



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**Caracterização Bioquímica Parcial dos Componentes Presentes na Peçonha Bruta  
da Formiga *Odontomachus chelifer***

Túlio Morato Damorin

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Biotecnologia, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de  
Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG  
Julho – 2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**Caracterização Bioquímica Parcial dos Componentes Presentes na Peçonha Bruta  
da Formiga *Odontomachus chelifer***

Túlio Morato Damorin

Dra. Renata Santos Rodrigues

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Biotecnologia, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de  
Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG  
Julho – 2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**Caracterização Bioquímica Parcial dos Componentes Presentes na Peçonha Bruta  
da Formiga *Odontomachus chelifer***

Túlio Morato Damorin

Dra. Renata Santos Rodrigues

Homologado pela coordenação do Curso

de Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG  
Julho – 2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**Caracterização Bioquímica Parcial dos Componentes Presentes na Peçonha Bruta  
da Formiga *Odontomachus chelifer***

Túlio Morato Damorin

Aprovado pela Banca Examinadora em: 05/07/2019      Nota: 91

Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues  
Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 05 de julho de 2019.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Renata Santos Rodrigues pela paciência, dedicação, disponibilidade e, acima de tudo, por ter me incentivado a persistir até o fim.

Às pesquisadoras Luana Gonçalves Barbosa e Thamirys Gimenes Coutinho de Sousa, por fazerem parte da banca e contribuírem com sugestões e reflexões sobre este trabalho.

À minha amada mãe e amiga Cíntia Thais Morato, por sempre estar ao meu lado, ajudando-me em todos os momentos da minha vida.

À minha família, pelo apoio moral e motivação para continuar seguindo em frente.

Aos professores e à 13ª turma do Curso de Graduação em Biotecnologia, por marcarem a minha vida e me proporcionarem uma grande experiência acadêmica.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Biotecnologia, por contribuírem com a minha formação.

## RESUMO

As formigas são insetos da família *Formicidae* que apresenta um grupo taxonômico muito diversificado, representado por 20 subfamílias, dentre as quais 16 apresentam ferrão e são classificadas como peçonhentas. Suas peçonhas desempenham importantes funções dentre as quais a defesa contra predadores, a captura de presas e a comunicação social; são compostas por uma mistura de carboidratos, ácido fórmico, amins bioativas, aminoácidos livres, alcaloides, proteínas e peptídeos. Aproximadamente 70% do peso seco das peçonhas de formigas correspondem a peptídeos e esses apresentam massas moleculares variando entre 1,4 a 7 kDa. As proteínas podem apresentar massa molecular variando entre 10 e 50 kDa e estão entre os alérgenos dessas peçonhas; dentre essas proteínas, podem-se destacar fosfolipases, hialuronidases, e serinoproteases. De forma geral, os componentes presentes nas peçonhas das formigas podem ser nocivos para o organismo humano, mas estudos científicos têm demonstrado que compostos isolados podem apresentar várias propriedades farmacológicas, dentre elas ação antitumoral, hemolítica, antimicrobiana, anti-inflamatória, anestésica, neuroativas, e anticonvulsivantes. Este trabalho propôs um estudo bioquímico, enzimático e funcional da peçonha bruta e *O. chelifera*. Dentre as inúmeras espécies de formiga do gênero *Odontomachus*, a espécie *O. chelifera* é uma promissora candidata para pesquisas científicas devido a sua peçonha ser pouco estudada e haver pouca ou quase nenhuma informação desta espécie na literatura. A análise eletroforética (SDS-PAGE) da peçonha bruta de *O. chelifera* mostrou um perfil proteico com vários componentes cujas massas molares variaram de 14 a 97 kDa, quando analisadas em condições redutoras, com marcação mais intensa para bandas na faixa de 97, 50, 40, 25 kDa e abaixo de 14,4 kDa. Não houve resultado positivo para o teste da atividade fosfolipásica A<sub>2</sub>, a hipótese para tal resultado é a de que a espécie *O. chelifera* não apresente enzimas da classe fosfolipase A<sub>2</sub> em sua peçonha. A avaliação da atividade coagulante mostrou que a peçonha bruta de *O. chelifera* não foi capaz de coagular o plasma bovino citratado, diferentemente do controle positivo, a peçonha de *B. pauloensis*, que coagulou o plasma em 18,2 segundos. Em suma, foi possível identificar toxinas em uma ampla faixa de massas molares, sendo necessário, entretanto, novos estudos para identificar componentes com ações enzimáticas e biológicas na peçonha bruta da formiga *O. chelifera*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Odontomachus chelifera*; peçonha bruta, caracterização bioquímica, enzimática e funcional.

## ABSTRACT

Ants are insects of the *Formicidae* family presenting a widely diversified taxonomic group represented by 20 families among which 16 are provided with stingers and thus classified as venomous. The major function of these 16 subfamilies venom is multifold, there being highlighted self-defense against predators, capture of preys and social communication; the venom comprises a mixture of carbohydrates, formic acid, bioactive amines, free amino acids, alkaloids, proteins and peptides. Approximately 70% of the dry weight of an ant venom is peptides and these have molecular mass varying between 1.4 and 7 kDa and are among the allergens of the venom; among the proteins there can be highlighted phospholipases, hyaluronidases and serinoproteases. On the whole, the compounds present in the venom of an ant can be harmful to the human body. However, scientific studies have shown that isolated compounds can point to a variety of pharmacological properties among which those of antitumorous action, hemolytic, antimicrobial, anti-inflammatory, anaesthetic, neuroactive and anticonvulsive. This work has proposed a biochemical, enzymatic and functional study of the gross venom of *O. chelifera*. Among the innumerable species of ant of the *Odontomachus* genus, the species *O. chelifera* is a promising choice for scientific researches owing to its venom having scarcely been studied and there being little or no information on this species in the literature. The electrophoretic analysis (SDS-PAGE) of the gross venom of the *O. chelifera* showed a proteic profile with a large number of compounds whose molar masses varied from 14 to 97 kDa when analysed under reducing conditions, with a more intense marking for bands around 97, 50, 40, 25 kDa and under 14.4 kDa. There was no positive result for the phospholipase A2 active test, the assumption for that being the fact that the species *O. chelifera* does not present enzymes of the phospholipase A2 class in its venom. The assessment of the regulating activity showed the gross venom of *O. chelifera* not capable of coagulating the citrated bovine plasma, different from the positive control, the *B. Pauloensis* venom, which coagulated the plasma in 18.2 seconds. In short, it was possible to identify toxins over a wide range of molar masses, there being necessary, however, new studies in order to identify compounds with enzymatic and biological actions in the gross venom of the *O. chelifera* ant.

**KEY-WORDS:** *Odontomachus chelifera*, gross venom, biochemical, enzymatic and functional characterization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática das glândulas exócrinas de formigas, em destaque a localização da glândula mandibular (SANTOS, 2014, p. 4). .....	13
<b>Figura 2:</b> Anatomia das glândulas de veneno (peçonha) de himenópteros (MITRA, 2013, p. 34). .....	13
<b>Figura 3abc:</b> Morfologia externa de <i>O. chelifer</i> . .....	16
<b>Figura 4:</b> Perfil eletroforético da peçonha bruta de <i>O. chelifer</i> em gel de poliacrilamida a 12,5% em condições desnaturantes. 1, 4: Padrão de Massa Molar. 2,5: 5 µg da peçonha bruta de <i>O. chelifer</i> . 3,6: 10 µg da peçonha bruta de <i>O. chelifer</i> . .....	23



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atividade coagulante da peçonha bruta de <i>B. pauloensis</i> e <i>O. chelifer</i> realizada sobre o plasma bovino.....	24
<b>Tabela 2:</b> Comparação entre espécies de abelhas, vespas e formigas quanto a sua atividade fosfolipásica (adaptado SCHMIDT <i>et al.</i> (1986)).....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN, Acetonitrila

BSA, Albumina do soro bovino

CaCl<sub>2</sub>, Cloreto de cálcio

EDTA, Ácido etilenodiamino tetra-acético

LABITOX, Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (Instituto de Biotecnologia, UFU)

NaOH, Hidróxido de sódio (soda cáustica)

PLA, Fosfolipase

PLA<sub>2</sub>, Fosfolipase A<sub>2</sub>

SDS, Dodecil sulfato de sódio

TFA, Ácido Trifluoracético

Tris-HCl, Tris-Hidroclorato

UFU, Universidade Federal de Uberlândia

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Aspectos gerais das formigas.....	12
1.2 Espécie <i>Odontomachus chelifer</i> .....	15
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Identificação, seleção e coleta das formigas da espécie <i>O. chelifer</i> .....	20
3.2 Extração e processamento da peçonha de <i>O. chelifer</i> .....	20
3.3 Determinação da concentração de proteínas na peçonha de <i>O. chelifer</i> .....	20
3.4 Análise em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	21
3.5 Atividade Fosfolipásica A <sub>2</sub> .....	22
3.6 Atividade Coagulante.....	22
4. RESULTADOS .....	23
4.1 Análise em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	23
4.2 Atividade Fosfolipásica (PLA <sub>2</sub> ).....	23
4.3 Atividade Coagulante.....	24
5. DISCUSSÃO .....	25
6. CONCLUSÃO.....	28

## 1. INTRODUÇÃO

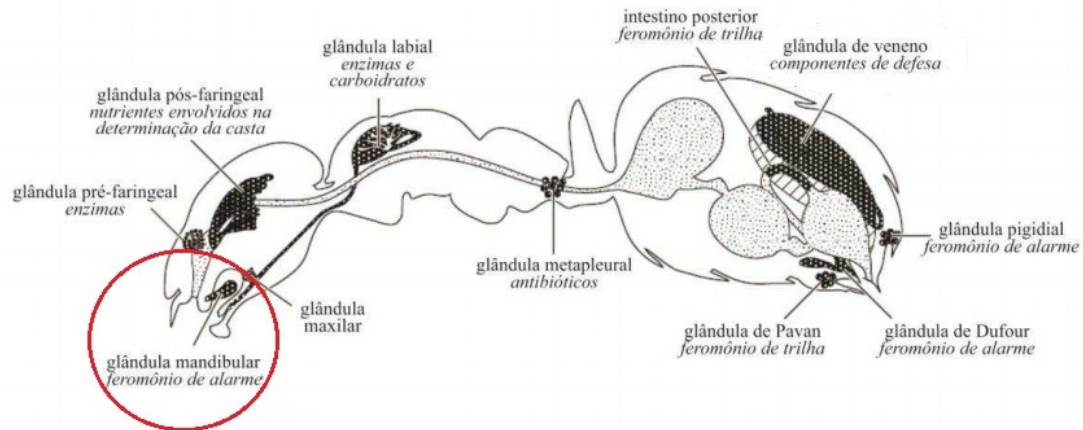
Os insetos são os invertebrados pertencentes ao subfilo Hexapoda e classe *Insecta* do filo *Arthropoda*. Estima-se ser o grupo de animais mais diversificado existente no planeta Terra. Esses representam mais que 70% de todas as espécies de seres vivos descritos (ARTHROPODS, s.d.). Dentre as diversas ordens existentes, três se destacam pela sua diversidade: *Diptera* (moscas, mosquitos, pernilongos), *Coleoptera* (besouros, joaninhas, escaravelhos) e *Himenoptera* (vespas, abelhas e formigas) (BERTONE *et al.* 2016).

A ordem *Himenoptera* compreende insetos com peças bucais mastigadoras e ciclo holometábolo (CASEWELL *et al.*, 2013), com hábitos solitários ou coloniais. Entre estes insetos, destacam-se as famílias *Apidae*, *Vespidae* e *Formicidae* que possuem peçonhas que são utilizadas para defesa e predação, causando dor, dano tecidual, hipersensibilidade alérgica e, ocasionalmente, morte, quando injetados em mamíferos (CASEWELL *et al.*, 2013; AILI *et al.*, 2014; HOFFMAN, 2010).

### 1.1 Aspectos gerais das formigas

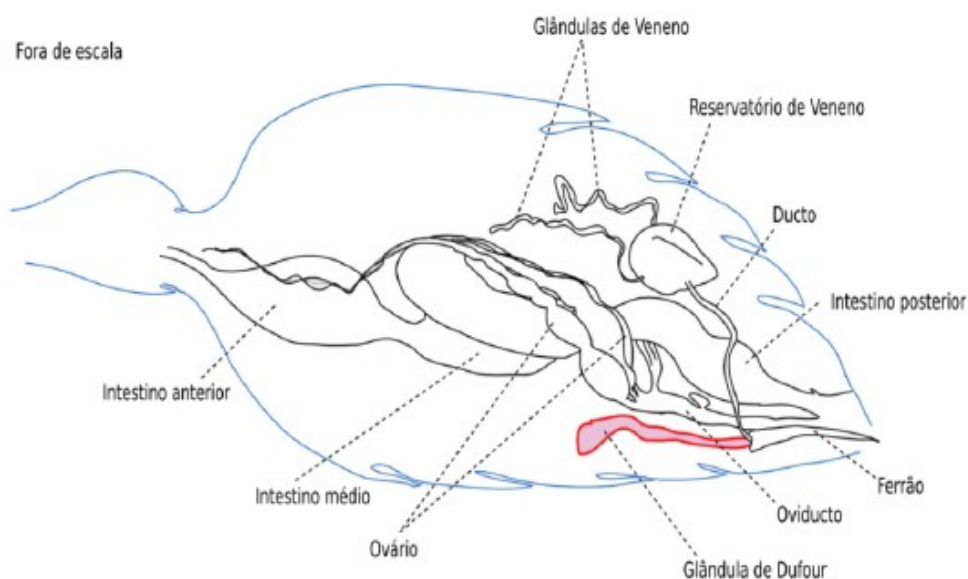
A família *Formicidae* apresenta um grupo taxonômico muito diversificado, representado por 20 subfamílias, dentre as quais 16 apresentam ferrão e são classificadas como peçonhentas. As glândulas de peçonhas desses animais podem ser mandibular ou abdominal (CASEWELL *et al.*, 2013; HOFFMAN, 2010; TOUCHARD *et al.*, 2015).

Alguns compostos já foram identificados na glândula mandibular de vespas e formigas e estão ligados à comunicação na colônia. De acordo com Serrão *et al.* (2015), a glândula mandibular de formigas (**Figura 1**) é conhecida pela produção do feromônio de alarme que desencadeia comportamento de defesa, além de serem portadoras de efeito fungicida (SERRÃO *et al.*, 2015, p. 256).



**Figura 1:** Representação esquemática das glândulas exócrinas de formigas, em destaque a localização da glândula mandibular (SANTOS, 2014, p. 4).

A peçonha encontrada na glândula abdominal está presente em fêmeas de algumas espécies da família *Vespidae* e *Formicidae* e é produzida por um aparato venenífero que se origina a partir de modificações do aparelho reprodutor desses animais. O aparato venenífero abdominal é constituído por diversas estruturas, que incluem reservatório de peçonha, glândula convoluta, glândula filamentosa e glândula de Dufour, além do aparato do ferrão (CASEWELL *et al.*, 2013; HOFFMAN, 2010; TOUCHARD *et al.*, 2015) (**Figura 2**).



**Figura 2:** Anatomia das glândulas de veneno (peçonha) de himenópteros (MITRA, 2013, p. 34).

Nas formigas, a peçonha apresenta três funções principais: a defesa contra predadores, a captura de presas e a comunicação social (BAR-COHEN, 2006; CASEWELL *et al.*, 2013). Nas espécies de formigas mais semelhantes ao ancestral, como nos representantes da subfamília *Ponerinae*, o ferrão é bem desenvolvido e perfeitamente adaptado para a predação, enquanto em algumas famílias de formigas como *Aneuretinae*, *Dolichoderinae* e *Formicinae*, o ferrão sofreu vários graus de redução e em algumas espécies é atrofiado (CASEWELL *et al.*, 2013; AILI *et al.*, 2014; HOFFMAN, 2010).

As peçonhas das formigas são compostas por uma mistura de carboidratos, ácido fórmico, aminas bioativas, aminoácidos livres, alcaloides, proteínas e peptídeos (BAR-COHEN, 2006; CASEWELL *et al.*, 2013). Aproximadamente 70% do peso seco das peçonhas de formigas correspondem a peptídeos, e esses apresentam massas moleculares variando entre 1,4 a 7 kDa (KEM *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2009; CHEN & FADAMIRO, 2009). As proteínas podem apresentar massa molecular variando entre 10 e 50 kDa e estão entre os alérgenos presentes nestas peçonhas. Dentre as proteínas, podem-se destacar fosfolipases (PLA), hialuronidases, e serinoproteases (CHEN & FADAMIRO, 2009).

As fosfolipases atuam nas membranas das células agindo sobre os fosfolipídios e gerando ácidos graxos e lisofosfolipídios. A diferença existente entre as classes destas enzimas é devido à especificidade que essas possuem pelos sítios nos fosfolipídios onde realizam a clivagem. As PLA agem sobre a ligação éster dos fosfolipídios na posição 1; catalisam a hidrólise da ligação éster na posição 2 dos fosfolipídios; as fosfolipases B agem sobre o grupo 1-acil de lisofosfolipídios; as fosfolipases C e D atuam sobre o grupamento fosfato dos fosfolipídios em posições distintas (KINI, 1997).

As hialuronidases são endoglicosidases que degradam, principalmente, o ácido

hialurônico e podem ter atividade sobre condroitina, sulfato de condroitina e dematan sulfato. Essas enzimas possuem a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e auxiliar na difusão das outras toxinas em tecidos adjacentes ao local da inoculação da peçonha. A ação das hialuronidases sobre o ácido hialurônico contribui para uma severa destruição tecidual no local da picada e para o colapso sistêmico quando chegam à corrente sanguínea (KEMPARAJU & GIRISH, 2006; HARRISON *et al.*, 2007).

As serinoproteases são glicoproteínas de cadeia única com ampla diversidade de substratos e são capazes de apresentar ação sistêmica no organismo, principalmente sobre as vias de coagulação que levam ao desequilíbrio da hemostasia (SERRANO & MAROUN, 2005; SERRANO, 2013). Em geral, essas proteases apresentam interesse médico para prevenção ou tratamento de trombozes (VU *et al.*, 2013).

De forma geral, esses componentes presentes nas peçonhas das formigas podem ser nocivos para o organismo humano, mas estudos científicos têm demonstrado que compostos isolados podem apresentar várias propriedades farmacológicas, dentre elas ação antitumoral, hemolítica, antimicrobiana, anti-inflamatória, anestésica, neuroativas, e anticonvulsivantes (LOPES, 2014; SILVA *et al.*, 2015).

## **1.2 Espécie *Odontomachus chelifer***

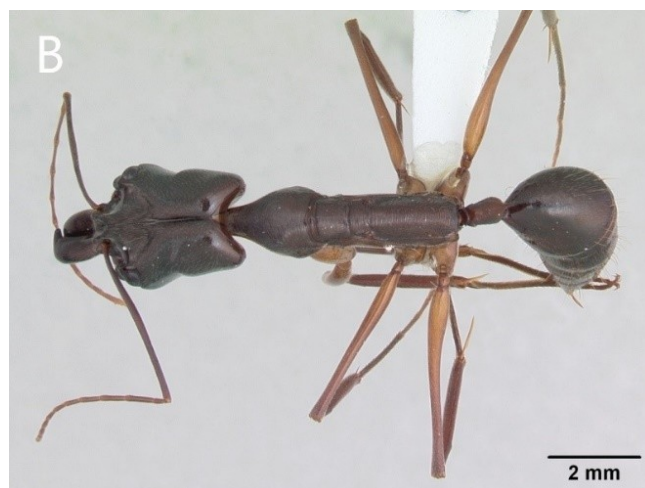
As peçonhas da glândula abdominal de formigas da subfamília *Ponerinae* são pouco estudadas, mas sabe-se que essas formigas estão distribuídas por todo o mundo, sendo mais abundantes nas regiões tropicais e quentes, principalmente nos neotrópicos (SPAGNA *et al.*, 2008; JESUS *et al.*, 2012; RODRIGUES-ACOSTA *et al.*, 2002; ESCOUBAS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2015). Dentre a subfamília *Ponerinae* está a espécie *Odontomachus chelifer*, conhecida popularmente como formiga-de-estalo.

Essa espécie peçonhenta é facilmente identificada pelo seu tamanho avantajado,

sua anatomia única e, principalmente, pelas suas mandíbulas capazes de abrir em 180 graus (GUIMARÃES, 2012) (**Figuras 3a, 2b, 2c**). Essas formigas costumam construir seus ninhos no solo, protegendo-os da luz solar direta e escolhendo o local para construí-los longe de perturbações ambientais. Quando os ninhos são perturbados, essas formigas atacam seus agressores e suas mordidas causam dor aguda imediata e sensação de queimação (RODRIGUES-ACOSTA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2015).



**Figura 3abc:** Morfologia externa de *O. chelifera*<sup>1</sup>.  
Visão frontal da cabeça (A).



Visão dorsal do corpo (B).

<sup>1</sup> Fonte: <<https://www.antweb.org/>>. Acesso em: 25 jun. 2019.





Visão lateral do corpo (C).

Silva *et al.* (2015) realizou estudos de caracterização enzimática e biológica da peçonha da formiga *Odontomachus bauri* e demonstrou que essa apresenta ação proteolítica, hemolítica, coagulante *in vitro*. Ademais, a peçonha também apresentou atividade bactericida frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bem como ação antiparasitária sobre *Toxoplasma gondii*.

Kazuma *et al.* (2017) utilizou as técnicas de transcriptoma e peptidoma para elucidar a composição proteica da peçonha bruta de *Odontomachus monticola* e suas propriedades. A partir das análises transcriptômicas da glândula da peçonha, foram identificados seis peptídeos pilosulina-like; e pelo peptidoma, foram detectados o peptídeo 1 pilosulina-like intacto e os peptídeos 2 e 3 pilosulina-like truncados.

Estudos de caracterização biológica da peçonha de espécies de formigas são escassos; dentre as inúmeras espécies de formiga do gênero *Odontomachus*, a espécie *O. chelififer* é uma promissora candidata para pesquisas científicas devido a sua peçonha ser pouco estudada e pela falta de informações desta espécie na literatura. Assim, este trabalho propõe um estudo parcial bioquímico, enzimático e funcional da peçonha de *O. chelififer*, uma vez que essas são uma vasta fonte de biomoléculas farmacologicamente ativas. Dessa forma, o estudo da peçonha desta formiga abre caminhos para um campo

inexplorado das biomoléculas com potencial biotecnológico, oriundas de peçonhas de formigas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar parcialmente os componentes presentes na peçonha bruta da formiga *O. chelifera*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Analisar a diversidade de componentes presentes na peçonha bruta da formiga *O. chelifera* por SDS-PAGE 12,5%;
- Determinar atividade fosfolipásica  $A_2$  da peçonha bruta da formiga *O. chelifera*;
- Determinar atividade coagulante da peçonha bruta da formiga *O. chelifera*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Identificação, seleção e coleta das formigas da espécie *O. chelifera***

Para a obtenção das formigas da espécie *O. chelifera*, os ninhos foram identificados na área de campo do campus Glória da Universidade Federal de Uberlândia (Rodovia BR-050, KM 78). Aproximadamente 70 espécimes de *O. chelifera* foram coletados pelo método manual, com a utilização de pinças, armazenadas em tubos de plástico e levadas ao Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais – LABITOX/UFU para a extração da peçonha.

#### **3.2 Extração e processamento da peçonha de *O. chelifera***

Para a extração da peçonha, as formigas foram dissecadas com o auxílio de pinças retirando-se o ferrão e o reservatório da peçonha com o material glandular, contidos no interior do abdômen.

Posteriormente, as glândulas que continham a peçonha foram transferidas para um microtubo contendo solução de Acetonitrila (ACN) com concentração de 30% e 0,1% de Ácido Trifluoracético (TFA) (0,1%), para retardar a ação de enzimas proteolíticas presentes na peçonha. Logo após este procedimento, a solução contendo as glândulas foi submetida à sonicação por cinco minutos, para que a membrana das glândulas veneníferas fosse rompida e o material da peçonha liberado para o meio. Após esta etapa, a solução foi centrifugada por duas vezes a 2000 rpm e o sobrenadante utilizado para a determinação das proteínas totais presente na peçonha de *O. chelifera*.

#### **3.3 Determinação da concentração de proteínas na peçonha de *O. chelifera***

Para a dosagem das proteínas contidas na peçonha de *O. chelifera*, seguiu-se a metodologia segundo Bradford (1976). As amostras foram quantificadas em duplicata e a leitura da absorbância a 595 nm foi feita em espectrofotômetro. A curva padrão de albumina do soro bovino (BSA) (concentração típica de 2mg/mL) foi construída para a

determinação da concentração de proteínas em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Os cálculos foram realizados por regressão linear baseados nos valores provindos da curva padrão.

Após a quantificação das proteínas, o material foi aliquoteado para liofilização e armazenado para uso posterior nos testes bioquímicos e enzimáticos.

### **3.4 Análise em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

A peçonha bruta de *O. chelifera* (5  $\mu\text{g}$  e 10  $\mu\text{g}$ ) foi analisada em gel de poliacrilamida a 12,5% (m/v) em condições redutoras na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). O sistema SDS-PAGE descontínuo consistiu de: gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS a 0,1% (m/v), e gel de separação a 12,5% contendo Tris-HCl 2,0 M pH 8,8 e SDS 0,1% (m/v), mantendo a relação de bis:acrilamida 0,8:30. Todos os géis foram preparados em um sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small 2 Mini-Vertical.

As amostras foram dissolvidas em um tampão de Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; SDS 2% (m/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v); azul de bromofenol 0,005% (m/v) e glicerol 10% (v/v). Em seguida as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100°C. O tampão do eletrodo é composto por Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v), pH 8,3. O gel foi corado em solução de Coomassie Bue-R250 0,1% (m/v), ácido acético 10% (v/v), metanol 50% (v/v), e descorado em solução de ácido acético 7% (v/v) e etanol 30% (v/v) para posterior análise.

As massas molares foram estimadas pela interpolação de uma curva logarítmica linear de massa molar relativa das proteínas do padrão de massa molar versus a distância de migração do gel. O padrão de massa molar consiste nas proteínas: Fosforilase b (97 kDa); Albumina (66 kDa); Ovoalbumina (45 kDa); Anidrase Carbônica (30kDa); Inibidor de Tripsina (20,1 kDa);  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa).

### 3.5 Atividade Fosfolipásica A<sub>2</sub>

A atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por De Haas *et al.* (1968). Como substrato foi utilizado uma emulsão de gema de ovo em presença de deoxicolato de sódio 0,03 M e CaCl<sub>2</sub> a 0,6 M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH 0,1208 N em pH 8,0 a temperatura ambiente. A atividade fosfolipásica foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto e a atividade específica pelo número de microequivalentes por minutos, por mg de proteína. Para cada ensaio foram utilizados 5µg da peçonha bruta de *O. chelifera*.

Foi feita uma média de três ensaios para cada uma das concentrações de 10, 20 e 30 µg da peçonha bruta de *O. chelifera*.

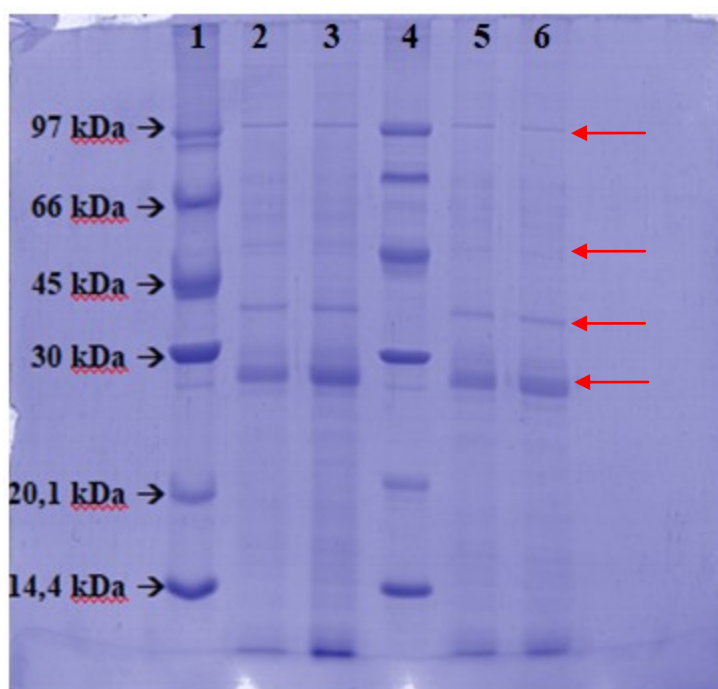
### 3.6 Atividade Coagulante

A atividade coagulante foi realizada sobre o plasma bovino citratado. Amostras em triplicata contendo diferentes concentrações (5 µg/ml e 10 µg/ml) de peçonha bruta de *O. chelifera* foram dissolvidas em 15 µL de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub> e foram incubadas com 200 µL do plasma bovino citratado. Para o controle negativo, utilizou-se 50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.4, contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (5 µg) diluída em 50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.4, contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub> foi utilizada como controle positivo. Os testes foram realizados em um aparelho coagulômetro microprocessador Quick-Timer (DRAKE LTDA). Esse aparelho detecta os primeiros traços da formação do coágulo de fibrina por um sistema óptico.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A amostra da peçonha bruta de *O. chelififer* apresentou concentração proteica média de 740 µg/mL. O perfil proteico da peçonha bruta de *O. chelififer* apresentou vários componentes com massas molares variando de 14 a 97 kDa, quando analisados em condições redutoras, com marcação mais intensa para bandas na faixa de 97, 50, 40, 25, menor que 14,4 kDa (**Figura 3**).



**Figura 4:** Perfil eletroforético da peçonha bruta de *O. chelififer* em gel de poliacrilamida a 12,5% em condições desnaturantes. 1, 4: Padrão de Massa Molar. 2,5: 5 µg da peçonha bruta de *O. chelififer*. 3,6: 10 µg da peçonha bruta de *O. chelififer*.

### 4.2 Atividade Fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>)

Não foi possível detectar atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>) para a peçonha de *O. chelififer* nas concentrações 10, 20 e 30 µg. A provável explicação para este resultado pode se dever ao longo tempo de armazenamento da peçonha bruta de *O. chelififer* em solução, antes da mesma ser liofilizada. Isto pode ter acarretado na desnaturação das

enzimas PLA<sub>2</sub> levando a perda da sua estrutura nativa, impossibilitando que as toxinas presentes na peçonha pudessem demonstrar qualquer atividade fosfolipásica.

### 4.3 Atividade Coagulante

A **Tabela 1** apresenta os resultados da atividade coagulante sobre o plasma bovino citratado para a peçonha bruta de *B. pauloensis* e *O. chelififer*. Duas amostras da peçonha bruta de *O. chelififer* (5 µg e 10 µg) com média de três ensaios foram avaliadas sobre o plasma bovino. As amostras não foram capazes de promover a coagulação do plasma bovino citratado nas duas concentrações testadas. A peçonha bruta de *B. pauloensis* utilizada como controle positivo apresentou atividade coagulante após 18,2 segundos.

Com base nas informações da **Tabela 2** pode-se presumir que a ausência de atividade coagulante nas duas concentrações (5 e 10 µg) da peçonha bruta de *O. chelififer* foi devido ao fato de que a espécie *O. chelififer* não apresenta atividade coagulante.

Ensaio	Tempo de coagulação (s) <sup>2</sup>
Controle negativo	>120
Peçonha bruta de <i>B. pauloensis</i>	18.2
Peçonha bruta de <i>O. chelififer</i>	>120

**Tabela 1:** Atividade coagulante da peçonha bruta de *B. pauloensis* e *O. chelififer* realizada sobre o plasma bovino.

<sup>2</sup> Média de três ensaios.



## 5. DISCUSSÃO

A ordem *Hymenoptera* representa um grupo taxonômico muito diverso de artrópodes, compreendendo aproximadamente 120.000 espécies (AILI *et al.*, 2014). As peçonhas de formigas exibem uma vasta gama de funções e papéis biológicos, podendo incluir captura da presa e defesa contra competidores e predadores. Portanto, a descoberta de toxinas naturais pode levar à identificação de compostos modelo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Nesse sentido, avaliamos o papel da peçonha bruta da formiga *O. chelifera*, quanto às suas propriedades enzimáticas e biológicas.

As peçonhas de himenópteros constituem um número de biomoléculas farmacologicamente ativas, das quais os componentes mais comuns são proteínas de baixa massa molar reconhecida como alérgenos. Na análise eletroforética da peçonha bruta de *O. chelifera* em condições redutoras foram identificadas bandas principais na faixa de 97, 50, 40, 25 kDa e abaixo de 14,4 kDa. Sabe-se que os componentes mais comuns presentes nas peçonhas de himenópteros apresentam baixa massa molar, caracterizando a presença de peptídeos (HOFFMAN, 2006).

Não foi identificada atividade fosfolipásica na peçonha de *O. chelifera*. Acredita-se que o motivo tenha sido a demora no processamento do material (peçonha bruta) e consequente perda da atividade enzimática. Outra hipótese para tal resultado é a de que a espécie *O. chelifera* não apresente enzimas da classe fosfolipase A<sub>2</sub> em sua peçonha.

Como mostra a **Tabela 2**, a atividade fosfolipásica se diferencia entre espécies da ordem *Hymenoptera*, demonstrando que esta pode ser variável, até mesmo, dentro de animais da mesma família filogenética.

Espécies em ordem filogenética <sup>3</sup>	Categoria animal	PLA ( $\mu$ /mg)
<b>Anthophoridae</b>		
<i>Xylocopa virginica</i>	Abelha solitária	28
<b>Vespidae</b>		
Polistinae		
<i>Polistes injuscatus</i>	Vespa social	560
Vespinae		
<i>Vespula (P.) pensylvanica</i>	Vespa social	94
<b>Formicidae</b>		
Ponerinae		
<i>Ectatomma quadridens</i>	Formiga	13
<i>Odontomachus hematodus</i>	Formiga	0,7
<i>Odontomachus chelifer</i>	Formiga	0
Myrmicinae		
<i>Pogonomyrmex badius</i>	Formiga	94

**Tabela 2:** Comparação entre espécies de abelhas, vespas e formigas quanto a sua atividade fosfolipásica (adaptado SCHMIDT *et al.* (1986).

De acordo com a literatura, as fosfolipases A<sub>1</sub> são mais comumente encontradas em peçonhas de formigas e vespas, enquanto as fosfolipases A<sub>2</sub> são mais encontradas em abelhas. No entanto, estudos com a peçonha da formiga *Solenopsis invicta*, popularmente conhecida como formiga de fogo, mostraram que essa peçonha apresenta atividade PLA<sub>2</sub> (PEREZ-RIVEROL, 2019). As PLA<sub>2</sub> também foram identificadas em abundância na peçonha de *Paraponera clavata* (AILI *et al.*, 2017; SANTOS-PINTO *et al.* 2018) e no transcriptoma de *Dinoponera quadriceps* (TORRES *et al.*, 2014; SANTOS-PINTO, *et al.* 2018).

<sup>3</sup> A ordem é do ancestral até a espécie derivada dentro das famílias e de insetos solitários a insetos sociais entre as famílias.

A avaliação da atividade coagulante para a peçonha bruta de *O. chelifera* mostrou que essa não foi capaz de coagular o plasma bovino citratado, diferentemente do controle positivo, a peçonha de *B. pauloensis*, que coagulou o plasma em 18,2 segundos.

Algumas enzimas com propriedades coagulantes foram descritas em peçonhas de formigas, como a *Pogonomyrmex barbatus*, e também em vespas, como *Vespula pennsylvanica*, *Polistes flavus* (NGET-HONG & GNANAJOTHY, 1992; SILVA *et al.*, 2015) e *Vespa magnifica* (HAN *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2015).

Silva *et al.* (2015) demonstraram que a peçonha bruta de *O. bauri* foi capaz de coagular o plasma bovino citratado em 15 segundos quando comparado com o controle positivo contendo  $\text{CaCl}_2$  0,2 M com tempo de coagulação de 2 minutos. A atividade enzimática da peçonha bruta de *O. bauri* na presença de diferentes inibidores de protease (EDTA, leupeptina e aprotinina) apresentou redução significativa sob efeito desses inibidores, particularmente a aprotinina, sugerindo que a peçonha bruta apresentava serinoproteases em sua composição.

Os dados mostrados acima nos levam a presumir que embora espécies de formigas compartilhem do mesmo gênero não necessariamente suas peçonhas apresentarão as mesmas propriedades enzimáticas.

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve a caracterização bioquímica parcial dos componentes presentes na peçonha da formiga de *O. chelifera*. Foram feitos testes para SDS-PAGE, atividade coagulante e atividade fosfolipásica. Foi possível identificar toxinas em uma ampla faixa de massas molares. Não foi possível detectar as atividades coagulante e fosfolipásica, tal resultado deve-se muito provavelmente à alta permanência da amostra em refrigeração. Concluindo, ainda são necessários estudos mais aprofundados para identificar componentes com ações enzimáticas e biológicas dessas toxinas de formiga. Ademais, este trabalho pode abrir novas perspectivas para estudos relacionados à estrutura-atividade das toxinas presentes na peçonha bruta de *O. chelifera*.

## 7. REFERÊNCIAS

AILI, S. *et al.* Combined peptidomic and proteomic analysis of electrically stimulated and manually dissected venom from the south american bullet ant *Paraponera clavata*. *Journal of Proteome Research*, v. 16, n. 3, p. 1339-1351, 2017. DOI: [10.1021/acs.jproteome.6b00948](https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00948).

AILI, S. *et al.* Diversity of peptide toxins from stinging ant venoms. *Toxicon*, n. 92, p. 166-178, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.10.021. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/268691211\\_Diversity\\_of\\_peptide\\_toxins\\_in\\_stinging\\_ant\\_venoms/download](https://www.researchgate.net/publication/268691211_Diversity_of_peptide_toxins_in_stinging_ant_venoms/download). Acesso em: 30 jun. 2019.

ARTHROPOD. *Enciclopedia Britannica*. Disponível em: <https://www.britannica.com/animal/arthropod>. Acesso em: 20 mai. 2018.

BAR-COHEN, Y. Biomimetics: using nature to inspire human innovation. *Bioinspiration & Biomimetics*, n. 1, p. 1-12, 2006. DOI: 10.1088/1748-3182/1/1/P01. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/fffb/f57fc5682b3dee7d554ee0700b61142aa1c4.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2019.

BERTONE, M. A. *et al.* Arthropods of the great indoors: characterizing diversity inside urban and suburban homes. *PeerJ*, n. 4, p. 1582e, 2016. DOI: 10.7717/peerj.1582. Disponível em: <https://peerj.com/articles/1582.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999. Disponível em: [http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford\\_assay.pdf](http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf). Acesso em: 30 jun. 2019.

CASEWELL, N. R. *et al.* Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 28, n. 4, p. 219-229, 2013. DOI: 10.1016/j.tree.2012.10.020. Disponível em: [https://static1.squarespace.com/static/55a239e2e4b0b3a7ae106f25/t/598149602994ca9c4777c940/1501645171734/2013\\_Fry\\_Complex\\_cocktails.pdf](https://static1.squarespace.com/static/55a239e2e4b0b3a7ae106f25/t/598149602994ca9c4777c940/1501645171734/2013_Fry_Complex_cocktails.pdf). Acesso em 30 jun. 2019.

CHEN, J. *et al.* Piperidine alkaloids from the poison gland of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 57, p. 3128-3133, 2009. DOI: 10.1021/jf803561y. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf803561y>. Acesso em 30 mai. 2019.

CHEN, L.; FADAMIRO, H. Re-investigation of venom chemistry of *Solenopsis* fire ants II Identification of novel alkaloids in *S. invicta*. *Toxicon*, v. 53, n. 5, p. 479-486, 2009. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.01.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101010900052X?via%3Dihub>. Acesso em: 30 jun. 2019.

DE HAAS, G. H. *et al.* Purification and properties of an anionic zymogen oh phospholipase A from porcine pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 159, n. 1, p. 118-129, 1968. DOI: 10.1016/0005-2744(68)90249-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005274468902490?via%3Dihub>. Acesso em: 30 jun. 2019.

ESCOUBAS, P. *et al.* Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, n. 43, p. 279–295, 2008. DOI: [10.1002/jms.1389](https://doi.org/10.1002/jms.1389).

GUIMARÃES, Maria. Jardineiras fiéis: formigas ajudam sementes a germinar na mata atlântica e no cerrado. *Revista FAPESP*, n. 8, p.100-103, 2012. Disponível em: [http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2012/08/100-103\\_jardineiras.pdf](http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2012/08/100-103_jardineiras.pdf). Acesso em: 01 jun. 2018.

HAN, J. *et al.* An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*. *Toxicon*, v. 51, n. 5, p. 914–922, 2008. DOI: [10.1016/j.toxicon.2008.01.002](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.01.002).

HARRISON, R. A. *et al.* Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts. *Gene*, v. 392, n. 1-2, p. 22-33, 2007. DOI: 10.1016/j.gene.2006.10.026. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111906006871?via%3Dihub>. Acesso em: 30 jun. 2019.

HOFFMAN, D. R. Ant venoms. *Current Opinion Allergy and Clinical Immunology*, n. v. 10, n. 4, p. 342-346, 2010. Disponível em: <https://journals.lww.com/co-allergy/toc/2010/08000>. Acesso em: 20 jun. 2019.

HOFFMAN, D.R. Hymenoptera venom allergens. *Clinical Reviews in Allergy Immunology*, n. 30, n. 2, p. 109-128, 2006. DOI: [10.1385/CRIAI:30:2:109](https://doi.org/10.1385/CRIAI:30:2:109).

JESUS, M. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* carried by *Odontomachus bauri* ants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 4, p. 466-469, 2012. DOI: 10.1590/S0074-02762012000400004. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762012000400004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000400004). Acesso em 24 jun. 2019.

KAZUMA, K. *et al.* Combined Venom Gland Transcriptomic and Venom Peptidomic Analysis of the Predatory Ant *Odontomachus monticola*. *Toxins*, v. 9, n. 10, 2017. DOI:10.3390/toxins9100323. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/9/10/323>. Acesso em: 30 jun. 2019.

KEM, W. R. *et al.* Nicotinic receptor inhibition by Tetraponera ant alkaloids. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 24, n. 4, p. 535-551, 2004. DOI: 10.1023/B:CEMN.0000023628.65936.a7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FB%3ACEMN.0000023628.65936.a7>. Acesso em: 24 jun. 2019.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochemistry & Function*, v. 24, n. 1, p. 7-12, 2006. DOI: [10.1002/cbf.1261](https://doi.org/10.1002/cbf.1261).

KINI, R. M. Phospholipase A<sub>2</sub>: a complex multifunctional protein puzzle. In: R. M. KINI (Ed.). *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> enzyme: Structure, Function and Mechanism*. Willey: Chichester, p. 1-28. 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/227680a0>. Acesso em 21 mai. 2019.

LOPES, K. S. *Estudo do potencial terapêutico do veneno de Dinoponera quadriceps sobre os modelos de convulsão in vivo e sobre astrócitos in vitro*. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/8327>. Acesso em: 20 jun. 2019.

MITRA, A. Function of the Dufour's gland in solitary and social Hymenoptera. *Journal of Hymenoptera Research*, n. 35, p. 33-58, 2013. DOI: 10.3897/JHR.35.4783. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/261992975\\_Function\\_of\\_the\\_Dufour's\\_gland\\_in\\_solitary\\_and\\_social\\_Hymenoptera](https://www.researchgate.net/publication/261992975_Function_of_the_Dufour's_gland_in_solitary_and_social_Hymenoptera). Acesso em: 25 jun. 2019.

NGET-HONG, T.; GNANAJOTHY, P. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 102, n. 2, p. 299-302, 1992. DOI: [10.1016/0742-8413\(92\)90011-U](https://doi.org/10.1016/0742-8413(92)90011-U).

PEREZ-RIVEROL, A. *et al.* Insect venom phospholipases A1 and A2: roles in the envenoming process and allergy. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, n. 105, p. 10-24, 2019. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.12.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174818303084?via%3Dihub>. Acesso em: 24 jun. 2019.

RODRIGUEZ-ACOSTA A. *et al.* Severe human urticaria produced by ant (Odontomachus bauri, Emery 1892) (Hymenoptera: Formicidae) venom. *International Journal of Dermatology*, v. 41, n. 11, p.801-803, 2002. DOI: [10.1046/j.1365-4362.2002.01480.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2002.01480.x).

SANTOS-PINTO, J.R.A. *et al.* Diversity of peptidic and proteinaceous toxins from social Hymenoptera venoms. *Toxicon*, n. 148, p. 172-196, 2018. DOI: [10.1016/j.toxicon.2018.04.029](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.029).

SANTOS, Pollyana Pereira. *Componentes químicos e atividade biológica do veneno de Pachycondyla striata F. Smith (Formicidae: Ponerinae)*. 2014. 70 f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2014. Disponível em: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/932>. Acesso em 30 jul. 2019.

SCHMIDT, J. O. *et al.* Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. *Toxicon*, v. 24, n. 9, p. 907-921, 1986. DOI: 10.1016/0041-0101(86)90091-7. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/223075892\\_Comparative\\_enzymology\\_of\\_venoms\\_from\\_stinging\\_Hymenoptera/download](https://www.researchgate.net/publication/223075892_Comparative_enzymology_of_venoms_from_stinging_Hymenoptera/download). Acesso em 30 jun. 2019.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.02.020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105000759?via%3Dihub>. Acesso em 20 jun. 2019.

SERRANO, S.M.T. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 19-26, 2013. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.09.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112007465?via%3Dihub>. Acesso em: 19 jun. 2019.

SERRÃO, J.E. *et al.* Morfologia interna de poneromorfas. In: DELABIE, J.H.C. *et al.* (Orgs). *As formigas poneromorfas do Brasil*. Ilhéus, BA: Editus, 2015, p. 247-269. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/m3gqd/pdf/delabie-9788574554419-17.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2019.

SILVA, M. F. *et al.* Biological and enzymatic characterization of proteases from crude venom of the ant *Ondotomachus bauri*. *Toxins*, v. 7, n. 12, p. 5114-5128, 2015. DOI: [10.3390/toxins7124869](https://doi.org/10.3390/toxins7124869).

SPAGNA, J.C. *et al.* Phylogeny, scaling, and the generation of extreme forces in trap-jaw ants. *Journal of Experimental Biology*, n. 211, p. 2358-2368, 2008. DOI: 10.1242/jeb.015263. Disponível em: <https://jeb.biologists.org/content/211/14/2358>. Acesso em: 20 jun. 2019.

TORRES, A.F.C. *et al.* Transcriptome analysis in venom gland of the predatory giant ant *Dinoponera quadriceps*: insights into the polypeptide toxin arsenal of hymenopterans. *PLOS ONE*, v. 9, n. 1, 2014. DOI: [10.1371/journal.pone.0087556](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087556).

TOUCHARD, A. *et al.* The complexity and structural diversity of ant venom peptidomes is revealed by mass spectrometry profiling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 29, n. 5, p. 385-396, 2015. DOI: 10.1002/rcm.7116. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/271538535\\_The\\_complexity\\_and\\_structural\\_diversity\\_of\\_ant\\_venom\\_peptidomes\\_is\\_revealed\\_by\\_mass\\_spectrometry\\_profiling](https://www.researchgate.net/publication/271538535_The_complexity_and_structural_diversity_of_ant_venom_peptidomes_is_revealed_by_mass_spectrometry_profiling). Acesso em: 30 jun. 2019.

VU, T. *et al.* Zinc: an important cofactor in haemostasis and thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 109, n. 3, p. 421-430, 2013. DOI: 10.1160/TH12-07-0465. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/cca8/7edc9ea57a8ccb3935393f67ce089b74e1bb.pdf?ga=2.12551860.148010080.1562004569-197200480.1562004569>. Acesso em: 20 jun. 2019.