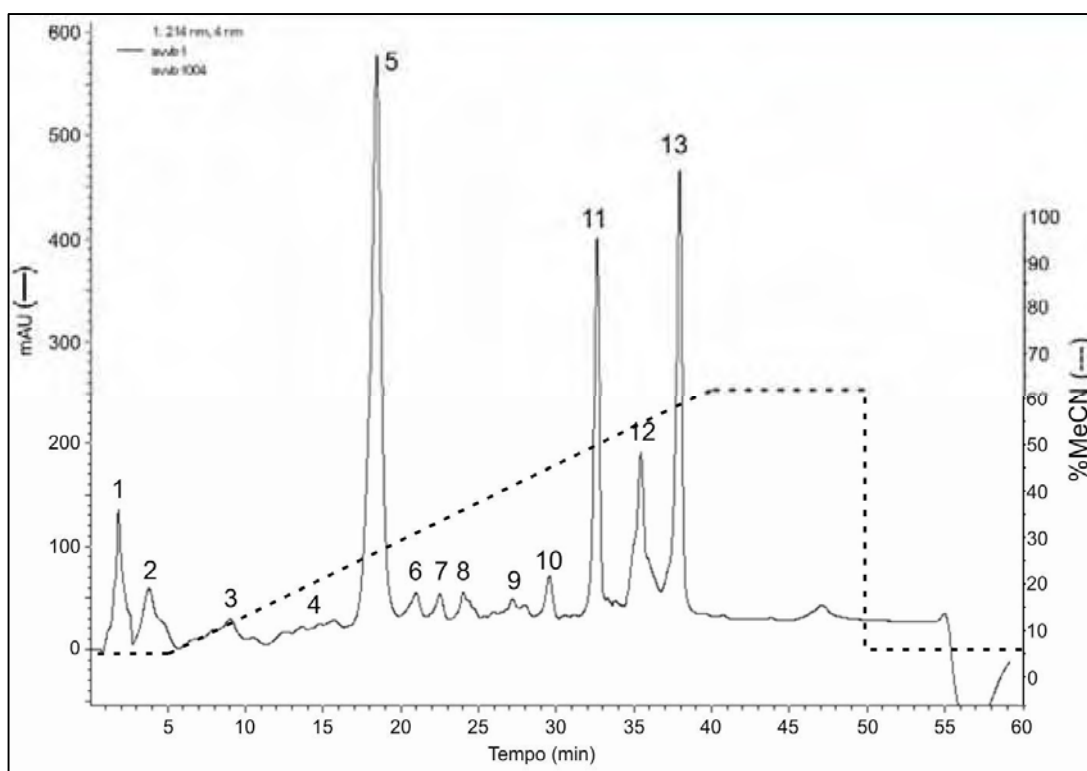
A Serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT) tem aplicações em praticamente toda função fisiológica ou comportamental concebível como: afeto, agressão, apetite, cognição, emese, função endócrina, gastro-intestinal, motora, neurotrófica, sensorial, sexual e vascular. De uma maneira geral, a presença de serotonina nos venenos pode estar relacionada ao mecanismo de produção de dor (Nakajima, 1986).

---

## 4.2 PARTE II – Compostos de Baixas Massas Moleculares Isolados do Veneno de *Agelaia vicina*

### Análise dos Compostos de Baixas Massas

A figura 14 mostra o perfil cromatográfico do veneno da vespa social *Agelaia vicina* onde se observa 13 principais frações. Os compostos de baixas massas moleculares podem ser encontrados nesse cromatograma através de espectrometria de massas nas frações com tempos de retenção variando entre 0 a 25 minutos. Os compostos com maior tempo de retenção constituem-se de peptídeos.



**Figura 14:** Perfil cromatográfico obtido como veneno bruto da vespa *Agelaia vicina* por RP-HPLC [coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5  $\mu$ m)], utilizando-se um gradiente linear de acetonitrila entre 5 % a 60 % (v/v) (contendo TFA 0,1% (v/v)) e monitorado por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.

#### 4.2.1 FRAÇÃO 1 e 5

Comparando-se os tempos de retenção, absorção máxima no espectro UV e os dados espectroscópicos de  $^1\text{H-RMN}$  e MS/MS (Anexo I, figuras A1 a A4) (obtidos para as frações 1 e 5 do veneno de *A. vicina*, com aqueles mostrados acima nas figuras de 3 a 7 (para a fração 1) e nas figuras de 10 a 12 (para a fração 2) do veneno de *A. p. pallipes*, observa-se o mesmo tempo de retenção e o resultados das análises espectroscópicas são muito semelhantes, entre as duas espécies de vespas, indicando que as frações 1 e 5 do veneno de *A. vicina*, correspondem à Histamina e Serotonina, respectivamente.

#### 4.2.2 FRAÇÃO 7

O espectro UV da fração 7 do veneno de *A. vicina* não apresentou máximos de absorção característicos de cromóforos aromáticos (dados não mostrados).

O espectro ESI-MS da fração 7 no modo positivo (figura 15), revelou um íon molecular de  $m/z$  302 na forma de  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , que quando analisado por MS/MS (figura 16) revelou a presença de um pequeno peptídeo, com uma seqüência G-I/L-I/L-OH.

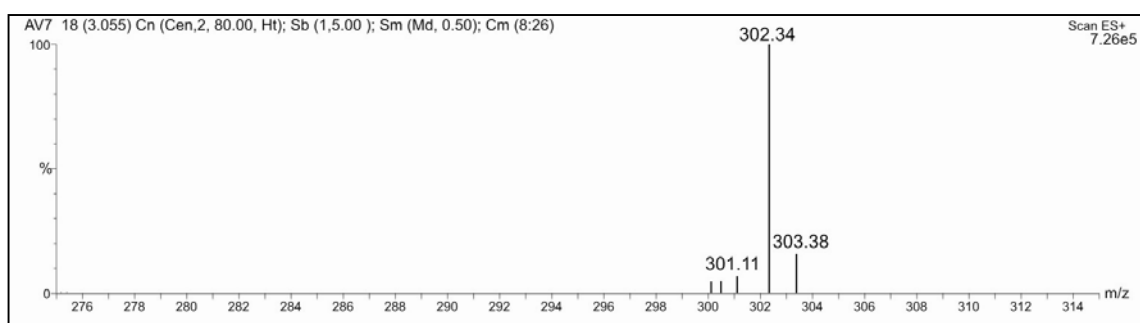


Figura 15- Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 7 do veneno da vespa *Agelaiia vicina*.

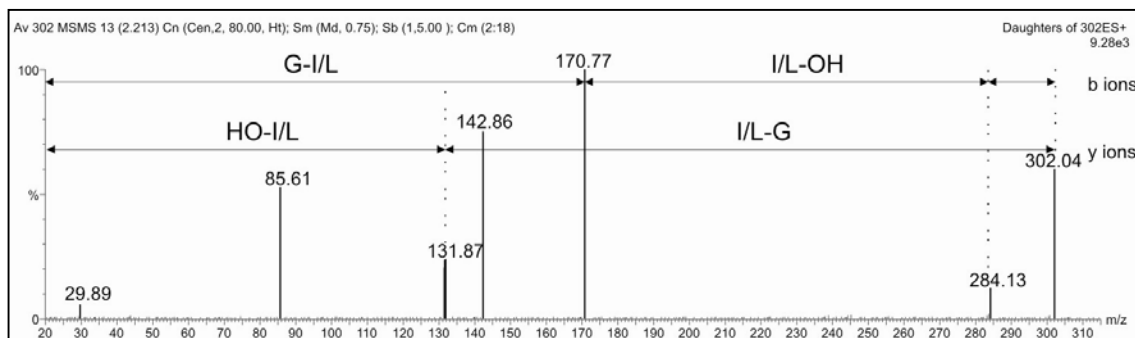


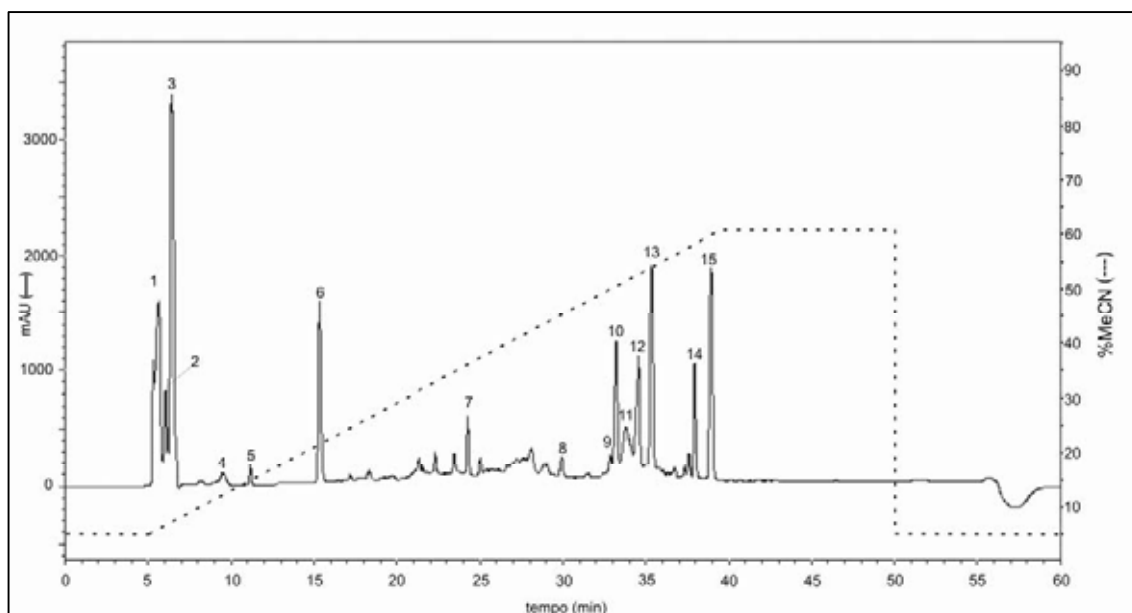
Figura 16- Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 7 do veneno da vespa *Agelais vicina*, mostrando um padrão de fragmentação de um peptídeo com uma seqüência de resíduos aminoácidos G-I/L-I/L-OH.

Este tripeptídeo foi também analisado por química degradativa de EDMAN o que confirmou sua estrutura como G-L-L-OH. Este tripeptídeo corresponde aos resíduos 7 a 9 do peptídeo quimiotático Protonectina, já isolado do veneno da vespa *Agelais pallipes pallipes* (MENDES et al., 2004), que atualmente vem sendo estudado em ramificações desse projeto, em nosso próprio laboratório.

### 4.3 PARTE III - Análise dos Compostos de Baixas Massas Moleculares Isolados do Veneno de *Polybia paulista*

#### Análise dos Compostos de Baixas Massas Moleculares

O veneno bruto da vespa social *Polybia paulista* foi fracionado sob fase reversa, em coluna C18, e o perfil cromatográfico obtido está mostrado na figura 17. Os compostos de baixas massas moleculares podem ser encontrados nesse cromatograma através de espectrometria de massas nas frações com tempos de retenção variando entre 0 a 30 minutos. Os compostos com maior tempo de retenção constituem-se de peptídeos.



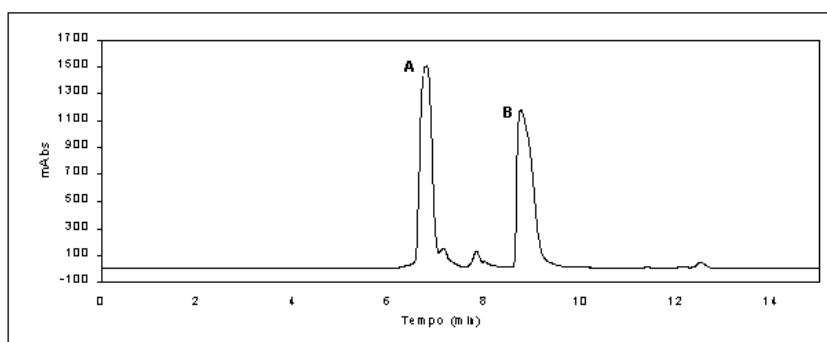
**Figura 17:** Perfil cromatográfico obtido do extrato de veneno bruto da vespa *Polybia paulista* por RP-HPLC [coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5  $\mu$ m)], utilizando-se um gradiente linear de acetonitrila entre 5 % a 60 % (v/v) (contendo TFA 0,1% (v/v)), monitorada por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.

Os primeiros picos existentes nesse perfil cromatográfico (frações 1 a 6) são constituídos de compostos de baixas massas moleculares, e tiveram suas homogeneidades avaliadas por espectrometria de massas ESI-MS, revelando-se não homogêneas. Estas frações foram então refracionadas por RP-HPLC, utilizando-se como fase móvel acetonitrila/água a 2% (v/v) [contendo TFA 0,1%

(v/v)] em eluição isocrática. O refração dos picos 2, 3 e 4 resultaram em muitas novas frações (resultados não mostrados), sendo cada uma delas presentes em concentrações muito reduzidas, para continuarem sendo investigadas quimicamente por esta estratégia. Portanto para essa vespa, foram analisadas somente as frações 1, 2, 5 e 6.

#### 4.3.1 FRAÇÃO 1

Pode-se observar no cromatograma de refração, que a fração 1 é constituída por dois picos (A e B), conforme mostrado na Figura 18. O pico “A” (6 mg totais) foi determinado como sendo o componente principal, devido à maior quantidade de material obtido em sua separação, tornando-se o objeto inicial do nosso estudo, enquanto o pico “B” não se apresentou suficientemente homogêneo para ter seus estudos continuados quando analisado por MS.

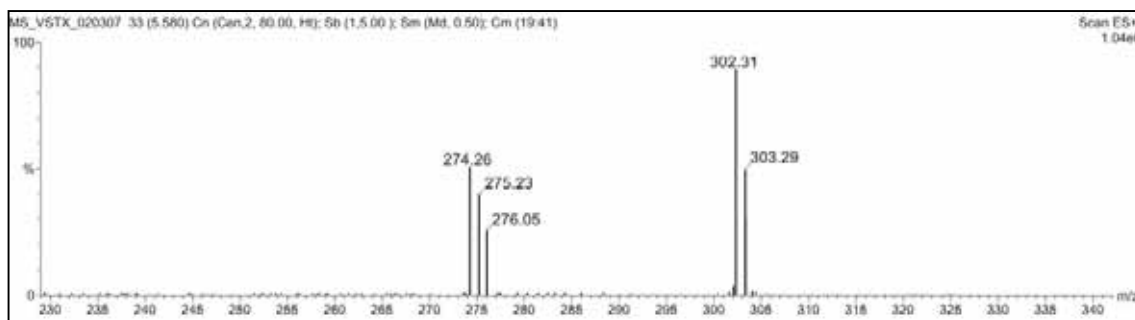


**Figura 18:** Perfil cromatográfico de refração da Fração 1 em eluição isocrática de 2% MeCN (v/v) [contendo TFA 0,1% (v/v)] obtida por RP-HPLC [coluna NUCLEOSIL-C 18 (10 x 250 nm, 5  $\mu$ m)], monitorada por absorção da radiação ultravioleta em 214 nm.

A etapa seguinte foi a determinação estrutural do composto, através de espectrometria de massas *tandem* e ressonância magnética nuclear.

A Figura 19 mostra os espectro de massas do tipo ESI obtido no modo positivo para a fração 1A. O espectro mostra que esta fração apresenta-se bastante homogênea com m/z 302 na forma  $[M+H]^+$ . Esse composto de massa molecular de 301 Da, mostrou-se bastante lábil com relação à voltagem de cone de amostra, e para que o mesmo fosse observado no espectro em sua forma intacta, foi

necessário ajustar a voltagem de Cone para 10 V, valor esse muito reduzido para grande maioria dos compostos naturais.



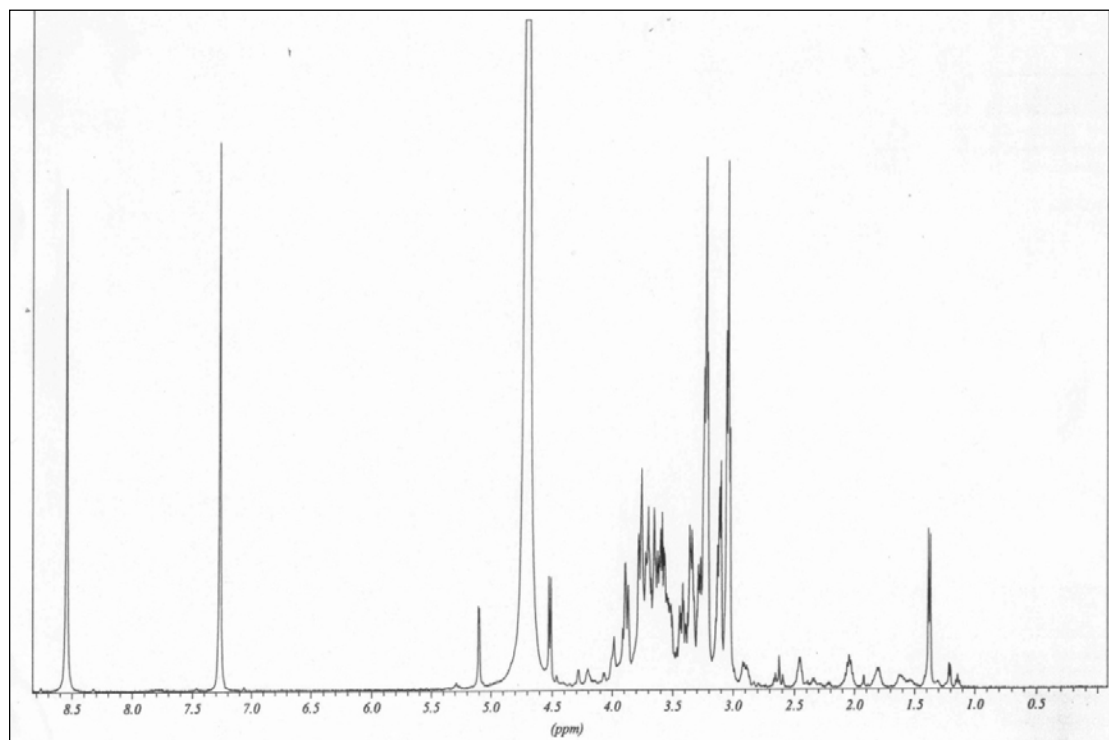
**Figura 19-** Espectro de massas obtido com o uso de um potencial reduzido no cone de amostra por ESI-MS, no modo positivo da Fração 1A do extrato de veneno da vespa *Polybia paulista*.

Em seguida a essas análises iniciais, este composto foi submetido a análises de espectroscopia de RMN 1D e 2D.

O espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 20) apresenta sinais na região de 3,0 a 5,5 ppm, possivelmente oriundos de carboidratos; em seguida estrutura a análise da estrutura molecular do componente presente nesta fração foi realizada por  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 21), que mostrou sinais entre 60 e 100 ppm, característicos de carboidratos. Além disso, pôde ser observado no espectro de  $^{13}\text{C}$  que os sinais nessa região (60 a 100 ppm) estão todos duplicados, indicando a presença de duas formas anoméricas da glicose, i.e., nas formas  $\alpha$  e  $\beta$ .

Podem ser observadas mais claramente, as duas formas anoméricas da glicose ( $\alpha$  e  $\beta$ ) através dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 20). No caso da forma  $\alpha$ , o  $\text{H}_1$  possui um  $\delta$  de 5,10 ppm e uma constante de acoplamento  $^3J_{\text{H}_1\text{H}_2} = 3,3$  Hz. Para a forma  $\beta$  o  $\text{H}_1$  possui um  $\delta$  de 4,5 ppm e uma constante de acoplamento de  $^3J_{\text{H}_1\text{H}_2} = 7,8$  Hz. Os sinais dos outros átomos de hidrogênio da glicose aparecem todos na região entre  $\delta$  3,3 a 4,0 ppm.





**Figura 20-** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$  do composto presente na fração 1A do veneno da vespa social *Polybia paulista*.

No espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 20) pode-se observar ainda a presença de dois tripletos um em 3,0 ppm e outro em 3,2 ppm, com constantes de acoplamento de  $^3J_{\text{HH}}=7,25$  Hz. Esses tripletes foram atribuídos a dois grupos  $\text{CH}_2$  que acoplam entre si. A presença desses dois grupos  $\text{CH}_2$  pode ser observada no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 21) em  $\delta$  22,5 e 38,2 ppm, e pelo espectro DEPT (Figura 22).

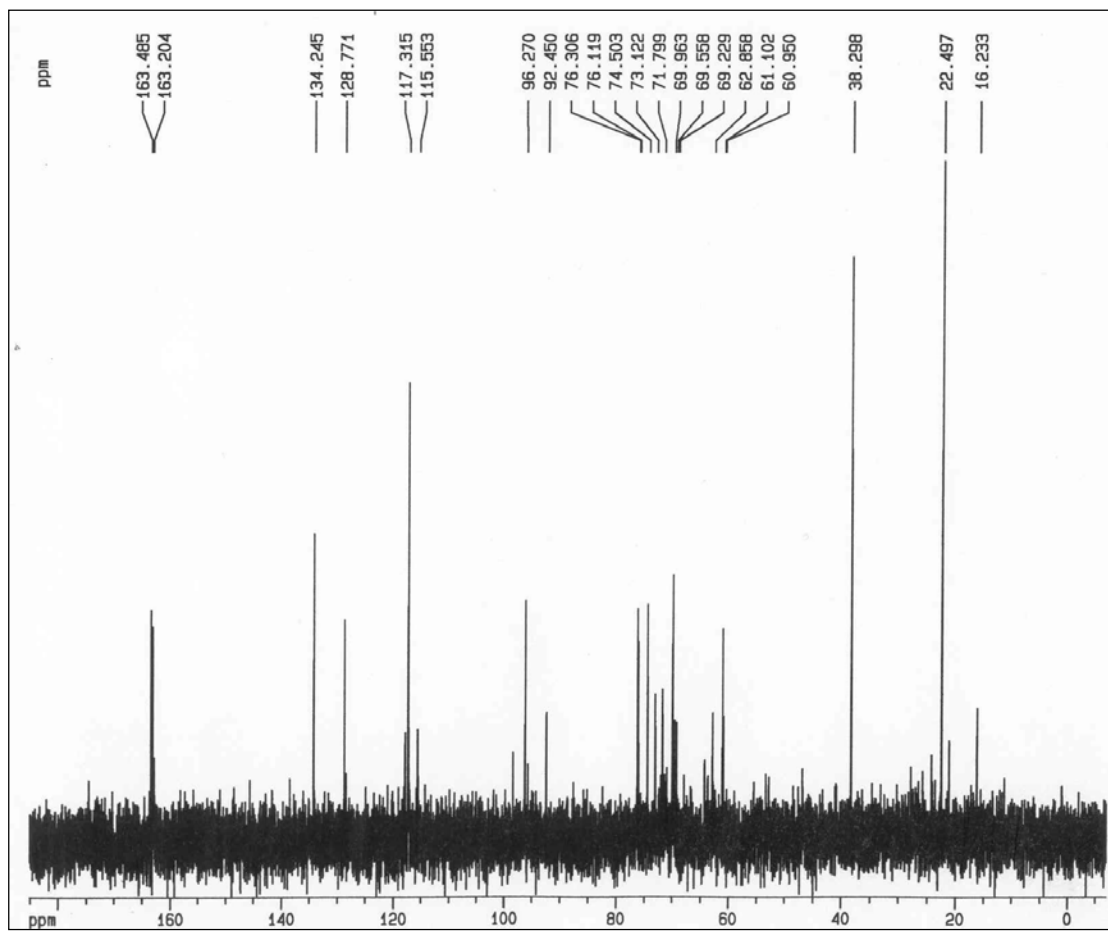
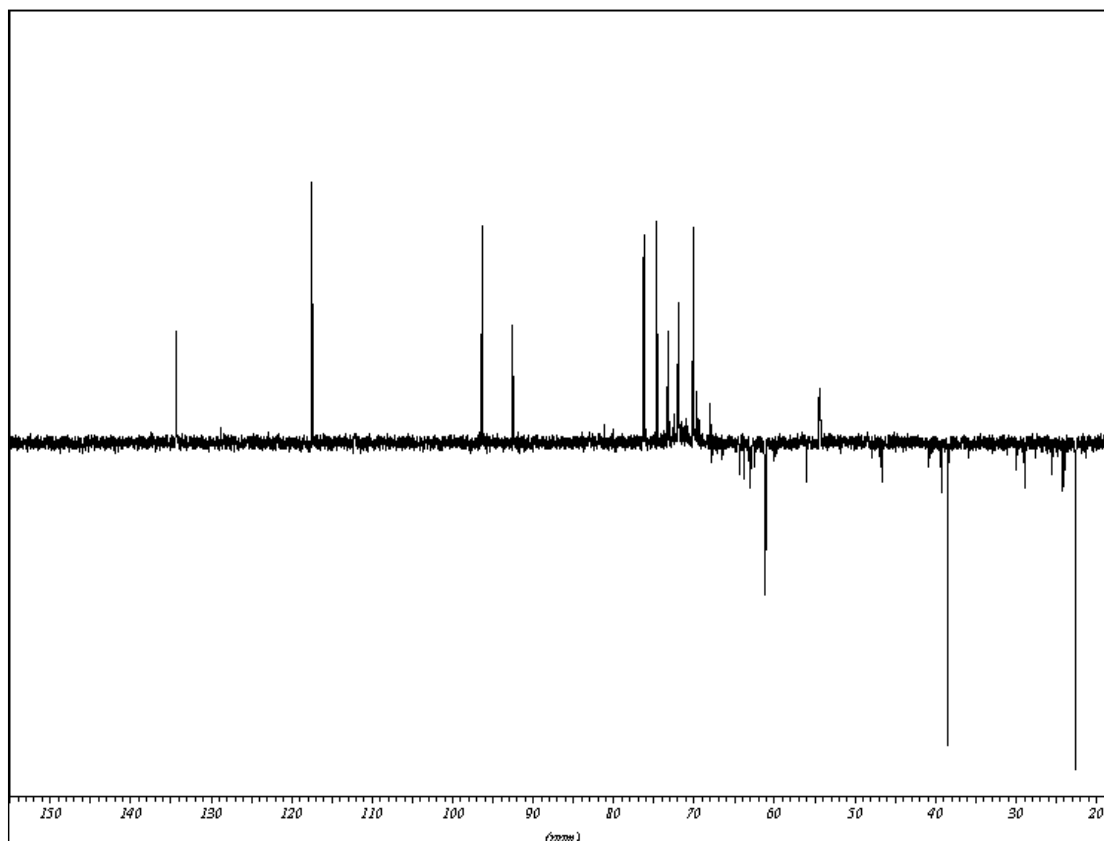


Figura 21- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$  do composto presente na fração 1A do veneno da vespa social *Polybia paulista*.



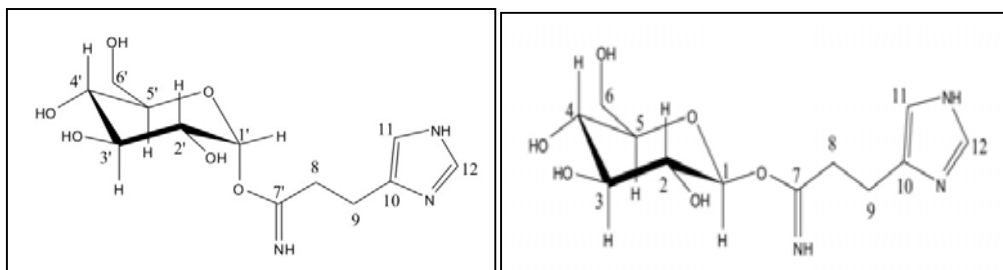
**Figura 22-** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DEPT) 125 MHz em  $\text{D}_2\text{O}$  do composto presente na fração 1A do veneno da vespa social *Polybia paulista*.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 21) possui ainda mais 5 sinais, sendo um deles em 163,5 e outro em 163,2 ppm; Esses sinais em 163 ppm foram atribuídos a um grupo de função imino-éster. A presença desses dois sinais se deve ao fato que esse grupo está ligado ao carbono anomérico da glicose nas formas  $\alpha$  e  $\beta$ , fazendo que esses grupos imino-ésteres sejam diferenciados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

O espectro de  $^{13}\text{C}$  possui, ainda, outro sinal em 128,7 ppm que sugere a presença de um carbono quaternário, conforme determinado pelo espectro DEPT (Figura 22).

Os sinais obtidos por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e suas características já discutidas estão representados nas tabelas 1, 2 e 3. A interpretação dos dados espectroscópicos disponíveis indica que esta molécula é um glicosídeo ligado a um derivado da histamina denominado de 2,3,4-trihidroxi-5-(hidroximetil) tetrahydro-2H-

pyran-1-il 3-(1*H*-imidazolil) propanimidato e esse composto foi denominado como Polybiosideo (figura 23).



**Figura 23-** Interpretação da estrutura molecular de Polybiosideo (fração 1A do veneno de *P. paulista*) nas formas  $\alpha$  (esquerda) e  $\beta$  (direita).

**Tabela 1-** Assinalamento dos sinais obtidos nas análises de RMN  $^1\text{H}$  (1D e 2D) para o Polybiosideo nas formas  $\alpha$  e  $\beta$ .

$\delta$ (ppm)	Atribuição	Sinal	$J$ (Hz)
8,54	H12	s	--
7,26	H11	s	--
4,52	H1	d	7,85
5,12	H1'	d	3,35
3,1	H2	dd	--
3,39	H2'	dd	--
3,36	H5	m	--
3,00-4,00	H3, H4 e H6	m	--
3,22	H9	t	7,25
3,03	H8	t	7,25

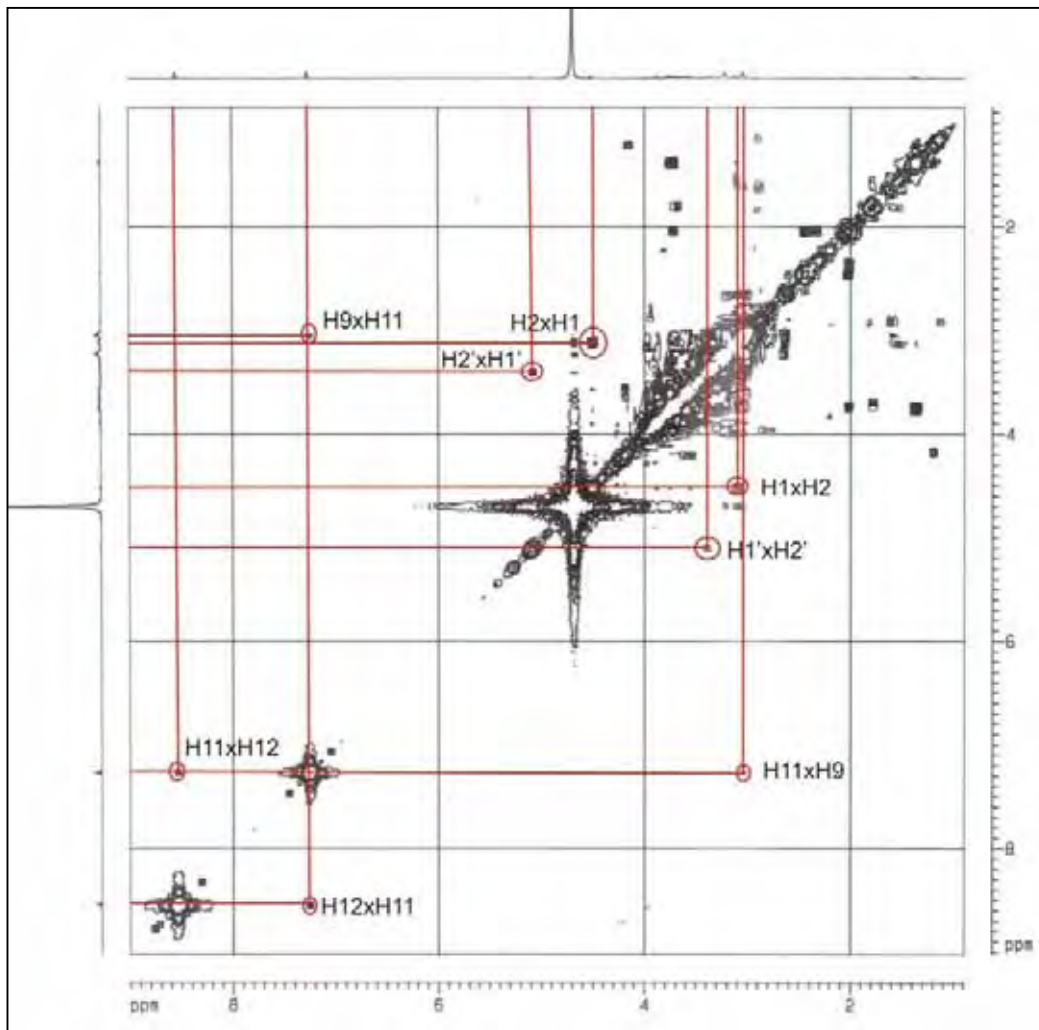
**Tabela 2-** Principais sinais obtidos nas análises de RMN -  $^{13}\text{C}$  para o composto presente na fração 1A do veneno da vespa *Polybia paulista* na forma  $\alpha$ .

$\delta$ (ppm)	Atribuição
22,5	C <sub>9</sub>
38,3	C <sub>8</sub>
60,9	C <sub>6'</sub>
69,5	C <sub>4'</sub>
71,8	C <sub>3'</sub>
73,1	C <sub>2'</sub>
76,1	C <sub>5'</sub>
92,4	C <sub>1'</sub>
117,3	C <sub>11</sub>
128,7	C <sub>10</sub>
134,2	C <sub>12</sub>
163,2	C <sub>7'</sub>

**Tabela 3:** Principais sinais obtidos nas análises de RMN -  $^{13}\text{C}$  para o composto presente na fração 1A do veneno da vespa *Polybia paulista* na forma  $\beta$ .

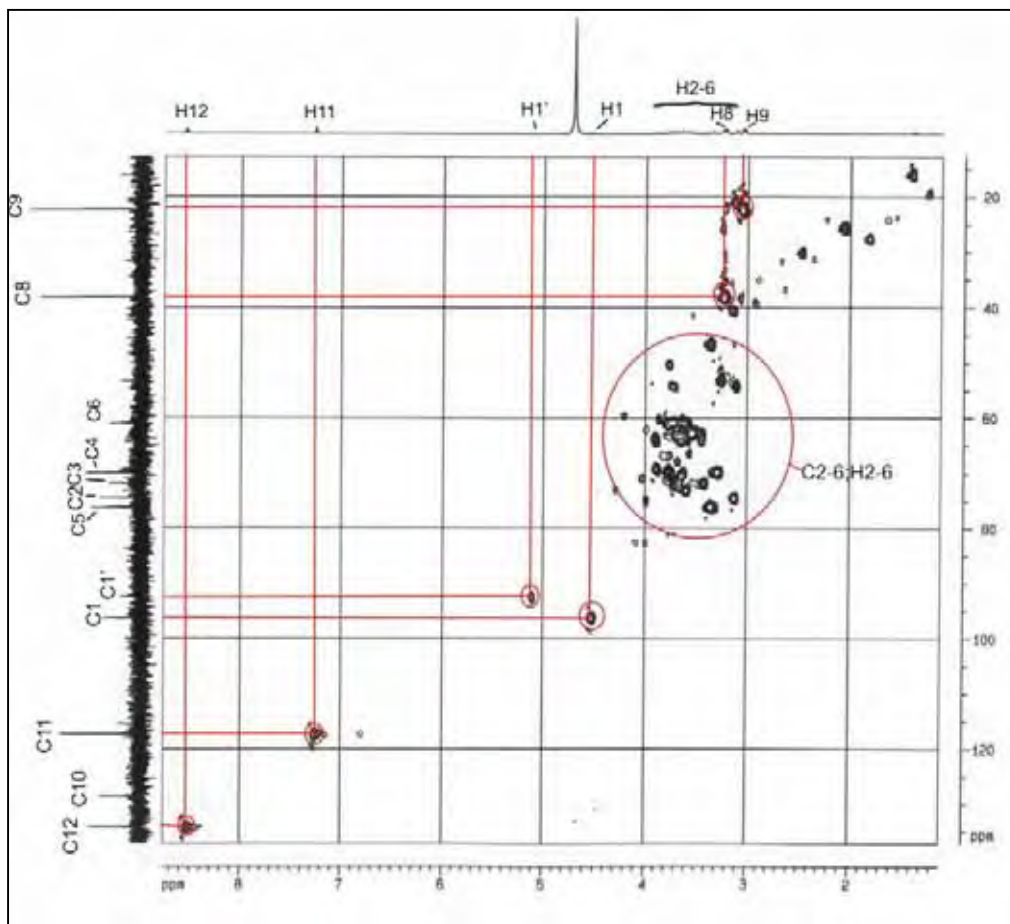
$\delta$ (ppm)	Atribuição
22,5	C <sub>9</sub>
38,3	C <sub>8</sub>
61,1	C <sub>6</sub>
69,9	C <sub>4</sub>
71,9	C <sub>3</sub>
74,5	C <sub>2</sub>
76,3	C <sub>5</sub>
96,3	C <sub>1</sub>
117,3	C <sub>11</sub>
128,7	C <sub>10</sub>
134,2	C <sub>12</sub>
163,5	C <sub>7</sub>

Através dos espectros de RMN em 2D g-COSY (figura 24) foi possível determinar as correlações entre os acoplamentos spin-spin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  desta molécula, conforme pode ser observado no espectro abaixo. Os  $^1\text{H}$  de número 3 a 6 da D-glicose não puderam ser correlacionados por esse espectro, pois os sinais de suas correlações se situam muito próximos da linha diagonal de correlações, fazendo com que os mesmos não fossem legíveis nesse espectro. Pode-se notar nesse espectro que há um pequeno acoplamento a longa distância entre H9 e H11, devido à ocorrência de dupla ligação entre C11 e C10 no anel aromático de imidazol.

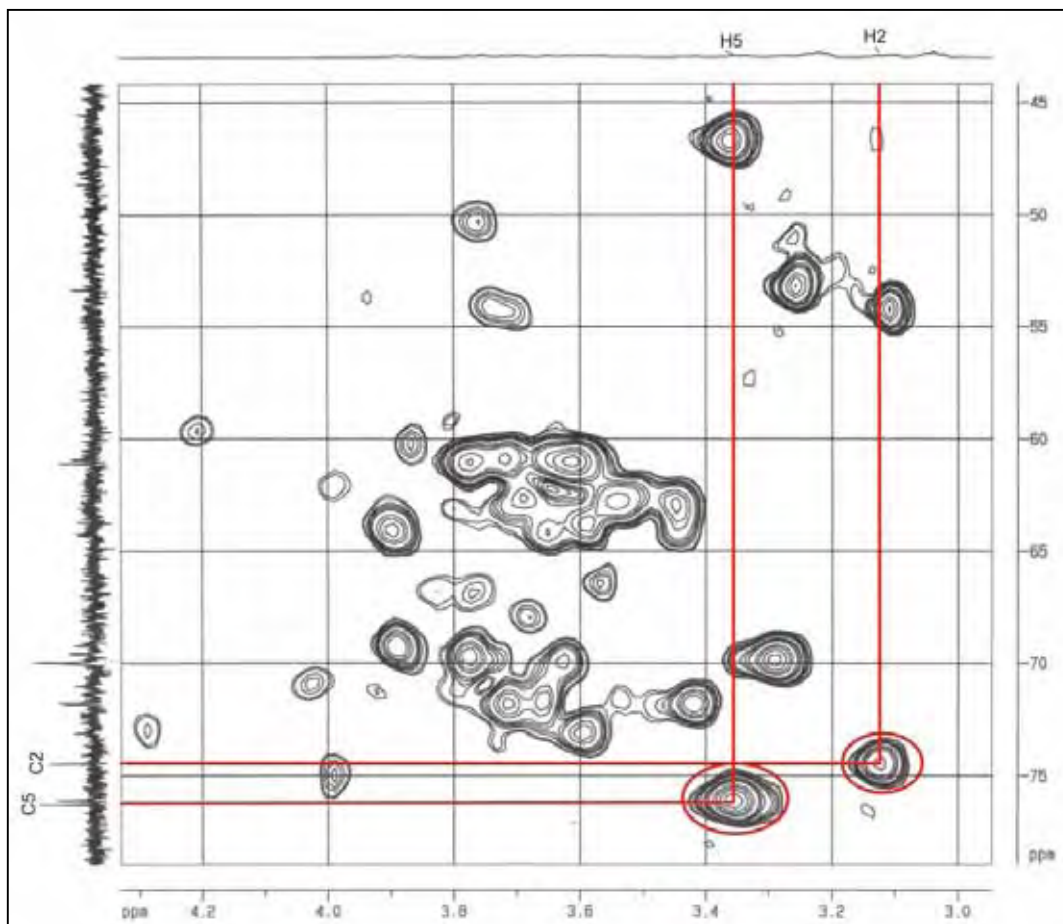


**Figura 24-** gCOSY- mapa de correlação (correlação homonuclear Próton-Próton) do composto correspondente à fração 1A, do veneno bruto da vespa *Polybia paulista*.

Utilizando-se os espectros de g-HSQC (figuras 25 e 26) e g-HMBC (figura 27) foi possível determinar as correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma e a múltiplas ligações, respectivamente, conforme pode ser observado nos espectros abaixo, confirmando, em parte, a estrutura proposta.



**Figura 25** - gHSQC (correlação heteronuclear a uma ligação Carbono-Hidrogênio) do composto extraído do veneno bruto da vespa *Polybia paulista*.



**Figura 26** – Detalhe do espectro de gHSQC (correlação heteronuclear a uma ligação Carbono-Hidrogênio) do composto extraído do veneno bruto da vespa *Polybia paulista* mostrando as correlações C2-H2 e C5-H5.

Através da ampliação do espectro de gHSQC, (figura 26) foi possível também inferir os deslocamentos químico de H5 (através da correlação com C5) e de C2, visto que o deslocamento químico de H2 já havia sido determinado por sua correlação com H1 através do espectro de gCOSY (figura 24). Através do espectro de gHMBC (figura 27), pode-se notar a correlação a múltiplas ligações de C11 com H12 e H8; do carbono quaternário C10 com H8, H9, H11 e H12 e C12 com H11.



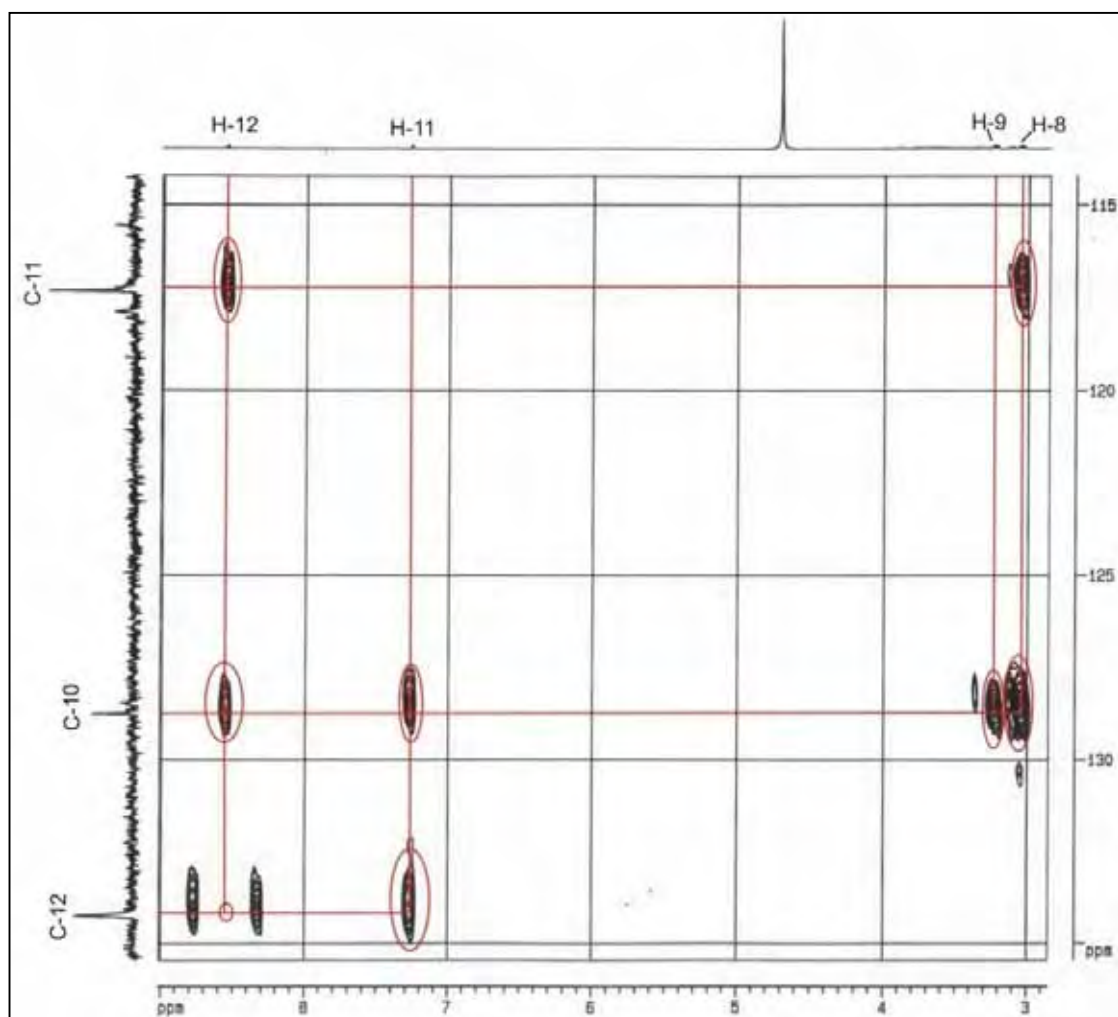
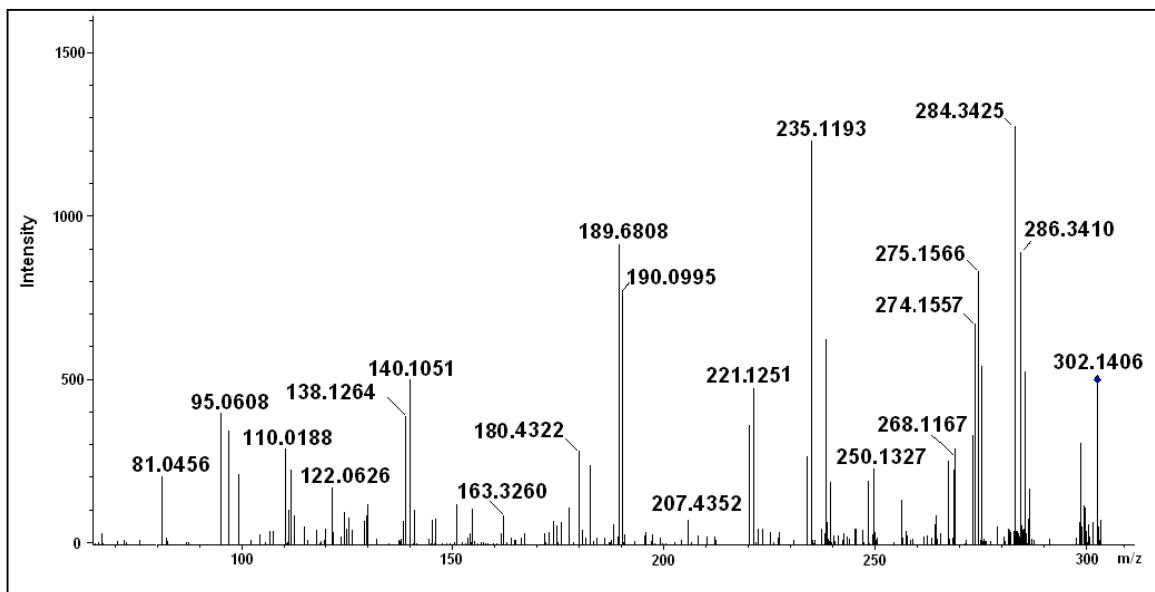
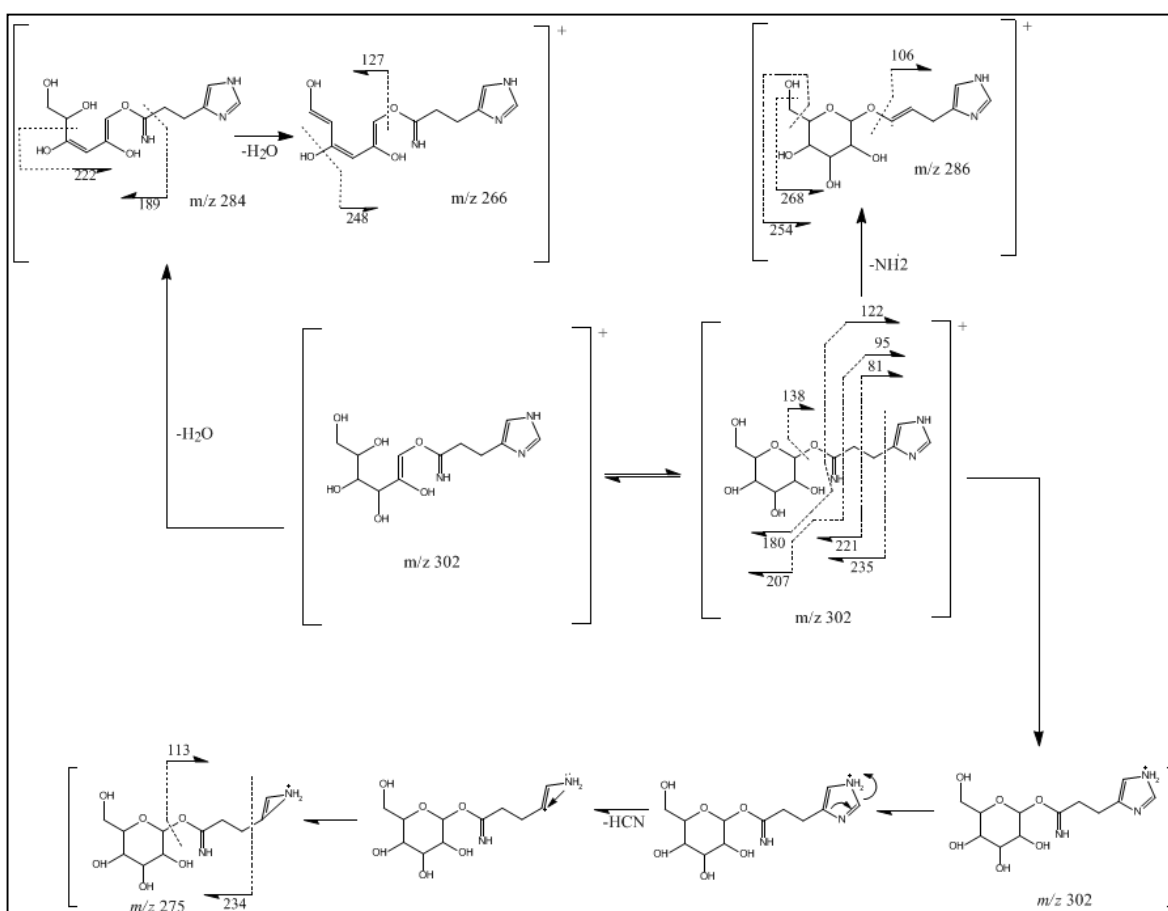


Figura 27- gHMBC (correlação heteronuclear a múltiplas ligações entre Carbono-Hidrogênio) do composto extraído do veneno bruto da vespa *Polybia paulista*

Após as análises por espectrometria de RMN, a estrutura proposta foi comparada com os espectro ESI-MS/MS em alta resolução (Figura 28), e foi proposto um esquema de fragmentação para a mesma (esquema 3) com base nos valores de  $m/z$  obtidos para os principais íons-fragmentos observados neste espectro.



**Figura 28-** Espectro de massas seqüenciais do tipo ESI-MS/MS para o composto de  $m/z$  302,14 Da. Na forma de  $[M + H]^+$ , presente na fração 1A.



**Esquema 3-** Esquema de fragmentação para o Polybiosideo mostrada na figura 23.

No espectro ESI-MS/MS do composto revelou os principais íons-fragmento como  $m/z$  286, 284, 275, 274, 268, 254, 250, 235, 221, 207, 190, 189, 183, 180, 173, 163, 147, 140, 138, 130, 122, 112, 98, 95 e 81 na forma de  $[M+H]^+$  (Figura 28). A interpretação do padrão de fragmentações do Polybiosideo em condições de CID pode ser observado no esquema 3. Os íons de  $m/z$  284  $[M+H - 18]^+$  e  $m/z$  266  $[M+H - 36]^+$  foram formados pela perda de uma e duas moléculas de água, respectivamente, a partir do íon molecular  $[M + H]^+$ . Os íons de  $m/z$  222 e 189 ocorrem na estrutura resultante da perda da primeira de água, a partir do íon molecular do Polybiosideo. Os íons de  $m/z$  248 e 127 foram atribuídos à estrutura formada após a perda de duas moléculas de água sucessivas, a partir do íon molecular do Polybiosideo. O íon de  $m/z$  286 foi formado a partir da perda do  $NH_2$  a partir do íon molecular do Polybiosideo,  $[M+H - 16]^+$ , enquanto que os íons de  $m/z$  268, 254 e 106 correspondem à fragmentações ocorridas a partir do íon de  $m/z$  286. O íon de  $m/z$  275 se origina aparentemente da fragmentação do anel imidazol, com conseqüente formação do cátion azirina, com um padrão e rearranjo de anel similar àquele previamente descrito para 1-metil-imidazol, (MAMER; LESIMPLE, 2005). A fragmentação da azirina a partir do íon de  $m/z$  275 deu origem ao íon de  $m/z$  234, corroborando a existência de azirina no íon de  $m/z$  275.

A perda do grupo imidazolil ( $m/z$  67), a partir do íon molecular  $[M + H - 67]^+$  resultou na formação do íon de  $m/z$  235. A fragmentação das unidades metilênicas e do grupo imina, resultou na formação de duas series de fragmentos, i.e., os íons que apresentaram retenção de carga no lado glucosil ( $m/z$  235, 221, 207 e 180) e seus fragmentos opostos, i.e., aqueles que apresentaram retenção de carga no lado do grupo imidazol ( $m/z$  81, 95 122 e 138). O padrão de fragmentação proposto no Esquema 3 se ajusta muito bem à estrutura proposta para Polybiosideo, corroborando com a elucidação estrutural feita por análises de RMN.

Os padrões de fragmentação observados, com o respectivo mecanismo, se ajustam bem à estrutura proposta.

---

## **Determinação da Atividade Biológica do Composto Obtida da Fração 1A do Veneno da Vespa Social *Polybia paulista***

### **4.3.1.1 Bioensaios das Atividades Tóxicas de Polybiosídeo em Abelhas *Apis mellifera***

Após a análise de todos os parâmetros descritos na metodologia de observação de comportamentos, constatou-se que não houve paralisia e/ou morte em abelhas *Apis mellifera*, indicando não haver indícios de inseto-toxicidade nas concentrações testadas. Provavelmente, o Polybiosídeo não é tóxico para insetos devido a não especialização do aparelho de ferroar de vespas sociais na captura de outros Artrópodes, pois as vespas sociais não utilizam seus venenos na captura de outros artrópodes, mas somente para defesa ativa, principalmente contra vertebrados (EVANS, 1958; EVANS & EBERHARD, 1970; SCHIMIDT, 1990).

### **4.3.1.2 Mapeamento e Determinação dos Tipos Neurais Ativados pelo Polybiosídeo no Encéfalo de Ratos**

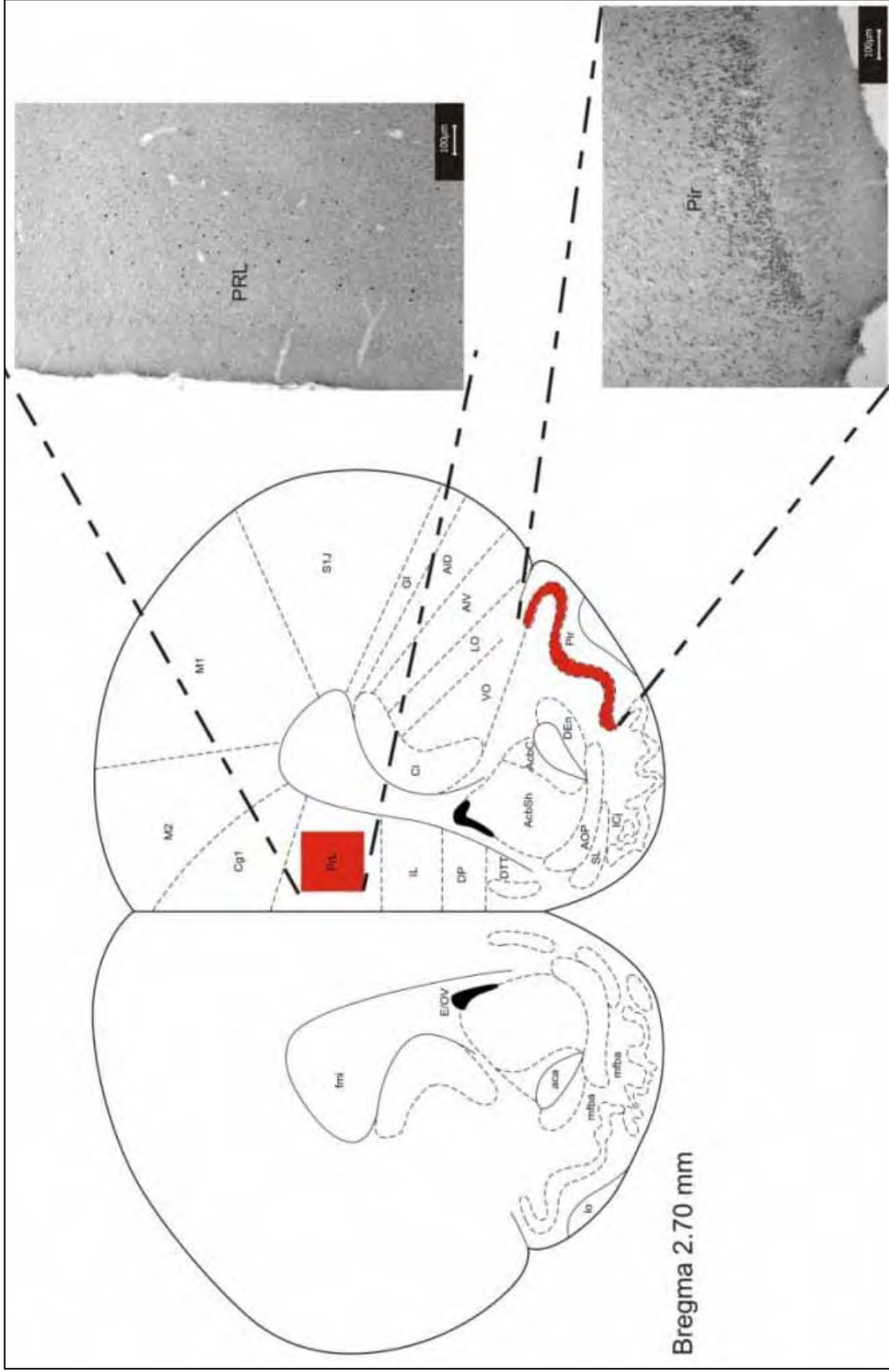
#### **Expressão de *c-Fos*.**

A expressão de *c-Fos* observada após a administração *icv* do composto pode ser observada nas figuras 29 a 32 que mostram um esquema do encéfalo dos ratos na região de cada corte, conjuntamente com fotos representativas dessas regiões marcadas por *c-Fos* (bregma 2.70 mm, - 0.30 mm, - 1.80 mm e - 3.14 mm):

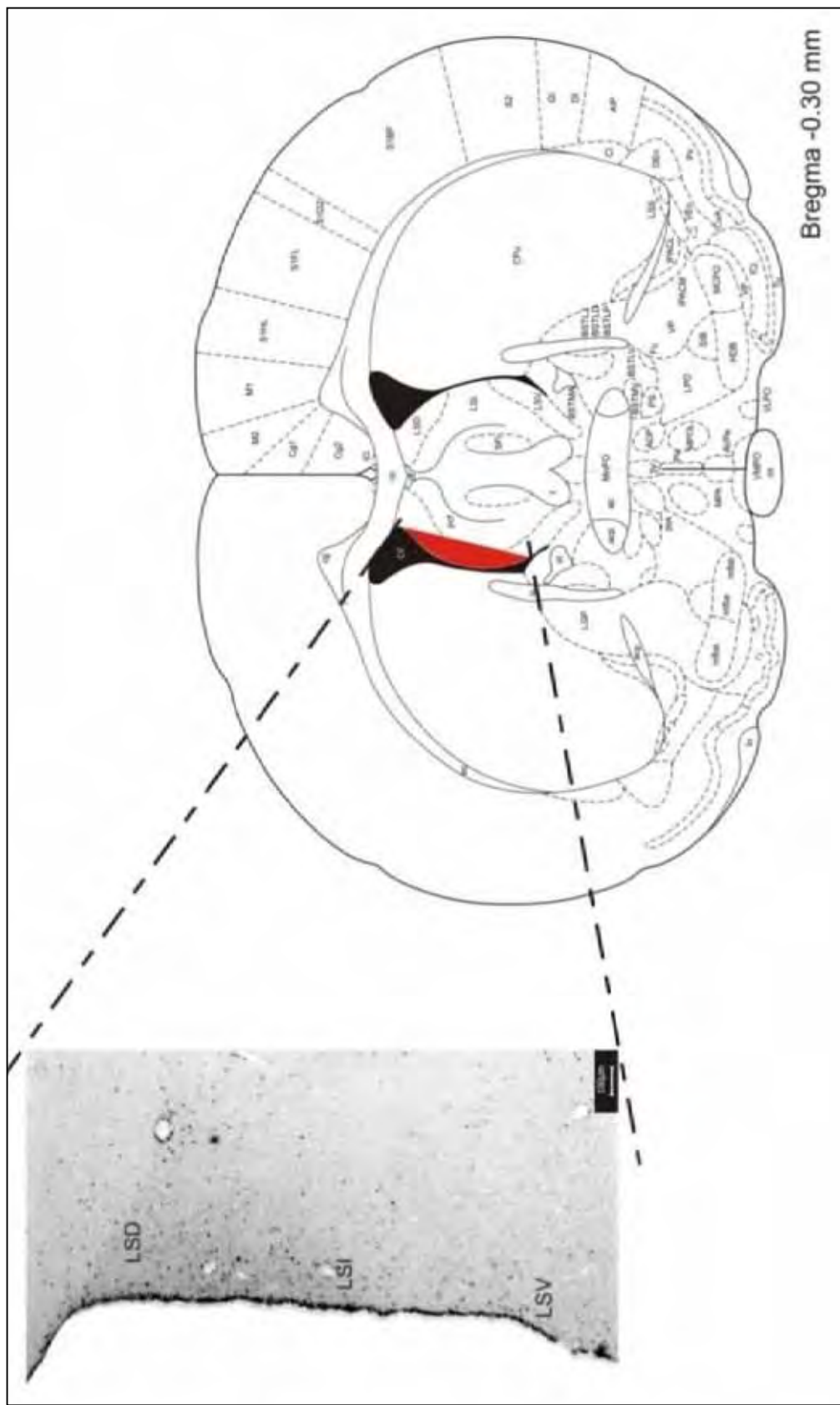
- figura 29 que mostra a expressão da proteína *c-Fos* no Córtex Pré-Límbico e no Córtex Piriforme.
  - figura 30 que mostra as marcações dessa proteína no Núcleo Septal Lateral (Dorsal, intermediário e ventral).
  - figura 31 que mostra essas marcações na Área Hipotalâmica, no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, na Área Hipotalâmica Lateral, no Fórnice, no Terceiro Ventrículo e no Quiasma Óptico.
-

- figura 32 que mostra a expressão dessa proteína na Região CA1 do Hipocampo, na Lâmina Polimorfa do Giro Denteado, no Núcleo Paraventricular Talâmico, Núcleo Intermédio Dorsal do Tálamo, Núcleo Centro Medial, Núcleo Rombóide, Núcleo Reuniens, Núcleo Central da Amígdala, divisão capsular e no Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo. Estes resultados Evidenciam que esse composto é neuroativo em diferentes regiões do cérebro de ratos.

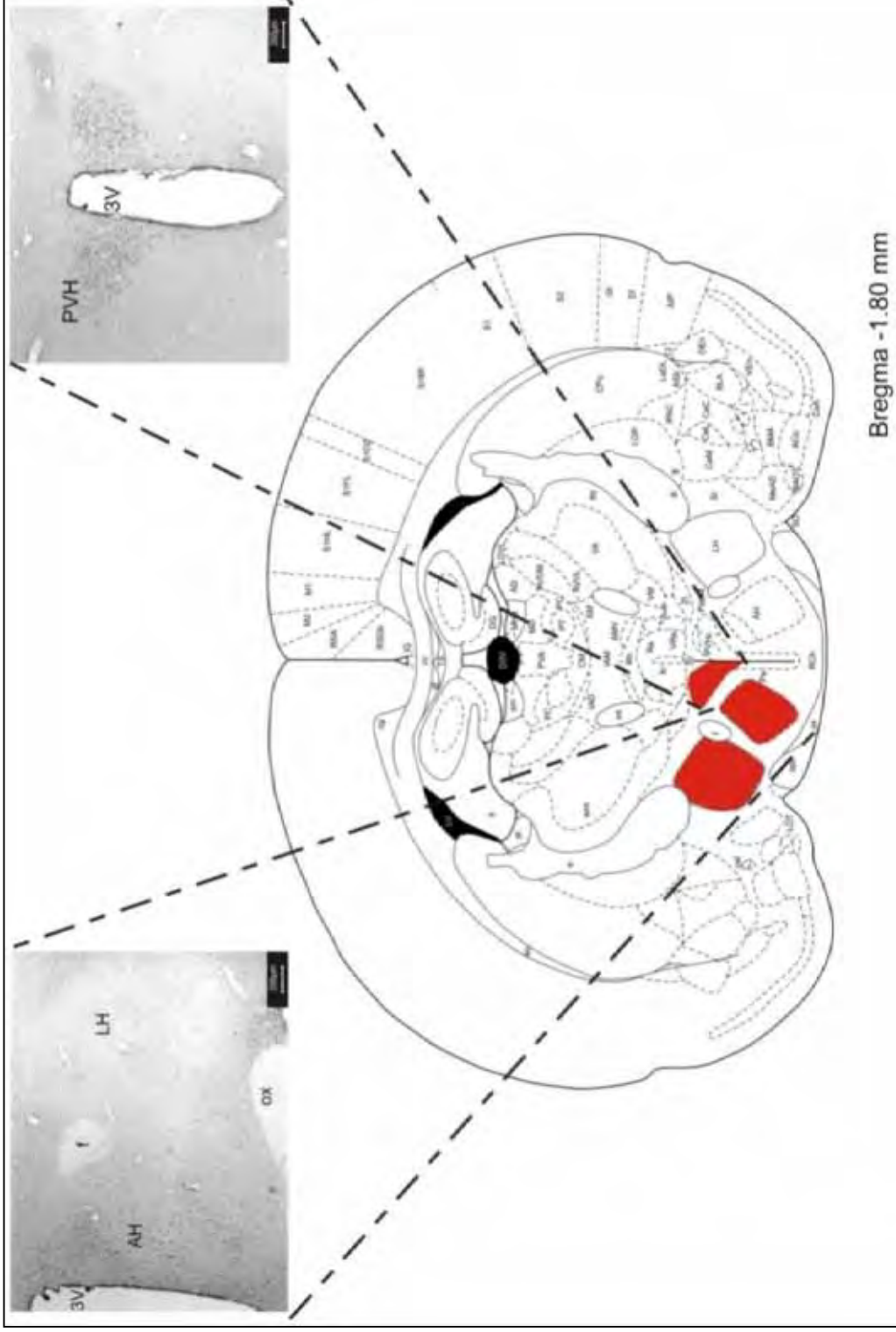
---



**Figura 29-** Marcação da expressão da proteína c-Fos: fotomicrografia de campo claro evidenciando células imunoreativas à proteína-*fos* após a administração icv de 10  $\mu$ L do Polybiosídeo (concentração 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L), e uma representação esquemática ilustrando as áreas que expressaram *fos* após a administração da toxina. Abreviações: PRL- Córtex Pré-Límbico Pir- Córtex Piriforme. Escalas: 100  $\mu$ m.

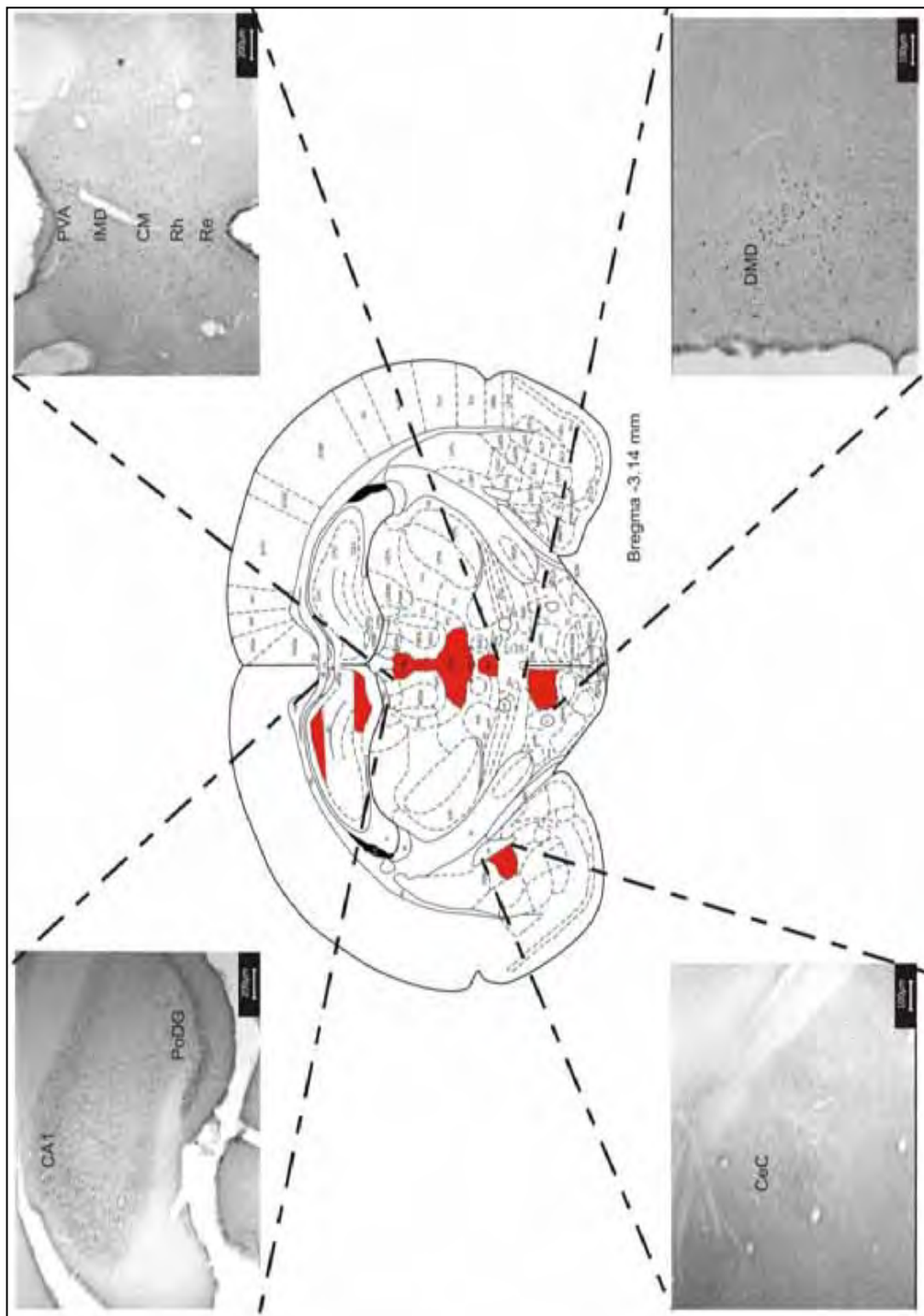


**Figura 30-** Marcação da expressão da proteína *c-Fos*: fotomicrografia de campo claro evidenciando células imunoreativas à proteína-*c-Fos* após a administração *icv* de 10  $\mu$ L do Polybiosídeo (concentração 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L), e uma representação esquemática ilustrando as áreas que expressaram *c-Fos* após a administração da toxina. Abreviações: LS- Núcleo Septal Lateral (Dorsal, intremediário e ventral). Escala: 100  $\mu$ m.



**Figura 31-** Marcação da expressão da proteína *c-Fos*: fotomicrografia de campo claro evidenciando células imunoreativas à proteína-*fos* após a administração *icv* de 10  $\mu\text{L}$  do Polybiosoide (concentração 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e uma representação esquemática ilustrando as áreas que expressaram *fos* após a administração da toxina. Abreviações: AH- Área Hipotalâmica Anterior; PVH- Área Hipotalâmica Lateral; f- fórnice; 3V- Terceiro Ventrículo; ox- Quiasma Óptico. Escalas: 200  $\mu\text{M}$





**Figura 32-** Marcação da expressão da proteína *c-Fos*: fotomicrografia de campo claro evidenciando células imunoreativas à proteína-*fos* após a administração *icv* de 10  $\mu$ L do Polybioso (concentração 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ L) e uma representação esquemática ilustrando as áreas que expressaram *fos* após a administração da toxina. Abreviações: CA1- Região CA1 do Hipocampo; PoDG- Lâmina Polimorfa do Giro Dentado; PVA- Núcleo Paraventricular Talâmico; IMD- Núcleo Intermédio Dorsal do Tálamo; CM- Núcleo Centro Medial; Rh- Núcleo Rombóide; Re- Núcleo Reuniens; CeC- Núcleo Central da Amígdala, divisão capsular; DMD- Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo. Escala:100  $\mu$ m para CeC e DMD e 200 $\mu$ m para CA1/PoDG e PVA/IMD/CM/Rh/Re.

Após análise de todas as áreas do encéfalo que expressaram c-Fos dentro dos 4 cortes coronais, pôde-se comparar essas regiões aos resultados obtidos para o grupo controle, o que permitiu inferir que essas marcações são resultantes de neuroatividade do Polybiosídeo no SNC desses mamíferos, e uma análise estatística paramétrica (Teste t-student) com significância de  $p < 0,05$  indicou que todas as regiões marcadas, excluindo-se o núcleo central da amígdala, foram estatisticamente significativas, em relação aos respectivos controles.

Através da análise da contagem das células em doze regiões diferentes dentro dos 4 cortes coronais, que foram marcadas para expressão de c-Fos, tanto para o grupo controle como para os animais tratados com a toxina, pôde-se observar a marcação pela expressão da proteína c-Fos em diversas áreas do SNC desses animais, principalmente no hipotálamo, hipocampo, núcleo septal lateral, núcleo paraventricular do hipotálamo e córtex piriforme, esses resultados foram sintetizados na tabela 4.

**Tabela 4** - Número de células (média +/- SEM) Mostrando as células Fos-imunoreativas de ratos submetidos ao tratamento com salina [0,9% (m/V)] e com o Polybiosídeo (0,1ug/uL).

Regiões	Polybiosídeo	Salina (controle)
Córtex piriforme	154 ± 5,33 *	7,00 ± 3,00
Núcleo septal lateral	102,00 ± 7,21 *	4,67 ± 2,51
Área hipotalâmica Anterior	124,33 ± 6,65 *	40,00 ± 5,56
Núcleo paraventricular do hipotálamo	79,33 ± 6,51 *	9,00 ± 3,00
Núcleo dorsomedial do hipotálamo	14,00 ± 2,00 *	1,33 ± 0,57
Hipocampo	83,33 ± 6,11 *	2,67 ± 2,08
Núcleo reuniens	17,67 ± 2,52 *	1,33 ± 0,58
Núcleo rombóide	10,00 ± 2,00 *	1,33 ± 0,58
Núcleo centro medial	12,67 ± 3,05 *	1,67 ± 0,58
Núcleo intermédio dorsal	12,67 ± 2,52 *	2,00 ± 1,73
Núcleo paraventricular do tálamo	39,33 ± 3,05 *	3,00 ± 2,00
Núcleo central da amígdala	16,67 ± 3,51	3,67 ± 2,08

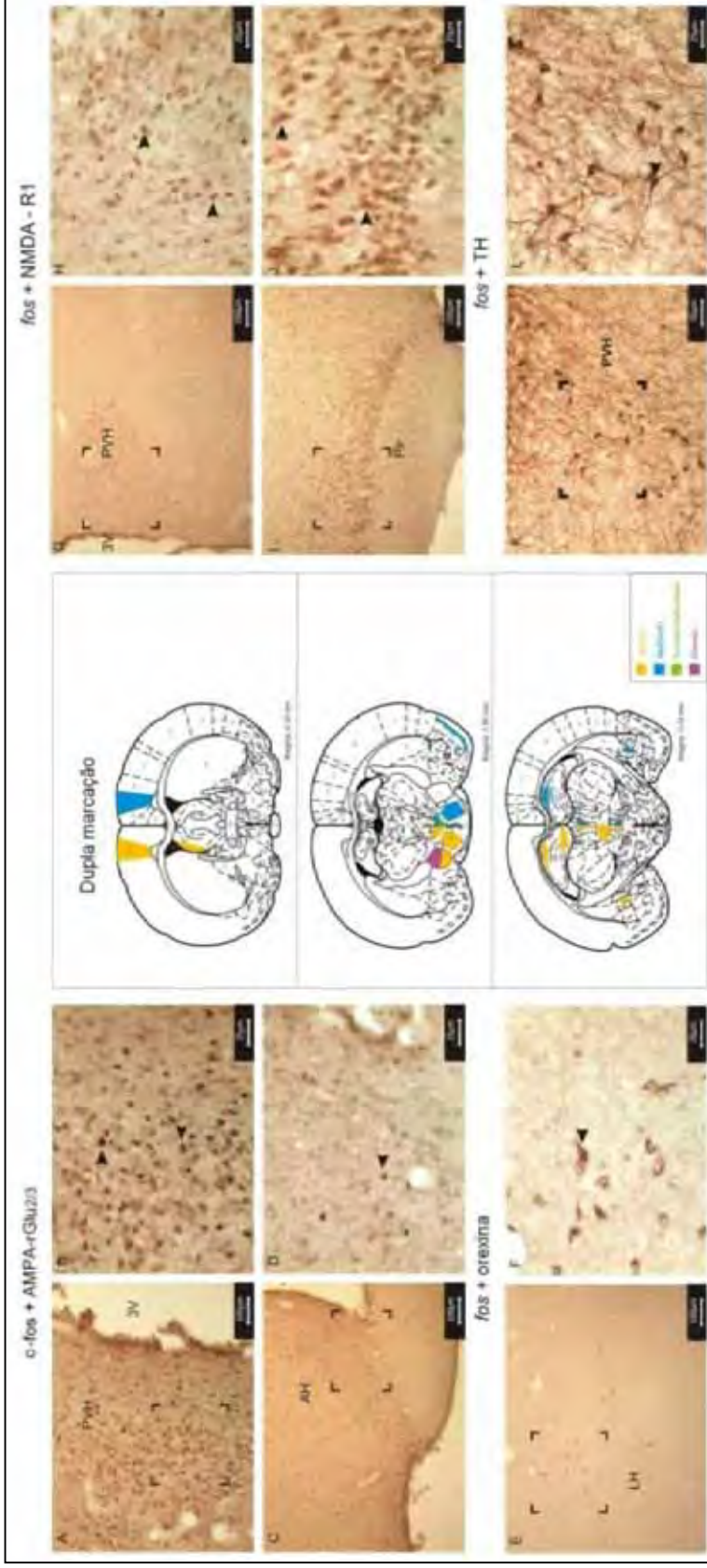
As células Fos-imunoreativas foram contadas em áreas fixas de  $1\text{mm}^2$  em todas as regiões acima descritas. Os valores atribuídos na tabela são referentes às médias ( $\pm$  SD) do número de células fos-positivas,  $n=3$ , sendo o grau de significância  $p < 0,05$  (teste t-Student) observado em todas as áreas (\*), exceto para o núcleo central da amígdala.

### **Análise das Duplas Marcações**

Com a finalidade de identificar a natureza bioquímico-farmacológica dos receptores neuronais, das diferentes regiões do cérebro dos ratos em que o composto agiu, cortes paralelos das mesmas regiões foram submetidos a ensaios de duplas marcações, pela técnica de imunohistoquímica, utilizando-se de anticorpos específicos para diferentes tipos e sub-tipos de receptores nervosos.

Os resultados para as duplas-marcações evidenciaram que Polybiosideo possui afinidade a diferentes tipos de neurônios, principalmente os glutamatérgicos, AMPA- e NMDA- dependentes em diferentes regiões cerebrais, que incluem principalmente as marcações do Córtex piriforme por rGlu<sub>2/3</sub> e NMDA-R<sub>1</sub>, núcleo septal lateral por rGlu<sub>2/3</sub>, núcleo paraventricular do hipotálamo por rGlu<sub>2/3</sub>, NMDA-R<sub>1</sub> e TH, hipocampo por rGlu<sub>2/3</sub> e NMR<sub>1</sub>, do núcleo de Reuniens e do núcleo central da amígdala por rGlu<sub>2/3</sub> e NMDA-R<sub>1</sub> e Área Hipotalâmica Lateral por rGlu<sub>2/3</sub>, NMDA-R<sub>1</sub> e Orexina, conforme pode ser visualizado na figura 33 e na ampliação de alguns detalhes dessa imagem na figura 34. Pode-se ainda, observar na figura 35 que existe uma sobreposição da marcação da expressão da proteína c-Fos sozinha e da dupla marcação, o que indica que a maioria dos neurônios ativados pôde ter seu mecanismo de ativação identificado pela técnica da dupla marcação. A figura 36 mostra a representação das porcentagens de neurônios duplamente marcados encontrados nos animais tratados com Polybiosideo.

---



**Figura 33-** Co-localização da proteína c-fos e marcadores neuronais após administração do Polybiosideo (concentração 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ): GluR2/3 (figuras A a D); Orexina (figuras E e F); NMDA-R1 (figuras G a J); Tyrosina Hidroxilase-TH (figuras K e L). Fotomicrografias de campo claro evidenciando a dupla marcação fos/marcadores neuronais (setas pretas). Essa marcação (pontos escuros) é evidenciada nas Membranas Plasmáticas tratadas com anticorpos específicos: anti-GluR2/3; anti-orexina; anti-NMDA-R1 e anti-TH. A: Núcleo Paraventricular hipotalâmico; B: Detalhe da figura A; C: Área Hipotalâmica; D: Detalhe da figura C; E: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; F: Detalhe da figura E; G: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; H: Detalhe da figura G; I: Área Hipotalâmica Lateral; J: Detalhe da figura I; K: Área Hipotalâmica Lateral; L: Área Hipotalâmica Lateral; M: Área Hipotalâmica Lateral. Abreviações: 3V - Terceiro Ventrículo; AH - Área Hipotalâmica; PVH - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; Pir - Córtex Piriforme; LH - Área Hipotalâmica Lateral. Escala 25um em B/D/F/H/J/L; 100um em A/C/E/G e 50um em K.

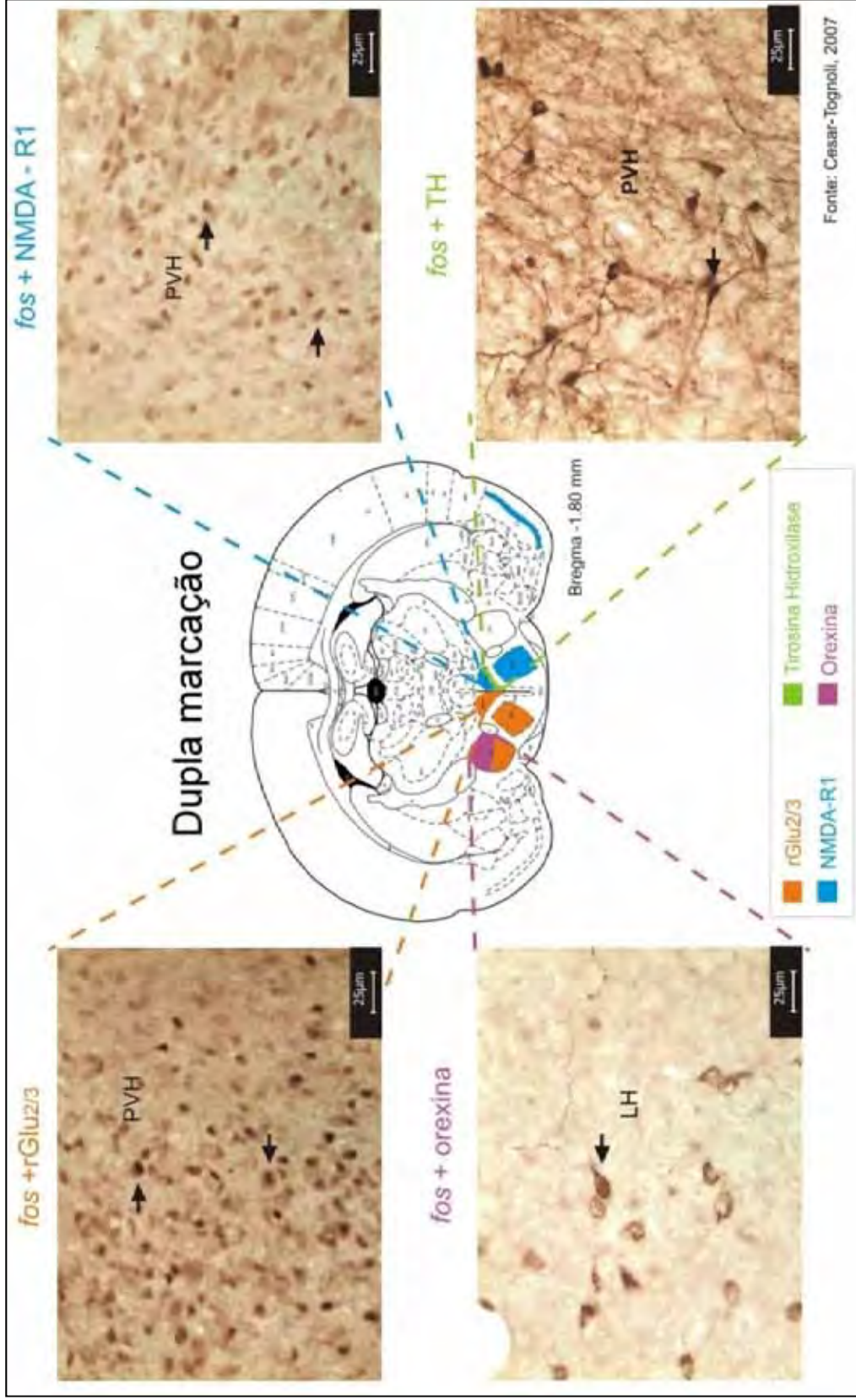
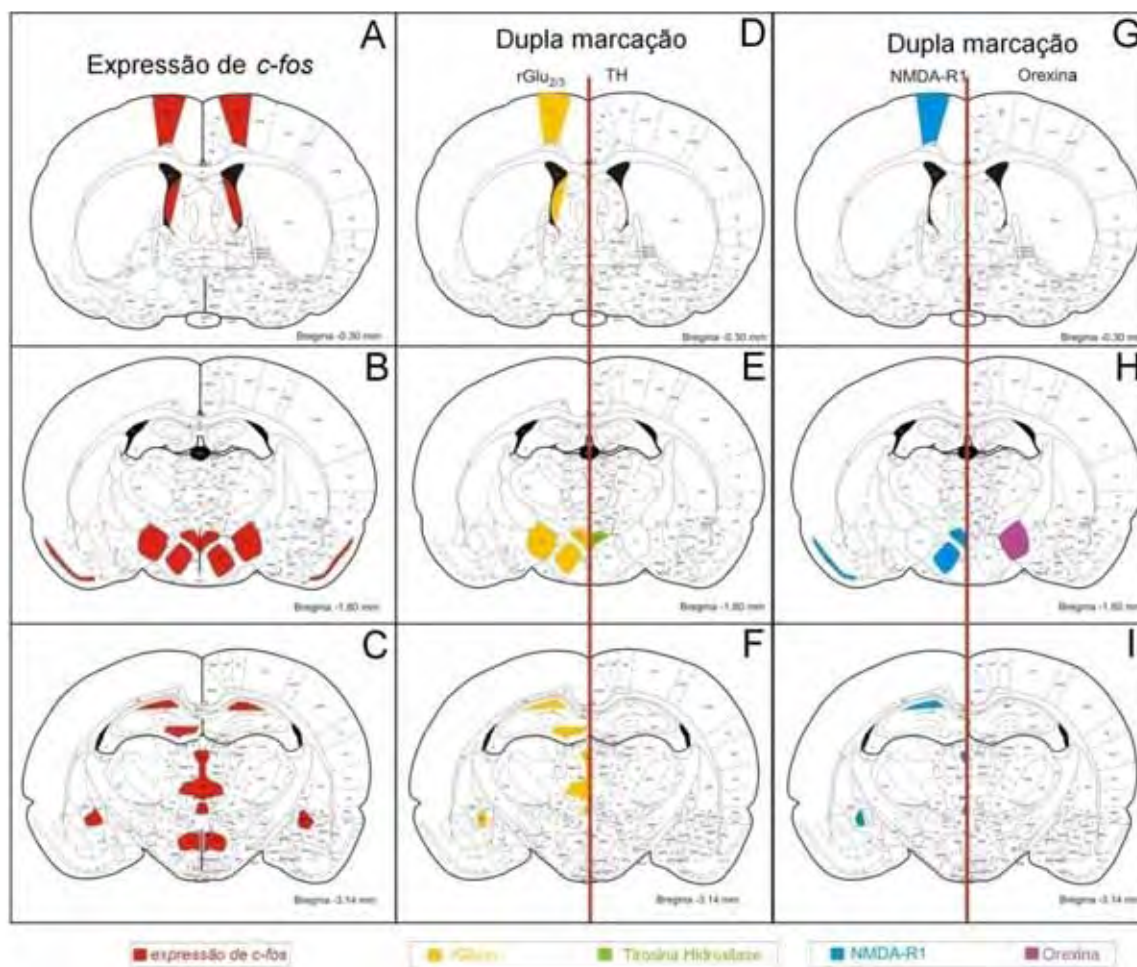
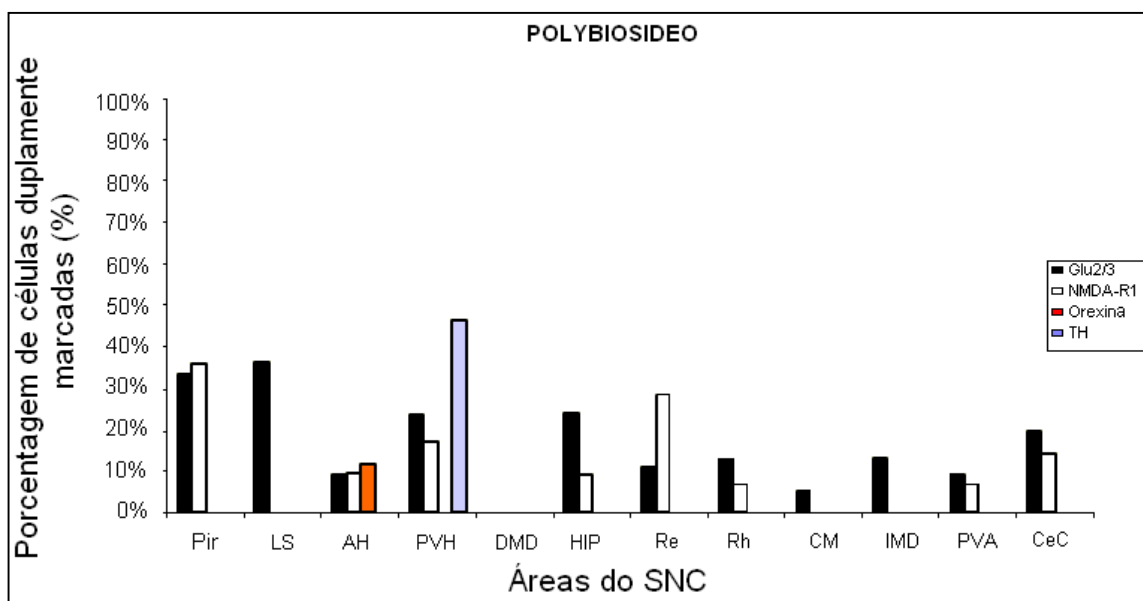


Figura 34- Ampliação dos detalhes da figura 33 mostrando esquematicamente as regiões duplamente marcadas na representação do centro da figura.



**Figura 35-** Esquema comparativo ilustrando as áreas que expressaram c-os e dupla marcação, após administração de Polybiosídeo (concentração 0,1 µg/µL). De A a C; Expressão de c-Fos (vermelho); de D a F: Co-localização da proteína c-Fos com receptores Glu2/3 (amarelo) e de NMDA-R1 (de G a I).



**Figura 36-** Representação das porcentagens de neurônios duplamente marcados encontrados nos animais tratados com Polybiosídeo (concentração 0,1 µg/µL). Abreviações: Pir- Córtex Piriforme; LS- Núcleo Septal Lateral; AH- Área Hipotalâmica; PVH- Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; DMD- Núcleo Dorsomedial; HP- Hipocampo; Re- Núcleo de Reuniens; Rh- Núcleo Rombóide; CM- Núcleo Central Medial; IMD- Núcleo Dorsal Intermedial; PVA- Núcleo Paraventricular do Tálamo; CeC- Núcleo Amigdalóide Central.

As duplas marcações foram observadas na maioria dos casos onde ocorreu a expressão de proteína c-Fos, podendo-se observar uma quantidade significativa de neurônios duplamente marcados conforme pode ser observado na síntese dos resultados mostrada na tabela 5.

**Tabela 5-** Porcentagem de neurônios duplamente marcados *fos/rGlu<sub>2/3</sub>*, *fos/NMDA-R1*, *fos/TH* e *fos-orexina*

Regiões	Glu2/3	NMR1	Orexina	TH
Córtex piriforme	33,6%	36,4%	-----	-----
Núcleo septal lateral	36,5%	-----	-----	-----
Área hipotalâmica	9,1%	9,6%	11,8%	-----
Núcleo paraventricular do hipotálamo	23,8%	17,5%	-----	46,7%
Núcleo dorsomedial do hipotálamo	-----	-----	-----	-----
Hipocampo	24,2%	9,1%	-----	-----
Núcleo reuniens	11,1%	28,6%	-----	-----
Núcleo rombóide	13,1%	7%	-----	-----
Núcleo centro medial	5,2%	-----	-----	-----
Núcleo intermédio dorsal	13,5%	-----	-----	-----
Núcleo paraventricular do tálamo	9,3%	7%	-----	-----
Núcleo central da amígdala	20%	14,5%	-----	-----

As regiões tracejadas indicam a inexistência de células duplamente marcadas

Analisando-se os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se notar que essa toxina agiu principalmente nas seguintes regiões:

- Córtex Piriforme que está relacionado ao sentido de olfato (HOFFMAN; HABERLY, 1996), através de receptores glutamatérgicos do sub-tipo AMPA, responsáveis por funções críticas de transmissão sináptica no SNC, e do sub-tipo NMDA, que são responsáveis por estímulos repetitivos e de longa duração no SNC (STONE, 1995).
  - Núcleo Septal Lateral, responsável por informações sensoriais, aprendizado e memória (ADAMS; MOGHADDAM, 2000), além de papéis na regulação da ansiedade e depressão (ESTRADA-CAMARENA et al., 2002) através de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.
  - Área Hipotalâmica Anterior, responsável por sintetizar e secretar neurohormônios, controlando a temperatura corpórea, fome, sede, fadiga, desejo sexual, raiva e ciclo circadiano (HARDLEY, LEVINE, 2007), principalmente através de receptores orexinérgicos responsáveis, principalmente, pela regulação do apetite (FLIER; MARATOS-FLIER, 1998) e glutamatérgicos do sub-tipo NMDA e AMPA.
  - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo é um dos mais importantes centros autonômicos no cérebro e é responsável pela regulação hormonal de diversos mecanismos como pressão sanguínea, taxa de batimentos cardíacos, controle do estresse, crescimento, reprodução, e outras funções autonômicas mais tradicionais como a gastrointestinal e renal (FERGUSON et al., 2008), marcado através de antígenos anti-Tirosina Hidroxilase que é uma enzima que participa da conversão do aminoácido L-tirosina para Dihidroxiifenilalanina (DOPA), que é um precursor da dopamina, que por sua vez é uma precursora de norepinefrina (noradrenalina) e epinefrina (adrenalina) (NAGATSU et al., 1964); aparentemente, isto sugere que o Polybiosideo pode agir em receptores DOPAminérgicos ao nível do núcleo paraventricular do hipotálamo, e essa região também foi marcada por receptores glutamatérgicos dos sub-tipos AMPA e NMDA.
-



- Hipocampo possui papel na memória de curta duração e navegação espacial além de um possível papel no controle da ansiedade (GRAY; MCNAUGHTON, 2000; SCOVILLE; MILNER, 1957), através de receptores glutamatérgicos dos sub-tipos AMPA e NMDA.

Existem alguns relatos na literatura de que a histamina altera a expressão de  $\beta$ -defensinas humanas do tipo 2 (HBD-2) em queratinócitos em cooperação com TNF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$ , através da ativação da expressão da proteína c-Fos induzida pela histamina (KANDA; WATANABE, 2007). Essas HBD-2 são peptídeos catiônicos com ação antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias gram-negativas que, além de serem encontrados em células epiteliais, também podem ser encontrados no sistema nervoso central de humanos (HAO *et al.*, 2001) e isso sugere que a histamina também possui um papel na defesa antimicrobiana tanto para infecções cutâneas como para as que ocorrem no SNC. Entretanto, não foram encontrados relatos sobre a indução por compostos similares a esse da expressão de proteínas c-Fos no SNC de mamíferos para comparação com os resultados obtidos aqui.

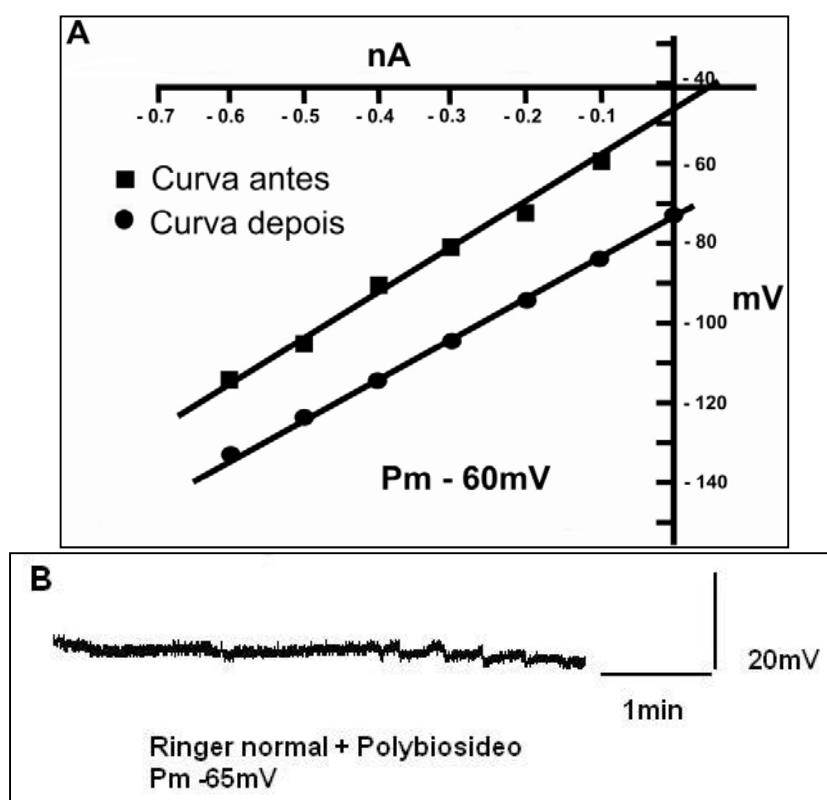
#### **4.3.1.3 Ensaios de Neurotoxicidade e Neuroproteção do Polybiosideo em Ratos Wistar**

Uma vez que foram identificadas as várias regiões do cérebro onde o Polybiosideo age, bem como foram identificados as naturezas farmacológicas de receptores nervosos, destas regiões, escolhemos uma delas (a região hipocampal), rica em receptores neuronais glutamatérgicos do sub-tipo NMDA (SALAMONI *et al.*, 2005), e desenvolvemos preparações da mesma para realização de ensaios de eletrofisiologia, voltados para estudos de mecanismo de ação do Polybiosideo.

Nos registros obtidos após a administração de aproximadamente 1 $\mu$ M do Polybiosideo, por perfusão desses neurônios com solução de Ringer normal, observou-se a ausência da atividade epileptiforme induzida por esse composto, conforme discutido a seguir.

---

A figura 37 A mostra a variação do potencial de membrana dos neurônios, em função da corrente aplicada, antes e depois do tratamento com Polybiosideo. Os resultados mostram uma grande linearidade entre essas variáveis, sendo que os valores limítrofes estão absolutamente dentro dos parâmetros normais em relação aos parâmetros de análise descritos por Salamoni et al. (2005), indicando que o Polybiosideo não causou qualquer dano aos neurônios; inclusive a curva controle do potencial intracelular não apresentou qualquer variação significativa. A figura 37 B mostra o registro intracelular do neurônio na presença de solução de Ringer normal contendo Polybiosideo na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , mostrando a não toxicidade do mesmo para neurônios hipocampais.

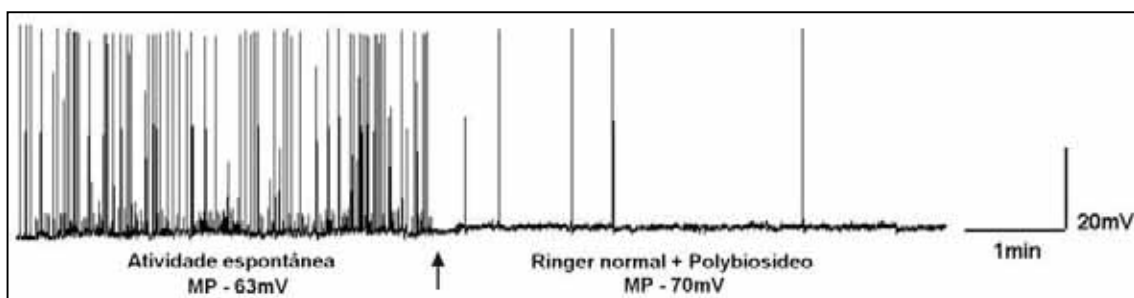


**Figura 37 A** - Rato controle: 60 dias de solução salina peso 200 g. Variação do potencial de membrana mostrando a viabilidade dos neurônios hipocampais em curva de voltagem x corrente antes e depois do tratamento com  $0 - \text{Mg}^{2+}$  e aplicação do Polybiosideo em tecido hipocampal de rato. **B** - Registro intracelular do neurônio na presença de solução de Ringer normal contendo Polybiosideo (concentração 1  $\mu\text{M}$ ).

Foram analisados também registros de perfusão dos neurônios com atividade espontânea normal (figura 38), e com atividade epileptiforme induzida pela perfusão com solução de Ringer, em ausência de íons  $Mg^{+2}$  (figura 39).

Nos registros obtidos, após a observação do padrão de descargas durante todo o registro eletrofisiológico de ambos os experimentos, os neurônios apresentaram uma forte redução tanto na atividade espontânea (Figura 38), como na atividade epileptiforme induzida (Figura 39), após a perfusão dos neurônios com o Polybiosideo, revelando um efeito neuroprotetor do mesmo. A lavagem e nova indução da atividade epileptiforme permitiram verificar a reversibilidade desta ação.

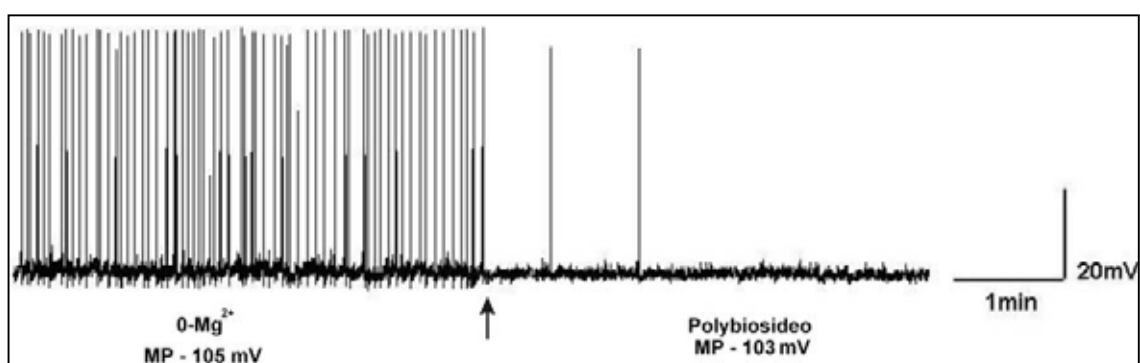
Para uma melhor compreensão destes efeitos deve-se considerar que quando da abertura dos canais de íons  $Ca^{+2}$  regulados por receptores de Glutamato (do sub-tipo NMDA), ocorre um influxo de íons  $Ca^{+2}$  para o interior do neurônio; o efeito eletrofisiológico observado é de aumento da intensidade do potencial registrado. Isso ocorre espontaneamente várias vezes a cada unidade de tempo. Quando o canal de íons  $Ca^{+2}$  se fecha, ocorre o efluxo de íons  $Na^{+}$ , reduzindo o potencial de membrana. Desta maneira, o registro normal revela uma série de picos que representam os aumentos e diminuições de potencial (SALAMONI et al., 2005). Considerando-se os resultados obtidos, pode-se sugerir que a adição de Polybiosideo ao meio de perfusão bloqueie a abertura dos canais de íons cálcio, eliminando a grande maioria dos picos (figura 38).



**Figura 38-** Registro intracelular dos neurônios hipocâmpais de CA1 na atividade espontânea, na ausência e presença de Polybiosideo (concentração 1  $\mu M$ ).

O registro da figura 39 mostra o funcionamento do mesmo sistema de neurônios, na ausência de íons  $Mg^{+2}$ , o que causa a perda da capacidade regulatória dos receptores de Glutamato, que por sua vez, causam a abertura

quase que permanente dos canais de  $\text{Ca}^{+2}$ ; o resultado disso é a ocorrência de um número muito maior de picos (de aumento de potencial), que aquele observado no funcionamento espontâneo dos neurônios (figura 38). O composto Polybiosideo, quando presente na solução de Ringer (na ausência de íons  $\text{Mg}^{+2}$ ), bloqueia fortemente este funcionamento anormal (epileptiforme) dos neurônios. Portanto, sugerimos aqui que Polybiosideo possa ser considerado um potente agente anti-epiléptico, quando ensaiado *in vitro*.



**Figura 39-** Registro intracelular de neurônios hipocâmpais de CA1 na atividade epileptiforme induzida, na ausência e presença de Polybiosideo (concentração 1  $\mu\text{M}$ )

Polybiosideo possui uma molécula de  $\alpha, \beta$  piranose ligada a um grupo imidazolil propanimidato e, portanto, para melhor compreensão dos resultados obtidos até agora, é importante a compreensão do papel de compostos similares a histamina e imidazolinicos na neuromodulação do Sistema Nervoso Central.

Em experimentos com indução de epilepsia pela remoção de íons Magnésio em neurônios hipocâmpais de ratos, realizados por Skaper et al. (2001), foi demonstrado que a histamina proveniente de mastócitos pode aumentar diretamente a sensibilidade dos neurônios hipocâmpais à toxicidade por excitação mediada sinápticamente, envolvendo receptores NMDA, potencializando significativamente a morte celular dos neurônios nessas condições de hiperexcitabilidade (SKAPER et al., 2001). Essa ativação de receptor ocorre presumivelmente em sítios sinápticos, que de acordo com esses autores podem estar relacionados a eventos que ocorrem no *status epilepticus* (SKAPER et al., 2001). Dessa forma, a histamina pode causar um aumento mais duradouro da

população de sinais no registro eletrofisiográfico e pode facilitar a indução de uma potenciação de longo termo em fatias de hipocampo de roedores. A histamina não causou danos em condições normais com a presença de íons Magnésio (SKAPER et al., 2001).

Os resultados obtidos pelos autores supracitados, se comparados com os obtidos no presente trabalho, sugerem que o composto Polybiosideo apesar de conter uma molécula similar a histamina em sua estrutura, possui o efeito de diminuição da população de sinais no registro eletrofisiográfico, o oposto do que foi descrito na literatura para a molécula de histamina sozinha, demonstrando uma ação direta deste nos receptores glutamatérgicos do sub-tipo NMDA, bloqueando tanto a atividade espontânea como a atividade epileptiforme induzida.

Geralmente, de maneira oposta aos resultados obtidos por Skaper et al., (2001) para neurônios hipocâmpais, contendo receptores glutamatérgicos do sub-tipo NMDA, as ações eletrofisiológicas da histamina antagonizam as oscilações rítmicas lentas e sincronizadas ou o disparo hiperativo de neurônios talamo-corticais levando a uma atividade de pico único. A atividade de pico único é devida à função de transmissão de sinais sensoriais, influenciando a atividade corticotalâmica ascendente e descendente, enquanto, a atividade de disparo hiperativo está relacionada com algumas funções cerebrais, tais como o sono de ondas curtas e patologias como as crises epiléticas relacionadas aos neurônios corticais (SANGALLI, 1997).

Os neuromoduladores ascendentes como a histamina, bloqueiam a atividade neuronal sincronizada, para que seja possível acordar do sono e a ativação desses sistemas sincronizados está relacionada aos disparos sincronizados dos neurônios. Esse mecanismo é consistente também com a indução de sono e ao efeito pró-convulsivante de anti-histamínicos que atuam como antagonistas no receptor H1 (SANGALLI, 1997).

Além de relatos como esses acima, para compostos antagonistas no receptor histaminérgico de H1, também existem relatos de convulsões neurotóxicas induzidas por antagonistas no receptor histaminérgico H2, como a cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina quando injetados via icv no cérebro de

---

camundongos. Nesse experimento, foi observada uma dose-dependência de convulsões tônicas e/ou clônicas com os valores de ED<sub>50</sub> de 997, 662, 23,4 e 404 nmol para cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina, respectivamente (SHIMOKAWA et al., 1996).

Outro dado relevante, para este trabalho, está relacionado ao fato de que algumas drogas imidazolínicas exercem efeitos neuroprotetores em modelos de isquemia cerebral e também possuem efeitos contra morte neuronal cerebelar de ratos, induzidas por bloqueio de correntes de NMDA, e esse efeito neuroprotetor pode estar de acordo com os dados obtidos no presente trabalho. Uma dessas drogas, a Antazolina, reduziu a neurotoxicidade mediada por NMDA em culturas de neurônios hipocâmpais de ratos e em um modelo in vitro de *status epilepticus* induzido por pilocarpina, diminuindo a neurotoxicidade mediada por NMDA e também bloqueando a corrente voltagem-dependente de NMDA com ação rapidamente reversível (MILHAUD et al., 2003).

#### 4.3.2 FRAÇÃO 2

Após comparação dos dados de espectroscópicos (tempo de retenção, RMN, MS e MS/MS) obtidos para a fração 2 do veneno da vespa social *P. paulista* (Anexo II, figuras A5 e A6), com os dados obtidos para fração 1-4 do veneno da vespa *A. p. pallipes*, concluiu-se que o composto encontrado da fração 2 do veneno de *P. paulista* trata-se Histamina.

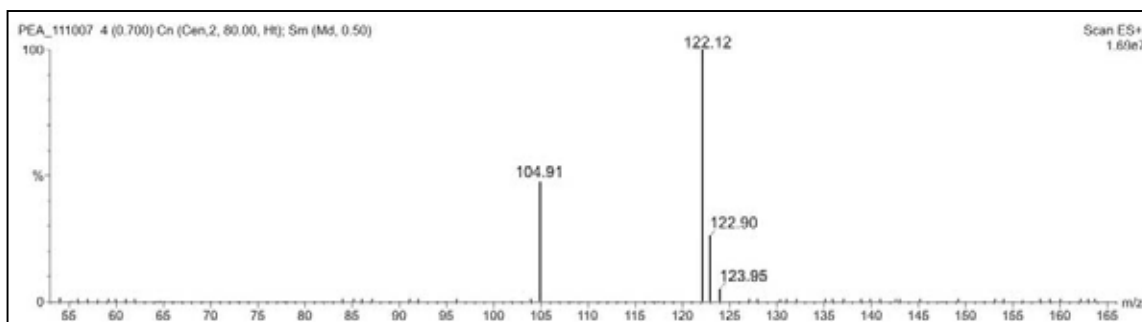
#### 4.3.3 FRAÇÃO 5

A fração 5 (1 mg total) do veneno de *P. paulista* também foi analisada pela abordagem escolhida nesse trabalho, pois foi obtido aproximadamente 1mg de componente puro da mesma, não necessitando de re-fracionamento.

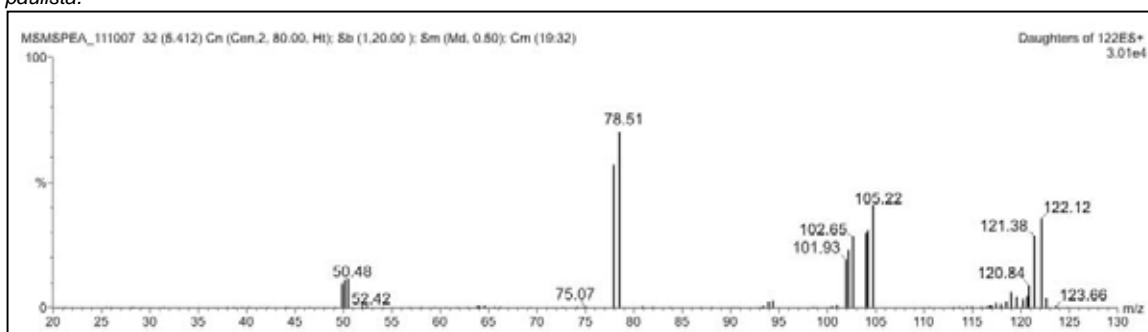
Através da técnica de ESI-MS foi determinado que este composto possui m/z de 122 na forma de  $[M + H]^+$  (figura 40) e a fragmentação do mesmo, através da

---

técnica ESI-MS/MS revelou os íons-fragmentos de  $m/z$  104.90 e 78.51 a partir do íon molecular (figura 41).



**Figura 40-** Espectro de massas ESI\_MS obtido no modo positivo da Fração 5 do extrato de veneno da vespa social *Polybia paulista*.



**Figura 41-** Espectro de massas ESI-MS /MS obtido no modo positivo da Fração 5 do extrato de veneno da vespa social *Polybia paulista*.

Em seguida às análises por espectrometria de massas, esse composto foi analisado por  $^1\text{H}$  RMN (figura 42) onde se pôde observar os seguintes sinais:

- Um Tripleto em 3,02 ppm com  $J= 2,0$  Hz (ampliação na figura 43)
- Um Tripleto em 3,3 ppm com  $J= 2,0$  Hz (ampliação na figura 43)
- Dois multipletos em 7,4 e 7,35 ppm

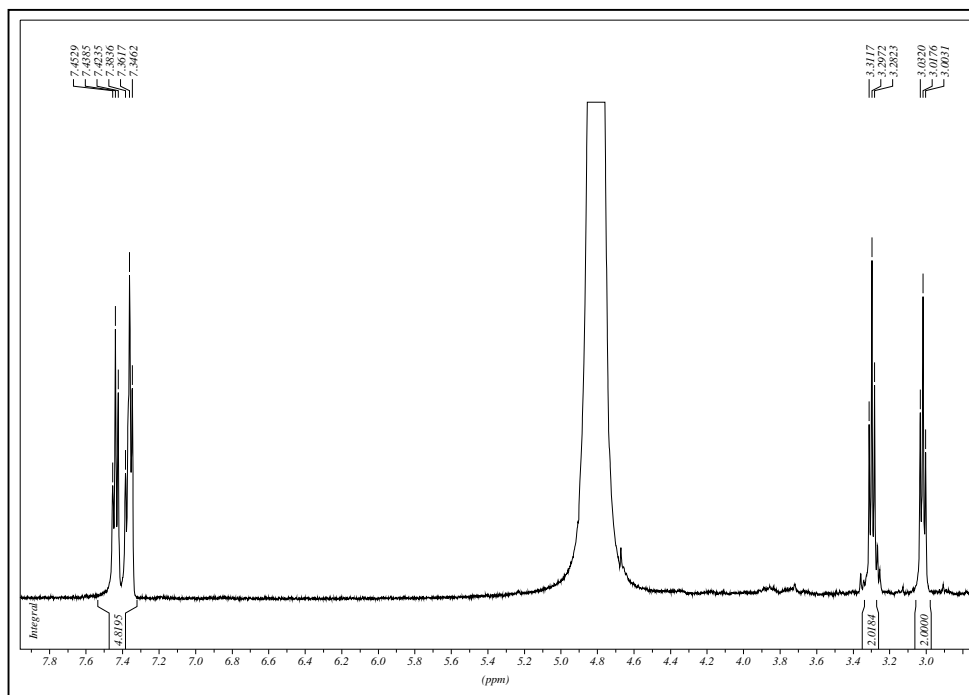
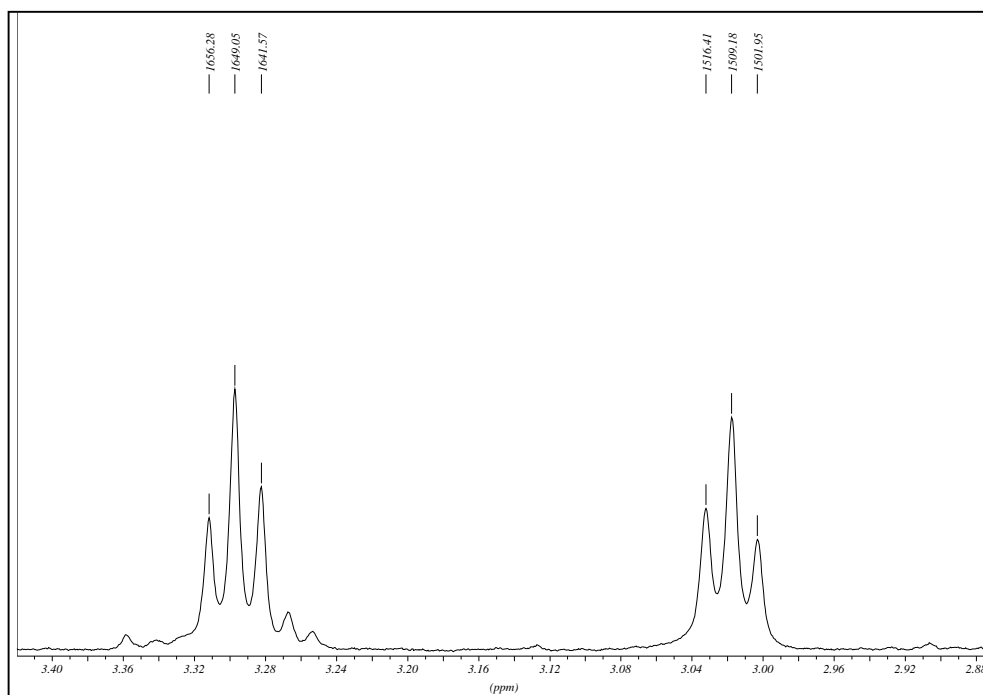
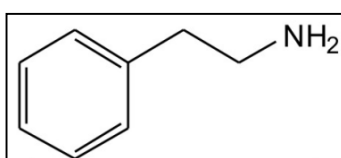


Figura 42- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H em D<sub>2</sub>O da fração 5 do veneno da vespa social *Poybia paulista*

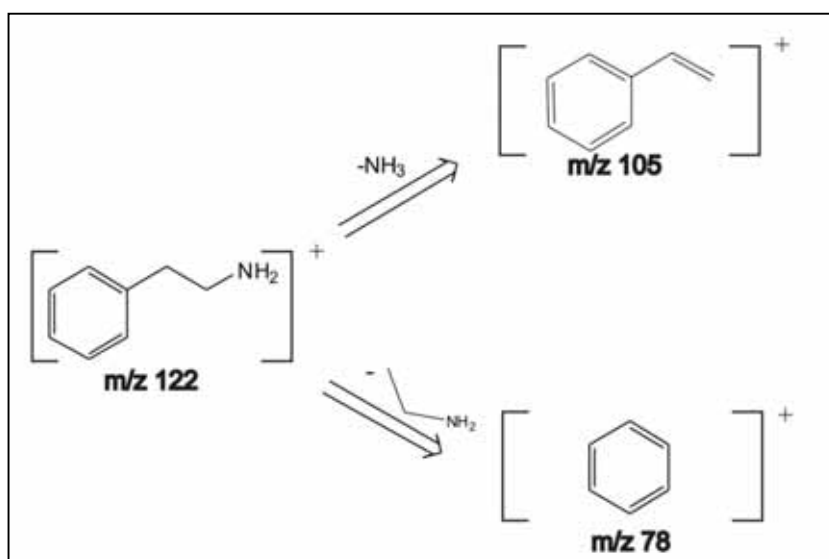




presença de um grupo mais eletronegativo ligado a um dos grupos CH<sub>2</sub> vizinhos e os multipletos, na região de 7,4 ppm, sugerem a presença de um anel benzênico na estrutura. Com base nos dados obtidos por <sup>1</sup>H RMN e da comparação dos δ dos sinais obtidos com os da literatura (ABEL *et al.*, 1999), juntamente com o padrão de fragmentação deste composto, foi possível concluir que esse composto é a 2-feniletilamina (FEA) (figura 44), cujo esquema de fragmentação está representado no esquema 4.



**Figura 44-** Estrutura química proposta para o composto presente na fração 5 do veneno da vespa *P. paulista*: 2-Feniletilamina



**Esquema 4-** Esquema de fragmentação da 2-Feniletilamina obtida da fração 5 do veneno da vespa social *Polybia paulista*

Esse composto foi isolado do veneno de vespas pela primeira vez em 1986 a partir das vespas *Paravespula vulgaris* e *Paravespula germanica* (SCHRADER *et al.*, 1986) e, mais recentemente, foi isolado de formigas do gênero *Messor* encontradas na região de Israel (CRUZ-LOPES *et al.*, 2006), porém a sua função em venenos animais permanece não esclarecida.

A FEA é uma amina endógena em mamíferos, relacionada às anfetaminas que é sintetizada pela descarboxilação da fenil-alanina em neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal e pode agir como um neuromodulador na neurotransmissão da catecolamina no cérebro de mamíferos (BARROSO; RODRIGUES, 1996). A feniletilamina não é armazenada em vesículas intraneuronais e é rapidamente degradada pela enzima Monoamino Oxidase B (MAO B). Apesar de sua meia vida curta, a feniletilamina tem chamado a atenção como uma anfetamina endógena, pois pode potencializar a neurotransmissão catecolaminérgica e induzir hiper-reatividade estriatal (JANSSEN et al., 1999).

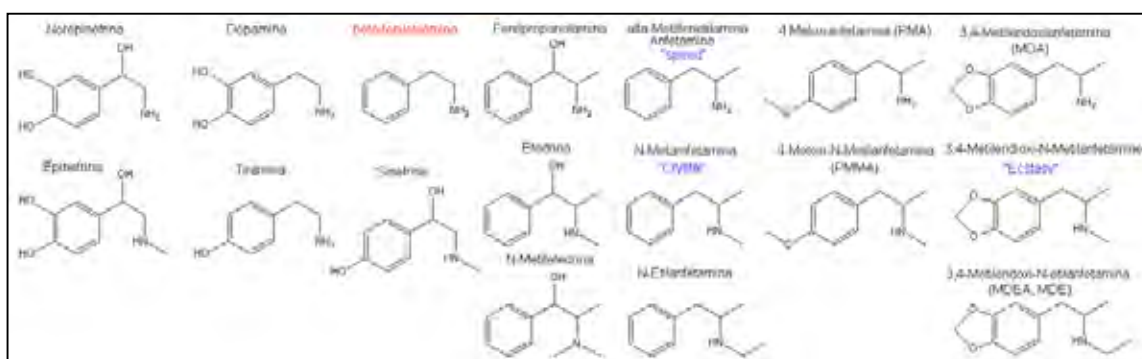
O mau funcionamento do sistema dopaminérgico está envolvido em algumas desordens mentais como a depressão (LANDÉN; THASE, 2007). A 2-FEA aumenta os níveis extracelulares de dopamina e outras monoaminas no SNC, enquanto que ao mesmo tempo inibe o disparo de neurônios dopaminérgicos (ISHIDA et al., 2005); essa substância também modula a transmissão noradrenérgica, sendo uma substância simpatomimética (PATERSON, 1993) e também é um antagonista em receptores GABAérgicos, além de diminuir potenciais inibitórios sinápticos em neurônios do SNC, confirmando seu papel como neuromodulador (FEDERICI et al., 2006). Baixos níveis desse neuromodulador são encontrados em casos de depressão e desordem de déficit de atenção (BAKER et al., 1991) e altos níveis são encontrados em quadros de esquizofrenia (POTKIN et al., 1979), estando associado com baixa dopamina na desordem de déficit de atenção e depressão e alta dopamina em esquizofrenia.

Também foi relatado na literatura que as concentrações de 2-FEA no líquido cérebro-espinhal (CSF) em pacientes com doença de Parkinson, que é causada por uma degeneração neuronal nigroestriatal progressiva, foram significativamente menores do que em pacientes com neuropatia periférica e controles (ZHOU et al., 1997).

As anfetaminas e outras drogas similares a feniletilamina estão entre as drogas de abuso mais comuns, e muitos dos seus efeitos comportamentais estão relacionados com os efeitos dessas substâncias na neurotransmissão dopaminérgica, facilitando-a e principalmente aumentando o efluxo de dopamina a

---

partir de um único pool citoplasmático. Foi relatado que anfetamina, tirosina, feniletilamina e octopamina possuem efeitos qualitativamente similares sobre a liberação de Dopamina endógena e [ $^3\text{H}$ ] Dopamina. A inibição de enzimas Monoamino oxidases (MAO) potencializou esses efeitos (PARKER; CUBEDDU, 1988). A figura 45 resume alguns dos principais compostos derivados da 2-feniletilamina.



**Figura 45-** Principais compostos derivados da 2-feniletilamina (modificado de [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Overview\\_Phenethylamines.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Overview_Phenethylamines.png))

A ligação específica de (+)-[ $^3\text{H}$ ] anfetamina ao hipotálamo é altamente confinada a membranas sinaptossomais, rapidamente reversível, e sensível ao calor e enzimas proteolíticas com dois possíveis sítios de ligação determinados por análise de Scatchard de equilíbrio de ligação (PAUL et al., 1982). Também foi demonstrado que os sítios de ligação não estão relacionados com receptores previamente descritos para neurotransmissores ou drogas, mas são específicos para anfetamina e derivados da feniletilamina (PAUL et al., 1982). As afinidades relativas de uma série de derivados da feniletilamina para sítios de ligação de (+)-[ $^3\text{H}$ ] anfetamina nas membranas hipotalâmicas estão altamente correlacionados com seus potenciais como agentes anoréxicos, sugerindo a presença de sítios específicos no hipotálamo que regulam a atividade anoréxica da anfetamina e drogas relacionadas (PAUL et al., 1982).

Investigações mais recentes também indicam que altas concentrações de Dopamina podem inibir respostas mediadas por receptores NMDA pelo bloqueio de canal do receptor de NMDA e devido a similaridade estrutural de dopamina e

anfetaminas, foi possível determinar que a anfetamina também pode atuar como um antagonista de respostas mediadas por receptores NMDA *in vitro* por dois mecanismos diferentes, provavelmente, através da interação direta com dois diferentes sítios de ligação nesse complexo receptor/canal (YEH et al., 2002)

Considerando-se as atividades já descritas na literatura para esse composto, pode-se sugerir que seu papel na autodefesa de vespas sociais contra predadores, que na maior parte dos casos são vertebrados, seja o de potencializar o pânico, desorientação, taquicardia, entre outros efeitos já descritos para o veneno de vespas sociais em mamíferos. Estas ações devem se somar ao conjunto de outras ações já conhecidas dos venenos de vespas sociais, que em conjunto não são letais, porém causam um grande desconforto físico às vítimas de ferroadas compondo a chamada “defesa mneumônica”, fazendo com que muitas pessoas e animais desenvolvam uma fobia incontrolável em relação a esses insetos (SCHIMIDT, 1986). Esses sintomas devem aumentar o efeito “traumático” desses venenos, quando em conjunto com os outros efeitos causados pelo coquetel de toxinas presentes nesses venenos, aumentando o sucesso de autodefesa da colônia.

Devido a pouca quantidade de material disponível no veneno para obtenção de atividades biológicas, esse composto foi adquirido em sua forma comercial da Sigma-Aldrich Chem. Co., para a realização de ensaios biológicos.

---

#### 4.3.3.1. Determinação da Atividade Biológica do Composto Obtido da Fração 5 (2-feniletilamina) do Veneno da Vespa Social *Polybia paulista*: Eensaio de Toxicidade em Abelhas

Após a aplicação deste composto na hemocele das abelhas pôde-se notar um aumento da atividade das mesmas, que ficaram hiperativas em relação ao grupo controle. Depois de 15 minutos da aplicação, foi observado que todas as abelhas dos grupos 1 e 2 (110 ng/mg e 70 ng/mg) ficaram sem capacidade de coordenar seus movimentos, com a região ventral voltada para cima e a proboscide para fora. Este efeito durou por aproximadamente 6 horas, enquanto as abelhas dos grupos 3, 4 e 5 (50ng/mg, 30 ng/mg, 10 ng/mg) apresentaram 60%, 40% e 20% desse efeito, que durou 3 horas, 2 horas e 45 minutos, respectivamente. O valor de ED<sub>50</sub> determinado para essas abelhas após 15 minutos foi de  $64,77 \pm 5,47$  ng/mg (n=3) de abelha (figura 46). Este resultado foi estatisticamente significativo se comparado com o grupo controle (salina) através do teste t-student ( $p < 0,05$ ). Comparando-se os efeitos da 2-FEA com dados da literatura em relação aos efeitos da toxina PWTX-I (alcalóide da família das tetrahydro- $\beta$ -carbolinas) (SAIDEMBERG et al., 2009), pode-se notar que a 2-FEA possui um efeito de paralisia na mesma faixa que a toxina alcalóide (ED<sub>50</sub>= 33 ng/mg para o enantiômero (-) PWTX-I).

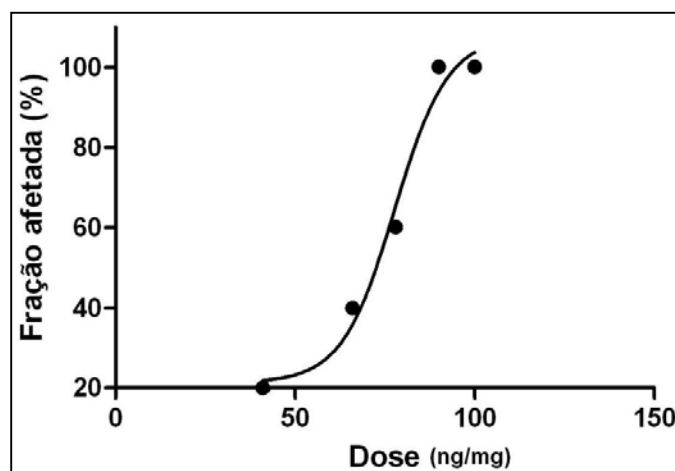


Figura 46- Curva de Dose-Efeito para a 2-FEA em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*).

#### 4.3.3.2 Bioensaios das Atividades Tóxicas da Feniletilamina em Microcrustáceos *Daphnia similis*

Como não foi possível detectar letalidade, mesmo com altas concentrações de 2-feniletilamina, por injeção na hemocele de abelhas africanizadas, optamos por um ensaio realizado com o microcrustáceo *Daphnia similis* que é muito sensível à presença de substâncias tóxicas em seu meio ambiente e, portanto, é geralmente empregado para se avaliar a toxicidade de efluentes sobre a vida aquática (GUIMARÃES, 2004), que em muitos casos, incluem substâncias inseto-tóxicas. No caso desse trabalho esse ensaio foi adaptado para se avaliar a letalidade/toxicidade desse composto. As seguintes concentrações foram testadas no meio de cultura do microcrustáceo *Daphnia similis* nas concentrações de 70 µg/mL, 50 µg/mL, 30 µg/mL, 10 µg/mL e um grupo controle, por um período de 48 horas a fim de se estabelecer a dose letal para 50 % dos organismos testados.

Tabela 6- Resultado da determinação da dose letal para 50% (DL<sub>50</sub>) em um período de 48 horas para o microcrustáceo *D. similis*.

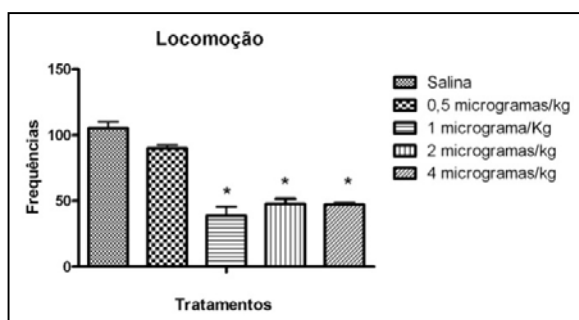
Amostra	DL <sub>50</sub> (µg/mL) 48h	UT = 100/DL <sub>50</sub> 48h
Feniletilamina	*inferior 30	3,4
	42	2,4
	*superior 59	1,7

\*Limite de confiança a 95%. Método: Ensaio adaptado a partir da norma CETESB L5.0018 (1991) e NBR ABNT 12713 (2004).

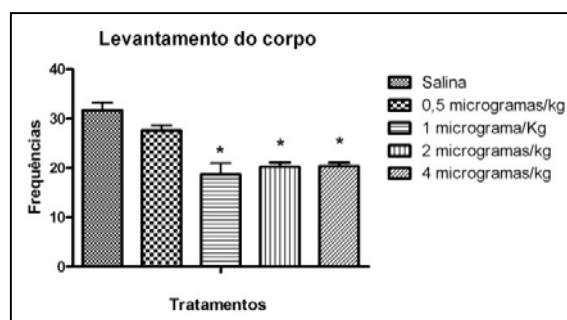
Analisando-se os resultados obtidos na tabela 6 pôde-se confirmar que a 2-feniletilamina somente é letal para invertebrados em altas concentrações, quando comparado com dados da literatura para ensaio de atividades tóxicas com microcrustáceos do mesmo gênero, em relação aos compostos bifenil polibrominado e difenil éter polibrominado (NAKARI; HUHTALA, 2008) e outros compostos como Poliamidoamina (PAMAM) (NAHA et al., 2009), que apresentam toxicidade frente ao micro-crustáceo na faixa de concentrações da ordem de µg/L; Isto indica que, a 2-FEA é aproximadamente, 1000 vezes menos potente que os compostos considerados como tóxicos pela literatura.

#### 4.3.3.3 Avaliação da Atividade Geral de Ratos Wistar por Campo Aberto Após Injeção de 2-FEA

Uma vez que o composto 2-feniletilamina pode induzir depressão e ansiedade, e drogas similares a 2-FEA como norepinefrina e dopamina que, também possuem esta propriedade, podem produzir alterações na atividade motora dos animais (SOCHA et al., 2008), foi nosso objetivo avaliar se a 2-FEA, acarretaria alteração desta atividade e, para isso, foram testadas as doses de 0,5, 1, 2 e 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Observamos que 30 minutos após o tratamento, a 2-FEA, acarretou alteração na freqüência de locomoção (Figura 47) e de levantamento do corpo, apoiado nos membros traseiros (Figura 48) dos animais, quando comparado aos animais controles, tratados com salina. Por outro lado, 2 horas após a administração do composto já não foi mais observado nenhuma alteração nos parâmetros de freqüência de locomoção e levantamento do corpo (resultados não mostrados).



**Figura 47** - Efeito da 2-feniletilamina sobre a atividade locomotora dos ratos 30 minutos após a administração i.p.; \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado com salina (controle).

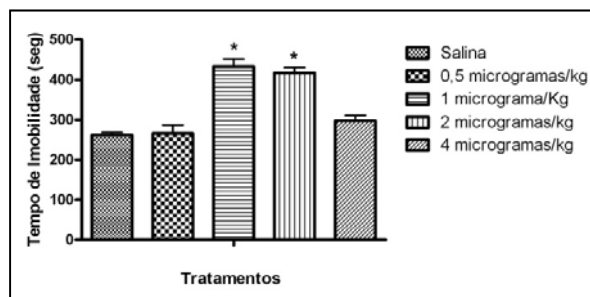


**Figura 48** - Efeito da 2-feniletilamina sobre a atividade de levantamento corporal dos ratos 30 minutos após a administração i.p.; \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado com salina (controle).

As freqüências de Locomoção (Figura 47) e Levantamento (Figura 48) foram avaliados no Campo Aberto, por um período de 9 minutos de observação, 30 minutos após a administração i.p. da 2-FEA (0,5, 1, 2 e 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). O grupo controle foi composto por animais que receberam salina (S), nas mesmas condições experimentais. Os dados representam a média  $\pm$  e.p.m. de 10 animais por grupo. \*

$P < 0,05$  em relação ao grupo controle com salina (ANOVA, Bonferroni). Pode-se notar após 30 minutos, que esse composto apresenta um potente efeito de diminuição da locomoção e de levantamento, nas concentrações de 1, 2 e 4  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  em relação ao grupo controle com salina. Além disso, não foi observado o desenvolvimento de catatonia nos animais para nenhuma das concentrações testadas. Também foi observado um aumento dessas atividades a partir da concentração de 6  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , após 30 minutos de administração i.p. (resultado não mostrado). Esses resultados apresentaram-se aproximadamente 1000 vezes mais potentes que aqueles geralmente apresentados na literatura, para compostos como canabinóides, que induzem redução de atividade motora na faixa de concentrações de  $\text{mg}/\text{Kg}$  (LONG et al., 2009).

A figura 49 mostra o aumento do tempo de imobilidade dos ratos tratados com 2-FEA nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  30 minutos após a administração. Pode-se notar que os ratos ficaram imóveis por um período maior de tempo nas concentrações de 1 e 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle com salina (ANOVA, Bonferroni).



**Figura 49** - Efeito da 2-feniletilamina sobre o tempo de imobilidade dos ratos 30 minutos após a administração i.p.; \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo tratado com salina (controle).

A 2-FEA possui um grande potencial de aplicações médicas, como agente “relaxante” nas concentrações testadas; Entretanto, isto exigiria um aprofundamento na caracterização farmacológica deste composto.

---



#### 4.3.4 FRAÇÃO 6

Comparando-se os tempos de retenção, absorção máxima no espectro UV e os dados espectroscópicos desta fração (tempo de retenção, espectro UV e MS/MS presentes no Anexo II, figuras A7 e A8) com aqueles obtidos para o veneno de *A. p. pallipes*, pode-se verificar que a fração 6 do veneno da vespa *P. paulista* também trata-se da Serotonina.

---

## 5 CONCLUSÕES

Os venenos de vespas sociais são ricos em compostos biologicamente ativos, principalmente direcionados ao sistema nervoso central e periférico, onde geralmente atuam com grande potência, mesmo em baixas concentrações, o que é condizente com os acentuados sintomas apresentados pelas vítimas de ferroadas desses pequenos animais. Porém, até recentemente, as pequenas quantidades de compostos obtidos a partir de venenos de vespas e a sensibilidade de algumas técnicas analíticas como a espectrometria de RMN, disponíveis para o estudo de tão baixas quantidades de material biológico se constituem uma dificuldade a ser enfrentada em estudos como esse.

Apesar dessa dificuldade, considerando a abordagem experimental utilizada na presente investigação, foi possível identificar alguns dos compostos de baixas massas moleculares mais abundantes nos venenos das vespas sociais *A. p. pallipes*, *A. vicina* e *P. paulista*, como por exemplo, a Histamina e a Serotonina, que são comuns aos venenos das três espécies de vespas sociais estudadas.

Também foi isolada e caracterizada a 2-feniletilamina, isolada a partir do veneno da vespa *P. paulista*. Esta substância é da família das anfetaminas, e possui efeitos estimulatórios no SNC, principalmente relacionados à facilitação da neurotransmissão dopaminérgica, e principalmente aumentando o efluxo de dopamina (PARKER, CUBEDDU, 1988); o presente estudo também demonstrou que este composto causou paralisia do SNC de abelhas africanizadas., provavelmente, por hiper-excitação. Também foram observados efeitos de redução de locomoção e levantamento do corpo, apoiando-se nas patas posteriores em ratos, nas concentrações de 2 e 4  $\mu\text{g/Kg}$  e, um aumento dessas atividades na concentração de 6  $\mu\text{g/Kg}$ , após 30 minutos de administração i.p., sendo que o efeito cessa após 2 horas da administração i.p. Resultado muito interessante, principalmente devido ao grande efeito do composto em baixas concentrações.

Além destes compostos, também foi identificado um novo tripeptídeo do veneno da vespa *A. vicina*, de sequência Gly-Leu-Leu-OH, cuja função ainda não é

---

conhecida; a síntese e ensaios biológicos do mesmo serão realizados em um projeto paralelo e este.

Foi ainda isolado e caracterizado um novo composto partir do veneno de *P. paulista*, o Polybiosideo, que atua no hipotálamo, hipocampo, núcleo septal lateral, núcleo paraventricular do hipotálamo e córtex motor do cérebro de ratos, sendo que algumas dessas áreas podem estar relacionadas aos mecanismos de repostas ao estresse e ansiedade. Nestas regiões, o sítio de ação parece estar associado aos receptores de glutamato do sub-tipo AMPA-Glu<sub>2/3</sub> e NMDA-R<sub>1</sub>. Os ensaios de eletrofisiologia com neurônios hipocampais da região CA1 que são ricos em receptores glutamatérgicos do sub-tipo NMDA, envolvidos em condições fisiológicas importantes como aprendizado e memória e também com algumas patologias como a epilepsia (STONE, 1995), sugerem um caráter neuroprotetor para o Polybiosideo. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o Polybiosideo é um antagonista de neurotransmissores em receptores de glutamato do sub-tipo NMDA, de modo a fechar dos canais de íons Ca<sup>2+</sup>, e assim sejam capazes de bloquear as crises epileptogênicas observadas nos experimentos de eletrofisiologia *in vitro*.

A possibilidade de associar mapeamento de ação da Polybiosideo por meio de técnicas imunohistoquímicas a ensaios eletrofisiológicos contribuiu para caracterizar a atividade de mais um composto químico isolado do veneno de vespas sociais, no SNC de mamíferos e abre caminho para novos estudos similares no futuro.

Desta maneira, o presente projeto alcançou os objetivos inicialmente almejados para o mesmo, identificando e caracterizando estrutural e funcionalmente alguns compostos naturais de baixas massas moleculares, presentes nos venenos de espécies de vespas sociais, autóctones da fauna do Estado de São Paulo. Contribuindo, dessa forma, com seu objetivo maior dentro do Programa BIOprospecTA/FAPESP, na prospecção venômica de Artrópodes peçonhentos: investigar e caracterizar estrutural e funcionalmente novos compostos naturais, com potencial de se tornar no futuro uma composto-modelo para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de bloquear crises epileptogênicas.

---

## 6 BIBLIOGRAFIA

ABEL, C. B. L.; LINDON, J. C.; NOBLE, D.; RUDD, B. A. M.; SIDEBOTTOM, P. J.; NICHOLSON, J. K. Characterization of metabolites in intact *Streptomyces citricolor* culture supernatants using high resolution Nuclear Magnetic Resonance and directly coupled High Pressure Liquid chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Analytical Biochemistry.**, v. 270, p. 220-230, 1999.

ADAMS B. W.; MOGHADDAM, B. Tactile stimulation activates dopamine release in the lateral septum. **Brain Research.**, v. 858, n.1, p. 177-180, 2000.

ADAMS, M. E.; HEROLD, E. E.; VENEMA, V. J. Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. **Journal of Comparative Physiology A.** v. 164, p. 333-342, 1989.

AGHAJANIAN, G. K. SANDERS-BUSH, E. Serotonin. In: DAVIS, K. L.; CHARNEY, D.; COYLE, J. T.; NEMEROFF, C. **Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.** American College of Neuropsychopharmacology, p.15-34, 2002.

ALCOCK, J. **Animal Behaviour: An evolutionary approach.** 6. ed. Sinauer Associates, Inc., 1998.

BARROSO, N.; RODRIGUES, M. Action of B-phenylethylamine and related amines on nigrostriatal dopamine neurotransmission. **European Journal of Pharmacology**, v. 297, n.3, p. 195-203, 1996.

---

ATTYGALLE, A. B.; MCCORMICK, K. D.; BLANKESPOOR, C. L.; EISNER, T.; MEINWALD, J. Azamacrolides: A family of alkaloids from the pupal defensive secretion of a ladybird beetle (*Epilachna varivestis*), **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 90, p. 5204 – 5208, 1993.

BAKER, G. B.; BORNSTEIN, R.A.; ROUGET, A. C.; ASHTON, S. E.; VAN MUYDEN, J. C.; COUTTS, R. T. Phenylethylaminergic mechanisms in attention-deficit disorder. **Biological Psychiatry**. v. 29, n.1, p.15-22, 1991.

BECK, C. H.; FIBIGER, H. C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-fos*: with and without diazepam pretreatment. **Journal of Neuroscience**. v.15, p.709 a 720,1995.

BERNSTEIN, K. Neurogen drug deal with Pfizer. **BioWorld Today**, 10/02/1992.

Disponível em:

<[http://www.bioworld.com/servlet/com.accumedia.web.Dispatcher?next=bioworldToday\\_currentIssue&issueId=3886&prodID=4&month=02&year=1992](http://www.bioworld.com/servlet/com.accumedia.web.Dispatcher?next=bioworldToday_currentIssue&issueId=3886&prodID=4&month=02&year=1992)>

Acesso em: 15 Jan. 2006

BLUM, D. E. New drugs for persons with epilepsy. **Advanced Neurology**, v. 76, p. 57–81, 1998.

BRASIL. **Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT** Título: NBR 12713 - Água - Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia Similis Claus*, 1876 (Cladocera, Crustacea), 2004.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschritte der psychosomatischen Medizin. Med.**, v. 1, p. 63-9, 1960.

---

BROWER, L. P. Avian predation on the monarch butterfly and its implications for mimicry theory. **The American Naturalist**, v. 131, 1988.

CRUZ-LOPEZ, L.; JACKSON, B. D.; HEFETZ, A.; MORGAN, E. D. Alkaloids in the venom of Messor ants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 199-204, 2006.

CESAR, L. M. M. Molecular Structure Characterization of the Tetrahydro- $\beta$ -Carboline Toxins from the Venom of Spider *Parawixia bistriata*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

CESAR, L. M. M.; TORMENA, C. F.; MARQUES, M. R.; SILVA, G. V. J.; MENDES, M. A.; RITTNER, R.; PALMA, M. S. Structure Determination of Hydroxytrypargine: A New Tetrahydro- $\beta$ -Carboline Toxin from the Venom of the Spider *Parawixia bistriata*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, 2005a.

CESAR, L. M. M.; MENDES, M. A.; TORMENA, C. F.; MARQUES M. R., SOUZA, B. M.; SAIDEMBERG, D. M.; BITTENCOURT, J. C.; PALMA, M. S. Isolation and Chemical Characterization of PwTx-II: A Novel Alkaloid Toxin from the Venom of the Spider *Parawixia bistriata*. (Araneidae, Araneae). **Toxicon**, v. 46, p. 786-796, 2005b.

CESAR-TOGNOLI, L. M. M. Estudos dos Mecanismos de Ação da Toxina 6-Hidroxitripargina no Sistema Nervoso de Roedores. 2005. 97f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

CETESB. Água - teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). Norma Técnica L5 018. São Paulo: **CETESB**, 33 p. 1991.

---

CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N.; MALASPINA, O. **Biologia e técnicas de manejo de abelhas e vespas**. In: BARRAVIERA, B. (Org). Venenos animais – Uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC, p. 14-18, 1994.

DAVIES, M. S. BAGANOFF, M. P.; GRISHIN, E. V.; LANTHORN, T. H.; VOLKOVA, T. M.; WATSON, G. B.; WIEGAND, R. C. Polyamine spider toxins are potent un-competitive antagonists of rat cortex excitatory amino acid receptors. **European Journal of Pharmacology – Molecular Pharmacological Section**. v.227, p. 51-56, 1992.

EDERY, H.; ISHAY, J. Pharmacological activity of oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom. **Toxicon**, v. 10, p.13-23,1972.

EDERY, H.; ISHAY, J.; GITTER, S.; JOSHUA, H. **Venoms of Vespidae** In: BETTINI, S. Arthropod venoms. New York: Springer-Verlag, p.691-771, 1978.

ESTRADA-CAMARENA, E.; CONTRERASA C. M.; SAAVEDRAA, M.; LUNA-BALTAZARA, I.; LÓPEZ-RUBALCAVAB, C. Participation of the lateral septal nuclei (LSN) in the antidepressant-like actions of progesterone in the forced swimming test (FST). **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. (1-2), p. 175-183, 2002.

EISNER, T.; MEINWALD, J.; MONRO, A.; GHENT, R. Defense mechanisms of Arthropods. The composition and function of the spray of the whipscorpion, *Mastigoproctus giganteus* (Lucas) (Arachnida : Pedipalpada). **Journal of Insect Physiology**, v. 6, p. 272-298, 1961.

EISNER, T.; WILSON, E. O. **The insects: Readings from Scientific American**. San Francisco: Freeman, p. 3-15, 1997.

---

- EVANS, H. E. The evolution of social life in wasps. **Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of Entomology**, v. 2, p. 449-457, 1958.
- EVANS, H. E.; EBERHARD, M. J. W., **The Wasps**, Univ. Michigan Press, Ann Arbor, p.265. 1970.
- FEDERICI, M.; GERACITANO, R.; TOZZI, A.; LONGONE, P.; DI ANGELANTONIO, S.; BENGTSON, C. P.; BERNARDI, G.; MERCURI, N. B. Trace amines depress GABA B response in dopaminergic neurons by inhibiting G- $\beta\gamma$ -Gated Inwardly Rectifying Potassium Channels. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 1283-1290, 2006
- FERGUSON, A. V.; LATCHFORD, K. J.; SAMSON W. K. The paraventricular nucleus of the hypothalamus – a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. **Expert Opinion on Therapeutical Targets**, v. 12, n. 6, p. 717-727, 2008.
- FLIER J. S.; MARATOS-FLIER, E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. **Cell**, v. 92, n. 4, p. 437-440, 1998.
- GARCIA, N. Spider Bioprospection- NPS to seek novel drugs in Madagascar. **BioWorld Today**, 27/05/1993. Disponível em:  
<[http://www.bioworld.com/servlet/com.accumedia.web.Dispatcher?next=bioworldToday\\_currentIssue&issueId=4215&prodID=4&month=05&year=1993](http://www.bioworld.com/servlet/com.accumedia.web.Dispatcher?next=bioworldToday_currentIssue&issueId=4215&prodID=4&month=05&year=1993)> Acesso em: 15/01/2006.
- GELFAND, E. W. The Role of Histamine in Immune Regulation. **Medscape Today**, 2005. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/503560>> Acesso em: 02/07/2007.
-



GERFEN, C. R.; SAWCHENKO, P. E. An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localizations of an axonally transported plant lectin *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. **Brain Research**, v.290, p. 219 a 238, 1984.

GOVINDARAJU, V.; YOUNG, K.; MAUDSLEY, A. A. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. **NMR in Biomedicine.**, v.13, p.129-153, 2000.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System.** Oxford University Press, 2000.

GUIMARÃES, E. S.; LACAVA, P. M.; MAGALHÃES, N. P. Avaliação da toxicidade aguda com *daphnia similis* na água captada no rio paraíba do sul e processada na estação de tratamento de água do município de jacareí - sp – brasil. **Engenharia sanitária e ambiental.** v. 9, n. 2, p. 124-130, 2004.

HAO H. N.; ZHAO J.; LOTOCZKY G.; GREVER W.E.; LYMAN W.D. Induction of human beta-defensin-2 expression in human astrocytes by lipopolysaccharide and cytokines. **Journal of Neurochemistry.** v.77, n.4, p. 1027-1035, 2001.

HADLEY, M. E.; LEVINE J. E. **Endocrinology.** 6. ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, p. 111-133, 2007

HARVEY, A. Strategies for discovering drug from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, n.7, 2000.

---

HEATH, T.; GIORDANI, A.B. Reversed-phase capillary high-performance liquid chromatography with on-line UV, fluorescence and electrospray ionization mass spectrometric detection in the analysis of peptides and proteins. **Journal of Chromatography**. v.638 n.1, p.9-19, 1993.

HERMANN H.R.; BLUM M.S. **Defensive mechanisms in the social Hymenoptera**. In: Hermann H. R. (org) Social Insects, New York: Academic Press, v.2, p. 78-198, 1981.

HERRERA, D. G.; ROBERTSON; H. A. Activation of *c-fos* in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 50, p. 83-107, 1996.

HISADA, M.; SATAKE, H.; MASUDA, K.; AOYAMA, M.; MURATA, K.; SHINADA, T.; IWASHITA, T.; OHFUNE, Y.; NAKAJIMA, T. Molecular components and toxicity of the venom of the solitary wasp, *Anoplius samariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.330, n.4, p.1048-54, 2005.

HODGES, R.; GRIMMET, M. R. The mass spectra of imidazole and 1-methylimidazole. **Australian Journal of Chemistry**, v. 21, p. 1085-1087, 1968.

HOFFMAN, W. H.; HABERLY, L. B. Kindling-induced epileptiform potentials in piriform cortex slices originate in the underlying endopiriform nucleus. **Neurophysiology**, v. 76, p. 1430-1438, 1996.

ISHIDA, K.; MURATA, M.; KATAGIRI, N.; ISHIKAWA, M.; ABE, K.; KATO, M.; UTSUNOMIYA, I.; TAGUCHI, K. Effects of  $\beta$ -Phenylethylamine on Dopaminergic Neurons of the Ventral Tegmental Area in the Rat: A Combined Electrophysiological and Microdialysis Study. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 2, 2005.

---

JACKSON, H.; USHERWOOD, P. N. R. Spider toxins as tools for dissecting elements of excitatory amino acid transmission. **Trends in Neurosciences**, v.11, n.278, 1998.

JANSSEN P. A., LEYSEN J. E., MEGENS A. A., AWOUTERS F. H. Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients? **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 2, n.3, p. 229-240,1999.

KANDA, N.; WATANABE, S. Histamine enhances the production of human  $\beta$ -defensin-2 in human keratinocytes. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 293, p. C1916-C1923, 2007.

KAWAY, N.; NAKAJIMA, T. **Neurotoxins from Spider Venoms**. In: Harvey, A. L. (org). Natural and Synthetic Neurotoxins. London: Acad. Press., p.319-345, 1993.

KOBAYASHI, K.; MCBURNEY, R. N.; GOLDIN, S. M. **Venoms and Toxins as Sources of Drug Leads**. In: New Drugs from Natural Sources. Oxford: Information Press, 1992.

KONNO, K.; HISADA, M.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; KAWAY, N.; MIWA, A.; YASUHARA, T.; MOTIMOTO, Y.; NAKAY, Y. Structure and biological activities of eumenine mastoparan – AF (EMP-AF), a new mast cell degranulation peptide in venom of solitary wasp (*Antenynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon** v. 38, p. 505- 1515, 2000.

LANDÉN, M.; THASE, M. E. A Model to Explain the Therapeutic Effects of Serotonin Reuptake Inhibitors: The Role of 5-HT<sub>2</sub> Receptors. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 147-166, 2007.

---

- LONG, L. E.; CHESWORTH, R.; HUANG, X. F.; MCGREGOR I. S.; ARNOLD, J.C.; KARL, T. A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. *In press*, 2009.
- MALASPINA, O.; PALMA, M. S.; MANZOLI-PALMA, M. F. **Vespas: riscos e benefícios de sua urbanização**. Vetores e Pragas, Rio de Janeiro. v.2, n.4, p. 32-35, 1999.
- MAMMER, O. A.; LESIMPLE, A. Protonated 1-methylimidazole decomposition by electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid communication in Mass Spectrometry**. v.19, p. 1771-1774, 2005.
- MANN, J. **Chemical Aspects of Biosynthesis: Alkaloids**. Oxford Science Publications. New York: Oxford University Press, Inc., n.20, p.62-80,1994.
- MANZOLI-PALMA, M. F.; GOBBI, N.; PALMA, M. S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.9, n.2, 2003.
- MARQUES, M. R.; MENDES, M. A.; TORMENA, C. F.; SOUZA, B. M.; RIBEIRO, S. P.; RITTNER, R.; PALMA, M. S. Structure Determination of an Organometallic 1-(diazenaryl) ethanol: a Novel Toxin Subclass from the web of the Spider *Nephila clavipes*. **Chemistry and Biodiversity**. v.1, p. 830-838, 2004.
- MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. Trad. de Hans Reichardt. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo (USP), 1977.
- MCCORMIC, K.D.; MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. **Journal of Chemical Ecology**. v.19, n.10, p. 2411-2451, 1993.
-

MEINWALD, J.; EISNER, T. The chemistry of phyletic dominance (Colloquium paper). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 14-18, 1995.

MEINWALD, J. Sex, violence and drugs in the world of insects: A Chemist's view. Adapted from a 2000 presentation by Jerrold Meinwald **Science on the Frontiers**, 2000. Disponível em:  
<<http://www.rescorp.org/science%20frontiers/meinwald.pd>> Acesso em: 15 Set. 2004.

MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes* by high performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v.181, n.7, p. 1-7, 2004.

MILHAUD, D.; RONDOUIN, M.; LERNER-NATOLI, J.; LAFON-CAZAL, M. Neuroprotective activity of antazoline against neuronal damage induced by limbic status epilepticus. **Neuroscience**, v. 120, p. 475-484, 2003.

MOE, S. T.; SMITH, D. L.; CHIEN, Y. E.; RASZKIEWICZ, J. L.; ARTMANN, L. D.; MUELLER, A. L. Design, synthesis and biological evaluation of spider toxin (argiotoxin- 636) analogs as NMDA receptor antagonists. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n.1, p. 31-38, 1998.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O. S.; FERREIRA, L. B; dos SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 2, p. 171-183, 2007.

---

MURATA, K.; SHINADA, T.; HANADA, M.; NAOKI, H.; OHFUNE, Y.; NAKAJIMA T.  
**Structure determination of neuroactive compounds from wasp venom; Sample preparation.** In: Molecular and Biochemical Approaches for Distinguished Insect Ability. "Project 4: Identification, Activity and Mode of Action of Bio-Active Molecules from Blood-Sucking and Stinging Insects". The Annual Meeting on Research for the Future Program, 2001.

NAGATSU, T.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. Tyrosine Hydroxylase the initial step in norepinephrine biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 9, p. 2910-2917, 1964.

NAHA, P. C.; DAVOREN, M.; CASEY, A.; BYRNE, H. J. An ecotoxicological study of poly(amidoamine) dendrimers-toward quantitative structure activity relationships. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 17, p. 6864-6869, 2009.

NAKAJIMA, T. **Biochemistry of Vespid Venoms.** In: TU, A. T. (org), Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms. Handbook of Natural Toxins, v. 2, p. 109-129, 1984.

NAKAJIMA, T. **Pharmacological biochemistry of vespid venoms.** In: PIEK, T. (org) Venoms of the Hymenoptera - Biochemical, pharmacological and behavioral aspects. London: Academic Press, p. 309-27, 1986.

NAKARI, T.; HUHTALA, S. Comparison of toxicity of congener-153 of PCB, PBB, and PBDE to *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 71, n. 2, p. 514-518, 2008.

OLIVEIRA, M. R.; PALMA, M. S. Polybitoxins: A group of phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of the neotropical social wasp "paulistinha" (*Polybia paulista*). **Toxicon**, v. 36, n. 1, p.189-199, 1998.

---

- ORESMAA, L.; AULASKARI, P.; VAINIOTALO, P. Electrospray ionization mass spectrometric studies of some imidazole amidoximes and nitrolic acids and esters. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v.20, p. 1071-1076, 2006.
- PALMA, M. S.; BRAGA, M. R. B. **Venenos de “Hymenoptera” sociais: Coleta, composição, bioquímica e mecanismos de ação**. In: BARRAVIERA, B. (org). Venenos animais – Uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC. p. 251-258, 1994.
- PALMA, M. S.; ITAGAKI, Y.; FUJITA, T.; NAOKI, H.; NAKAJIMA, T. Structural Characterization of a New Acylpolyaminetoxin from the Venom of Brazilian Garden Spider *Nephilengys cruentata*. **Toxicon**, v.36, n.3, p. 485-493, 1998.
- PALMA, M. S.; NAKAJIMA, T. A Natural Combinatorial Chemistry Strategy in Acylpolyamine Toxins From Nephilinae Orb-Web Spiders. **Toxin Reviews**, v.24, p. 209-234, 2005.
- PARKER, E. M.; CUBEDDU, L. X. Comparative effects of amphetamine, phenylethylamine and related drugs on dopamine efflux, dopamine uptake and mazindol binding. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 245, n. 1, p. 199-210, 1988.
- PATERSON, I. A. The potentiation of cortical neuron responses to noradrenaline by 2-phenylethylamine is independent of endogenous noradrenaline. **Neurochemical Research**, v. 18, n. 2, 1993.
- PAUL, S. M.; HULIHAN-GIBLIN, B.; SKOLNICK, P. (+)-Amphetamine binding to rat hypothalamus: relation to anorexic potency for phenylethylamines. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 487-490, 1982.
-

POTKIN, S. G.; KAROUM, F.; CHUANG, L. W.; CANNON-SPOOR, H. E., PHILLIPS, I.; WYATT R. J. Phenylethylamine in paranoid chronic schizophrenia. **Science**, v. 206, n. 4417, p. 470 – 471, 1979.

QUICKE, D. Spiders bite their way towards safer insecticides. **New Scientist**, n.1640, p.38-41, 1988.

RODRIGUES, M. C. A. Análise Neuroetológica e Estudo da Atividade Pró-Convulsivante e Anti-Convulsivante *in vivo* da Peçonha Bruta da Aranha *Parawixia bistrriata* em Ratos: Injeção Central e Periférica. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 1999.

RUSSEL, F. E. **Toxic effects of animal toxins**. In: Klassen, C. D., (org). Casarett and Doull's Toxicology. the basic science of poisons.: New York: McGraw-Hill, p. 801-839, 1996.

SAIDEMBERG, D. M.; FERREIRA, M. A. B.; TAKAHASHI, T. N.; GOMES, P. C.; CESAR-TOGNOLI, L. M. M.; DA SILVA-FILHO, L. C.; TORMENA, C. F.; DA SILVA, G. V. J.; PAMA, M. S. Monoamine oxidase inhibitory activities of indolylalkaloid toxins from the venom of the colonial spider *Parawixia bistrriata*: Functional characterization of PwTX-I. **Toxicon**. v. 54, n. 6, 2009.

SALAMONI, S.D.; da COSTA J.C.; PALMA M.S.; KONNO K.; NIHEI K.; AZAMBUJA N.A.; NETO E.P.; VENTURIN G.T.; TAVARES A.A.; de ABREU D.S.; BREDA R.V. The antiepileptic activity of JSTX-3 is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in human hippocampal neurons. **Neuroreport**, v.16, n.16, p. 1869-1873, 2005.

---



SANGALLI, B. C. Role of the central histaminergic neuronal system in the CNS toxicity of the first generation H1-antagonists. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 145-147, 1997.

SCHIMIDT, J. O. **Allergy to Hymenoptera venoms**. In: PIEK, T. Venoms of the Hymenoptera- Biochemical, pharmacological and behavioural aspects. London: Academic Press, p. 509-539, 1986.

SCHIMIDT, J. O. **Hymenopteran venoms: Striving toward the ultimate defense against vertebrates**. In: Insect defenses adaptative mechanisms and strategies of prey and predators. Albany: State University of New York Press, p. 387-419, 1990.

SCHRADER, K. D. SCHULZE, U.. KÖNIG, W. A Investigation of low molecular weight constituents of wasp venom: Identification of pharmacologically active compounds. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 324, p. 358, 1986.

SCOVILLE, W. B., MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 20, p.11-21, 1957.

SHIMOKAWA, M.; YAMAMOTO, K.; KAWAKAMI, J.; SAWADA, Y.; IGA, T. Neurotoxic convulsions induced by histamine H2 receptor antagonists in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 136, p. 317-323, 1996.

SHU, S.; JU, G.; FAN, L. The glucose oxidase-DAB-Nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neuroscience Letters**, v. 85, p. 169-171, 1988.

---

- SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. **Brain Research**, v. 970, p. 232-237, 2003.
- SKAPER, S. D.; FACCI, L.; KEE, W. J.; STRIJBOS, P. J. L. M. Potentiation by histamine of synaptically mediated excitotoxicity in cultured hippocampal neurones: a possible role for mast cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 76 p. 47-55, 2001
- SOCHA, R.; KODRÍK, D.; ZEMEK, R. Stimulatory effects of bioamines norepinephrine and dopamine on locomotion of *Pyrrhocoris apterus* (L.): is the adipokinetic hormone involved? **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology**. V. 151, n.3, p. 305-310, 2008.
- SPRADBERY, J. P. **Wasps – An Account of the Biology and Natural History of Solitary and Social Wasps**. London: Sidgwick & Jackson, p.1-12, 1973
- STONE, T. W. **Neuropharmacology**. New York: W. H. Freeman and Comp. Limited, p.57-60, 1995
- USHERWOOD, P. N.; BLAGBROUGH, I. S. Spider toxins affecting glutamate receptors: polyamines in therapeutic neurochemistry. **Pharmacology & Therapeutics**, v.52, n.2, p. 245-248, 1991.
- WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press, p.7-27, 1971.
- TOKI, T.; JASUHARA, T.; ARAMAKI, Y.; OSAWA, K.; MIWA, A.; KAWAI, N.; NAKAJIMA, T. Isolation and chemical characterization of a series of new spider toxin (nephilatoxins) in the venom of Joro spider, *Nephila clavata*. **Biomedical Research**, v. 9 p. 421–428, 1988.
-

VASCONCELOS, L. A. P.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. **Administração intracerebroventricular ou intravenosa de substâncias associadas ao uso de fatores de transcrição.** In: BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Métodos em neurociência. São Paulo: Ed. Roca, 2007.

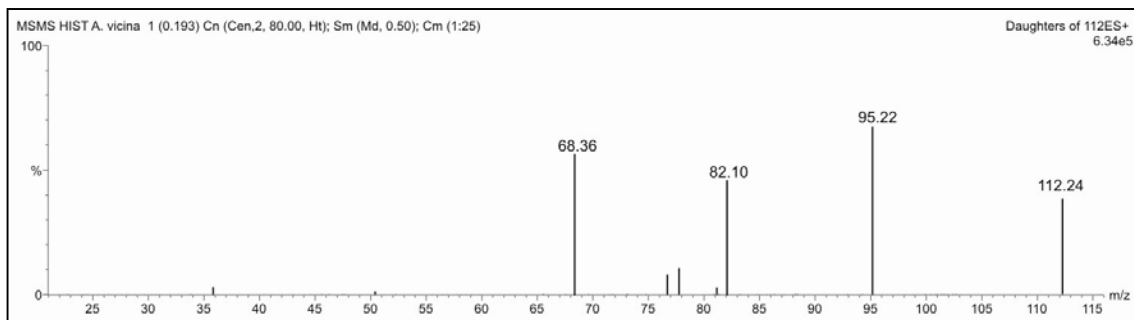
YEH, G.-C.; CHEN, J.-C.; TSAI, H.-C.; WU, H.-H.; LIN, C.-Y.; HSU, P.-C.; PENG, Y.-C. Amphetamine Inhibits the N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Mediated Responses by Directly Interacting with The Receptor/Channel Complex. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.300, p.1008-1016, 2002.

ZLOTKIN, E. Insect selective toxins derived from scorpion venoms: an approach to insect neuropharmacology. **Insect Biochemistry**, v.13, n.3, p. 219-236, 1983.

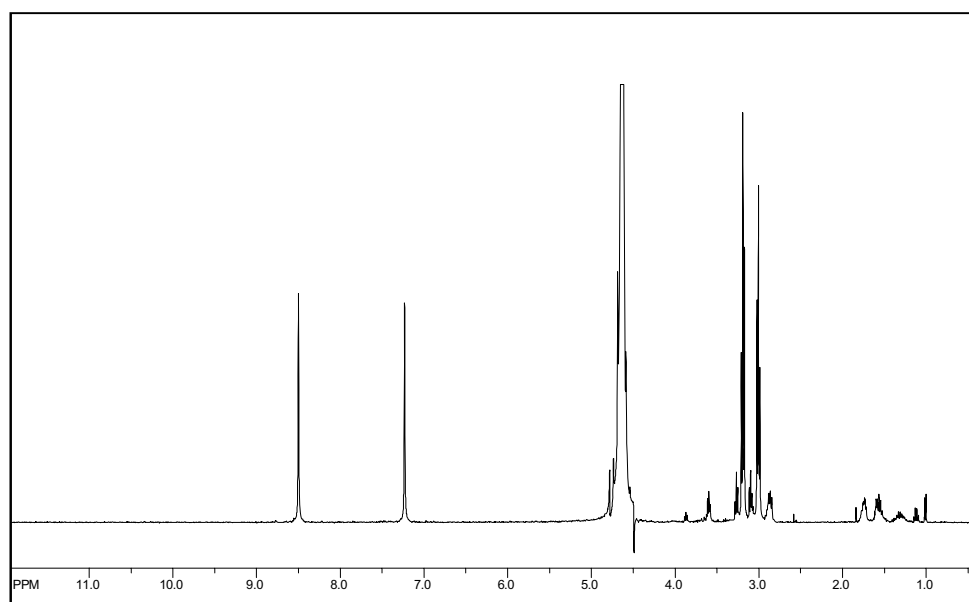
ZHOU, G., SHOJI, H., YAMADA, S., MATSUIISHI, T. Decreased  $\beta$ -phenylethylamine in CSF in Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v 63 n 6, p. 754–758, 1997.

---

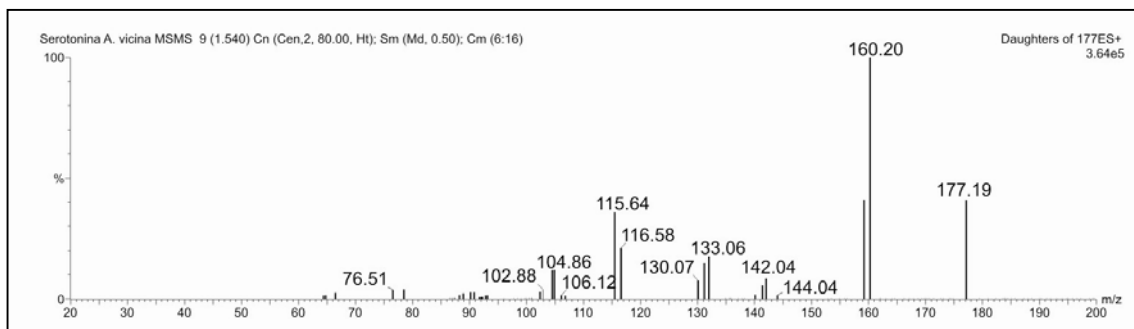
## ANEXO I – Dados Espectroscópicos Obtidos do Veneno da Vespa Social *A. vicina*



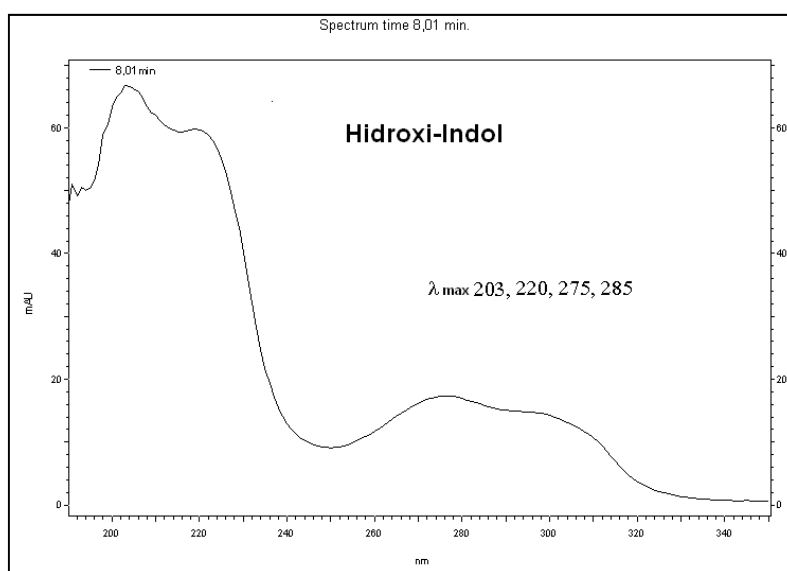
**Figura A1-** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 1 do veneno da vespa *A. vicina*.



**Figura A2-** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN em  $\text{D}_2\text{O}$  da fração 1, isolada da vespa *A. vicina*, com sua possível interpretação.

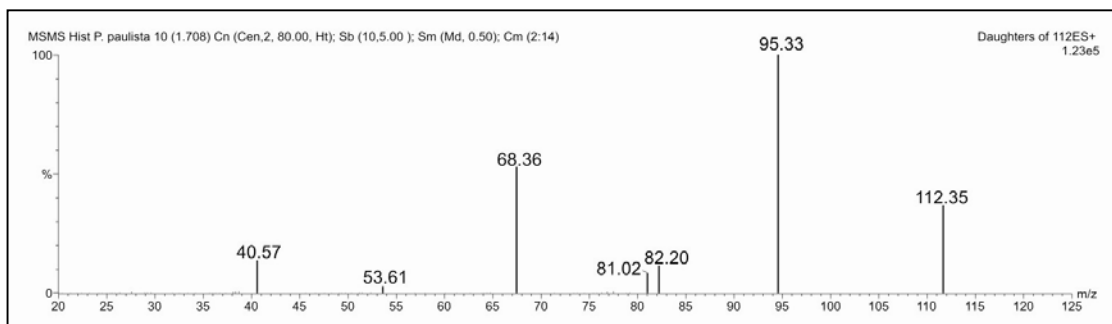


**Figura A3-** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 5 do veneno da vespa *A. vicina*.

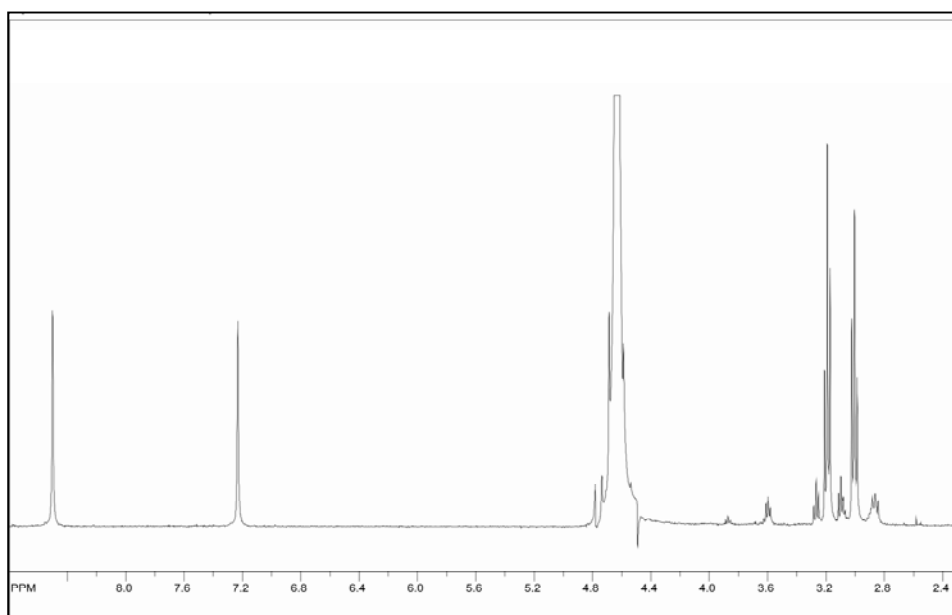


**Figura A4-** Espectro UV da fração 5 do veneno da vespa *A. vicina*, obtida no re-fracionamento por RP-HPLC [coluna YMC C18 (4,6 x 150 mm)], utilizando-se um isocrático de MeCN/H<sub>2</sub>O de 7% [contendo TFA 0,1% (v/v)], mostrando um perfil de espectro UV com valores  $\lambda_{max}$  típicos para o grupo hidroxi-indol .

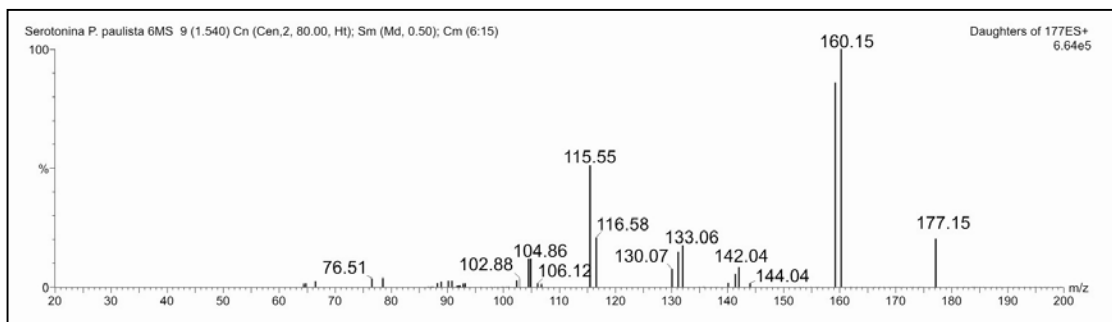
## ANEXO II – Dados Espectroscópicos Obtidos do Veneno da Vespa Social *P. paulista*



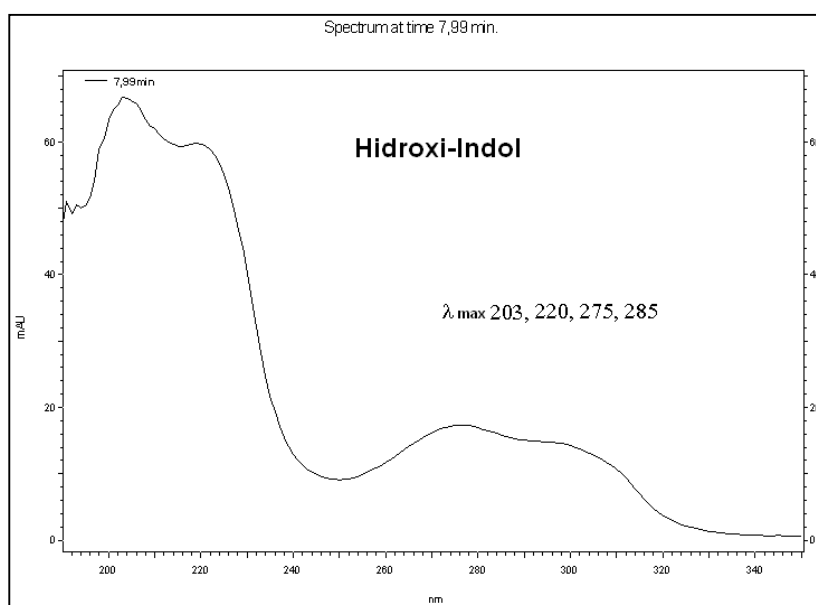
**Figura A5** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 2 do veneno da vespa *P. paulista*.



**Figura A6-** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN em D<sub>2</sub>O da fração 2, isolada da vespa *P. paulista*.



**Figura A7-** Espectro de ESI-MS/MS no modo positivo, do composto isolado da fração 2 do veneno da vespa *P. paulista*.



**Figura A8-** Espectro UV da fração 2 do veneno da vespa *P. paulista*, obtida no re-fracionamento por RP-HPLC [coluna YMC C18 (4,6 x 150 mm)], utilizando-se um isocrático de MeCN/H<sub>2</sub>O de 7% [contendo TFA 0,1% (v/v)], mostrando um perfil de espectro UV com valores  $\lambda_{max}$  típicos para o grupo hidroxi-indol.