
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VICTOR SPILLER DE OLIVEIRA

BIOPROSPECÇÃO DE FOSFOPEPTÍDEOS
DE VENENO DA VESPA *Apoica pallens*



Rio Claro
2019

VICTOR SPILLER DE OLIVEIRA

BIOPROSPECÇÃO DE FOSFOPEPTÍDEOS DE VENENO DA VESPA
Apoica pallens

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de
Rio Claro, para obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas

Rio Claro
2019

O48b	Oliveira, Victor Spiller de BIOPROSPECÇÃO DE FOSFOPEPTÍDEOS DE VENENO DA VESPA <i>Apoica pallens</i> (HYMENOPTERA) / Victor Spiller de Oliveira. -- Rio Claro, 2019 53 p. Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Mario Sergio Palma 1. Espectrometria de massas. 2. Fosfopeptídeos. 3. Peptídeos. 4. <i>Apoica pallens</i>. I. Título.
------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RESUMO

No decorrer da evolução os mecanismos de defesa dos animais diversificaram e sofisticaram-se, produzindo uma infinidade de compostos com atividade biológica. Sendo alguns desses compostos capazes de modificar a pressão arterial, relaxar ou contrair musculatura lisa, aumentar a permeabilidade dos vasos localmente entre outras. Desse modo, os venenos animais apresentam um rico arsenal de substâncias a serem estudadas para tornar possível a criação de fármacos com potencial de salvar incontáveis vidas. Este trabalho tem por objetivo extrair amostras de veneno da vespa *Apoica pallens*, purificar, quantificar e identificar os compostos de natureza fosfopeptídica.

Palavras-chave: Espectrometria de massas; *Apoica pallens*; Fosfopeptídeos; Peptídeos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila

CID - Dissociação induzida por colisão

CP - Peptídeo quimiotático

Da - Daltons

ESI - Fonte de ionização do tipo Electrospray

g - Gramas

Hz - Hertz

kV - Quilovolts

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

l/min - Litros por minuto

ml - Mililitro

ml/min - Mililitros por minuto

mm - Milímetro

MS - Espectrometria de Massas

MS/MS ou MS2 - Espectrometria de massas sequencial (*Tandem*)

m/z - Relação Massa por carga

nm - Nanômetro

TFA - Ácido trifluoroacético

TIC - Cromatograma de íons totais

TOF - "*time of flight*" ou tempo de voo

V - Volts

v/v - Volume por volume

µm - Micrômetro

µg - Micrograma

µl - Microlitro

UV - Ultravioleta

UFLC - Cromatografia líquida ultrarrápida

W - Watt

% - Por cento

°C - Graus Celsius

TABELA DE AMINOÁCIDOS

NOME	COMPOSIÇÃO	MASSA MÉDIA	MASSA MONOISOTÓPICA
ALANINA ALA ou A	C3H5NO	71,0788	71,03711
ARGININA ARG ou R	C6H12N4O	156,1876	156,10111
ASPARAGINA ASN ou N	C4H6N2O2	114,1039	114,04293
ÁCIDO ASPÁRTICO ASP ou D	C4H5NO3	115,0886	115,02694
CISTEÍNA CYS ou C	C3H5NOS	103,1448	103,00919
ÁCIDO GLUTÂMICO GLU ou E	C5H7NO3	129,1155	129,04259
GLUTAMINA GLN ou Q	C5H8N2O2	128,1308	128,05858
GLICINA GLY ou G	C2H3NO	57,0520	57,02146
HISTIDINA HIS ou H	C6H7N3O	137,1412	137,05891
ISOLEUCINA ILE ou I	C6H11NO	113,1595	113,08406
LEUCINA LEU ou L	C6H11NO	113,1595	113,08406
LISINA LYS ou K	C6H12N2O	128,1742	128,09496
METIONINA MET ou M	C5H9NOS	131,1986	131,04049
FENILALANINA PHE ou F	C9H9NO	147,1766	147,06841
PROLINA PRO ou P	C5H7NO	97,1167	97,05276
SERINA SER ou S	C3H5NO2	87,0782	87,03203
TREONINA THR ou T	C4H7NO2	101,1051	101,04768
TRIPTOFANO TRP ou W	C11H10N2O	186,2133	186,07931
TIROSINA TYR ou Y	C9H9NO2	163,1760	163,06333
VALINA VAL ou V	C5H9NO	99,1326	99,06841 72

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, sobretudo à minha mãe, que durante toda minha vida esteve presente e apoiando minhas decisões.

A todos os professores que estiveram presentes na minha vida educacional e sem os quais não teria chegado até aqui.

Ao meu orientador, Mario Palma, pela oportunidade e apoio para elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos, principalmente Letícia dos Santos, Gabriela de Oliveira, Yuri Rios, junto dos quais essa etapa foi mais divertida e enriquecedora.

Agradeço também ao Lucas Rosa, com quem divido tanto de mim e sempre me dá apoio e força nessa caminhada

Agradecimento à Bibiana de Souza e Nathalia Dias que me ajudaram muito na elaboração deste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Venenos de vespas sociais	6
1.2. Compostos de natureza proteica	7
1.3. Classes de peptídeos	8
1.4. Sequenciamento por espectrometria de massas	9
1.5. As modificações pós-traducionais	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Extração do veneno	14
3.2. Enriquecimento de fosfopeptídeos	15
3.3. Experimento de peptidômica utilizando sistema LCMS-Q-TOF	15
3.4. Processamento dos espectros com Script do Biotoools Software no Compass DataAnalysis	17
3.5. Identificação dos peptídeos a partir do PEAKS X	18
3.6. Etapa de alinhamento das sequências	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Cromatografia líquida da fração peptídica	20
4.2. Sequenciamento de peptídeo de íon precursor m/z 605,91 $[M+2H]^{2+}$	22
4.3. Resultado do sequenciamento pelo PEAKS STUDIO para peptídeos fosforilados	23
4.4. Resultado do sequenciamento pelo PEAKS STUDIO para peptídeos não- fosforilados	33
4.5. Peptídeos que tiveram suas sequências alinhadas	41
4.6. Lista dos demais peptídeos	45
5. CONCLUSÃO	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Venenos de vespas sociais

Arthropoda é o maior filo do reino animal, sendo que a classe Insecta contribui com mais de um milhão de espécies descritas, exibindo uma enorme diversidade de morfologia, comportamento e hábitos (RUPPERT et al., 2005; STORK, 2017). De acordo com Ederly e colaboradores (1978), vespas, abelhas e formigas constituem a Ordem Hymenoptera e, juntos, representam mais de 200.000 espécies.

Dentre as vespas sociais, a Subfamília Polistinae possui a maior riqueza de espécies e diversidade, tanto morfológica quanto comportamental (CARPENTER, 1991). Os insetos do gênero *Apoica* são peculiares por serem ativos principalmente durante o período noturno, com adaptações visuais que possibilitam esse comportamento (GREINER, 2006).

Figura 1. *Vespa Apoica pallens*



Fonte: <http://www.americaninsects.net/hy/apoica-pallens.html>

A espécie de vespa *Apoica pallens*, popularmente conhecida como “marimbondo chapéu”, dada a forma de construção do seu ninho, possui a maior distribuição geográfica dentre as espécies do gênero, seu território abrange desde o sul da América do Norte até Argentina e Brasil (RICHARDS, 1978; NOLL, 2013).

Possui um veneno que causa dor em uma intensidade intermediária e, por ser uma vespa noturna, tem um risco aumentado de casos de acidentes.

Um indivíduo que de forma intencional ou não venha a perturbar o ninho pode sofrer múltiplas ferroadas, resultando geralmente em dores prolongadas e, devido ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos da pele, edema local e eritema, levando, em alguns casos, o indivíduo a morte (SCHMIDT, 1990; NAKAJIMA, 1996, BRIGATTE et al., 2011).

Os venenos dos himenópteros são constituídos por uma mistura complexa de compostos (DIAS et al., 2014). As vespas, em geral, possuem entre 1,5 e 20 microgramas de veneno em seus reservatórios, sendo constituído principalmente de proteínas e peptídeos (HOFFMAN, JACOBSON, 1984).

1.2. Compostos de natureza proteica

Dentre os compostos de natureza proteica, se destacam o Antígeno-5, que apresenta potente ação imunogênica (CRUZ-HÖFLING, ROCHA 2009) e as fosfolipases A1 e A2, que são responsáveis pela hidrólise dos componentes de membrana plasmática facilitando a difusão das toxinas para o interior das células (ARGIOLAS; PISANO, 1983). Além dessas proteínas, o veneno possui hialuronidase, que age juntamente com as fosfolipases sendo responsáveis pela formação de edema na região da ferroadada (CRUZ-HÖFLING, ROCHA, 2009).

Os constituintes peptídicos do veneno de vespa correspondem a cerca de 70% do peso seco. Eles estão divididos em algumas classes de acordo com suas atividades e estruturas moleculares. Até o momento, já foram descritos peptídeos pertencentes à família dos mastoparanos, peptídeos quimiotáticos, cininas de vespas e outras. A maior parte dos peptídeos são ricos em estruturas secundárias, como alfa-hélice, e componentes policatiônicos anfipáticos. Devido à sua composição podem exercer papel na lise celular, como a hemólise, antibiose como também atuar na liberação de ativadores e mediadores celulares (de SOUZA; PALMA, 2009).

1.3. Classes de peptídeos

Os mastoparanos são tetradecapeptídeos lineares, geralmente policatiônicos, ricos em resíduos hidrofóbicos, como leucina, isoleucina e alanina, e apresentam amidação no resíduo C-terminal (MARKLAND, 1998). Inicialmente foi o primeiro peptídeo liberador de histamina isolado, sendo hoje a classe mais abundante dos componentes peptídicos dos venenos de vespas (PINTO et al., 2006; de SOUZA; PALMA, 2009). Sua conformação estrutural, determinada por meio de técnicas como Dicroísmo Circular (CD) e Ressonância Magnética Nuclear (NMR), é governada pelo microambiente em que se encontra (REIS et al., 2006). Apresentam-se dispersos randomicamente em água, enquanto em álcool, Dodecil sulfato de Sódio (SDS), Trifluoroetanol (TFE) ou vesículas lipídicas assumem uma conformação em alfa-hélice (DOHTSU et al. 1993, HIGASHIJIMA et al. 1983; SANTOS-CABRERA et al. 2004). Devido a sua conformação e a característica anfipática, os mastoparanos interagem com a membrana plasmática causando a formação de poros e, consequentemente, lise celular (NAKAJIMA, 1986). Outra atividade encontrada nessa classe de molécula é a de se acoplar ao receptor de proteína-G, levando a ativação de mecanismos de liberação de diferentes secreções, dependendo do tipo de célula alvo (SILVA et al., 1996).

Uma segunda classe de peptídeos presentes nos vespídeos é a dos peptídeos quimiotáticos. Geralmente são tridecapeptídeos policatiônicos que apresentam uma cadeia primária semelhante à dos Mastoparanos, tanto pela riqueza de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos quanto pela amidação do resíduo C-terminal (MARKLAND, 1998). Esses peptídeos são capazes de induzir a quimiotaxia em leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, além de, em algumas situações, levar à liberação de histamina dos mastócitos (REIS et al., 2006). Como resultado da atividade quimiotática há o desenvolvimento de edema no local da ferroadá acompanhada de reação inflamatória (KANOST et al., 2004).

Outra classe de peptídeo com atividade biologicamente importante presente nos vespídeos são as Cininas de vespa. Esse grupo de peptídeos possui entre 9 e 18 resíduos de aminoácidos, com uma sequência interna semelhante às bradicininas de mamíferos. Essas moléculas conhecidas pela produção de dor são componentes neurotóxicos que agem bloqueando a transmissão colinérgica do Sistema Nervoso

Central dos insetos por meio da depleção irreversível da recaptação de Colina pela inibição não-competitiva (SAPPINGTON; RAIKHEL, 1998). Por outro lado, foi descoberto ação antinociceptiva quando injetada no Sistema Nervoso Central de ratos, causando analgesia superior à morfina (MORTARI et al., 2007).

Alguns estudos indicam uma variedade de peptídeos bioativos além das neurotoxinas, com atividade antimicrobiana, peptídeos citolíticos, entre outros (KONNO et al., 2016). Muitas dessas moléculas apresentam um grande potencial para o desenvolvimento de fármacos, sendo conhecidas por apresentarem efeito anticonvulsivante além de antibiótico, antiviral, antifúngico e antiparasítico (FERREIRA, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2007; CONCANNON et al., 2003).

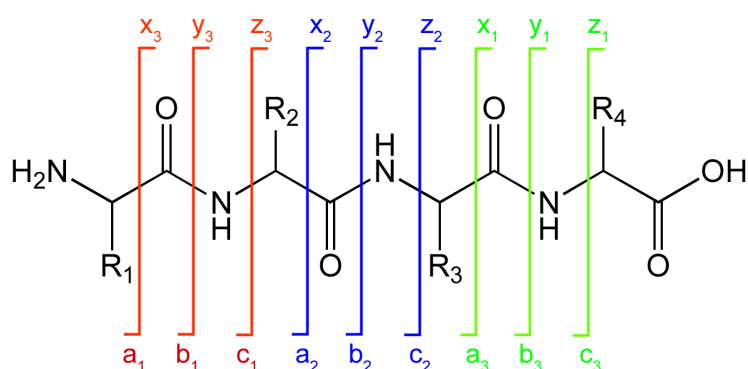
No decorrer da evolução, essa grande variedade de peptídeos foi desenvolvida evolutivamente com alta especificidade, diversidade de estruturas e funções biológicas, se mostrando necessário o desenvolvimento de técnicas para identificar, sequenciar e caracterizar esses compostos (ADERMANN et al., 2004).

1.4. Sequenciamento por espectrometria de massas

Para entender a atividade que os peptídeos exercem nos organismos vivos o sequenciamento de resíduos de aminoácidos se mostra necessário pois as características físico-químicas individuais dos aminoácidos desempenham papel fundamental no peptídeo como um todo. O processo de fragmentação de peptídeos por meio da dissociação induzida por colisão (collision induced dissociation – CID) é utilizado na técnica de espectrometria de massas para efetuar seu sequenciamento. Nessa técnica os peptídeos são ionizados positivamente (por meio do acréscimo de prótons na molécula) e acelerados para uma região do espectrômetro composta de um gás inerte (ex. nitrogênio) propiciando sua colisão. A energia translacional da colisão é convertida em energia interna intramolecular resultando em uma instabilidade das ligações polipeptídicas do esqueleto da molécula culminando na formação de dois íons-fragmento complementares. Os íons resultantes são definidos segundo a nomenclatura de Roepstorff-Fohlmann-Biemann denominados -a, -b ou -c (dependendo da posição da fragmentação do resíduo de aminoácido) quando o íon fragmento protonado (carga positiva) reside no lado N-terminal do peptídeo ou -x, -y,

ou -z (novamente, dependendo da posição da fragmentação do resíduo de aminoácido) quando a protonação reside no lado C-terminal do peptídeo. Além do conjunto de letras usados para determinar o ponto da fragmentação, números subscritos são utilizados para determinar a contagem dos aminoácidos na cadeia polipeptídica começando pela extremidade (N ou C-terminal) do fragmento (CANTÚ et al, 2008).

Figura 2. Padrão de fragmentação da cadeia peptídica proposto por Roepstorff-Fohlmann-Biemann.



Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Peptide_fragmentation.gif

É importante salientar que fragmentos a/x, b/y, e c/z são complementares entre si dado a natureza da fragmentação e, portanto, são utilizados como contraprova na identificação dos resíduos de aminoácidos.

Outros exemplos de íons gerados no processo de fragmentação são os íons -d e -w resultantes da quebra da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos de alguns fragmentos ou mesmo a quebra das duas extremidades (N- e C- terminal) de um fragmento denominados íon imônio. Os íons imônios menos comuns podem ser utilizados como íons diagnóstico possibilitando a indicação de que determinados resíduos de aminoácidos estejam presentes na sequência do peptídeo.

Apesar de, teoricamente, haver a possibilidade encontrar fragmentos pertencentes à várias séries de íons, na espectrometria de massas sequencial de peptídeos os fragmentos mais favoráveis de se formarem são os da série -b/-y. Isto está relacionado ao fato da ligação peptídica ser a ligação mais fraca entre as ligações que formam uma cadeia polipeptídica. Devido a predominância dessas duas séries de íons a interpretação e sequenciamento torna-se facilitada, já que é possível

descobrir qual resíduo de aminoácido está em determinada posição da cadeia a partir da subtração da massa de picos adjacentes.

Entretanto apesar de elucidar quase completamente a sequência de resíduos de aminoácidos, certas ambiguidades são inerentes à técnica. Os aminoácidos Leucina e Isoleucina (ambos de massa monoisotópica 113,1 Da), bem como, Lisina e Glutamina (de massas 128,1 e 128,0 Da respectivamente) são considerados isóbaros, resultando em ambiguidade I/L ou K/Q. Os valores de íons de simulação da fragmentação da cadeia lateral dos aminoácidos, representados pelos íons -d e -w, podem ser utilizados para desfazer a ambiguidades na maioria dos casos dos resíduos I/L. A presença do íon -d com diferença de 42 Da corresponde a perda da cadeia lateral de um resíduo de Leucina, enquanto a diferença de 14 Da corresponde a Isoleucina, por exemplo (CANTÚ et al, 2008).

O termo peptidômica foi inicialmente introduzido no início dos anos 2000 na conferência "From Singular to Global Analyses of Biological Systems" e se refere à análise quantitativa e qualitativa de pequenas proteínas e peptídeos de um dado sistema biológico (SCHULZ-KNAPPE et al., 2005; ESCOUBAS et al., 1997).

1.5. As modificações pós-traducionais

O desenvolvimento de novas técnicas combinadas permite a descoberta e a caracterização de muitas outras moléculas e metabólitos, inclusive contendo modificações pós traducionais como fosforilações, alquilações, acetilações, metilações entre outras.

Já foi demonstrado que modificações pós traducionais afetam o reconhecimento de antígenos específicos, levando a um diferente recrutamento durante a resposta imune (RESENDE et al., 2013).

Fosforilações reversíveis são conhecidas por possuir importante papel no funcionamento de células eucarióticas, ligando e desligando atividades cruciais como propagação de sinais e interação de proteínas. Já foi observado que problemas no controle desses mecanismos estão relacionados a diversas doenças conhecidas, como câncer e doenças neurodegenerativas. Portanto, conhecer esses mecanismos nos venenos animais representa um significativo avanço para a ciência (HUMPHREY et al., 2015).

Muito embora peptídeos fosforilados sejam detectáveis e identificáveis, apresentam uma abundância muito pequena cerca de 0,01%. No entanto não se sabe qual é a representatividade fisiológica desses peptídeos nos venenos (RESENDE et al., 2013).

Devido à complexidade de moléculas encontradas nesses venenos, técnicas sofisticadas de separação, como a cromatografia, o uso de técnicas de enriquecimento e derivatização combinados trazem uma nova abordagem na busca destes componentes. A utilização de cromatografia contendo resinas com Óxido de Titânio (TiO_2) permite a separação de componentes do veneno por meio de afinidade química, já que possuem alta afinidade ao grupamento fosfato dos peptídeos fosforilados, separando-os da porção não fosforilada (LARSEN et al., 2005).

A fosforilação está entre as modificações pós-traducionais mais difundidas na natureza, por exemplo, pode ocorrer fosforilação em mais de 30% das proteínas em uma determinada célula de mamífero. A fosforilação e desfosforilação de proteínas regula processos biológicos, tais como transdução de sinal, reconhecimento molecular, interação e outros eventos celulares. Uma compreensão fundamental destes processos biológicos em nível molecular requer, portanto, o reconhecimento e caracterização de possíveis alvos fosforilados (LARSEN et al., 2005).

2. OBJETIVOS

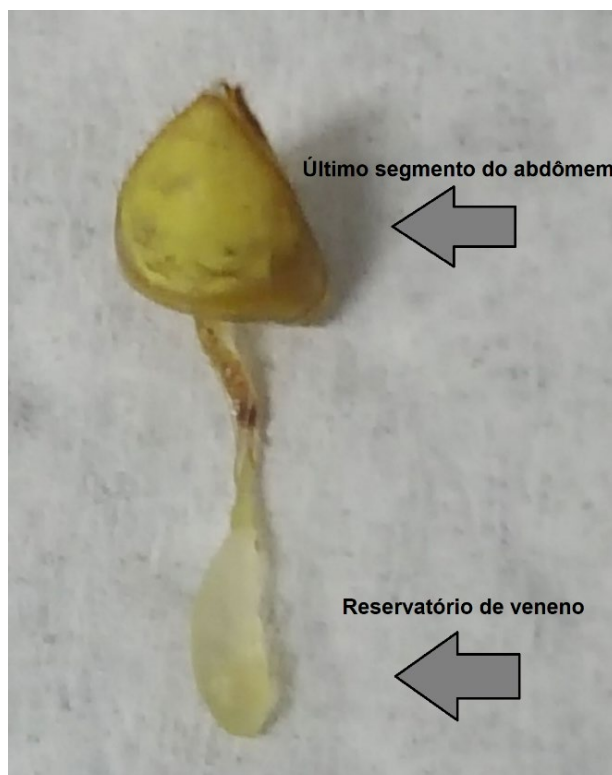
Neste estudo procurou-se realizar buscas de fosfopeptídeos presentes no veneno da vespa *Apoica pallens*. Para isso, foram utilizadas técnicas de separação entre proteínas e peptídeos, e enriquecimento dos peptídeos obtidos com resinas contendo dióxido de titânio (TiO₂). Para a realização deste trabalho, foram analisadas amostras complexas, ou seja, extrato bruto, as quais foram enriquecidas para serem submetidas ao LC/MS e LC/MSMS. Os resultados foram analisados por softwares de bioinformática peptidômica, com objetivo de se obter tanto as sequências peptídicas quanto de fazer uma correlação da função destas moléculas com a atividade biológica desempenhada pelo veneno desta espécie.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração do veneno

O veneno foi extraído de vespas *Apoica pallens*. Os reservatórios de veneno, que são pequenas vesículas transparentes com conteúdo líquido translúcido que fica na região posterior do abdômen da vespa, foram retirados com auxílio de pinças de ponta fina, tomando cuidado para que não estoureem causando a perda do conteúdo. Esses reservatórios foram então levados para tubos de microcentrífuga (EPPENDORF) de 1,5 mL contendo solução aquosa 50% (v/v) de Acetonitrila. Após serem colocados cerca de 100 reservatórios, o veneno foi extraído pressionando com um bastão de vidro de ponta arredondada contra o fundo do tubo, o processo se deu sem macerar para evitar que proteínas do tecido sejam liberadas, atrapalhando as análises posteriores. Usou Acetonitrila 50% (v/v) para promover precipitação da fração proteica, sendo que no sobrenadante permanecem os compostos de baixa massa molecular, como alguns sais e os peptídeos, sendo extraído desta forma, o que chamamos de fração peptídica.

Figura 3. Extração do reservatório de veneno do abdômen da vespa



Fonte: Captada e adaptada pelo autor.

O material foi então centrifugado em microcentrífuga de alta rotação (Modelo 5415 D, EPPENDORF) a 8000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante, contendo agora a fração peptídica do veneno, foi recolhido e filtrado em filtro hidrofóbico de acetato-celulose 0,45 μm (MILLIPORE) e em seguida liofilizado (liofilizador Drywinner 5, HETO) acoplado a um concentrador de amostras à vácuo (*SpeedVac*, HETO) e mantido refrigerado à -20°C até a utilização. As amostras foram quantificadas por método de peso seco e divididas em alíquotas de 1000 μg .

3.2 Enriquecimento de Fosfopeptídeos

A alíquota contendo 1000 μg foi enriquecida, devido à baixa concentração de fosfopeptídeos da fração peptídica do veneno. Para tal será utilizado o kit de enriquecimento para fosfopeptídeos Pierce TiO_2 *Phosphopeptide Enrichment and Clean-up Kit* (THERMO SCIENTIFIC), seguindo o protocolo do fabricante. Nessa etapa a fração peptídica será colocada em solução contendo a resina de TiO_2 que tem afinidade pelo grupo fosfato presente nos peptídeos. Desta forma é realizada a separação da fração de fosfopeptídeos dos peptídeos não fosforilados, por meio de consecutivas lavagens com os tampões próprios do kit. Os sais produzidos devido a técnica de enriquecimento serão removidos utilizando a *Graphite Clean-up* do próprio kit permitindo que os fosfopeptídeos sejam analisados por espectrometria de massa.

3.3 Experimento de peptidômica utilizando sistema LCMS-Q-TOF

Os peptídeos foram analisados em frações de 100 μL em um sistema LCMS-Q-TOF (BRUKER), para prospecção e sequenciamento de novos peptídeos. As análises realizadas no equipamento semi- μLC -ESI-micrOToF-QIII (BRUKER DALTONICS) utilizará um sistema de Cromatografia Líquida Ultrarrápida (UFLC - SHIMADZU) constituído de duas bombas LC20 AD e um injetor automático SIL 20 AHT (SHIMADZU). A cromatografia líquida utilizou uma coluna XBridge™ BEH130 C18 (2,1x100 mm; 3,5 μm). A temperatura da coluna foi mantida constante a 25°C . O sistema semi- μLC será diretamente conectado a um espectrômetro de massas do tipo ESI-micrOToF-QIII 12 (BRUKER DALTONICS). As fases móveis utilizadas foram (A)

H₂O/Ácido fórmico 0,1% (v/v) e (B) Acetonitrila (ACN)/Ácido fórmico 0,1% (v/v). O gradiente de eluição foi de 5 a 95% (v/v) de B em 90 minutos, com fluxo de solvente de 0,2 ml/min, a 25 °C e eluição dos componentes foi monitorada por absorbância ultravioleta a 214 nm.

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização “electrospray” (ESI). Os espectros de massas serão obtidos com velocidade de aquisição de 1 Hz, a voltagem na agulha a 4,5kV e a voltagem no cone a 3,5 kV, pressão do gás nebulizador será 3 bar, fluxo do gás secante de 8 l/min e a temperatura de 200 °C. O tempo de pré-pulso foi ajustado para 4 µs. A energia de colisão utilizada foi de 8 eV no modo MS, e de 15 eV no modo MS/MS, sendo utilizada a aquisição simultânea dos dados de MS e MS/MS. Esse sistema foi calibrado através de uma solução padrão de calibração de peptídeos (Tunning Mix low concentration, AGILENT) no modo positivo, considerando um erro de até 5 ppm e um escore de calibração mínimo de 90%.

A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, com uma resolução de aproximadamente 15000. Os experimentos de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, espectros de fragmentação peptídica (MS²) em condições de dissociação induzida por colisão (CID) foram realizados utilizando-se os mesmos parâmetros dos experimentos de MS¹. Foi utilizado nitrogênio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa. Os dados adquiridos foram processados pelo software DataAnalysis v4.3 (BRUKER DALTONICS).

3.4 Processamento dos espectros com Script do Biotoools Software no Compass DataAnalysis

Os espectros produzidos no espectrômetro de massa são brutos e para serem sequenciados existe a necessidade de processar esses dados. Para tal é utilizado o script da BioTools Software (BRUKER DALTONICS) que se segue abaixo.

Figura 4. Script da BioTools Software

```
'This script creates compounds from autoMS(n) data
'within the selected range and exports the data
'as mgf file using the analysis name
option explicit

dim filename, Filename2, targetxml, targetmgf

'select a retention time range of 5 - 45 min
Analysis.AddChromatogramRangeSelection 5,180, 0, 0

'perform Find Compounds AutoMS(n)
Analysis.FindAutoMSn

'deconvolute all compound spectra
'Analysis.Compounds.Deconvolute

'make filename for MGF file within analysis folder
filename = Analysis.Name
filename2 = split(filename, ".d", -1, 1)
targetmgf = Analysis.Path & "\" & filename2(0) & ".mgf"

'export MGF file
Analysis.compounds.export targetmgf, daMGF

'perform MASCOT search
Analysis.mascotsearch

Analysis.compounds.clear

form.close
```

Fonte: BioTools Software. Captado pelo autor.

Ao final do processamento pelo script será gerado o arquivo que poderá ser utilizado pelos softwares de bioinformática subsequentes para sequenciamento dos resíduos de aminoácidos de cada peptídeo.

3.5 Identificação dos peptídeos a partir do PEAKS X

PEAKS X é uma ferramenta de análise de dados de espectrometria de dados proteômica e peptidômica que proporciona a identificação dos peptídeos, das modificações pós traducionais (*Post Translational Modification* – PTM) como fosforilações, bem como a validação e a visualização dos resultados a partir dos dados brutos de espectrometria de massas.

Este software será utilizado para otimizar os sequenciamentos dos peptídeos encontrados na fase de espectrometria de massas. Foram utilizados parâmetros de buscas na qual pudesse ocorrer oxidação de resíduos de Metionina como modificação variável dos peptídeos fosforilados e não fosforilados. Além de modificações variáveis, especificamente para os peptídeos fosforilados, foi utilizado o parâmetro de busca de modificações fixas de fosforilação para resíduos de Serina, Treonina e Tirosina (sítios de fosforilação).

3.6 Etapa de alinhamento das sequências

Os peptídeos sequenciados pelo PEAKS STUDIO e resolvido a ambiguidade I/L serão então comparados por alinhamento com sequências já descritos na literatura organizados em Peptídeos quimiotáticos, Mastoparanos e Cininas. Como sequência representando os peptídeos quimiotáticos estão a sequência da Protonectina e Protonectina(1-6) (I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-G-L e I-L-G-T-I-L respectivamente) encontrados na vespa *Agelaia pallipes pallipes*, além da Protonectina e Polybia-CP (I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-G-L e I-L-G-T-I-L-G-L-L-K-S-L respectivamente) presentes em *Polybia paulista*. Entre as sequências de Mastoparanos presentes no alinhamento estão App-5 (I-N-W-K-A-I-L-E-R-I-K-M-A) de *Agelaia pallipes pallipes*, Apoica-MP (I-N-W-L-K-I-A-K-K-V-A-G-M-L) de *Apoica pallens*, Domilina A (I-N-W-K-K-I-A-E-V-G-G-K-I-L-S-S-L) de *Polistes dominulus* e Mastoparano-X (I-N-W-K-G-I-A-A-M-A-K-K-L-L) de *Vespa xanthoptera*. Como referência no alinhamento das Cininas encontra-se a

sequência da Bradicinina (R-P-P-G-F-S-P-R) presente em mamíferos, Thr6-Bradicinina (R-P-P-G-F-T-P-F-R) de *Chiphononix fulvognathus*, Vespacinina-X (A-R-P-P-G-F-S-P-F-R-I-V) de *Vespa xanthoptera*, Polistescinina-3 (P-E-T-N-K-K-K-L-R-G-R-P-P-G-F-S-P-F-R) de vespas do gênero *Polistes* sp.

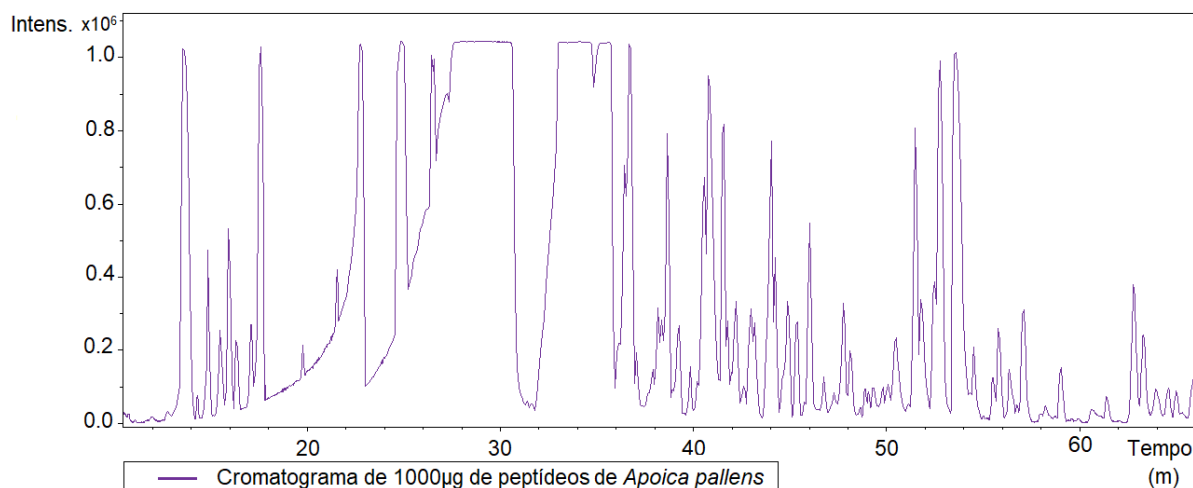
A partir do alinhamento pode se determinar qual classe os peptídeos encontrados pertencem e assim inferir as características do veneno por meio da elucidação de seus componentes.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. Cromatografia líquida da fração peptídica

Uma alíquota de 1000 µg da fração peptídica do veneno foi utilizada para ser sequenciada pelo espectrômetro de massas e teve seu perfil cromatográfico observado como na figura 3. O que se pôde observar é a presença de uma riqueza de compostos ao longo de toda eluição da coluna pela quantidade de picos presentes no perfil cromatográfico. Além disso há uma grande abundância de peptídeos especialmente entre os intervalos 27 e 31 minutos e 33 e 36 minutos.

Figura 5. Fração peptídica do veneno imobilizada numa coluna XBridge™ BEH130 C18 (2,1x100mm; 3,5µm). A eluição se deu em condição isocrática de 0 a 5.0 min com 5% (v/v) de ACN (contendo 0.1% (v/v) de TFA) seguindo para um gradiente linear de 5 a 95% (v/v) de ACN (contendo 0.1% (v/v) de TFA) no intervalo de 5.1 a 90.0 min. A eluição se deu em 25°C, sob fluxo de solvente de 0,2 ml/min, o volume de amostra injetada foi de 2 µL e eluição dos componentes foi monitorada por absorbância ultravioleta a 214nm.



Fonte: DataAnalysis. Captado pelo autor.

Os espectros foram obtidos sob dissociação induzida por colisão (CID - collision-induced dissociation) e sua interpretação foi realizada utilizando o software *PEAKS X – Complete Solutions for Proteomics*, que permitiu o sequenciamento dos resíduos de aminoácidos quase completamente.

A identificação I/L foi realizada manualmente por meio da identificação dos íons -d e -w que são oriundos da fragmentação da cadeia lateral desses aminoácidos.

Simulações de fragmentação para os resíduos de Leucina ou Isoleucina foram obtidas por meio do software MassLynx v3.2 (WATERS) em que íons -d e -w dessas simulações foram procurados no espectro de peptídeo selecionados para resolver a ambiguidade entre Isoleucina e Leucina. Já Lisina e Glutamina não são diferenciáveis utilizando esse protocolo experimental e foram mantidas na forma ambígua.

O objetivo desse trabalho é de encontrar peptídeos fosforilados de amostras do veneno de *A. pallens* no entanto, a partir do processo de enriquecimento do protocolo descrito em “materiais e métodos” não foram encontrados na amostra enriquecida. Esse fato provavelmente ocorreu devido à instabilidade dos fosfopeptídeos nas concentrações utilizadas no protocolo de enriquecimento, havendo dissociação do grupo fosfato na sua forma ácida, conforme reportado por Resende e colaboradores (2013). Outra hipótese especulativa é ter ocorrido hidrólise do grupo fosfato antes mesmo do processo de enriquecimento, por ação de fosfatases endógenas presentes no veneno. Independentemente da razão de não ter sido encontrado fosfopeptídeos nas amostras enriquecidas alguns puderam ser apontados nos espectros da amostra não enriquecida, sendo então selecionados para continuidade do trabalho.

A amostra analisada foi sequenciada utilizando o software PEAKS STUDIO X (BIOINFORMATICS SOLUTIONS, INC.) de maneira automatizada visando maximizar o número de sequências dos peptídeos encontrados. Esse software possui um algoritmo que busca identificar os resíduos de aminoácidos por meio da subtração de todos os picos com seus picos adjacentes, sendo a sequência final exibida a matematicamente mais provável para a determinação no espectro.

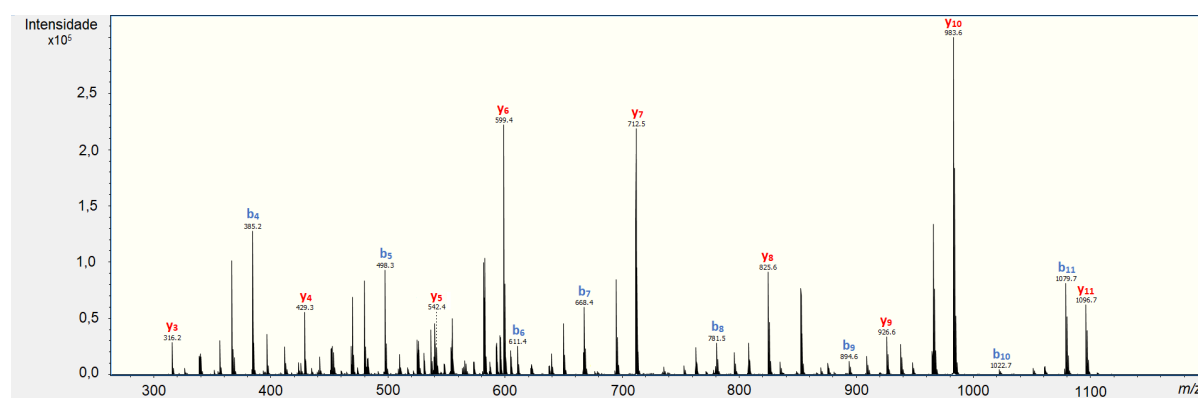
Como exemplo do procedimento de sequenciamento manual será utilizado a Protonectina, um dodecapeptídeo de 1208 Da previamente descrito na literatura encontrado no veneno de *A. pallens*. O íon precursor de m/z 605,91 na forma $[M+2H]^{2+}$ foi deconvolvido, ou seja os picos no espectro foram convertidos para forma $[M+H]^+$ (monoprotonada) para facilitar o sequenciamento.

Os resíduos são identificados na série -b a partir da extremidade N-terminal do peptídeo já série -y se dá na extremidade C-terminal de modo que as duas séries são complementares e quando espectros mais pobres em que picos de uma das séries é suprimido a determinação é feita a partir da outra série.

4.2. Sequenciamento de peptídeo de íon precursor m/z 605,91 $[M+2H]^{2+}$

Por meios da diferença entre as massas de picos consecutivos que correspondam a massa de resíduos de aminoácidos naturais é possível reconhecer as séries de íons fragmentos no espectro. A identificação da sequência completa do peptídeo pode ser confirmada além da presença das duas séries de íons principais - b e -y mas também por picos que correspondem a perdas neutras (NH_3 ou H_2O) dos picos dessas duas séries principais.

Figura 6. Espectro de fragmentação do íon precursor m/z 605,91 na forma $[M+2H]^{2+}$



Fonte: DataAnalysis. Captado pelo autor

A série de íons -b pode ser observada no espectro da figura 6: m/z 385,2 (b_4), m/z 498,3 (b_5), m/z 611,4 (b_6), m/z 668,4 (b_7), m/z 781,5 (b_8), m/z 894,6 (b_9), m/z 1022,7 (b_{10}), m/z 1079,7 (b_{11}). A série -y também pode ser observada no espectro: m/z 316,2 (y_3), m/z 429,3 (y_4), m/z 542,4 (y_5), m/z 599,4 (y_6), m/z 712,5 (y_7), m/z 825,6 (y_8), m/z 926,6 (y_9), m/z 983,6 (y_{10}), m/z 1096,7 (y_{11}).

Usando como exemplo o íon b_4 do espectro tem valor de m/z de 385,2 que corresponde a soma da massa dos resíduos de Isoleucina (113,16 Da), Leucina (113,16 Da), Glicina (57 Da), Treonina (101,10 Da) e ao valor de um próton (1 Da). Já o íon b_5 de m/z 498,3 corresponde a massa do resíduo de Isoleucina a soma do íon fragmento b_4 . Enquanto o íon b_6 tem o valor do íon b_5 acrescido do valor da massa do resíduo de Leucina e assim sucessivamente para os demais íons da série.

Analisando o espectro apresentado é possível chegar na sequência **I/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LK/QGI/L** sendo que os resíduos I/L e o K/Q são isóbaros e, portanto, ambíguos ao se utilizar as séries -b e -y.

É possível observar no espectro que nem todos os íons representam as séries -b e -y e assim íons de outras séries são utilizados para confirmar a identificação. A série de íons -d e -w, que podem ser utilizados para diferenciar aminoácidos isóbaros como Isoleucina e Leucina (ambos resíduos possuem 113,16 Da) e foram simulados entre as possibilidades de peptídeos contendo I ou L na sua cadeia pelo software Protein/Peptide Editor in BioLynx/Mass Lynx (v3.2) (WATERS). Todos os valores simulados foram cuidadosamente procurados em cada espectro dos peptídeos para poder desfazer essas ambiguidades.

Os íons que indicam a determinação das sequência ambíguas são: m/z 442,3 (da_5), m/z 541,4 (da_6), m/z 711,5 (da_8), m/z 824,6 (da_9), m/z 937,6 (da_{10}), m/z 371,2 (wa_4), m/z 484,3 (wa_5), m/z 654,4 (wa_7), m/z 781,5 (wa_8), m/z 795,5 (wb_8), m/z 1038,7 (wa_{11}).

Após a busca desses íons foi possível resolver as ambiguidades entre os resíduos de Leucina e Isoleucina concluindo a seguinte sequência **ILGTILGLLK/QGL**.

Os espectros a seguir pertencem as sequências de peptídeos fosforilados e não fosforilados com maiores índices de confiabilidade e com mais de 80% de área de cobertura (ALC > 80%) segundo o critério interno do algoritmo do software PEAKS STUDIO.

Esses peptídeos selecionados para diferenciar as ambiguidades I/L por meio da busca manual dos íons -d e -w obtidos por meio de simulações usando o MassLynx (v3.2) exibem seus respectivos espectros.

4.3. Resultado do sequenciamento pelo PEAKS STUDIO para peptídeos fosforilados

Os fosfopeptídeos foram encontrados utilizando parâmetros de busca específicos para fosforilações em que variações de massa de 79,97 Da a resíduos aminoácidos que são sítios de fosforilação STY (Serina, Treonina e Tirosina) indicam a presença de fosforilação nesse resíduo. O local da fosforilação na sequência de cada espectro está indicado com o uso do índice “p” subscrito ao resíduo fosforilado. Simulações de íons da série “d” e “w” foram utilizados para resolver a ambiguidade entre Isoleucina e Leucina. Os espectros foram abertos utilizando os recursos do

software PEAKS STUDIO para a busca desses íons que, em geral, possuem baixa intensidade.

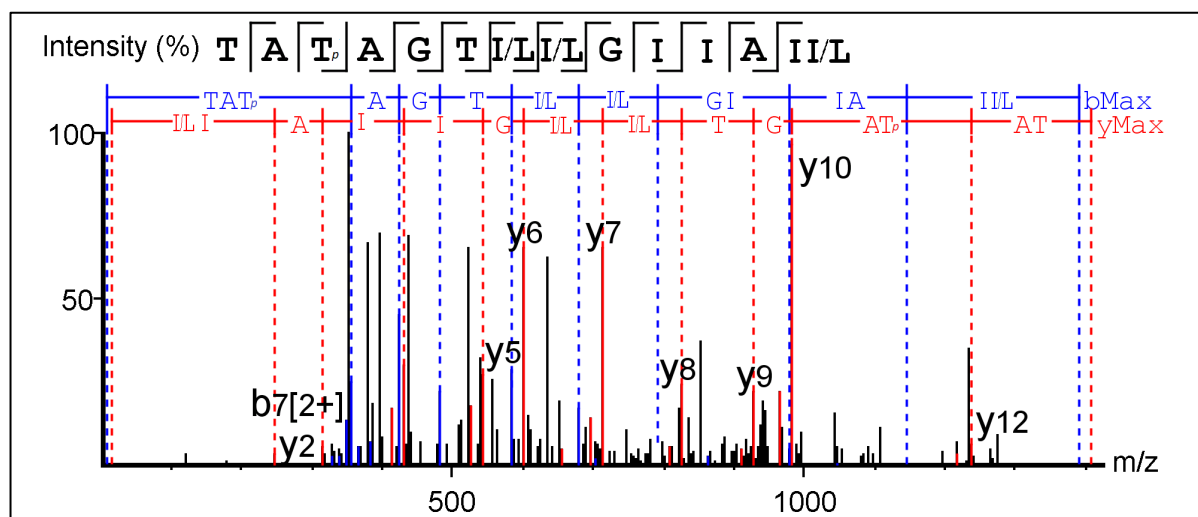
Dessa forma, segue-se uma seção dedicada ao resultado do sequenciamento a ser ilustrada pelo Quadro 1 a seguir.

Quadro 1. Fosfopeptídeos com ambiguidade I/I resolvidas.

Sequências	Figura
T-A-T_p-A-G-T-I/L-I/L-G-I-I-A-I-I/L	Figura 7
D-V-I-G-L-A-H-I-S_p-I-G-T-I-L-G-I-I-A-I-I/L	Figura 8
I/L-A-R-A-I-G-H-G-S_p-L-I-I-G-T-L-I-G-I-I-I-L-A	Figura 9
I/L-M-S_p-I-G-I-I/L-T-G-I/L-I-G-I-I-I-P-S	Figura 10
G-S-K/Q-H-A-I-S_p-G-T-I/L-I/L-G-L-I/L-I-I/L-A	Figura 11
V-V-I/L-S_p-P-I/L-K/Q-I/L-A-K/Q-K/Q-V-A	Figura 12
C-K/Q-S_p-A-I/L-K/Q-A-A-C-I/L-I-G-T-L-I-G-I-A-P-E-I/L	Figura 13
K/Q-K/Q-V-I-H-I-G-S_p-I/L-I-L-G-T-L-L-G-I/L-I-I/L-P-S	Figura 14

Elaborado pelo autor.

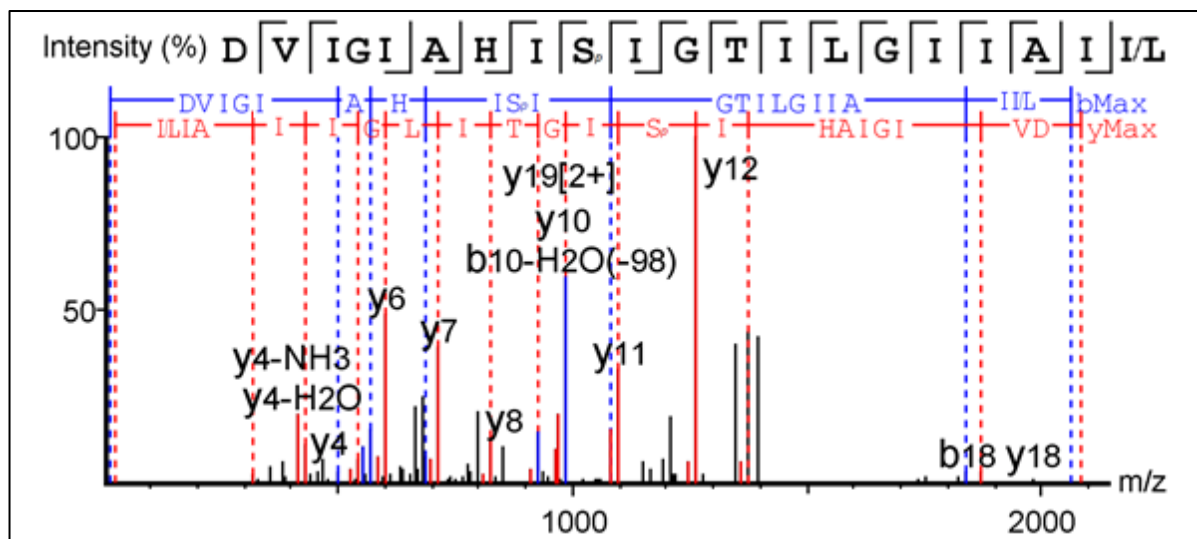
Figura 7. Espectro CID do peptídeo natural T-A-T_p-A-G-T-I/L-I/L-G-I-I-A-I-I/L selecionando-se o íon precursor de m/z 704,399 $[M+2H]^{2+}$, possuindo uma fosforilação em uma de suas Treoninas (índice “p” subscrito ao resíduo de Treonina representa sua fosforilação). Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons m/z 123,4 (db_{13}), m/z 398,3 (wb_4), m/z 511,3 (wb_5) indicaram a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 10, 11 e 13 do peptídeo.

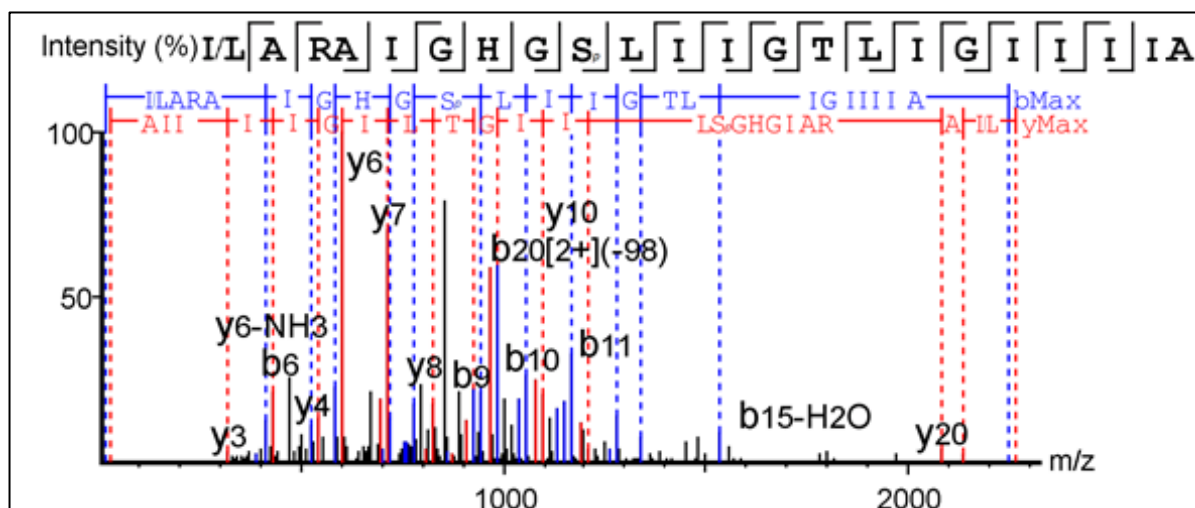
Figura 8. Espectro CID do peptídeo natural D-V-I-G-I-A-H-I-S_p-I-G-T-I-L-G-I-I-A-I-I/L selecionando-se o íon precursor de m/z 695,0761 $[M+3H]^{3+}$, possuindo uma fosforilação em sua Serina (índice “p” subscrito ao resíduo de Serina representa sua fosforilação). Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 456,3 (db_5), m/z 763,4 (da_8), m/z 777,5 (db_8), m/z 1314,7 (da_{13}), m/z 384,2 (wa_4), m/z 497,3 (wa_5), m/z 1051,7 (wa_{11}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 3, 5, 8, 10, 13, 16, 17 e 19. Já o íon de m/z 1413,8 (da_{14}) indica presença de resíduo de Leucina na posição 14.

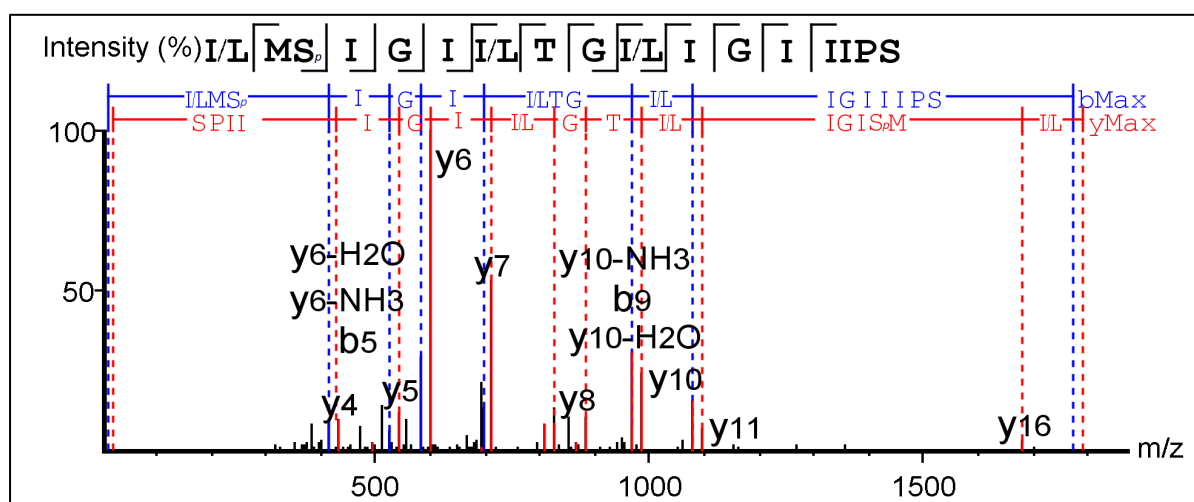
Figura 9. Espectro CID do peptídeo natural I/L-A-R-A-I-G-H-G-S_p-L-I-I-G-T-L-I-G-I-I-I-A Selecionando-se o íon precursor de m/z 755,7969 $[M+3H]^{3+}$, possuindo uma fosforilação em sua Serina (índice “p” subscrito ao resíduo de Serina representa sua fosforilação). Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 469,3 (db_5), m/z 1226,7 (da_{12}), m/z 2022,4 (db_{20}), m/z 172,1 (wb_2), m/z 384,2 (wa_4), m/z 497,3 (wa_5), m/z 667,4 (wa_7), m/z 1164,8 (wa_{12}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 5, 11, 12, 16, 18, 19, 20 e 21. Já os íons m/z 1483,8 (da_{15}) e m/z 1263,8 (wa_{13}) indicam presença de resíduos Leucina nas posições 10 e 15.

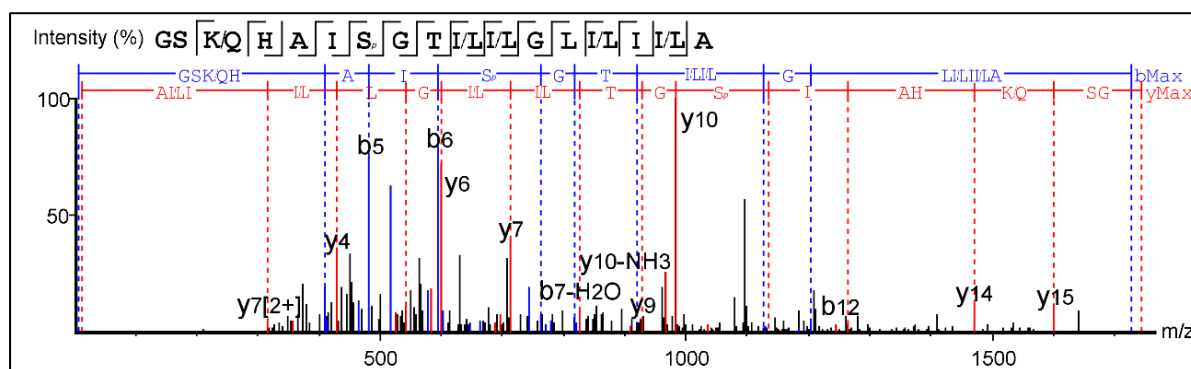
Figura 10. Espectro CID representando o peptídeo natural I/L-M-S_p-I-G-I-I/L-T-G-I/L-I-G-I-I-I-P-S, selecionando-se o íon precursor de m/z 597,6721 $[M+3H]^{3+}$, possuindo uma fosforilação em uma de suas Serinas (índice “p” subscrito ao resíduo de Serina representa sua fosforilação). Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 469,2 (db_4), m/z 1136,6 (da_{11}), m/z 1150,6 (db_{11}), m/z 1306,7 (da_{13}), m/z 1320,7 (da_{13}), m/z 285,1 (wa_3), m/z 384,2 (wa_5), m/z 667,4 (wa_7), m/z 1178,7 (wa_{12}), m/z 1334,8 (wa_{14}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 4, 6, 11, 13, 14 e 15.

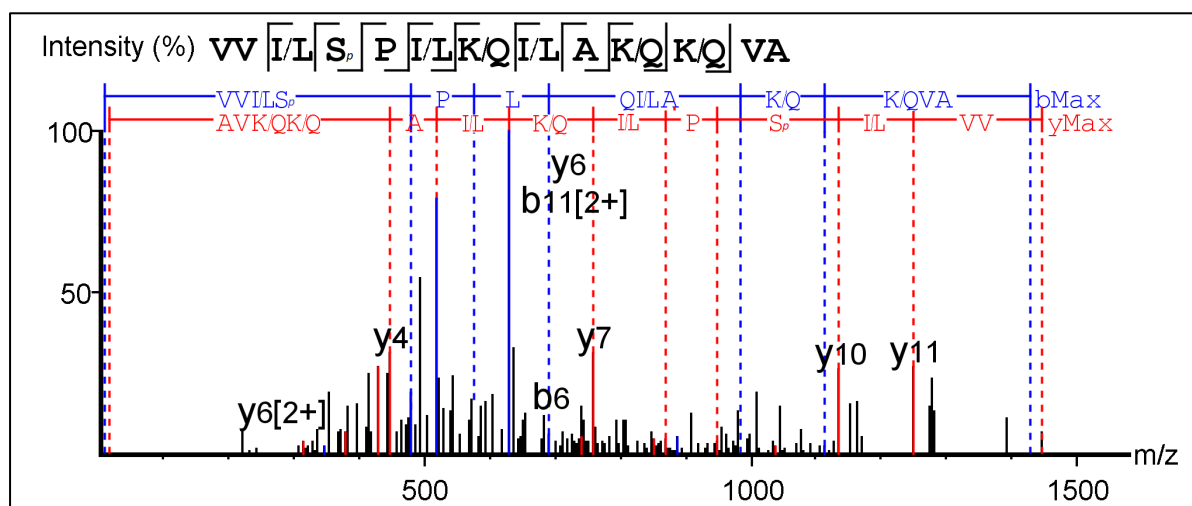
Figura 11. Espectro CID representando o peptídeo natural G-S-K/Q-H-A-I-S_p-G-T-I/L-I/L-G-L-I/L-I/L-A, selecionando-se o íon precursor de m/z 872,4958 $[M+2H]^{2+}$, possuindo uma fosforilação em sua Serina (índice “p” subscrito ao resíduo de Serina representa sua fosforilação). Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 538,2 (db_6), m/z 1485,8 (db_{15}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 6 e 15. O íon de m/z 1245,6 (da_{13}) indica a presença de um resíduo de Leucina na posição 13.

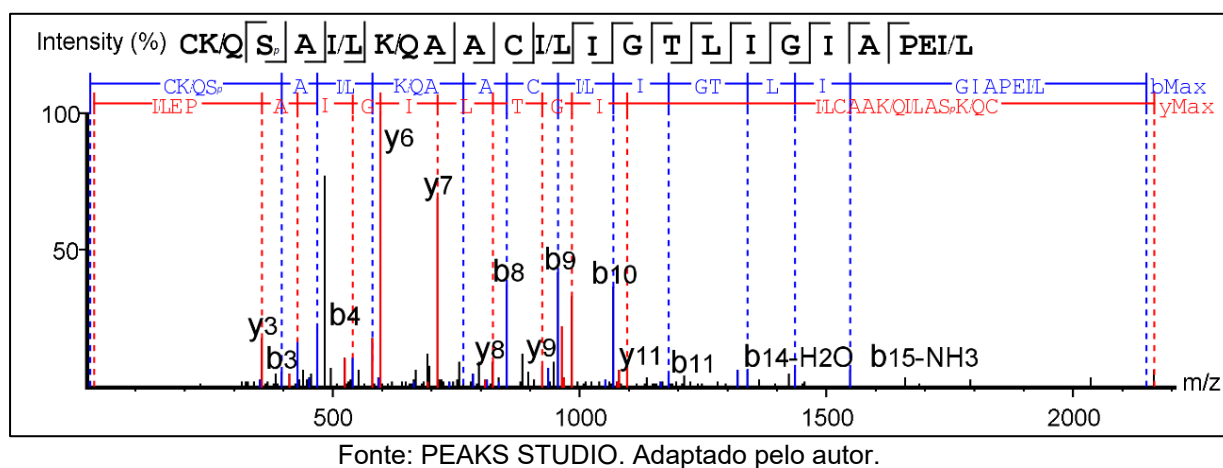
Figura 12. Espectro CID representando o peptídeo natural V-V-I/L-S_p-P-I/L-K/Q-I/L-A-K/Q-K/Q-V-A, selecionando-se o íon precursor de m/z 482,6173 $[M+3H]^{3+}$, possuindo uma fosforilação em sua Serina (índice “p” subscrito ao resíduo de Serina representa sua fosforilação). Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

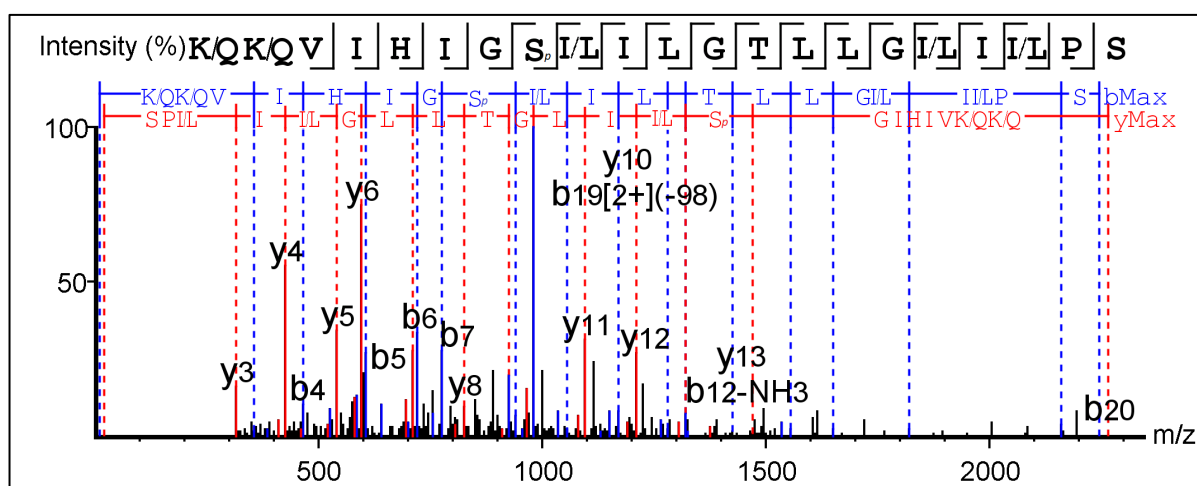
Os íons de m/z 874,5 (da_8), m/z 839,5 (wa_8) indicam a presença de resíduos de Isoleucina. Os íons de m/z 619,3 (da_6), m/z 860,5 (da_8) indicam a presença de resíduos de Leucina. Os íons encontrados referem-se as mesmas posições tornando inconclusiva a diferenciação entre Isoleucina e Leucina sendo representada por I/L.

Figura 13. Espectro CID representando o peptídeo natural C-K/Q-S_p-A-I/L-K/Q-A-A-C-I/L-I-G-T-L-I-G-I-A-P-E-I/L, selecionando-se o íon precursor de m/z 722,3954 $[M+3H]^{3+}$, possuindo uma fosforilação em sua Serina (índice “p” subscrito ao resíduo) representa sua fosforilação Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Os íons de m/z 497,3 (wa_5), m/z 511,3 (wb_5), m/z 667,4 (wa_7), m/z 1051,6 (wa_{11}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 11, 15 e 17. O íon de m/z 1383,7 (da_{14}) indica a presença de resíduo de Leucina na posição 14.

Figura 14. Espectro CID representando o peptídeo natural K/Q-K/Q-V-I-H-I-G-S_p-I/L-I-L-G-T-L-L-G-I/L-I-I/L-P-S, selecionando-se o íon precursor de m/z 1133,186 $[M+2H]^{2+}$, possuindo uma fosforilação em uma de suas Serinas (índice “p” subscrito ao resíduo de Serina representa sua fosforilação). Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 413,3 (da_4), m/z 1895,3 (da_{18}), m/z 384,2 (wa_4), m/z 1164,7 (wa_{12}), m/z 1178,7 (wb_{12}), m/z 1614,9 (wa_{16}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 4, 6, 10 e 18. O íon de m/z 1212,0 (da_{11}) e m/z 1483,9 (da_{14}) indicam a presença de resíduo de Leucina nas posições 11, 14 e 15.

4.4. Resultado do sequenciamento pelo PEAKS STUDIO para peptídeos não-fosforilados

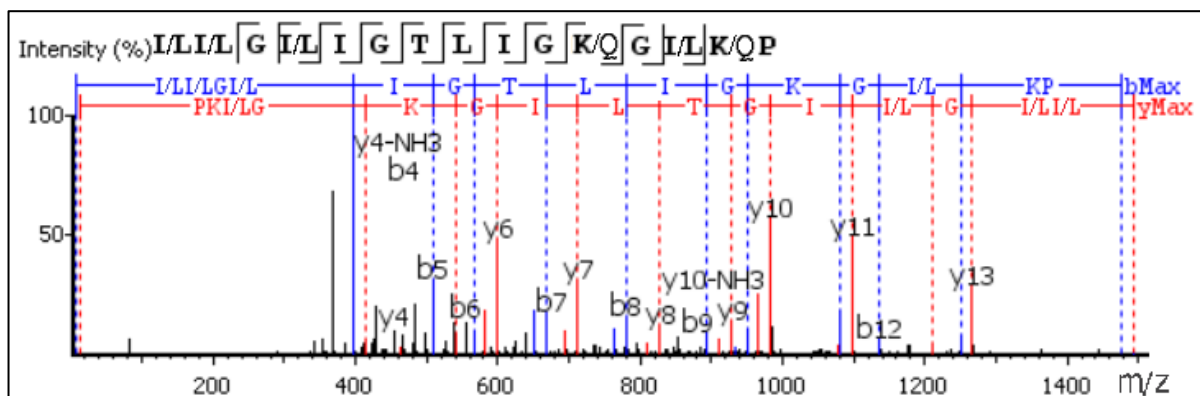
Os peptídeos não fosforilados foram encontrados utilizando parâmetros de buscas compreendendo a forma oxidada da Metionina como uma modificação variável. Por meio de simulações de íons da série “d” e “w” foram utilizados para resolver a ambiguidade entre Isoleucina e Leucina. Os espectros foram abertos utilizando os recursos do software PEAKS STUDIO para a busca desses íons que, em geral, possuem baixa intensidade.

Quadro 2. Peptídeos não fosforilados com ambiguidade I/L resolvidas

Sequências	Figura
I/L-I/L-G-I/L-I-G-T-L-I-G-K/Q-G-I/L-K/Q-P	Figura 15
I/L-I-G-T-I-I-G-I-I/L-A-I/L-I/L	Figura 16
N-A-I-I/L-G-T-I-I/L-G-I-I/L-I/L-S-P	Figura 17
E-P-A-I/L-I/L-I-G-I/L-I/L-A-I-I	Figura 18
W-K/Q-P-T-A-E-A-I-I-G-T-I/L-I/L-G-I/L-I/L-P-P-C	Figura 19
I/L-N-W-I/L-K/Q-I/L-A-K/Q-K/Q-V-A-G-M	Figura 20
I/L-I/L-G-T-I/L-I/L-L-I/L-G-N-G-R-G-F-T	Figura 21
E-P-G-T-I/L-I-I-I-G-T-I-I-G-I-I/L-A-I/L-I/L	Figura 22

Elaborado pelo autor.

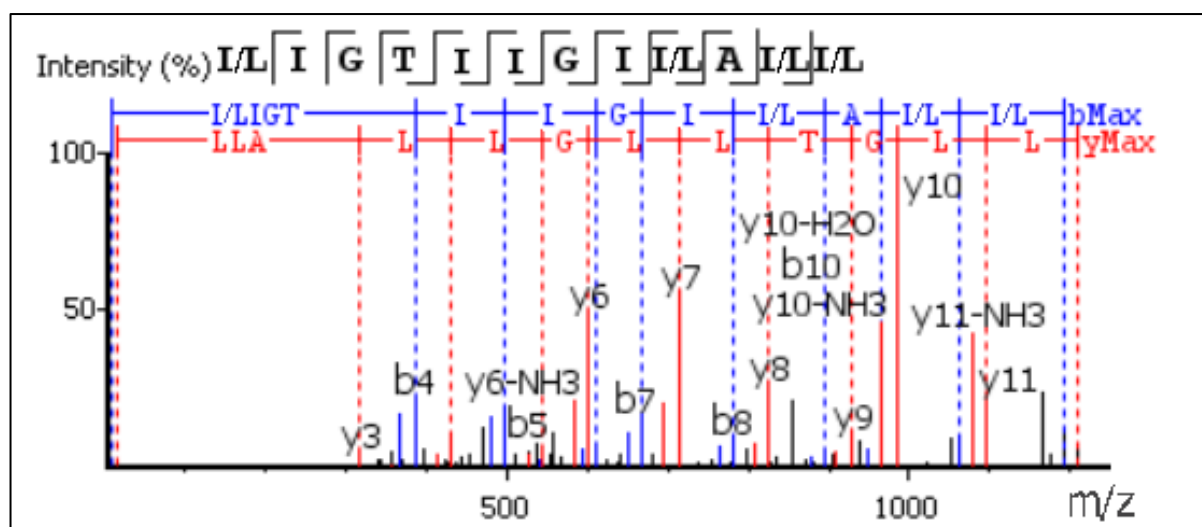
Figura 15. Espectro CID representando o peptídeo natural I/L-I/L-G-I/L-I-G-T-L-I-G-K/Q-G-I/L-K/Q-P, selecionando-se o íon precursor de m/z 746,9844 $[M+2H]^{2+}$. Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 454,3 (da_5), m/z 383,6 (da_9), m/z 667,4 (wa_7), m/z 1051,7 (wa_{11}), m/z 1065,7 (wb_{11}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 5 e 9. O íon de m/z 766,5 (wa_8) indica a presença de resíduo de Leucina na posição 8.

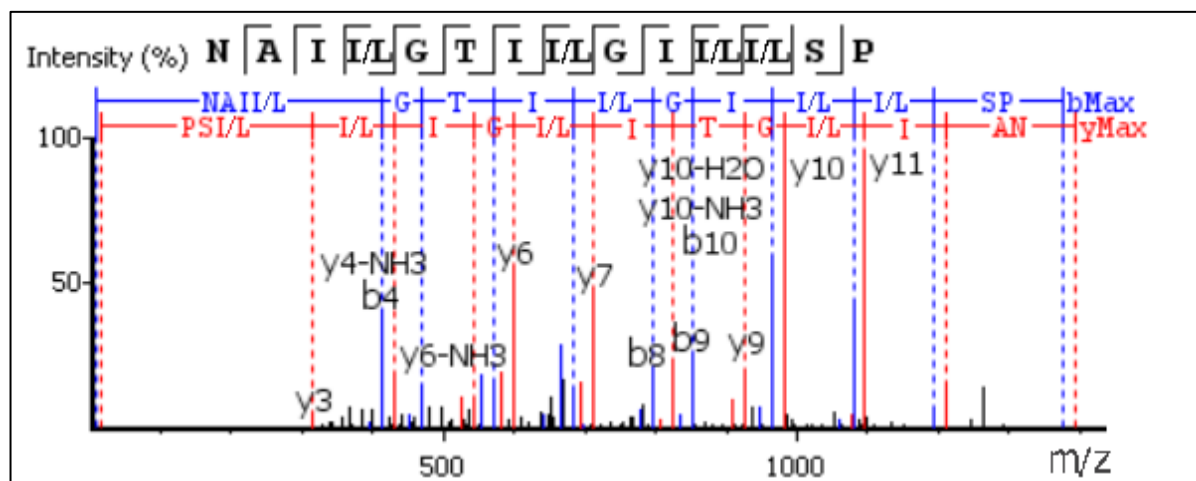
Figura 16. Espectro CID representando o peptídeo natural I/L-I-G-T-I-I-G-I-I/L-A-I/L-I/L, selecionando-se o íon precursor de m/z 605,4055 $[M+2H]^{2+}$. Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 442,3 (da_5), m/z 555,4 (da_6), m/z 739,5 (db_8), m/z 780,5 (wa_8), m/z 1051,7 (wa_{11}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 2, 5, 6 e 8.

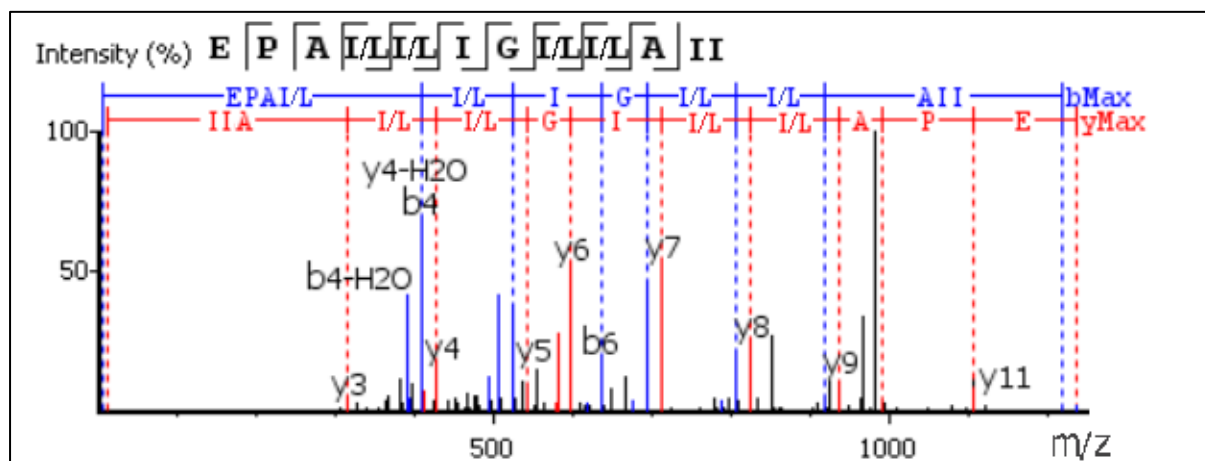
Figura 17. Espectro CID representando o peptídeo natural N-A-I-I/L-G-T-I-I/L-G-I-I/L-I/L-S-P, selecionando-se o íon precursor de m/z 697,9363 $[M+2H]^{2+}$. Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 243,1 (da_3), m/z 910,6 (da_{10}), m/z 497,3 (wa_5), m/z 667,4 (wa_8) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 3, 7 e 10.

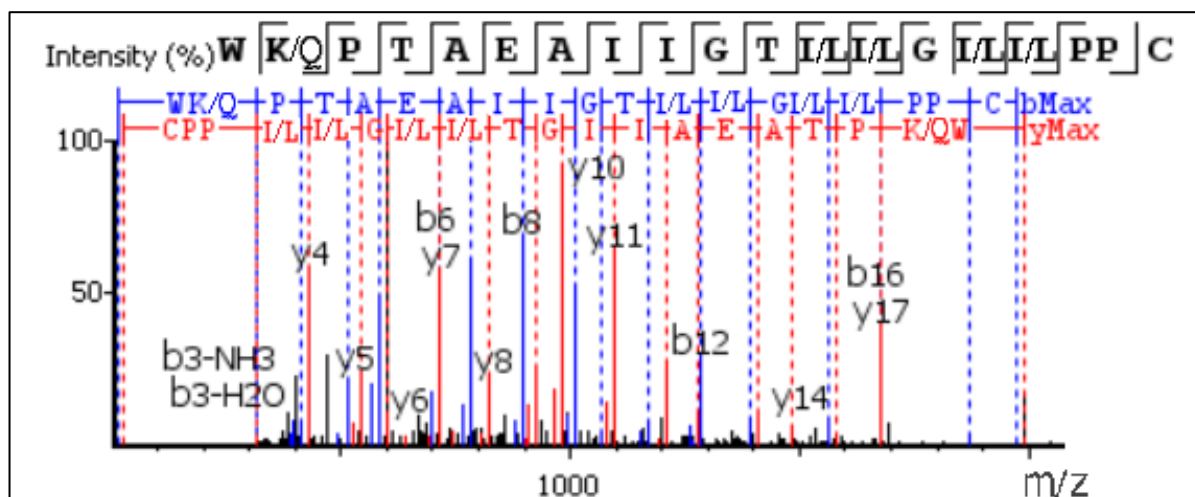
Figura 18. Espectro CID representando o peptídeo natural E-P-A-I/L-I/L-I-G-I/L-I/L-A-I-I, selecionando-se o íon precursor de m/z 618,4058 $[M+2H]^{2+}$. Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 1048,7 (da_{11}), m/z 87,0,4 (wa_1), m/z 214,1 (wb_2), m/z 667,4 (wa_7) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 6, 11 e 12.

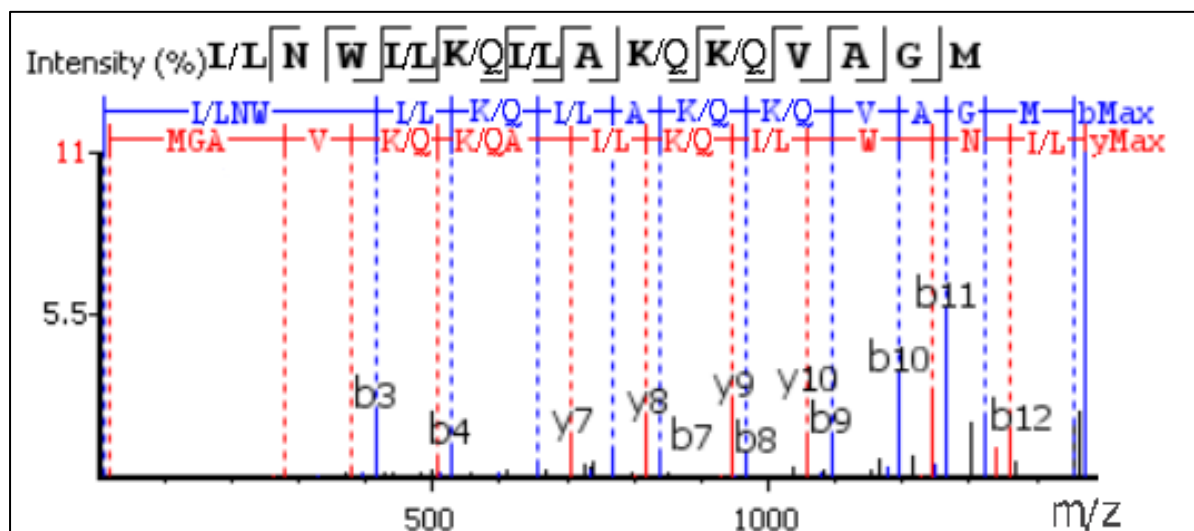
Figura 18. Espectro CID representando o peptídeo natural W-K/Q-P-T-A-E-A-I-I-G-T-I/L-I/L-G-I/L-I/L-P-P-C, selecionando-se o íon precursor de m/z 997,0494 $[M+2H]^{2+}$. Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 1051,6 (wa_{11}), m/z 1164,7 (wa_{12}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 8 e 9.

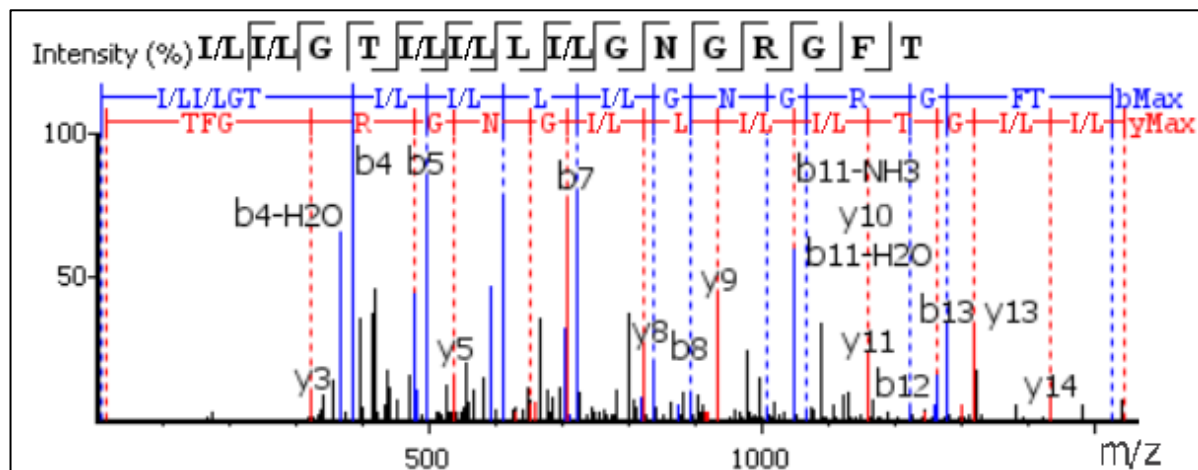
Figura 19. Espectro CID representando o peptídeo natural I/L-N-W-I/L-K/Q-I/L-A-K/Q-K/Q-V-A-G-M, selecionando-se o íon precursor de m/z 736,4388 $[M+2H]^{2+}$. Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Não foram encontrados os valores dos íons “d” e “w” da simulação presentes no espectro do peptídeo I/LNWI/LK/QI/LAK/QK/QVAGM que indicassem a diferenciação entre Isoleucina e Leucina e, portanto, todas as ambiguidades foram apresentadas como I/L.

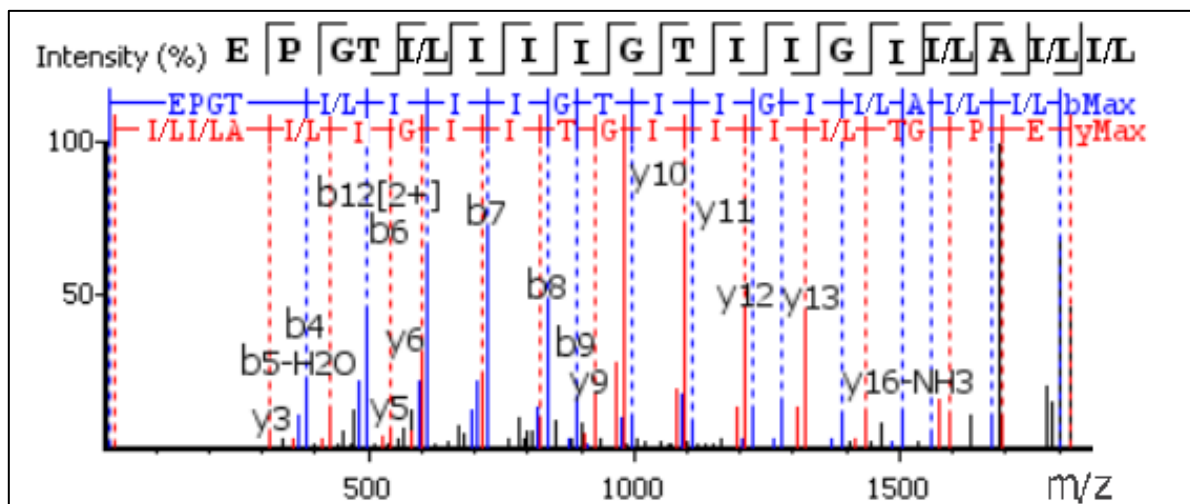
Figura 20. Espectro CID representando o peptídeo natural I/L-I/L-G-T-I/L-I/L-L-I/L-G-N-G-R-G-F-T, selecionando-se o íon precursor de m/z 772,9730 $[M+2H]^{2+}$. Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

O íon de m/z 654,5 (da_7) indica a presença de resíduo de Leucina na posição 7.

Figura 21. Espectro CID representando o peptídeo natural E-P-G-T-I/L-I-I-I-G-T-I-I-G-I/L-L-A-I/L-I/L, selecionando-se o íon precursor de m/z 910,0494 $[M+2H]^{2+}$. Os íons-fragmentos tipo “y” e “b” foram representados em vermelho e azul, respectivamente.



Fonte: PEAKS STUDIO. Adaptado pelo autor.

Os íons de m/z 555,3 (da_6), m/z 668,4 (da_7), m/z 781,5 (da_8), m/z 1052,6 (da_{11}), m/z 1165,7 (da_{12}), m/z 497,4 (wa_5), m/z 667,4 (wa_7), m/z 1051,7 (wa_{11}), m/z 1164,8 (wa_{12}), m/z 1291,9 (wa_{13}) indicam a presença de resíduos de Isoleucina nas posições 6, 7, 8, 11, 12 e 14.

4.5. Peptídeos que tiveram suas sequências alinhadas

Os peptídeos fosforilados e não fosforilados foram então alinhados a partir de sua sequência com dados presentes na literatura em que sua atividade biológica foi descrita por meio de bioensaios. A partir desses alinhamentos é possível inferir a função das sequências baseado na função de moléculas semelhantes.

Tabela 1. Alinhamento das sequências de peptídeos quimiotáticos

Espécie	Peptídeo	Sequência															
<i>A. pallipes</i>	Protonectina ^[1]	I L G T I L G L L K G L															
	Protonectina (1-6) ^[1]	I L G T I L															
<i>A. pallens</i>	Apoica CP-1*	I/L I G T I I G I I/L A I/L I/L															
	Apoica CP-2*	I/L I/L G T I/L I/L L I/L G N G R G F T															
	Apoica CP-3*	N A I I/L G T I I/L G I I/L I/L S P															
	Apoica CP-4*	I/L I/L G I/L I G T L I G K/Q G I/L K/Q P															
	Apoica CP-5*	I/L M S _p I G I I/L T G I/L I G I I I P S															
	Apoica CP-6*	E P G T I/L I I I G T I I G I I/L A I/L I/L															
	Apoica CP-7*	V I G I A H I S _p I G T I L G I I A I I/L															
	Apoica CP-8*	W K/Q P T A E A I I G T I/L I/L G I/L I/L P P C															
	Apoica CP-9*	K/Q K/Q V I H I G S _p I/L I L G T L L G I/L I I/L P S															
	Apoica CP10*	I/L A R A I G H G S _p L I I G T L I G I I I I A															
<i>P. paulista</i>	Protonectina ^[2]	I L G T I L G L L K G L															
	Polybia-CP ^[3]	I L G T I L G L L K S L															

Fonte: * Peptídeos identificados pelo autor; ^[1] MENDES et al. (2004); ^[2] DOHTSU et al. 1993 ; ^[3] SOUZA et al. (2015).

Os peptídeos quimiotáticos apresentados na Tabela 3 apresentam uma região de resíduos de aminoácidos bem conservada (ILGTIL), semelhante a sequência da Protonectina (1-6). A conservação dessa sequência provavelmente indica se tratar da região ativa do peptídeo enquanto a variação dos resíduos de aminoácidos nas demais posições pode se tratar de uma variabilidade de possibilidades de modo que a seleção natural pode atuar em tornar um veneno mais efetivo.

A presença de peptídeos quimiotáticos se mostrou abundante no veneno de *A. pallens* o que nos leva a concluir que esse veneno cause forte desenvolvimento de edema no local da ferroada acompanhado de uma reação inflamatória. Isto se deve a capacidade desses peptídeos induzirem a quimiotaxia de Leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, além de possivelmente causar a liberação de histamina dos Mastócitos.

Tabela 3. Alinhamento das sequências de Mastoparanos

Espécie	Nome	Sequência													
<i>A. pallipes</i>	App-5 ^[1]	I	N	W	K	A	I	L	E	R	I	K	M	A	
<i>A. pallens</i>	Apoica-MP ^[2]	I	N	W	L	K	I	A	K	K	V	A	G	M	L
	Apoica-MP 2*	I/L	N	W	I/L	K/Q	I/L	A	K/Q	K/Q	V	A	G	M	
<i>P. dominulus</i>	Domilina A ^[3]	I	N	W	K	K	I	A	E	V	G	G	K	I	L S S L
<i>V. xanthoptera</i>	Mastoparano-X ^[4]	I	N	W	K	G	I	A	A	M	A	K	K	L	L

Fonte: * Peptídeos identificados pelo autor; ^[1] MENDES et al. (2004); ^[2] NAKAJIMA et al. (1986); ^[3] TURILLAZZI et al. 2005 ;^[4] HIRAI et al. (1979b).

Os peptídeos da classe dos Mastoparanos foram alinhados na Tabela 4 apresentando uma conservação na extremidade N-terminal com a sequência **INWK**. Essa classe de peptídeo foi o primeiro liberador de histamina isolado sendo hoje considerado o mais abundante componente dos venenos de vespa.

Os mastoparanos interagem com a membrana plasmática causando a formação de poros e, consequentemente, lise celular devido a característica anfipática e sua conformação tridimensional. Esse peptídeo pode se acoplar ao receptor de proteína-G, levando a ativação de mecanismos de degranulação liberando diferentes secreções a depender da célula alvo.

Tabela 2. Alinhamento das sequências de Cininas

Espécie	Nome	Sequência
<i>A. pallens</i>	Bradicinina [1]	R P P G F S P F R
	Apoicacinina 1*	R R P P G F T P M R
	Apoicacinina 2*	R A R P P G F T P F R
<i>C. fulvognathus</i>	Thr6-Bradicinina [2]	R P P G F T P F R
<i>V. xanthoptera</i>	Vespacinina-X [3]	A R P P G F S P F R I V
<i>Polistes sp.</i>	Polistescinina-3[4]	P E T N K K K L R G R P P G F S P F R

Fonte: * Peptídeos encontrados pelo autor; [1] NAKAJIMA et al. 1986; [2] PICOLO et al. 2010; [3] YASUHARA et al. 1977; [4] PIZANO, 1970.

As Cininas presentes na Tabela 5 possuem uma sequência de resíduos de aminoácidos muito semelhante às bradicininas de mamíferos, no entanto, apresentam baixa concentração nos venenos da maioria das vespas sociais, sendo encontrado apenas duas neste trabalho: Apoicacinina 1 e Apoicacinina 2. Essas moléculas são conhecidas por causarem dor sendo componentes neurotóxicos, causam contração da musculatura lisa e aumento da pressão arterial.

4.6. Lista dos demais peptídeos

A lista a seguir compreende as demais sequências encontradas no trabalho a partir do veneno da vespa *A. pallens* com alta confiabilidade e área de cobertura superior a 80% segundo critérios do PEAKS STUDIO. Os dados estão organizados pela classe do peptídeo exibindo a massa molecular, o valor de m/z , a carga (z), o tempo de retenção (RT) do íon precursor, a sequência e a classe.

Massa molecular	m/z	z	RT	Sequência dos peptídeos	Classe
1229,679657	410,8932	3	13,5819	RRPPGFTPM ₀ R	Cinina
1300,726227	434,5754	3	13,7849	RARPPGFTPFR	Cinina
1220,776123	611,3881	2	53,5982	AAI/LI/LGK/QGI/LI/LGVPI/L	Mastoparano
1282,805328	428,6018	3	19,875	I/LNWI/LK/QI/LAK/QNAI/L	Mastoparano
1470,877686	736,4388	2	1,5095	I/LNWI/LK/QI/LAK/QK/QVAGM	Mastoparano
1470,882568	491,2942	3	1,5095	I/LNWI/LK/QI/LAK/QK/QGGMI/L	Mastoparano
1582,956787	792,4784	2	28,7976	I/LNWI/LK/QI/LAK/QK/QVAGNE	Mastoparano
1598,942017	800,471	2	24,7377	I/LNWI/LK/QI/LAK/QK/QVAGMK/Q	Mastoparano
1565,002441	783,5012	2	27,8753	ENGI/LI/LK/QI/LAQK/QVPK/QK/Q	Mastoparano
1819,172119	910,5861	2	53,5982	I/LI/LGTI/LI/LI/LI/LGTI/LI/LGK/QGI/LPK/Q	Mastoparano
925,6234741	463,8117	2	23,4764	I/LI/LTGI/LAI/LI/LI/L	Pept. quimiotático
1208,756592	605,3783	2	34,3507	I/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LAPE	Pept. quimiotático
1208,773926	605,387	2	103,548	I/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LVPT	Pept. quimiotático
1208,811035	605,4055	2	33,4048	I/LIGTIIGII/LAI/LI/L	Pept. quimiotático
1209,809448	605,9047	2	33,9817	NI/LGTI/LI/LI/LK/QI/LI/LI/L	Pept. quimiotático
1234,811523	618,4058	2	44,8782	EPAI/LI/LIGI/LI/LAI	Pept. quimiotático
1266,809326	634,4047	2	33,6964	I/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LK/QGGI/L	Pept. quimiotático
1278,836426	640,4182	2	35,4409	I/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LAAPK/Q	Pept. quimiotático
1308,801025	655,4005	2	54,6214	RGI/LGTI/LI/LGI/LI/LPAE	Pept. quimiotático
1310,829712	656,4149	2	56,3763	K/QSI/LGTI/LI/LGI/LI/LPVT	Pept. quimiotático
1310,831177	656,4156	2	58,2205	K/QSI/LGTI/LI/LGI/LI/LI/LAI/L	Pept. quimiotático
1320,828857	661,4144	2	66,2909	K/QPI/LGTI/LI/LGI/LI/LI/LPS	Pept. quimiotático
1320,865601	661,4328	2	48,0408	K/QPI/LGTI/LI/LGI/LI/LVTP	Pept. quimiotático
1320,877197	661,4386	2	38,5828	I/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LAI/LPK/Q	Pept. quimiotático
1322,814331	662,4072	2	55,8675	RAI/LGTI/LI/LGI/LI/LAPE	Pept. quimiotático
1322,814697	662,4073	2	53,5079	K/QVI/LGTI/LI/LGI/LI/LAPE	Pept. quimiotático
1322,814697	662,4073	2	53,5079	I/LNI/LGTI/LI/LGI/LI/LAPE	Pept. quimiotático
1326,818115	664,4091	2	41,8918	K/QCI/LGTI/LI/LGI/LI/LVVV	Pept. quimiotático
1338,813354	670,4067	2	49,9218	ENI/LGTI/LI/LGI/LI/LI/LI/LA	Pept. quimiotático
1354,813721	678,4069	2	43,9806	MK/QI/LGTI/LI/LGI/LI/LEAP	Pept. quimiotático
1356,828369	679,4142	2	37,9405	M ₀ NI/LGTI/LI/LGI/LI/LAI/LI/L	Pept. quimiotático
1366,883789	684,4419	2	39,2237	I/LI/LTGI/LI/LTI/LI/LGK/QI/LI/L	Pept. quimiotático
1370,8396	686,4198	2	49,0861	K/QM ₀ I/LGTI/LI/LGI/LI/LAI/LI/L	Pept. quimiotático
1380,875244	691,4376	2	40,8771	TAI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LPVT	Pept. quimiotático
1384,825195	693,4126	2	35,3669	MTGI/LGTI/LI/LGI/LI/LSI/LP	Pept. quimiotático
1386,831177	694,4156	2	51,4994	K/QYI/LGTI/LI/LGI/LI/LVPT	Pept. quimiotático
1390,852539	696,4263	2	48,133	SAHI/LGTI/LI/LGI/LI/LSPI/L	Pept. quimiotático

1392,910889	697,4554	2	43,217	I/LAI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LI/LPS	Pept. quimiotático
1393,872681	697,9363	2	41,8021	NAII/LGTII/LGII/LI/LSP	Pept. quimiotático
1394,849365	698,4247	2	44,2576	EGI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LPTV	Pept. quimiotático
1394,886353	698,4432	2	46,7659	VSI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LI/LPS	Pept. quimiotático
1408,875	705,4375	2	41,615	EAI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LPI/LS	Pept. quimiotático
1412,843384	707,4217	2	51,4071	MHGII/LI/LGI/LI/LK/QFAI/L	Pept. quimiotático
1415,887451	708,9437	2	44,1653	K/QHAPGTI/LI/LGI/LI/LI/LI/LA	Pept. quimiotático
1419,884766	710,9424	2	41,7995	K/QVPI/LGTI/LI/LGI/LI/LPPC	Pept. quimiotático
1420,868896	711,4344	2	43,0325	DPI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LSI/LP	Pept. quimiotático
1424,862793	713,4314	2	46,0438	ESI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LI/LSP	Pept. quimiotático
1426,892578	714,4463	2	44,1653	FAI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LVTP	Pept. quimiotático
1434,884521	718,4423	2	42,0763	EPI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LVPT	Pept. quimiotático
1521,965332	761,9827	2	51,8684	MI/LGPVI/LI/LI/LGTI/LGI/LI/LI/L	Pept. quimiotático
1535,997925	768,999	2	43,217	I/LI/LTGI/LI/LVDI/LGI/LI/LAI/LI/L	Pept. quimiotático
1593,013428	797,5067	2	49,3584	I/LI/LGTI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LAPE	Pept. quimiotático
1622,939453	812,4697	2	55,4561	NDNAI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LSPI/L	Pept. quimiotático
1802,153687	601,7179	3	53,5982	I/LNAI/LI/LGI/LI/LTGI/LI/LI/LTHK/QI/L	Pept. quimiotático
1807,025879	904,5129	2	48,1434	EPTAEAI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LPSI/L	Pept. quimiotático
1819,172119	910,5861	2	53,5982	EPGTI/LIIIGTIIGII/LAI/LI/L	Pept. quimiotático
1819,181396	607,3938	3	53,5982	MPRI/LI/LI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LAI/LI/L	Pept. quimiotático
1819,181396	607,3938	3	53,5982	I/LDVGI/LI/LI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LAI/LI/L	Pept. quimiotático
1338,813354	670,4067	2	49,9218	DK/QI/LGTI/LI/LGI/LI/LI/LI/LA	Pept. quimiotático
1543,946045	772,973	2	51,8684	I/LI/LGTI/LI/LLI/LGNGRGFT	Pept. quimiotático
1208,779053	605,3895	2	103,582	I/LI/LGTI/LI/LGK/QGI/LPK/Q	Pept. quimiotático/mast
1491,96875	746,9844	2	49,4353	I/LI/LGI/LIGTLIGK/QGI/LK/QP	Pept. quimiotático/mast
1543,946045	772,973	2	51,8684	PK/QPGGI/LTGI/LI/LI/LI/LRPI/L	Pept. quimiotático/mast
1548,878052	775,439	2	50,5007	K/QYI/LGTI/LI/LGI/LI/LEVCK/Q	Pept. quimiotático/mast
1981,208008	991,604	2	52,5155	MPRI/LI/LI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LRRM _o	Pept. quimiotático/mast
2102,328613	1052,164	2	65,9625	MPRI/LI/LGI/LI/LI/LI/LGTI/LI/LGI/LI/LAPE	Pept. quimiotático/mast
982,6436768	492,3218	2	27,5981	SAI/LI/LGI/LI/LI/LAI/L	n/d
1023,688721	512,8444	2	39,316	SAI/LI/LI/LGI/LI/LK/QP	n/d
1209,800049	605,9	2	38,7708	NI/LGTI/LI/LGI/LAI/LI/LI/L	n/d
1209,809082	605,9045	2	34,6329	VK/QGTI/LI/LGI/LI/LAI/LI/L	n/d
1238,798584	620,3993	2	38,2172	MI/LTGI/LI/LI/LGI/LVI/LP	n/d
1250,805786	626,4029	2	52,7923	PI/LDTI/LI/LGI/LI/LI/LI/LA	n/d
1278,800049	640,4	2	44,9806	APK/QGTI/LI/LGI/LI/LI/LI/LA	n/d
1278,838623	640,4193	2	43,0325	K/QAPGTI/LI/LGI/LI/LI/LI/LA	n/d
1279,83374	640,9169	2	39,8286	SPI/LGTI/LI/LGI/LI/LI/LAI/L	n/d
1308,801025	655,4005	2	54,6214	I/LVGGGTI/LI/LGI/LI/LTVP	n/d
1356,821777	679,4109	2	51,3149	MoNI/LGTI/LI/LGI/LI/LVVV	n/d
1356,821777	679,4109	2	48,6732	FNI/LGTI/LI/LGI/LI/LPTV	n/d
1366,859497	684,4297	2	43,7961	RDI/LGTI/LI/LGI/LI/LAI/LI/L	n/d
1370,856689	686,4283	2	33,7057	AI/LGFGTI/LI/LGI/LI/LI/LI/LA	n/d
1841,156616	614,7189	3	53,5982	I/LI/LSAI/LI/LI/LI/LGTTMoGI/LI/LAI/LI/L	n/d
1992,098877	997,0494	2	47,7771	WK/QPTAEAIIGTI/LI/LGI/LI/LPPC	n/d

Nota: Alguns resíduos de metionina foram encontrados na forma oxidada sendo então diferenciado por um “o” subscrito junto ao resíduo.

5. CONCLUSÃO

O veneno de *A. pallens* demonstram a variedade de compostos presentes na natureza sendo uma fonte de moléculas com potencial para serem estudados e transformados em fármacos.

Nesse trabalho foram encontrados 8 peptídeos que possuem fosforilações nos resíduos de Serina e Treonina e 80 peptídeos que não apresentaram fosforilação.

Dos peptídeos fosforilados 4 pertencem a classe dos peptídeos quimiotáticos (Apoica CP-5, Apoica CP-7, Apoica CP-9 e Apoica CP-10) de acordo com os alinhamentos entre os peptídeos descritos na literatura.

Entre os peptídeos não fosforilados foram encontrados 8 mastoparanos (Apoica-MP2), 56 peptídeos quimiotáticos (Apoica CP-1, Apoica CP-2, Apoica CP-3, Apoica CP-4, Apoica CP-6, Apoica CP-8) sendo 6 desses com resíduos de aminoácidos semelhante aos mastoparanos, 2 cininas (Apoicacinina 1 e Apoicacinina 2) e 14 peptídeos que não se assemelhavam a nenhum dos usados como comparativo.

A grande maioria dos peptídeos encontrados foi a de peptídeos quimiotáticos compondo 60 peptídeos do total. Como resultado dessa riqueza desse tipo de peptídeo é esperado que após uma ferroada causada por essa vespa haja formação de edema seguido de reação inflamatória devido à natureza dessas moléculas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERMANN, K.; JOHN, H.; STÄNDKER, L.; FORSSMANN, W. G. Exploiting natural peptide diversity: novel research tools and drug leads. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 2004, v.15, p.599-606.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A₂ activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasps' venom. **J. Biol. Chem.**, 1983, v.258, p.13697-702.

BRIGATTE, P., CURY, Y., DE SOUZA, B.M., SAIDEMBERG, N.B., SAIDEMBERG, D.M., GUTIERREZ, V.P., PALMA, M.S., 2011. Hyperalgesic and edematogenic effects of peptides isolated from the venoms of honeybee (*Apis mellifera*) and Neotropical social wasps (*Polybia paulista* and *Protonectarina sylveirae*). **Amino Acids** 40, 101e111

CARPENTER, J. M. Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In: Roos, K. G.; Matthews, R. W. **The social biology of wasps**. 1.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1991. p.7-32.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S.; Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova.**, 2008 v.31, No. 3, 669-75.

CONCANNON, S. P.; CROWE, T. D.; ABERCROMBI, J. J.; MOLIN, C. M.; HOU, P.; SUKUMARAN, D. K.; RAJ, P. A.; LEUNG, K. P. Susceptibility of oral bacteria to an antimicrobial decapeptide. **J. Med. Microbiol.**, 2003, v.52, p.1083-93.

COSTA, H. Caracterização bioquímica da peçonha da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) **UNESP – Júlio de Mesquita Filho**, Rio Claro, 1996.

CRUZ-HÖFFLING, M. A.; ROCHA, T. Aspectos da miotoxicidade e neurotoxicidade de venenos de Himenóptera. In: CASTRO, F. M.; PALMA, M. S. **Alergia a venenos de insetos**. Barueri: Editora Manole Ltda., 2009, p.63-84.

DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Peptides from Hymenoptera venoms. In: Lima, M. E.; PIMENTA, A. M.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; ZINGALI, R. B.; ROCHAT, H. (Eds.) **Animal Toxins: state of the art**. Perspectives in health and biotechnology. 1.ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009. p.345-90.

DE SOUZA, B.M.; MENDES, M. A.; SANTOS, L. D.; MARQUES, M. R.; CESAR, L. M. M.; ALMEIDA, R. N. A.; PAGNOCCA, F. C.; KONNO, K.; PALMA, M. S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, 2015, v.26, p.2157-64.

DIAS, N. B.; DE SOUZA, B. M.; GOMES, P. C.; PALMA, M. S. Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): A comparison of the intra- and inter-colony compositions. **Peptides**, 2014, v.51, p.122-30.

DOHTSU, K.; OKUMURA, K.; PALMA, M. S.; NAKAJIMA, T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera – Vespidae). **Nat. Toxins**, 1993, v.1, p. 271-6.

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

ESCOUBAS, P.; CÉLÉRIER, M. L.; NAKAJIMA, T. High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus *Brachypelma*: chemotaxonomic and biochemical applications. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.** 1997, v.11, p.1891-9.

FERREIRA, D. A. N. M. **Efeito anticonvulsivante de frações isoladas da peçonha da formiga *Dinoponera quadriceps* (Formicidae: Ponerinae)**. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015, 76f.

GREINER, B. Visual adaptations in the night-active wasp *Apoica pallens*. **J. Comp. Neurol.**, 2006, v.495, p.255-62.

HIGASHIJIMA, T.; WAKAMATSU, K.; TAKEMITSU, M.; FUJINO, M.; NAKAJIMA, T.; MIYAZAWA, T. Conformational change of mastoparan from wasp venom on binding with phospholipid membrane. **FEBS Lett.**, 1983, v.152, p. 227.

HIRAI, Y.; KUWADA, M.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). **Chem Pharm Bull**, 1979b, 27:1945-46.

HOFFMAN, D. R.; JACOBSON, R. S. Allergens in hymenoptera venom XII: How much protein is in a sting? **Ann. Allergy**, 1984, v.52, p.276-8.

HUMPHREY, S. J.; AZIMIFAR, S. B.; MANN, M. High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. **Nat. Biotechnol.**, 2015, v.33, p.990-5.

KANOST, M. R.; JIANG, H.; YU, X. Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunol Rev.**, 2004, v.198, p.97-105.

KONNO, K.; KAZUMA, K.; NIHEI, K. Peptide Toxins in Solitary Wasp Venoms. **Toxins**, 2016, v.8, p.114-24.

LARSEN, M. R.; THINGHOLM, T. E.; JENSEN, O. N.; ROEPSTORFF, P.; JORGENSEN, T. J. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. **Mol. Cell Proteomics**, 2005, v.4, p.873-86.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 1998, v.36, p.1749-800.

MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; PALMA, M. S.; Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon** 2004, 44, 67 e 74.

MORTARI, M R, CUNHA, A. O. S, CAROLINO, R O G, COUTINHO-NETTO, J, TOMAZ, J C, LOPES, N P, COIMBRA, N C, DOS SANTOS, WF. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. *British Journal of Pharmacology*, 2007, 151, 860–869

NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespine venoms. In: Piek, T. (Ed.) **Venoms of the Hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioural aspects**. London: Academic Press Inc., 1986. p. 309-27.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **J. Nat. Prod.**, 2007, v.70, p.461-77.

NOLL, F. B. Marimbondos: a review on the neotropical swarm-founding polistines.

Sociobiology, 2013, v.60, p.347-54.

PICOLO G.; HISADA M.; MOURA A. B.; MACHADO M. F.; SCIANI J. M.; CONCEIÇÃO I. M.; MELO R. L.; OLIVEIRA V.; LIMA-LANDMAN M. T.; Cury Y.; Konno K.; Hayashi M. A.; Bradykinin-related peptides in the venom of the solitary wasp *Cyphononyx fulvognathus*. **Biochem Pharmacol** 79(3):478-86, 2010.

PISANO, J. J. Kinins in non-mammalian origin. Berlin, **Hand. Exp. Pharmacol.**, v. 25, p.589-96, 1970.

REIS, C. V.; ANDRADE, S. A.; RAMOS, O. H.; RAMOS, C. R.; HO, P. L.; BATISTA, I. F.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A M. Lopap, a prothrombin activator from *Lononmia obliqua* belonging of the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights. **Biochem. J.**, 2006, v.398, p.295-302.

RESENDE, V. M. F.; VASILJ, A.; SANTOS, K. S.; PALMA, M. S.; SHEVCHENKO, A. Proteome and phosphoproteome of Africanized and European honeybee venoms. **Proteomics**, 2013, v.13, 2638–48.

RICHARDS, O. W. **The social wasps of america**, excluding the Vespinae. 1.ed. Norwich: Fletcher & Son Ltd., 1978, p.260-7.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 2005, 7.ed. São Paulo: Editora Roca. 1145p.

SANTOS-CABRERA, M. P. D.; DE SOUZA, B. M.; FONTANA, R.; KONNO, K.; PALMA, M. S.; de AZEVEDO Jr., W. F.; RUGGIERO NETTO, J. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **J. Pep. Res.**, 2004, v.64, p.95-103.

SAPPINGTON, T. W.; RAIKHEL, A. S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. **Insect Biochem. Mol. Bio.**, 1998, v.28, p.277-300.

SCHMIDT, J. O. Hymenoptera venoms: striving toward the ultimate defense against vertebrates. In: Ewans D.L.; Schmitd, J.O. (Eds). **Insect defenses: adaptive mechanisms and strategies of prey and predators**. Alvany: State University of New York Press, 1990, p.387-420.

SCHULZ-KNAPPE, P.; SCHRADER, M.; ZUCHT, H. D. Comb Chem High Throughput Screen, The peptidomics concept. **BioVisioN A.G.**, 2005, v.8, p.697-704.

SILVA, G. H.; CAMPOS, A. C. M. R.; GONÇALVES, L. C. R.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; HIGASHI, H. G.; YAMAGUSHI, I. K.; KELEN, E. M. A. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, 1996, v.34, p.1045-9.

STORK, N. E. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? **Annu. Rev. Entomol.**, 2018, v.63, p.31-45.

TURILLAZZI, S.; MASTROBUONI, G.; DANI, F. R.; MONETI, G.; PIERACCINI, G.; MARCA, G.; BARTOLUCCI, GIANLUCA.; PERITO, B.; LAMBARDI, D.; CAVALLINI, V.; DAPPORTO, L. Dominulin A and B: Two New AntibacterialPeptides Identified on the Cuticleand in the Venom of the Social Paper WaspPolistes dominulusUsing MALDI-TOF,MALDI-TOF/TOF, and ESI-Ion Trap **American Society for Mass Spectrometry. Published by Elsevier Inc.** 2006 v.17, 376-83.

YASUHARA T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; Chemical investigation of the hornet (*Vespa xanthoptera* Cameron) venom. The structure of a new bradykinin analogue "Vespakinin-X". **Chem Pharm Bull**, 25:935-941, 1977.

Victor Spiller de Oliveira
Discente

Mario Sergio Palma
Orientador