



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Daniela Araújo Vilela

**Prospecção de peptídeos antimicrobianos na peçonha do
escorpião *Tityus obscurus***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Botucatu

2022

Daniela Araújo Vilela

**Prospecção de peptídeos antimicrobianos na peçonha do
escorpião *Tityus obscurus***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vilela, Daniela Araújo.

Prospecção de peptídeos antimicrobianos na peçonha do
escorpião *Tityus obscurus* / Daniela Araújo Vilela. -
Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Daniel Carvalho Pimenta

Capes: 20802005

1. Escorpiões Veneno. 2. Bioprospecção. 3. Peptídeos.
4. Anti-infecciosos. 5. Espectrometria de massa.

Palavras-chave: AMPs; Antimicrobiano; Bioprospecção;
Peptidômica; *Tityus obscurus*.

Dedico este trabalho a minha família e amigos, que incentivaram meus sonhos e estiveram sempre ao meu lado. Este é o meu presente para vocês.

"Seja a mudança que você quer ver no mundo".

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Daniel Carvalho Pimenta, que acreditou em mim. Pela oportunidade de realizar esta pesquisa, bem como pelos ensinamentos. Obrigada pela paciência, compreensão e amizade.

Ao Dr. Emídio Beraldo Neto, pela ajuda imensurável no desenvolvimento deste projeto, pelo apoio e disposição em ajudar e ensinar.

À Dra. Ana Leonor Abrahão Nencioni, pela doação dos venenos liofilizados.

À Dra. Márcia Regina Franzolin, pela realização dos experimentos de atividade biológica.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), por me apresentar aos animais peçonhentos e disponibilizar o espaço para realização de parte dos experimentos.

À Dra. Luciana Curtolo de Barros, pela amizade, auxílio no projeto e por todos os ensinamentos no manejo e práticas laboratoriais.

Aos amigos do CEVAP, Alessandra Jim Stefanini, Elenize Jamas Pereira, Leonardo Melo, Letícia Murback e Vitória Meneghetti Minatel por deixar os meus dias mais leves. O apoio de vocês foi crucial para realizar mais essa fase da minha vida acadêmica.

Aos profissionais do manejo, servidores, funcionários e pesquisadores do CEVAP/UNESP, pelo acolhimento e conversas diárias.

Aos meus pais Carmo Felisbino Vilela e Maria Aparecida de Araújo Vilela, e irmão, Fernando Araújo Vilela, pelo apoio incondicional e por acreditarem nos meus sonhos, mesmo que significasse morar em outra cidade, frente à todas as dificuldades.

Ao William Guilherme Guimarães Vigaro e sua família, por todo amor e acolhimento.

À Juliana Fontanesi, pela presença (mesmo à distância) e paciência, entendendo o motivo da minha ausência em diversas ocasiões.

À Tatiane Biondo da seção técnica de pós-graduação, por todo suporte e carinho.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) e a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) pela oportunidade de ingressar na pós-graduação e me encantar com a carreira acadêmica.

Aos membros que compõem a banca por suas contribuições e disponibilidade para avaliar esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código de financiamento 88887.569499/2020-00, pelo auxílio financeiro.

Por fim, a todos que de alguma maneira se fizeram presente e colaboraram para que fosse possível a realização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Os venenos escorpiônicos são misturas complexas de componentes, como, nucleotídeos, mucopolissacarídeos, oligopeptídeos, moléculas de baixa massa molecular, proteínas e peptídeos. Além disso, os peptídeos podem ser divididos em duas categorias, os peptídeos de ponte dissulfeto (DBPs) e peptídeos sem ponte dissulfeto (NDBPs). Este estudo tem como objetivo caracterizar bioquimicamente os peptídeos no veneno do escorpião preto amazônico *Tityus obscurus*, após fracionamento cromatográfico, a fim de avaliar a presença de atividade antimicrobiana. A amostra do veneno foi separada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa (CLAE ou em inglês “HPLC - RP”), equipado com uma coluna analítica C18 para obtenção de seis frações, que foram testadas sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *C. tropicalis*. O percentual de inibição de crescimento microbiano efetivo das frações ocorreu em *C. albicans* (F5 – 18,36% e F6 – 38,95%) e *S. aureus* (F5 – 16,52%). No entanto, na maioria dos casos houve leve aumento da proliferação microbiana. As análises por espectrometria de massas da fração com maior índice de inibição de crescimento microbiano indicaram a presença de três moléculas: uma fosfolipase, uma metalopeptidase e uma neurotoxina. Atividades antibióticas derivadas de hidrolases já são conhecidas, inclusive para *Tityus* sp., restando investigar o possível papel desta neurotoxina na atividade antibiótica aqui reportada para *T. obscurus*. O uso de peptídeos antimicrobianos advindos de fontes alternativas, como visto em venenos escorpiônicos, geraram interesse e notoriedade devido a sua vasta atividade biológica. Este conhecimento pode auxiliar tratamentos adjuntos e/ou alternativos para as infecções resistentes aos antibióticos convencionais.

Palavras-chave: *Tityus obscurus*, peptidômica, antimicrobiano, bioprospecção, AMPs.

ABSTRACT

Scorpion venoms are complex mixtures of components, such as nucleotides, mucopolysaccharides, oligopeptides, low molar mass molecules, proteins and peptides. Furthermore, peptides can be divided into two categories, disulfide-bridged peptides (DBPs) and non-disulfide-bridged peptides (NDBPs). This study aims to characterize biochemically the peptides in the venom of the Amazonian black scorpion *Tityus obscurus* after chromatographic fractionation in order to assess antimicrobial activity presence. The venom sample was injected into a High Performance Liquid Chromatography - Reverse Phase (HPLC - RP), equipped with a C18 analytical column to obtain the six fractions, which were tested for the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *C. tropicalis*. The percentage of effective microbial growth inhibition of the fractions occurred in *C. albicans* (F5 – 18.36% and F6 – 38.95%) and *S. aureus* (F5 – 16.52%). Nevertheless, there was an slight increase in microbial proliferation. The mass spectrometry analysis of the fraction with the highest microbial growth inhibition rate indicated the presence of three molecules: a phospholipase, a metallopeptidase and a neurotoxin. Antibiotic activities derived from hydrolases are already known, including for *Tityus* sp, and the possible role of this neurotoxin in the antibiotic activity reported here for *T. obscurus* remains to be investigated. The use of antimicrobial from alternative sources, as seen in scorpion venoms, has generated interest and notoriety due to their broad biological activity. This knowledge can aid adjunctive and/or alternative treatments for infections resistant to conventional antibiotics.

Keywords: *Tityus obscurus*, peptidomics, antimicrobial, bioprospecting, AMPs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. GRADIENTE DA RIQUEZA DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA BUTHIDAE NO BRASIL.	12
FIGURA 2. EXEMPLARES DE ESPÉCIMES DE ESCORPIÕES: A) PROSCORPIUS OSHORNI, NEW YORK, EUA (SILURIANO); B) PROTOISCHNURUS AXELRODORUM, CEARÁ, BRASIL (CRETÁCEO); C) TITYUS SERRULATUS, BAHIA, BRASIL (ATUAL).	13
FIGURA 3. MORFOLOGIA DO ESCORPIÃO.	14
FIGURA 4. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ACIDENTES COM ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL, ENTRE OS ANOS DE 2018 E 2021.	16
FIGURA 5. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ACIDENTES POR ESCORPIÃO SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE NO BRASIL, NO ANO DE 2021.	17
FIGURA 6. TITYUS OBSCURUS. A) JUVENIL (SAUT SABBAT, GUIANA FRANCESA); B) FÊMEA ADULTA (CAYENNE, GUIANA FRANCESA).	19
FIGURA 7. A) TUBÉRCULO SUBACULEAR AO LADO DO FERRÃO (B).....	19
FIGURA 8. ESTRUTURA DE INOCULAÇÃO DO VENENO. (A) VESÍCULA OU TÉLSON E (B) FERRÃO OU AGUILHÃO DE TITYUS OBSCURUS.	19
FIGURA 9. DIFERENÇAS ENTRE O VENENO DE TITYUS SERRULATUS (Ts) E TITYUS OBSCURUS (To).	26
FIGURA 10. MORTES GLOBAIS ATRIBUÍDAS E ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA BACTERIANA POR DIFERENTES ESPÉCIES DE BACTÉRIAS (2019).....	32
FIGURA 11. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A VÁRIOS ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS.	33
FIGURA 12. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM) DA BACTÉRIA STAPHYLOCOCCUS AUREUS....	34
FIGURA 13. SURGIMENTO DE ALGUNS ANTIBIÓTICOS E CEPAS RESISTENTES DO S. AUREUS NOS SÉCULOS XX E XXI.....	34
FIGURA 14. ESCHERICHIA COLI AMPLIADA 6.836 VEZES.	35
FIGURA 15. MICROGRAFIAS DIC DE C. ALBICANS (A) E C. TROPICALIS (B).	37
FIGURA 16. PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA DA AMOSTRA DO VENENO DE TITYUS OBSCURUS.	41
FIGURA 17. PERFIL DO CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO 1 (F1) DO VENENO DE T. OBSCURUS. TEMPO DE RETENÇÃO INICIAL E FINAL ($\approx 2,6 - 14,9$ MIN.) E QUANTIDADE DE FRAÇÕES (≈ 27).	42
FIGURA 18. PERFIL DO CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO 2 (F2) DO VENENO DE T. OBSCURUS. TEMPO DE RETENÇÃO INICIAL E FINAL ($\approx 15,3 - 18,3$ MIN.) E QUANTIDADE DE FRAÇÕES (≈ 13).	42
FIGURA 19. PERFIL DO CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO 3 (F3) DO VENENO DE T. OBSCURUS. TEMPO DE RETENÇÃO INICIAL E FINAL ($\approx 18,6 - 19,9$ MIN.) E QUANTIDADE DE FRAÇÕES (≈ 6).	43
FIGURA 20. PERFIL DO CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO 4 (F4) DO VENENO DE T. OBSCURUS. TEMPO DE RETENÇÃO INICIAL E FINAL ($\approx 20,4 - 21,9$ MIN.) E QUANTIDADE DE FRAÇÕES (≈ 6).	43
FIGURA 21. PERFIL DO CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO 5 (F5) DO VENENO DE T. OBSCURUS. TEMPO DE RETENÇÃO INICIAL E FINAL ($\approx 22,1 - 25,2$ MIN.) E QUANTIDADE DE FRAÇÕES (≈ 8).	43
FIGURA 22. PERFIL DO CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO 6 (F6) DO VENENO DE T. OBSCURUS. TEMPO DE RETENÇÃO INICIAL E FINAL ($\approx 25,9 - 37,5$ MIN.) E QUANTIDADE DE FRAÇÕES (≈ 13).	44
FIGURA 23. FRAÇÕES ESCOLHIDAS DE F5 E F6 (EM CIMA) E RESULTADO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA C. ALBICANS E C. TROPICALIS NAS FRAÇÕES TESTADAS (EMBAIXO).	45
FIGURA 24. AS 26 PRIMEIRAS PROTEÍNAS ORIGINADAS DA FRAÇÃO 62 (F6) DO VENENO BRUTO DE T. OBSCURUS.	46
FIGURA 25. IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA PARCIAL DE To5, PRESENTE NA FRAÇÃO 62.	46

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. CLASSIFICAÇÃO DO ESCORPIONISMO.	16
QUADRO 2 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E INFORMAÇÕES SOBRE OS ACIDENTES DAS QUATRO ESPÉCIES DE ESCORPIÕES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA DO BRASIL.	18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO VENENO DE T. OBSCURUS.	28
TABELA 2. FRAÇÕES OBTIDAS DO CROMATOGRAMA COMPLETO DO VENENO DE TITYUS OBSCURUS COM SEUS RESPECTIVOS TEMPOS DE RETENÇÃO INICIAL E FINAL (EM MINUTOS), E A QUANTIDADE DE FRAÇÕES.	41
TABELA 3. PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICROBIANO NAS FRAÇÕES TESTADAS DO VENENO DE TITYUS OBSCURUS.	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. BIOLOGIA DOS ESCORPIÕES	12
1.2. ESCORPIONISMO	15
1.4. VENENO ESCORPIÔNICO	19
1.4.1. PEPTÍDEOS COM PONTES DISSULFETO (DBPs).....	21
1.4.1.1. Canais de íons sódio.....	21
1.4.1.2. Canais de íons potássio	22
1.4.1.3. Canais de íons cloreto	22
1.4.1.4. Canais de íons cálcio	23
1.4.2. PEPTÍDEOS SEM PONTES DISSULFETO (NDBPs)	23
1.4.3. PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (AMPs)	24
1.4.4. VENENO DE <i>T. OBSCURUS</i>	25
1.5. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	32
2. OBJETIVOS	38
2.1. OBJETIVO GERAL.....	38
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3. METODOLOGIA	39
3.1. FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – FASE REVERSA (CLAE OU HPLC-RP).....	39
3.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	39
3.3. ANÁLISE PROTEÔMICA	40
4. RESULTADOS	41
4.1. FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – FASE REVERSA (CLAE OU HPLC-RP).....	41
4.2. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	44
4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	51
7. ETAPAS FUTURAS	51
8. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOLOGIA DOS ESCORPIÕES

Os escorpiões pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida e Ordem Scorpiones e são reconhecidas 2.722 espécies¹. A escorpiofauna brasileira é composta por quatro famílias (Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Hormuridae) e cerca de 160 espécies reconhecidas². A maior família contendo 95 gêneros e 1.300 espécies pertence à Buthidae¹. Destes, 50 espécies são consideradas perigosas para o ser humano³ e as espécies de escorpiões de importância médica no Brasil é encontrada no gênero *Tityus*⁴.

A família Buthidae ocorre em todas as regiões do Brasil (Figura 1), sendo que as regiões Norte (n= 35) e Nordeste (n= 29) possuem uma elevada riqueza de espécies, seguidos das regiões Centro-Oeste (n= 20), Sudeste (n= 18) e Sul (n= 9). Os Estados de maior riqueza de butídeos são a Bahia (n= 24) e o Amazonas (n= 22)⁵.



Figura 1. Gradiente da riqueza de espécies da família Buthidae no Brasil.

Fonte: Adaptado de Brazil TK, Porto TJ (2010)⁵.

A região Norte, que representa 45% do país e é amplamente coberta pela floresta amazônica, tem a maior riqueza de espécies^{5,6}. Mais de 70 espécies foram identificadas nessa região e todas as quatro famílias de escorpiões têm representantes na Amazônia brasileira^{2,7}.

Os escorpiões surgiram como animais aquáticos durante o período Siluriano (450 a 425 milhões de anos atrás). As espécies têm uma distribuição biogeográfica quase cosmopolita, estando ausentes em ambientes boreais, Antártica e certas regiões insulares mais isoladas, apesar das translocações antropogênicas^{8,9}. Houve relatos de escorpiões encontrados nos Andes Peruanos (mais de 5.500 m de altitude),

dentro de cavernas escuras, desertos áridos, florestas úmidas e sob rochas cobertas de neve¹⁰.

Os escorpiões são classificados como um dos artrópodes mais antigos e conservados, tanto na origem quanto na morfologia corporal. Devido à essas poucas alterações, alguns autores definiram-no como “fóssil vivo” (Figura 2). Contrariamente a essa afirmação, os escorpiões sofreram significativas adaptações bioquímicas, fisiológicas, comportamentais e ecológicas que contribuíram para sua sobrevivência nos últimos 450 milhões de anos^{5,8}.

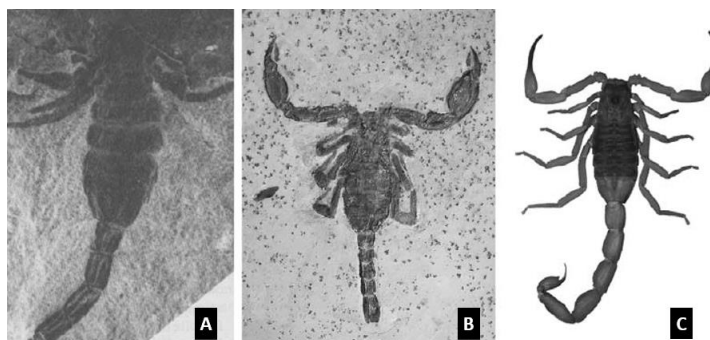


Figura 2. Exemplares de espécimes de escorpiões: A) *Proscorpius oshorni*, New York, EUA (Siluriano); B) *Protoischnurus axelrodorum*, Ceará, Brasil (Cretáceo); C) *Tityus serrulatus*, Bahia, Brasil (atual).

Fonte: Retirado de Brazil TK, Porto TJ (2010)⁵.

Esta variedade de adaptações permitiu aos escorpiões a sobrevivência em ambientes hostis com disponibilidade mínima de água e altas temperaturas. Várias espécies dos gêneros *Bothriurus*, *Centruroides*, *Escorpius*, *Isometrus* e *Tityus*, apresentam grande adaptabilidade ecológica e distribuições geográficas irregulares, indicando que vivem em ecossistemas variados e transformados devido a atividade humana¹⁰.

São comumente avistados em frestas de rochas, troncos em decomposição, sob folhas, cascas de árvores, tijolos e/ou esconderijos evitando o encontro com seus predadores naturais (seriemas, galinhas, corujas, lagartos, macacos, quatis e anuros). São mais ativos à noite e durante os meses mais quentes e úmidos do ano (regiões tropicais)⁵, entretanto a possibilidade desse encontro em outros meses do ano não está descartada. Se alimentam principalmente de aranhas e insetos, e o canibalismo entre os escorpiões é predominante; os escorpiões localizam as presas orientando-se pelas vibrações do ar e do solo¹¹.

Os escorpiões geralmente são solitários, mas algumas espécies desenvolveram algum comportamento social¹². O comportamento de corte é a interação intraespecífica mais complexa e bem estudada. Durante a época de

acasalamento, a fêmea receptiva produz um feromônio que atrai o macho da espécie⁵. A iniciação, a dança e a transferência de espermatozoides (reprodução sexuada) são os três aspectos da corte do escorpião¹³. Existem também espécies que se reproduzem assexuadamente por partenogênese, em que os ovos se desenvolvem sem serem fertilizados por um macho. *Tityus metuendus*, *Tityus serrulatus*, *Tityus stigmurus*, *Tityus uruguayensis* e *Tityus trivittatus* são cinco espécies encontradas no Brasil que utilizam essa técnica reprodutiva¹⁴.

Ambas as reproduções podem ter um período de gestação de 2 meses (curto), como mostrado na família Buthidae, ou até 22 meses (longo), como visto em várias espécies das famílias Ischinuridae, Scorpionidae e Diplocentridae. Pode haver de 1 a 105 filhotes, que permanecem no dorso da mãe (cuidado parental) até a primeira ou segunda muda, momento em que se dispersam (em torno de 5 a 30 dias, dependendo da espécie)¹². A maturidade sexual pode levar de 6 meses a 7 anos e a expectativa de vida é de 2 a 10 anos, no entanto, certos escorpiões podem viver até 25 anos, sendo que as fêmeas vivem mais que os machos e a longevidade é maior em cativeiro do que na natureza^{5,11}.

O corpo do escorpião (Figura 3) é dividido em:

- Prossoma: contém um par de quelíceras (tritura o alimento), um par de pedipalpos (pinças) e quatro pares de pernas.
- Opistossoma (abdômen) dividido em duas regiões:
 - Mesossoma (tronco): se encontra o opérculo genital, apêndices sensoriais (pentes) e os espiráculos (aberturas externas dos pulmões).
 - Metassoma (cauda): em sua extremidade possui o télson e o aguilhão, utilizado para inocular a peçonha.

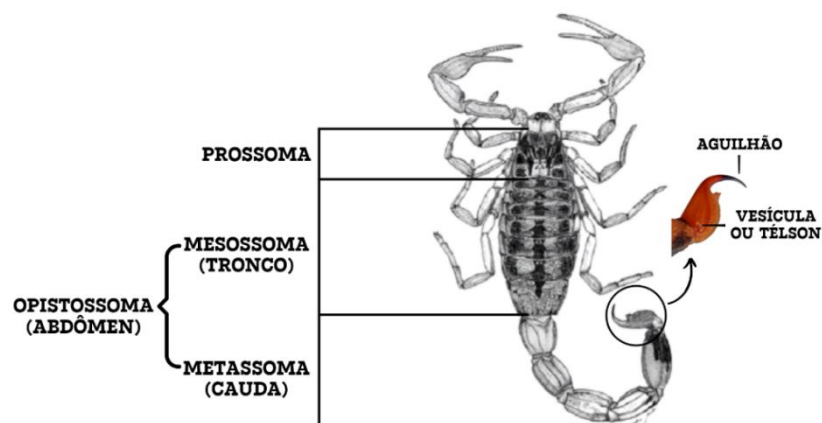


Figura 3. Morfologia do escorpião.
Fonte: Adaptado de Brasil (2009)¹⁵.

1.2. ESCORPIONISMO

Acidentes envolvendo animais peçonhentos foram adicionados à lista de Doenças Tropicais Negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2009. Esses acidentes são a segunda maior causa de intoxicação humana no Brasil, perdendo apenas para as intoxicações por uso de medicamentos¹⁶.

Os acidentes ocasionados por animais peçonhentos são importantes causas de morbimortalidade no mundo todo, com elevada prevalência na população do campo, floresta e águas, além disso, são subnotificados como problema de saúde pública. E ainda são relativamente comuns, especialmente em países tropicais e subtropicais, podendo causar envenenamento letal em humanos, principalmente em crianças e idosos¹⁷.

No Brasil, as primeiras pesquisas sobre escorpionismo foram realizadas no início do século XX, por iniciativa do Dr. Vital Brazil Mineiro da Campanha (1897-1950), diretor-fundador do Instituto Butantan em São Paulo. O naturalista Rodolpho Teodoro Gaspar Wilhelm Von Ihering (1883-1939) auxiliou Vital Brazil na identificação dos escorpiões, posteriormente classificados como espécies do gênero *Tityus*¹⁸. Embora tenham relatado apenas duas espécies, *Tityus bahiensis* e *T. serrulatus*, pesquisas posteriores de Heitor Maurano¹⁹, Octávio de Magalhães^{20,21} e Wolfgang Bücherl²² revelaram que os acidentes causados por esses animais devem ser considerados como um problema sanitário, fato que persiste até hoje devido à sua frequência e potencial gravidade.

Em acidentes com animais peçonhentos, o escorpionismo é o de maior incidência no Brasil. De acordo com os dados do Sinan, em 2021, o número de casos de acidentes por animais peçonhentos foi, em ordem, por escorpiões (149.134), serpentes (29.152), aranhas (27.118), abelhas (17.879) e lagartas (3.959); este número elevado se estende também para outros anos (Figura 4)²³. A alta adaptação urbana desses animais e a sua reprodução partenogenética são variáveis que contribuem para sua dispersão e explicam o número elevado de acidentes^{24,25}.

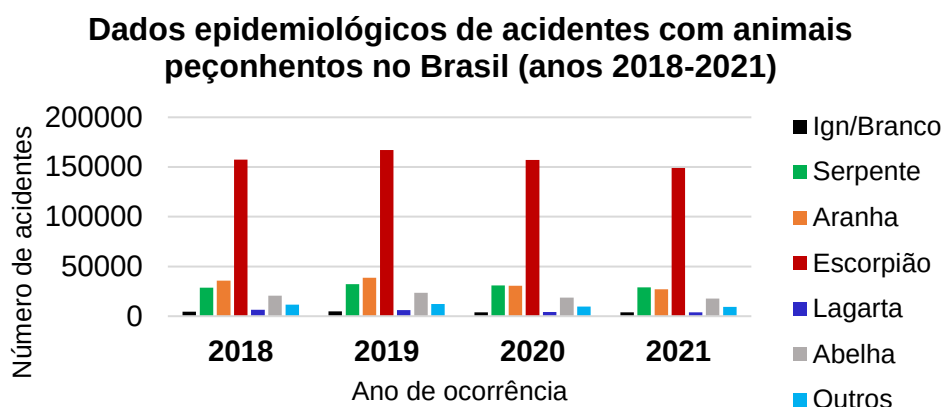


Figura 4. Dados epidemiológicos de acidentes com animais peçonhentos no Brasil, entre os anos de 2018 e 2021.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.

A gravidade do escorpionismo varia conforme a quantidade de veneno injetada, toxicidade, espécie do escorpião, local da picada, sensibilidade ao veneno e idade da pessoa, assim como fatores relacionados ao tratamento, como diagnóstico precoce e tempo decorrido do acidente até soroterapia²⁶. Nos acidentes, os escorpiões podem injetar entre 0,1 e 0,9 µl de veneno em suas vítimas²⁷. A localização geográfica, a alimentação específica e a idade dos escorpiões são fatores que afetam a concentração das toxinas injetadas após um acidente^{25,28}.

O escorpionismo é classificado em²⁶:

Quadro 1. Classificação do escorpionismo.

CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
LEVE	Sintomatologia local, sendo a dor referida em quase todos os casos. Podem ocorrer vômitos ocasionais, discreta taquicardia e agitação, decorrentes da dor e da ansiedade;
MODERADO	Sintomatologia local e manifestações sistêmicas como náuseas, sudorese, vômitos, taquicardia, taquipneia, agitação e hipertensão arterial;
GRAVE	Sintomatologia local é mascarada pelo quadro sistêmico de vômitos profusos e frequentes (indicando a gravidade do envenenamento), sudorese profusa, palidez, hipotermia, agitação alternada com sonolência, hipertensão arterial, taqui ou bradicardia, extrassístoles, taqui ou hiperpneia, tremores e espasmos musculares. Pode haver evolução para insuficiência cardíaca, choque cardiocirculatório e edema agudo de pulmão, que são as causas mais frequentes de óbito.

Felizmente, a maioria dos acidentes por escorpião é classificada como leve (Figura 5)²⁹, de modo que o tratamento consiste em anestésicos ou analgésicos para alívio da dor. O tratamento específico consiste na administração do soro antiescorpiônico (SAEsc) ou antiaracnídico (SAA) aos pacientes com formas moderadas e graves. A aplicação do soro deve ser realizada por via intravenosa, com cautela diante da possibilidade de reações alérgicas³⁰.

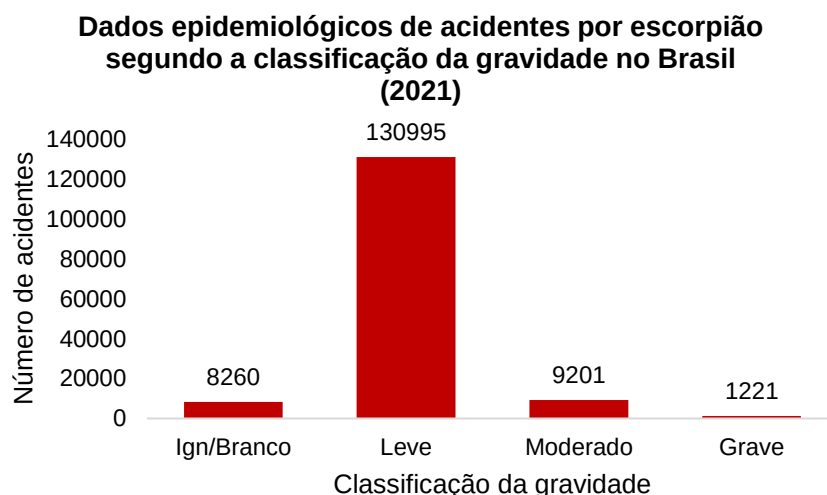


Figura 5. Dados epidemiológicos de acidentes por escorpião segundo a classificação da gravidade no Brasil, no ano de 2021.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net.

Existem 54 espécies do gênero *Tityus* no país, entretanto as de importância médica compreendem principalmente *T. serrulatus* (escorpião amarelo), *T. stigmurus* (escorpião amarelo do Nordeste), *T. bahiensis* (escorpião marrom) e *T. obscurus* (escorpião preto da Amazônia). As informações das quatro espécies de escorpiões de importância médica no Brasil encontram-se no Quadro 2. As espécies deste gênero ocorrem em cerrados e campos abertos, adaptando satisfatoriamente à vida domiciliar urbana⁵.

Quadro 2 - Principais características, distribuição geográfica e informações sobre os acidentes das quatro espécies de escorpiões de importância médica do Brasil.

ESPÉCIE	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	DISTRIBUIÇÃO	ACIDENTES
A. <i>Tityus bahiensis</i> 	• $\cong 7$ cm; • Pernas e pedipalpos marrons; • Metassoma, dorso do prossoma e mesossoma escuros; • Macho com tibia do pedipalpo mais robusta do que a tibia da fêmea;	Regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul	Segundo maior causador de acidentes na região Sudeste. Possui registro de acidentes graves em crianças.
B. <i>Tityus obscurus</i> 	• $\cong 9$ cm; • Quando adulto, todo o corpo é negro; • Machos com pedipalpo mais fino e longo do que na fêmea;	Regiões Norte e Centro-Oeste	Causador de muitos acidentes na região Norte.
C. <i>Tityus serrulatus</i> 	• $\cong 7$ cm; • Pernas, pedipalpo e metassoma amarelos; • Prossoma e metassoma com dorso marrom escuro; • Serrilha dorsal no 3º e 4º segmentos do metassoma; • Populações sexuadas e assexuadas; • Macho com metassoma mais robusto do que na fêmea;	Regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul	Causador do maior número de acidentes no Brasil. Maior frequência de acidentes graves. Principal causador de óbitos no país.
D. <i>Tityus stigmurus</i> 	• $\cong 7$ cm; • Pernas, pedipalpo e metassoma amarelos; • Faixa escura longitudinal no dorso do mesossoma com duas faixas menores nas laterais e mancha escura em forma de triângulo no dorso do prossoma; • Serrilha dorsal no 3º e 4º segmento do metassoma; • Populações sexuadas e assexuadas; • Macho com pedipalpo mais fino e metassoma mais robusto do que na fêmea.	Regiões Nordeste e Sudeste	Causador do maior número de acidentes na região Nordeste, com registros de surtos populacionais em capitais, como Salvador e Recife.

Fonte: Adaptado de Brazil TK, Porto TJ (2010)⁵.

Fotos: A) e C) ©Daniela A. Vilela; B) ©M. Cozijn e D) ©Rogério Bertani.

O *Tityus obscurus*, sinônimo de *T. paraensis* (Kraepelin, 1896) e *T. cambridgei* (Pocock, 1897), conhecido como escorpião preto da Amazônia, é pertencente à família Buthidae e no Brasil é comum no Norte (escorpião de importância médica nessa região, principalmente na região amazônica brasileira) e pode ser encontrado inclusive na região Centro-Oeste. Possui em média 9 cm de comprimento e quando adulto, todo seu corpo é negro e os espécimes jovens são marrons (Figura 6). Sua reprodução é sexuada^{5,15}.



Figura 6. *Tityus obscurus*. A) Juvenil (Saut Sabbat, Guiana Francesa); B) Fêmea adulta (Cayenne, Guiana Francesa).
Fotos: ©Eric Ythier (2018)³¹.

Esses escorpiões possuem, ao lado do ferrão, o tubérculo subaculear que se assemelha a um espinho. Essa característica é crucial para separá-los de outros escorpiões comuns e sem importância médica na região amazônica (Figura 7)³².

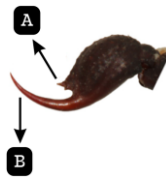


Figura 7. A) Tubérculo subaculear ao lado do ferrão (B).
Foto: ©Rogério Bertani.

1.4. VENENO ESCORPIÔNICO

Por mais de 400 milhões de anos de evolução, os escorpiões selecionaram venenos que têm efeitos tóxicos em uma variedade de alvos biológicos³³. A inoculação do veneno ocorre pelo ferrão ou aguilhão, estrutura localizada no quinto segmento da cauda, o télson (Figura 8).

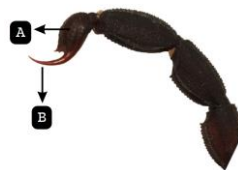


Figura 8. Estrutura de inoculação do veneno. (A) vesícula ou télson e (B) ferrão ou aguilhão de *Tityus obscurus*.
Foto: ©Rogério Bertani

O veneno dos escorpiões é uma mistura complexa de compostos, como, nucleotídeos, mucopolissacarídeos, oligopeptídeos, proteínas básicas, moléculas de baixa massa molecular como serotonina e histamina, e peptídeos com ações neurotóxicas, contribuindo para as múltiplas ações do veneno³⁴⁻³⁹. Podem também, estar presente enzimas, como as proteases, hialuronidase, fosfolipase A2 e fosfoesterases, embora tenham papel menor no acidente por veneno escorpiônico⁴⁰.

As neurotoxinas encontradas nesses venenos foram selecionadas ao longo do tempo por sua especificidade, potência e alta atividade biológica, permitindo que esses animais atacassem e imobilizassem, além de se defenderem contra predadores. A principal propriedade desses compostos é que eles se ligam a locais específicos de canais iônicos nas membranas celulares^{36,41}.

No veneno escorpiônico, estão presentes os peptídeos de ponte dissulfeto (DBPs – do inglês “*Disulfide-Bridged Peptides*”) e peptídeos sem ponte dissulfeto (NDBPs – do inglês “*Non-Disulfide-Bridged Peptides*”)⁴². Além disso, esse veneno complexo possui proteínas que correspondem de 30 a 75% da secreção seca obtida por estimulação elétrica⁴³.

As moléculas presentes no veneno são mais conhecidas, do ponto de vista da toxinologia molecular e biotecnologia, pelos efeitos tóxicos sobre as células, tecidos e organismos, mas também têm demonstrado atividades que podem ser úteis para o desenvolvimento de compostos químicos de uso farmacêutico, como exemplo, peptídeos antibióticos, antimaláricos, com atividades imunossupressoras e anticancerígenos⁴². Além disso, há um número crescente de ensaios com medicamentos que aliviam a dor, controlam a arritmia e a pressão arterial, bem como anticonvulsivantes, antibióticos e agentes inseticidas. Os peptídeos antibióticos têm recebido muita atenção como uma nova classe de antibióticos, especialmente para o tratamento de infecções resistentes aos antibióticos convencionais⁴⁴.

A maioria das pesquisas sobre veneno escorpiônico concentra-se na caracterização de toxinas de alta massa molecular (peptídeos acima de 5 kDa e proteínas), fazendo com que os peptídeos de cadeia curta fossem negligenciados por vários anos de pesquisa. Até então, eles eram excluídos pelos processos de extração e separação utilizados, que incluíam tampões e centrífugas, que acarretava a exclusão das análises⁴¹.

A diversidade peptídica observada em venenos representa um grande desafio para a pesquisa, principalmente relacionadas à produção de novos fármacos. A complexidade das estruturas e atividades biológicas de muitos componentes de venenos animais tem sido demonstrada nos últimos 30 anos⁴⁴. Até 2015, componentes do veneno escorpiônico registrou resultados satisfatórios para marcação e direcionamento de tumores, entretanto não houve registro do fármaco. Além disso, os peptídeos escorpiônicos podem agir como carreadores, levando

compostos terapêuticos para seus alvos moleculares. Adicionalmente podem servir como *scaffold* como plataforma para o design de medicamentos⁴⁵.

1.4.1. PEPTÍDEOS COM PONTES DISSULFETO (DBPs)

Os canais iônicos permitem que íons específicos passem através da membrana celular⁴⁶. Estão associados a vários processos fisiológicos, como sinalização elétrica em neurônios e células musculares, e sua disfunção resulta em uma variedade de distúrbios em humanos, de modo que esses canais iônicos são alvos cruciais para a descoberta de medicamentos³⁶.

Os DBPs são considerados as principais moléculas responsáveis pelos efeitos neurotóxicos observados no escorpionismo, afetando a função dos canais iônicos de células excitáveis e não excitáveis⁴⁷⁻⁴⁹.

As neurotoxinas presentes nos venenos de escorpiões podem acarretar a alteração da função dos canais de Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{++} , levando a liberação de neurotransmissores em quantidades elevadas no sistema nervoso central ou autônomo^{50,51}.

1.4.1.1. Canais de íons sódio

As toxinas que atuam em canais de íons sódio de modo geral constituem-se de peptídeos longos com cadeias de aminoácidos de 60 a 70 resíduos de aminoácidos⁵²⁻⁵⁴ e essas interações são a principal causa dos efeitos que são induzidos pelos venenos de escorpiões. Como resultado do envenenamento, há liberação de catecolaminas e acetilcolina, atuando em diferentes receptores nos inúmeros tecidos das vítimas desses envenenamentos, de modo que a liberação de quantidades significativas desses tipos de neurotransmissores é responsável pela maioria dos sintomas observados no escorpionismo³⁴.

Além disso, as toxinas foram divididas em duas categorias (α - e β -). As α -toxinas contêm entre 6500 e 8500 Da e possui cerca de 58-76 resíduos de aminoácidos com uma estrutura tridimensional em α -hélice e β -pregueada antiparalela⁵⁵. O resultado dos efeitos destas toxinas causa maior influxo de íons sódio no interior da célula, resultando em aumento da despolarização e, conseqüentemente, liberação massiva de neurotransmissores (elas retardam a rápida inativação)⁴¹.

As α -neurotoxinas, em baixas dosagens, acarretam forte despolarização da membrana celular seguido da diminuição da excitabilidade. Em doses elevadas,

prolongam o potencial de excitação das células e induzem arritmia cardíaca e paralisia⁵⁶. Já as β -neurotoxinas modificam a ativação dos canais de íons sódio voltagem dependentes, tornando o potencial mais eletronegativo permitindo o aumento da tendência da célula em responder espontânea e repetidamente, independente do potencial de membrana. As β -toxinas demonstraram provocar respostas musculares espásticas⁵⁷.

1.4.1.2. Canais de íons potássio

As toxinas que atuam em canais de íons potássio são tipicamente peptídeos menores referidos genericamente como KTx^{58,59}.

Possuem de 20 a 95 resíduos de aminoácidos, a maioria com menos de 40 resíduos em suas sequências, uma ampla gama de tipos de aminoácidos e de 3 a 4 pontes dissulfeto intramoleculares⁶⁰⁻⁶². Além disso, foi encontrada uma nova classe de toxinas conhecidas como k-KTx, que possuem apenas duas ligações dissulfeto e atuam em menor grau nos canais de íons potássio⁶³⁻⁶⁵.

1.4.1.3. Canais de íons cloreto

As toxinas que atuam são principalmente polipeptídeos com 35 a 38 aminoácidos, compostos por 4 pontes dissulfetos. A estrutura primária destas toxinas apresenta similaridade de 50-74% e a localização dos resíduos de cisteínas é conservada dentro da família⁶⁶. O peptídeo GaTx1, isolado do veneno da espécie *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, foi identificado como a primeira toxina de peçonha escorpiônica que modula com alta afinidade a condutância de íons cloreto⁶⁷. Outro peptídeo da família das clorotoxinas (Bs-TX7), isolado a partir do veneno do escorpião *Buthus indicus*, foi identificado, sequenciado, sintetizado e suas atividades testadas⁶⁸.

A clorotoxina isolada da espécie *L. quinquestriatus* liga-se a canais de íons cloreto na matriz extracelular de gliomas com alta especificidade, sugerindo que possa ser usada como marcadores diagnósticas para tratamento de câncer⁶⁹. Em consequência desta descoberta, as empresas farmacêuticas passaram a conduzir testes de fase clínica para uso no diagnóstico por imagem e tratamento local de gliomas^{70,71}.

1.4.1.4. Canais de íons cálcio

As toxinas geralmente formam um grupo heterogêneo, diferindo bastante quanto às suas sequências de aminoácidos, quantidade de pontes dissulfetos, tamanho e estrutura sendo toxinas de cadeia tanto longa quanto curta⁷²⁻⁷⁵. Estas possuem a nomenclatura bem estabelecida, inicialmente proposta por Tytgat et al. (1999) baseada no tamanho, localização das cisteínas e a similaridade de suas estruturas primárias⁷⁶.

A imperioxotinas (IpTxA e IpTxi) do escorpião *Pandinus imperator*⁷³ e a maurocalcina (Mca) do escorpião *Scorpio maurus palmatus*⁷⁷ são duas toxinas que atuam nos canais de íons Ca^{+2} , que ativam o receptor de rianodina (Ryr), um canal de liberação de íons cálcio intracelulares.

1.4.2. PEPTÍDEOS SEM PONTES DISSULFETO (NDBPs)

Os NDBPs têm estruturas diversas e exibem sua atividade contra alvos biológicos distintos, em contraste com os DBPs, que possui relações estrutura-função conservadas. Como resultado, esses peptídeos vêm atraindo a atenção por parte dos pesquisadores, entretanto, apenas algumas dezenas de NDBPs foram caracterizadas nos venenos de escorpião até o momento⁷⁸.

Existem várias técnicas que têm sido utilizadas para fracionar e identificar novos NDBPs em veneno escorpiônico. As estratégias iniciais para identificação de NDBPs utilizavam a separação cromatográfica em conjunto com a espectrometria de massas para purificar e identificar os componentes peptídicos do veneno. Para verificar as funções dos peptídeos descobertos, experimentos biológicos foram conduzidos após essas abordagens⁷⁹. Seguindo esses métodos de separação, o sequenciamento de peptídeos foi realizado usando a degradação de Edman, método que foi fundamental para determinar a sequência completa de aminoácidos dos peptídeos de interesse, mas havia limitações técnicas na identificação de peptídeos de cadeias longas, bem como desafios relacionados às modificações N-terminais, que foram relatadas em alguns peptídeos^{80,81}.

O uso de técnicas de clonagem molecular em conjunto com fracionamento por HPLC e espectrometria de massas foram um dos principais avanços para a caracterização dos componentes peptídicos do veneno. Com este novo método, primers degenerados podem ser projetados para clonar sequências de cDNA completas dos peptídeos precursores da toxina, mesmo com a escassa informação

da sequência peptídica N-terminal obtida da degradação de Edman⁸². Além disso, a estruturação de bibliotecas de cDNA derivadas de mRNA de escorpião permitiu a triagem de vários clones de cDNA aleatórios, o que provou ser um método eficaz para a descoberta de vários NDBPs putativos relatados em várias pesquisas⁸³.

Conhecimento adicional sobre o processamento pós-traducional e a diversidade evolutiva desses peptídeos foi obtido a partir do estudo do perfil transcriptômico de NDBPs, e esses detalhes provaram ser ferramentas cruciais no campo da taxonomia⁸⁴.

1.4.3. PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (AMPs)

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs - do inglês "*Antimicrobial Peptides*") são componentes importantes no sistema de defesa inata dos organismos vivos. É considerado primitivo, uma vez que foi o primeiro mecanismo de defesa imunológica a evoluir na natureza, com sua síntese e secreção desencadeadas por agentes invasores ou gerados constitutivamente dentro do organismo como resultado de pressões ambientais⁸⁵. Esses peptídeos possuem um amplo espectro de atividade contra diferentes microrganismos, sendo eles, bactérias, protozoários, fungos, leveduras e vírus. Os AMPs são encontrados em uma ampla gama de organismos, incluindo bactérias, fungos, animais e plantas, e em todas as espécies de mamíferos⁸⁶.

O veneno escorpiônico demonstrou ser uma rica fonte de moléculas bioativas, particularmente bloqueadores de canais iônicos. Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que os venenos de escorpião também têm um suprimento abundante de AMPs. Tem sido sugerido que a presença de AMPs pode proteger a glândula do veneno da infecção e facilitar a ação de outras neurotoxinas⁸⁷.

Os peptídeos anfipáticos carregados positivamente encontrados em veneno de escorpião, ou AMPs, podem ser separados em três categorias estruturais: (1) peptídeos contendo cisteína com pontes dissulfeto, (2) peptídeos com uma α -hélice anfipática, sem resíduos de cisteína e (3) peptídeos ricos em certos aminoácidos, como prolina e glicina⁸⁸.

A primeira categoria de AMPs, os peptídeos contendo cisteína, são comuns e geralmente possuem 3 ou 4 pontes dissulfeto. Esses peptídeos, que compõem a maior família de peptídeos no veneno, foram identificados interagindo com canais iônicos, como visto anteriormente (seção "1.4.1. PEPTÍDEOS COM PONTES

DISSULFETO (DBPs)"). Embora os AMPs estejam se tornando mais prevalente nos peptídeos sem ponte dissulfeto, os que possui ponte dissulfeto têm propriedades biologicamente notáveis dos quais merecem atenção. O segundo, peptídeos com uma α -hélice anfipática, sem resíduos de cisteína, podem ainda serem divididos em três grupos: peptídeos de cadeia longa (>35 aminoácidos), de cadeia intermediária (20-35 aminoácidos) e de cadeia curta (<20 aminoácidos)⁸⁸.

As características, como, sua potência, baixas taxas de resistência e modo de ação, tornam os AMPs uma família de compostos atraentes com a potencialidade de interesse terapêutico⁸⁹.

Diversos peptídeos do veneno de escorpião foram descobertos tendo uma gama de atividades antimicrobianas⁸⁸, incluindo *hadrurin*, *scorpine*, *pandinins*, *IsCTs*, *opistoporins*, *parabutoporin*, *mucroporin*, *imcroporin*, *meucins*, *Im-1*, *StCTs*, *ctriporin*, *HsAPs*, *VmCTs*, *UyCTs*, *TsAPs*, *vejovine*, *stigmurin*, *Smps*, *BmKn2*, *BmKb1*, *BmKbpp*, *marcin-18*, *AamAP1129*, *AamAP2130*, *Css54*, *pantinins*^{80,82,90-114} e esse número vem aumentando consistentemente a cada dia.

1.4.4. VENENO DE *T. obscurus*

Dependendo da região de origem, os sintomas do acidente por *T. obscurus* pode variar. Além da parestesia, edema, eritema, sudorese, piloereção e queimação, desconforto local e irradiante são frequentemente observados. Os pacientes da região oeste do Pará apresentaram maior predominância nos sintomas de parestesia e dor irradiada. Mioclonia, dismetria e ataxia são os efeitos neurológicos predominantes, sem sinais autonômicos. Apenas pacientes do oeste do Pará relataram mioclonia, sensação de choque elétrico corporal, disartria, parestesia, ataxia e dismetria, não sendo observada em outras regiões da Amazônia, mesmo pela mesma espécie^{115,116}. De acordo com Torrez et al. (2014)¹¹⁷, foi relatado que a grande maioria dos pacientes apresentou sintomas consistentes de disfunção cerebelar aguda e manifestações neuromusculares anormais e em alguns casos, lesão muscular, sintomas esses que nunca foram descritas em nenhuma outra região do mundo.

Além dos casos anteriores, houve três casos fatais (2 crianças e 1 adulto) em um período de 12 meses, relatados na Guiana. Os pacientes viviam em assentamentos rurais dentro ou adjacentes à grande selva da Guiana que confina com a bacia amazônica e os acidentes ocorreram no pé. Nenhum deles apresentavam outras comorbidades¹¹⁸.

Um perfil eletroforético realizado por de Oliveira UC, et al. (2018)⁸¹, mostrou que o veneno de *T. obscurus* não é reconhecido pelo soro antiescorpiônico*. A Figura 9A mostra uma banda principal que está abaixo de 14,4 kDa e outros componentes que estão entre 31,0 e 66,2 kDa; em *T. serrulatus* esses componentes apresentaram um perfil substancialmente diferente. Os componentes do veneno de *T. obscurus* não são antigenicamente comparáveis aos de *T. serrulatus*, de acordo com um exame de Western Blotting desses venenos utilizando soro antiescorpiônico (Figura 9B). Esses achados são consistentes com as variações nos sintomas clínicos desses venenos^{119,120}. A região amazônica, onde a espécie é encontrada, pode ter contribuído para a divergência de repertórios de toxinas com epítomos antigênicos distintos⁸¹.

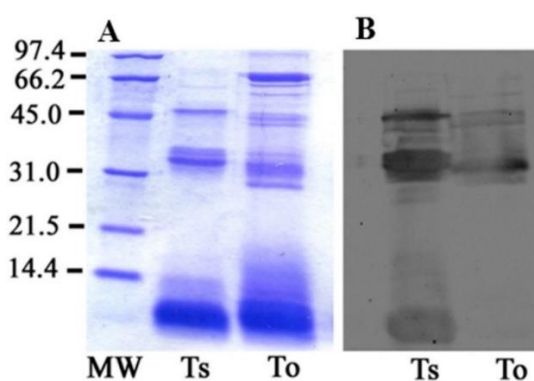


Figura 9. Diferenças entre o veneno de *Tityus serrulatus* (Ts) e *Tityus obscurus* (To).

(A) 1D SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue R. de 30µg de cada veneno. (B) Western blotting usando soro antiescorpiônico, imunocorado, mostrando que o soro não reconheceu todas as toxinas do veneno de *T. obscurus*. Para comparar os dois venenos e servir como controle positivo no experimento de Western blotting, foi utilizado veneno de *T. serrulatus* (Ts).

Fonte: Retirado de de Oliveira UC, et al (2018)⁸¹.

O veneno de *T. obscurus* (DL₅₀ = 3,13 mg/kg) é menos tóxico que de *T. serrulatus* (DL₅₀ = 0,99 mg/kg), segundo pesquisas, mas pode induzir ação letal. Doses mais altas resultaram em sintomas e consequências comportamentais mais pronunciadas em camundongos e ratos, mas o envenenamento em camundongos foi mais leve e não convulsivo em comparação com *T. serrulatus*¹²¹. Além dos sintomas caracterizados como "choque elétrico" que ocorrem exclusivamente com *T. obscurus*, a reduzida similaridade das sequências de aminoácidos de *T. obscurus* com toxinas conhecidas poderia explicar diferenças de efeitos que os gerados por *T. serrulatus*. Esses achados implicam que as toxinas de *T. obscurus* podem influenciar um canal

* O soro antiescorpiônico, heterólogo e hiperimune, é apresentado em ampolas contendo 5 mL de solução injetável da fração F(ab')₂ de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas de plasma de equinos hiperimunizados com uma mistura de venenos de escorpiões *Tityus serrulatus* e acondicionadas em caixa com 04 unidades. (Bula com informações ao Profissional de Saúde — soro antiescorpiônico. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2020/04/Bula-soro-antiescorpi%C3%B4nico-para-o-profissional-2020.pdf>).

iônico particular. Este veneno pode, portanto, ser usado para rastrear possíveis moduladores de certos canais iônicos⁸¹.

A primeira toxina de canal de potássio (Tc1) do veneno de *T. obscurus* foi descrita em 1998 e caracterizada em 2000¹²². Já existem 48 e 33 transcritos de *T. obscurus* que são comparáveis com toxinas dos canais de sódio e potássio estabelecidos, respectivamente⁸¹. Nove NaTx e um KTx estavam entre eles; três NaTx e o KTx apresentaram evidência proteômica⁸¹. Toxinas de canal de potássio (3)^{122,123} e sódio (4)¹²⁴⁻¹²⁸ e *T. obscurus* foram investigadas em experimentos eletrofisiológicos (Tabela 2).

Numerosos venenos animais contêm metalopeptidases, enzimas proteolíticas cuja atividade depende de íons bivalentes, muitas vezes um Zn^{2+} no centro catalítico. Essas enzimas são capazes de hidrolisar a matriz celular além de interferir no processo de coagulação da hemolinfa ou sangue (atividade hemolítica). Em estudo, as metalopeptidases representaram 43,22% do total de componentes do veneno de *T. obscurus*⁸¹ (Tabela 2). O escorpião amazônico pode causar danos pulmonares caracterizados pela presença de glóbulos vermelhos no parênquima¹²⁹. Esses resultados podem ser influenciados pelas metalopeptidases presentes no veneno.

O perfil transcriptômico de *T. obscurus* permitiu a identificação de componentes adicionais do veneno, incluindo peptídeos antimicrobianos, peptídeos aniônicos, proteínas anticoagulantes, peptídeo potencializador de bradicinina, peptídeos secretores ricos em cisteína, fosfolipases A2 e C, lipases, inibidores de peptidases, serina e cisteína proteases, metalopeptidases e hialuronidase. Além disso, foram descritas duas moléculas semelhantes à enzima conversora de angiotensina (tipo ACE – Tobs00978 e Tobs01141) no transcriptoma de *T. obscurus*⁸¹ (Tabela 2).

Os estudos de Dias et al. (2018) detectaram 360 peptídeos na faixa de massa de 400-4000 Da, dos quais 40 peptídeos apresentaram massas moleculares entre 2115 e 3926 Da (26 deles tinham massas moleculares acima de 3200 Da e possivelmente são DBPs/neurotoxinas). Os 320 peptídeos restantes são compostos principalmente de NDBPs. Cerca de 70% desse veneno é composto por peptídeos, embora apenas 5% do veneno bruto seja composto de NDBPs. Apesar do alto número de NDBPs detectados, apenas alguns peptídeos foram caracterizados estruturalmente e funcionalmente¹³⁰.

Tabela 1. Compostos identificados no veneno de *T. obscurus*.

TOXINA (SINÔNIMO)	UNIPROT ID	CLASSE	ATIVIDADE	REF.
Tc1	P83243	α -KTx 13.1	Bloqueio <i>Shaker</i> B canais de K ⁺	122
Tc30	P60210	α -KTx 4.4	Bloqueio <i>Shaker</i> B(Kv1.1) e Kv1.3	123
Tc32	P60211	α -KTx 18.1	Bloqueio <i>Shaker</i> B(Kv1.1) e Kv1.3	
To2 (Tc48a)	-	NaTx	-	124
To3 (Tc49a)	-	NaTx	-	
To1 (Tc49b)	-	NaTx	Altera as correntes de Na ⁺ das células granulares.	
To4 (Tc54)	-	NaTx	-	
Tc1	P83243	KTx	-	125
Tc27	P84676	-	-	
Tc29	P84677	-	-	
Tc30	P60210	KTx	-	
Tc31	P84678	-	-	
Tc32	P60211	-	-	
Tc33	P84679	-	-	
Tc35	P84680	-	-	
Tc37	P84681	-	-	
Tc39	P84682	-	-	
Tc40 (To13)	P84683	-	-	
Tc41 (To14)	P84684	-	-	
To6 (Tc43)	P84685	-	-	
Tc46	P84686	-	-	
To2 (Tc48a)	P60212	NaTx	Altera os canais Na ⁺	
To3 (Tc48b)	P69213	NaTx	-	
To3 (Tc49a)	P69213	NaTx	-	
To1 (Tc49b)	P60214	NaTx	-	
Tc50	P84688	-	-	
To4 (Tc54)	P60215	NaTx	-	
Tc56	P84689	-	-	

Tabela 1. Continuação.

Tc58	P84690	-	-	
Tc61 (To8)	P84691	-	-	
Tc64	P84692	-	-	
To5 (Tc66)	P84693	-	-	
Tc83	P84694	-	-	
To3 (Tc48b)	P69213	α -toxin	Altera as correntes de Na ⁺ de células GH3 pituitárias de rato cultivadas.	126
To1 (Tc49b)	P60214			
To2 (Tc48a)	P60212			
To3 (Tc48b/Tc49a)	P69213			
To4 (Tc54)	P60215			
To5	P84693			
To6 (Tc43)	P84685	Todas as proteínas compartilharam identidade de sequência com NaTx.		
To7 (Tc50)	P84688			
To8	H1ZZH7		-	131
To9	H1ZZH8			
To10	H1ZZH9			
To11	H1ZZI0			
To12	H1ZZI1			
To13	H1ZZI2			
To14	H1ZZI3			
To15	H1ZZI4			
Toxina recombinante Tc32	P60211	α -KTx	Bloqueador Kv1.1 e Kv1.3	132
ToP11	-	Inibidor da serina peptidase.	Potente atividade inibidora de tripsina; não reduziu a viabilidade das células tumorais; sem alterações comportamentais e/ou fisiológicas visíveis em camundongos; estável na faixa de pH 3,0 a 9,0 mesmo a 95°C;	133

Tabela 1. Continuação.

ToAP1	LT576029	AMP, NDBP	Ativo contra a formação de biofilme. Inferior a 50% de hemólise em todas as concentrações testadas. Ativo contra <i>C. neoformans</i> e todas as <i>Candida</i> spp. (exceto <i>C. glabrata</i>).	
ToAP2	LT576030	AMP, NDBP	Ativo contra a formação de biofilme e todas as cepas testadas (CIM 3, 12 a 200 µM). Hemólise mantida em cerca de 50%.	
ToAP2S1	-	AMP, NDBP	Porcentagem de hemólise superior a 50% em concentrações de até 25 µM. Sem atividade antifúngica.	134
ToAP3	-	AMP, NDBP	Ativo contra <i>C. neoformans</i> e todas as <i>Candida</i> spp. (exceto para <i>C. glabrata</i>)	
ToAP4	-	AMP, NDBP	Sem atividade antifúngica.	
NDBP-4.23	S6D3A7	AMP, NDBP	Ativo contra a formação de biofilme. Inferior a 50% de hemólise em todas as concentrações testadas.	
ToAcP	A0A1D3IY23	AMP, NDBP	Sem atividade antifúngica.	
ToAP2	LT576030	AMP, NDBP	Atividade antifúngica contra células planctônicas e biofilme de <i>C. albicans</i>	135
ToAP2	LT576030	AMP, NDBP	Atividade antifúngica contra 4 cepas de <i>Mycobacterium massiliense</i> (GO01, GO06, GO08 e CRM0020)	136
To4 (Tc54)	P60215	β-toxina	Alterações hNav 1.1, hNav 1.2 e hNav 1.4	137
Transcrições com evidências proteômicas	-	Enzima conversora de angiotensina		
		Proteína rica em cisteína, relacionada ao alérgeno V5/Tpx-1		81
		Enzima conversora de endotelina		
		Hialuronidase		
		Metaloproteinases		
		Serina e cisteína proteinases		
		Fosfolipase A ₂		
		KTx		

Tabela 1. Continuação.

		Inibidores de proteínase NaTx		
		Fragmentos de		
-	-	hipotensinas, KTx e a proteína alérgeno 5	-	130
To1 (Tc49b)	P60214	β-toxina	Alterações Na _v 1.3, Na _v 1.6, BgNa _v 1, VdNa _v 1	128
Peptídeo sintético	-	AMP, NDBP	Ativo contra a replicação do vírus da imunodeficiência símia (SIV) na linhagem celular HUT-78 e em leucócitos humanos primários.	138
ToAP2 (P6)				

Legenda: KTx: toxina do canal de potássio; NaTx: toxina do canal de sódio; CIM: concentração inibitória mínima; Na_v: canal de sódio dependente de voltagem; K_v: canal de potássio dependente de voltagem; NDBP: peptídeo sem ponte dissulfeto; AMP: peptídeo antimicrobiano; Ref.: referência.

1.5. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana (AMR - do inglês “*Antimicrobial Resistance*”) foi listada como uma das 10 principais preocupações mundiais de saúde pública para a humanidade pela Organização Mundial da Saúde (OMS)¹³⁹.

Devido à crescente prevalência da AMR aos antibióticos, particularmente a evolução de infecções multirresistentes, há uma variedade reduzida de medicamentos antimicrobianos que são eficazes contra patógenos humanos comuns. Fatores como, uso generalizado e inadequado dos antibióticos, programas insuficientes de prevenção e controle de infecções e a capacidade laboratorial limitada, exacerbou o problema global da AMR¹⁴⁰.

Em estudo realizado em 2019, estima-se que 5 milhões de mortes por ano são atribuídas a infecções bacterianas resistentes aos medicamentos. Das mortes atribuíveis à resistência bacteriana, a *Escherichia coli* foi responsável pelo maior número de mortes em 2019, seguida por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 10)¹⁴¹.

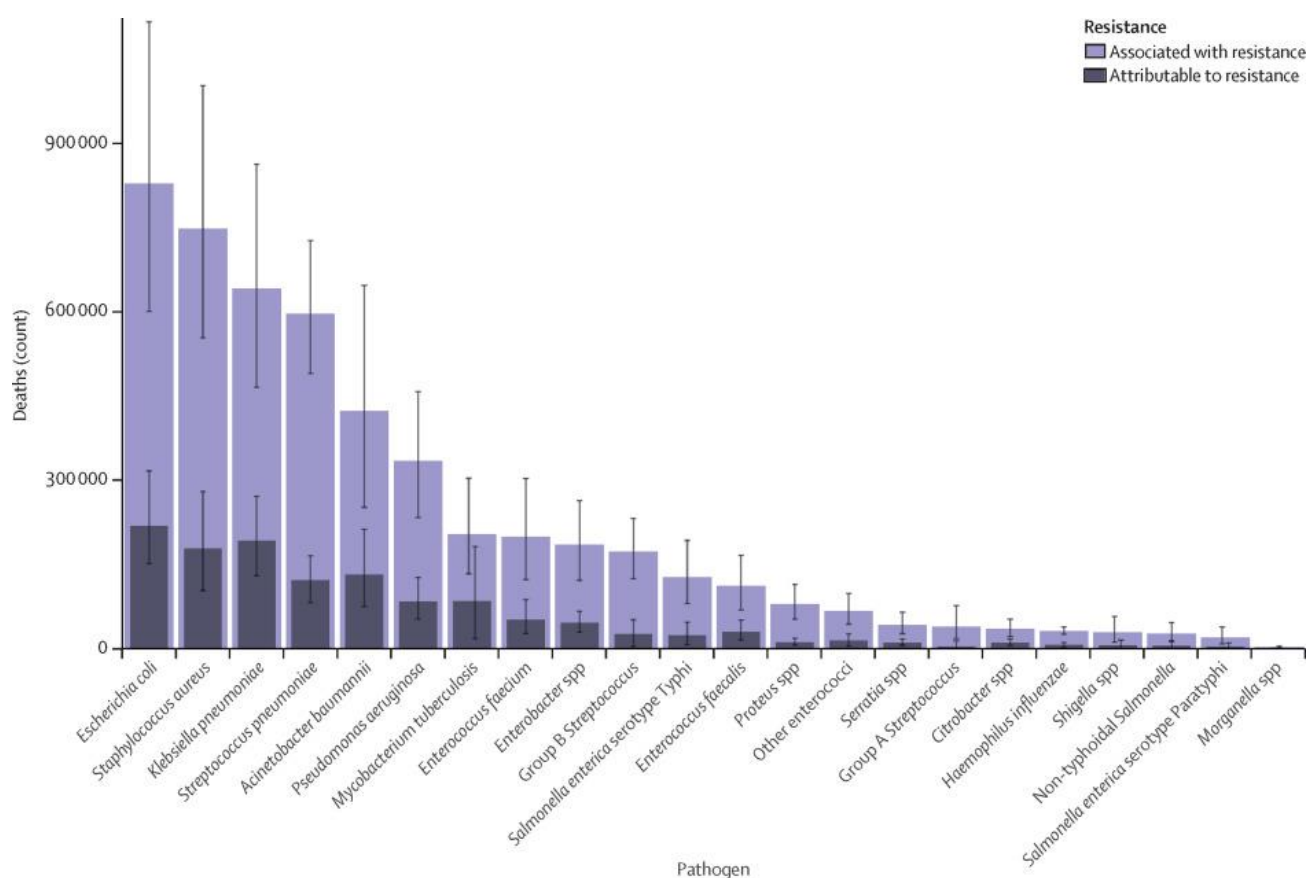


Figura 10. Mortes globais atribuídas e associadas à resistência bacteriana por diferentes espécies de bactérias (2019).

Fonte: Retirado de Antimicrobial Resistance Collaborators¹⁴¹.

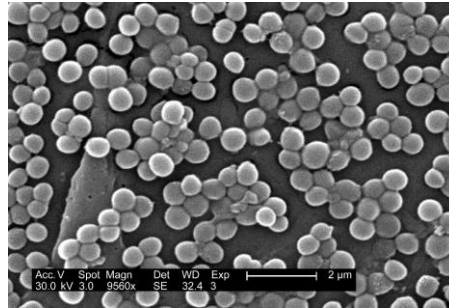


Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura (SEM) da bactéria *Staphylococcus aureus*.
Foto: ©Janice Haney Carr (2005).

É rotina o isolamento de pacientes colonizados em ambientes como, hospitais (principalmente berçários e unidades de terapia intensiva). O *S. aureus* pode induzir uma série de processos infecciosos, desde infecções cutâneas persistentes (muito benignas) até infecções sistêmicas (potencialmente fatais). Como resultado, também oferece perigo para pacientes em diálise, queimados, diabéticos e HIV-positivos¹⁴².

Acreditava-se que as doenças infecciosas terminariam, como resultado do desenvolvimento da antimicrobianoterapia no início da década de 1930, com o uso da sulfanilamida, descoberto por Gerard Domagk em 1932. As primeiras cepas de *S. aureus* resistentes a esse medicamento quimioterápico, entretanto, surgiram perto do final daquela década; desde então, novas cepas resistentes se desenvolveram com cada novo antibiótico usado para tratar as doenças associadas a ele¹⁴³ (Figura 13).

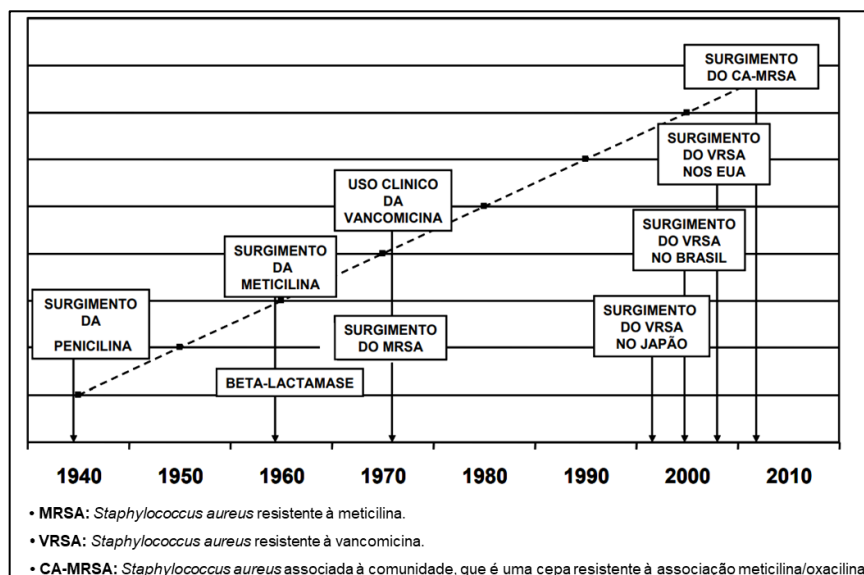


Figura 13. Surgimento de alguns antibióticos e cepas resistentes do *S. aureus* nos séculos XX e XXI.
Fonte: Adaptado de dos Santos AL, et al (2007)¹⁴³.

Um dos patógenos mais prevalentes adquiridos em hospitais é a *Escherichia coli* (Figura 14), uma bactéria gram-negativa, móvel, anaeróbica facultativa, em forma

de bastonete, que pode causar infecções da corrente sanguínea (ICS), no trato urinário, abdominais etc¹⁴⁴. Durante décadas, esta bactéria – um componente essencial da microflora intestinal – e seu hospedeiro humano coexistiram em saúde e benefício mútuo. Quase nunca causam doenças, salvo em hospedeiros imunocomprometidos ou em situações em que as barreiras gastrointestinais típicas são rompidas¹⁴⁵.

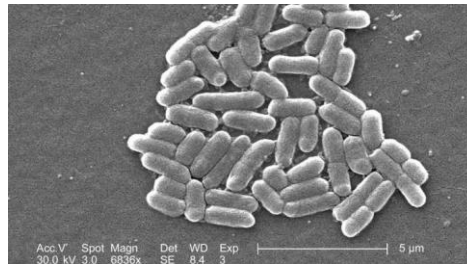


Figura 14. *Escherichia coli* ampliada 6.836 vezes.
Foto: Public Domain Files.

A *E. coli* é uma espécie diversa que, do ponto de vista da saúde humana, pode ser vista como três subconjuntos (patótipos) clínicos principais^{146,147}:

1. Cepas comensais, que colonizam naturalmente o cólon de hospedeiros saudáveis e só causam doença extra-intestinal no contexto de um grande comprometimento do hospedeiro e/ou trauma abdominal.
2. Cepas diarreiogênicas, que causam síndromes de diarreia que variam em apresentação clínica e patogênese de acordo com as características de virulência distintas da cepa. Por exemplo, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC), são subpatótipos que se distinguem por essas características. Tais cepas quase nunca causam infecção extra-intestinal e, fora do mundo em desenvolvimento, raramente colonizam hospedeiros saudáveis.
3. *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC), que frequentemente coloniza o intestino humano sem causar danos. No entanto, eles têm uma capacidade única de entrar e sobreviver em locais extraintestinais geralmente estéreis, onde podem causar doenças.

Para antimicrobianos como a ampicilina que têm sido utilizados na medicina humana e veterinária por um longo período, a *E. coli* exibe níveis altos de resistência antimicrobiana. No entanto, nas últimas duas décadas, foram observados surgimento

e disseminação de bactérias multirresistentes, incluindo cepas resistentes a antibióticos mais recentes, como fluoroquinolonas e cefalosporinas de alto espectro¹⁴⁸.

As infecções fúngicas têm crescido significativamente em importância na prática clínica durante as últimas décadas, com pacientes imunocomprometidos sendo particularmente vulneráveis. Apesar do fato de serem responsáveis por pelo menos 10% das mortes hospitalares, as infecções fúngicas são difíceis de tratar devido às suas vias metabólicas conservadas¹⁴⁰.

As quatro classes principais de medicamentos antifúngicos são os polienos, azólicos, alilaminas e equinocandinas. A maioria dos antifúngicos tem como alvo o ergosterol (polienos), a sua via biossintética (alilaminas e azóis) ou a síntese de β -glucanos (equinocandinas), entretanto, essas proteínas alvo podem levar ao desenvolvimento de resistência¹⁴⁹.

Os polienos e azóis interferem na biossíntese e distribuição do ergosterol. Mesmo com amplo espectro, o seu uso em humanos é limitado por sua toxicidade, que resulta da semelhança estrutural entre o ergosterol fúngico e o colesterol de mamíferos¹⁴⁹. A classe mais recente de antifúngicos a entrar em uso clínico, as equinocandinas, tem como alvo a β -1,3 glucana sintase da parede celular. Embora as equinocandinas tenham um alcance limitado da atividade, elas não são perigosas para os humanos, entretanto, já foi observada resistência contra eles e, logo após sua introdução, foram descobertas bactérias clinicamente resistentes¹⁵⁰.

As espécies do gênero *Candida* sp. são fungos que normalmente possuem relação de comensalismo com animais de sangue quente (incluindo humanos), fazendo parte da flora normal da boca, trato gastrointestinal e membranas que cobrem mucosas e outras cavidades do corpo. No entanto, pode causar infecções cutâneas em indivíduos saudáveis (candidíase) e, em circunstâncias mais raras (indivíduos com baixa resistência, HIV ou leucemia), pode entrar na corrente sanguínea e causar infecções sérias em órgãos vitais. Além disso, pode sobreviver por períodos longos sem nutrientes, e é conhecida por formar biofilmes em dispositivos médicos¹⁵¹.

A *C. albicans* é considerada o fungo causador mais comum de infecção fúngica em humanos, contudo a *C. tropicalis* vem sendo a segunda espécie do gênero a ser isolada em hospitais brasileiros¹⁵². Dentre as espécies do gênero, *C. tropicalis* possui maior tamanho ($\approx 7,9$ μm diâmetro) comparado a *C. albicans* ($\approx 5,6$ μm diâmetro) (Figura 15)¹⁵³.

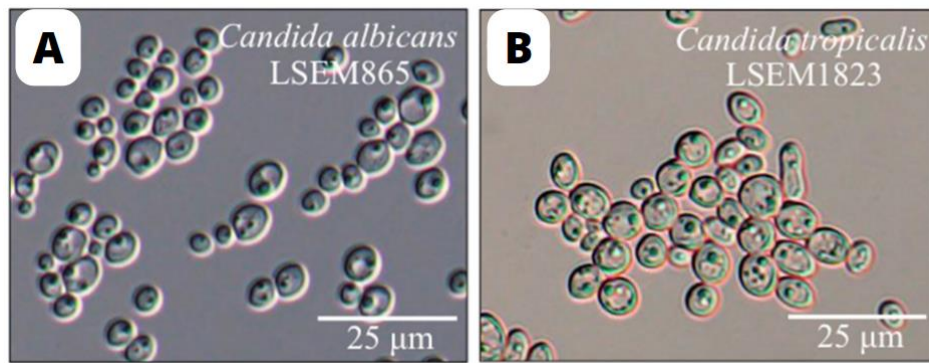


Figura 15. Micrografias DIC de *C. albicans* (A) e *C. tropicalis* (B).

Fonte: Retirado de Pezzotti et al (2022)¹²⁷.

A indução de bombas de efluxo que bombeiam antifúngicos azólicos da célula fúngica em espécies de *Candida*, levam a diminuição das concentrações do fármaco no interior da célula sendo responsável, entre outros, pela diminuição da suscetibilidade ou resistência da *Candida* sp. a esses antifúngicos¹⁴⁰.

Ao contrário dos medicamentos antibacterianos, há menos antifúngicos no mercado. A necessidade de tratamentos mais eficientes é necessária pela complexidade médica dos pacientes e pelos complicados mecanismos biológicos subjacentes à resistência e tolerância aos medicamentos¹⁴⁰.

Novas abordagens farmacológicas são necessárias devido ao aumento de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais. O uso de peptídeos antimicrobianos advindos de fontes alternativas, como visto em venenos escorpionicos, geraram interesse e notoriedade devido a sua vasta atividade biológica. Isto é, certamente, um grande desenvolvimento biotecnológico e, consequentemente, um avanço socioeconômico significativo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar bioquimicamente o veneno do escorpião *T. obscurus*, após fracionamento cromatográfico, monitorado pela presença de atividade antimicrobiana.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar cromatograficamente o veneno de *T. obscurus*;
- Realizar a análise prospectiva das frações isoladas do veneno do escorpião *T. obscurus* em ensaios antimicrobianos;
- Realizar a análise proteômica das frações com atividade biológica.

3. METODOLOGIA

O veneno bruto liofilizado foi disponibilizado pela Dra. Ana Leonor Abrahão Nencioni do Laboratório de Farmacologia, do Instituto Butantan, sob nº de licença do IBAMA 20158-1 e aprovado pelo Protocolo CEUA 0215/2021 (FMVZ/UNESP) para utilização de material biológico para este trabalho. Os espécimes são oriundos dos municípios de Santarém e Belterra, no Estado do Pará.

3.1. Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa (CLAE ou HPLC-RP)

O veneno foi ressuspenso em uma solução 0,1% de TFA e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C - o sobrenadante foi injetado em um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) Prominence Shimadzu, equipado com uma coluna analítica C18 (250 x 4,6 mm) com detecção em espectrofotômetro em comprimento de onda de 214nm, para obtenção das frações. Foi utilizado um gradiente inicial de 0-100% de solvente B em 40 min (solvente A: H₂O/TFA 0.1% e solvente B: Acetonitrila + solvente A 10%) sob fluxo de 1,0 mL/min em uma coluna C18.

3.2. Ensaio de Atividade Antimicrobiana

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado de acordo com o NCCLS (2003)¹⁵⁴.

Para o inóculo, as amostras de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 90112 e *C. tropicalis* ATCC 750 foram cultivadas em caldo Trypticaseína de soja (TSB) por 18 horas. No dia seguinte, foram passadas para ágar Trypticaseína de soja (TSA) para obter colônias isoladas. Foram incubadas por 18 horas e preparadas soluções microbianas na escala 0,5 de McFarland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml) em solução salina a 0,85% estéril e foram então diluídas de forma a obter solução com 10^6 UFC/ml. Foram usados meio Muller Hinton (MH) para as bactérias e Sabouraud (Sab) para os fungos.

Foram distribuídos na microplaca 50 µl da fração ($100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) e 50 µl do inóculo microbiano (10^6 UFC/ml), deixando assim, a concentração microbiana 5×10^5 UFC/ml ou de 5×10^4 UFC / poço. O mesmo procedimento foi realizado com a fração tratamento ($50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). A concentração da amostra do veneno utilizada para cada

fração foi de 0,1 µg/µl. Foram distribuídos em 3 poços os controles de crescimento das amostras bacterianas (sem tratamento) colocando-se 50 µl de caldo e 50 µl inóculo / poço.

Foram colocados nos poços de uma coluna da microplaca 100 µl cada de caldo (para controle de esterilidade dos meios). Em alguns poços foi adicionado a fração com meio de cultura para controle de esterilidade. Como controles positivos, foram empregados Gentamicina (8 µg. µl⁻¹) para bactérias e Anfotericina B (15 µg. µl⁻¹) para levedura. A placa foi vedada com *parafilm* nas bordas e incubada a 37°C durante 24 horas. A leitura foi realizada em absorbância a 595 nm no leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Isher Scientific, EUA).

O percentual de inibição de crescimento microbiano das frações foi calculado através da fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \frac{\text{Absorbância do microrganismo tratado} \times 100}{\text{Absorbância do microrganismo não tratado}}$$

3.3. Análise Proteômica

Em uma alíquota do pico fracionado por HPLC foi adicionado 5µl DTT (ditiotretitol 100mM) por 30 minutos a 60°C; após, foi adicionado 2.5µl de iodoacetamida (200mM) por mais 30 minutos em temperatura ambiente e protegido de luz. A amostra foi incubada por no mínimo 12 horas a temperatura ambiente com 10µl de tripsina ou quimiotripsina (40ng/µl em bicarbonato de amônia 100mM). A reação foi interrompida adicionando 50% ACN/ 5% TFA.

As amostras foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida-espectrometria de massas em um equipamento ESI-IT-TOF acoplado a um UFLC (20A Prominence, Shimadzu). Cada amostra foi injetada em uma coluna C18 (Kinetex C18, 5 µm; 50 × 2.1 mm) em um sistema de solventes binário: (A) água: DMSO: ácido (949:50:1) e (B) ACN: DMSO: água: ácido (850: 50: 99: 1). Foi utilizado um gradiente de eluição de 0-40% de solvente B por 35 minutos em um fluxo constante de 0.2ml/min. As amostras foram monitoradas por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA antes de serem injetadas no espectrômetro de massas.

A voltagem da interface foi de 4,5 kV; a voltagem capilar de 1,85 kV, a 200°C; e a fragmentação induzida por colisão de argônio, com 55% de "energia". Os espectros MS foram adquiridos em modo positivo, na faixa de massa de 350-1400 / carga (m/z). Os espectros de MS/MS foram coletados na faixa de 50 a 1950 m/z.

4. RESULTADOS

4.1. Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Fase Reversa (CLAE ou HPLC-RP)

A cromatografia líquida de fase reversa foi utilizada para visualizar o perfil dos compostos existentes, relacionando complexidade e polaridade, a fim de fornecer uma caracterização geral (Figura 16).

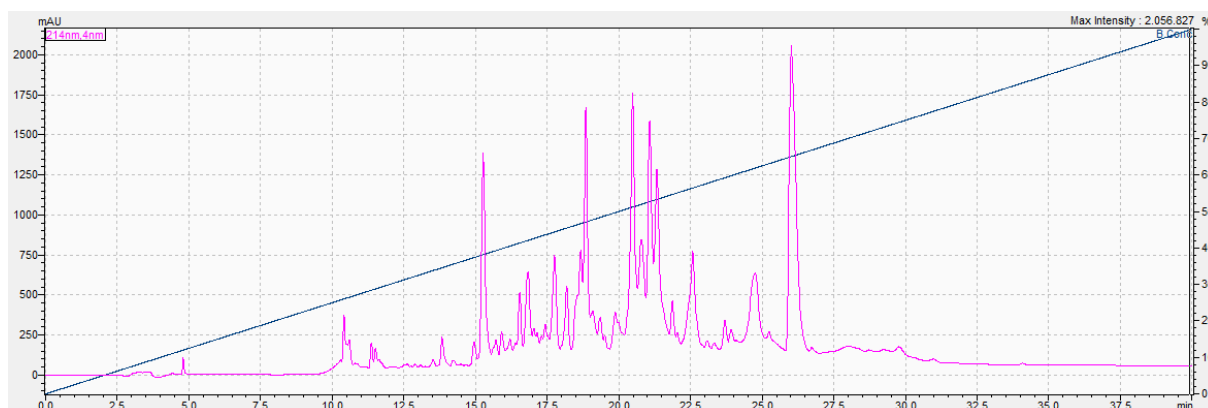


Figura 16. Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra do veneno de *Tityus obscurus*.

Foi utilizado um gradiente inicial de 0-100% de solvente B em 40 min (solvente A: H₂O/TFA 0.1% e solvente B: Acetonitrila + solvente A 10%). No caso do veneno de *T. obscurus*, existe uma distribuição homogênea de moléculas ao longo do gradiente, com frações que começaram a surgir em aproximadamente 2,6 minutos de corrida e finalizando em 37,5 minutos.

Foram realizadas 10 vezes o procedimento de separação cromatográfica a fim de se obter a quantidade de material biológico necessário para a realização dos testes biológicos. O fracionamento foi realizado por faixa de tempo de retenção, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Frações obtidas do cromatograma completo do veneno de *Tityus obscurus* com seus respectivos tempos de retenção inicial e final (em minutos), e a quantidade de frações.

Fração	Tempo de Retenção Inicial (Mín – Máx) em min.	Tempo de Retenção Final (Mín – Máx) em min.	Quantidade de Frações (Mín – Máx)
F1	2,6 (0,6 – 3,6)	14,9 (14,6 – 15,2)	27 (26 – 30)
F2	15,3 (15 – 15,4)	18,3 (17,8 – 18,6)	13 (10 – 15)
F3	18,6 (18,3 – 18,8)	19,9 (19,6 – 20,3)	6 (4 – 8)
F4	20,4 (19,9 – 20,6)	21,9 (21,8 – 22)	4 (4 – 5)
F5	22,1 (22 – 22,6)	25,2 (25 – 25,6)	8 (7 – 9)
F6	25,9 (25,8 – 26)	37,5 (36,9 – 38,2)	13 (11 – 17)

A coluna 'Quantidade de Frações' da Tabela 2 é derivada da análise individual dos cromatogramas, de acordo com as figuras ilustrativas do processo de fracionamento apresentadas a seguir (Figuras 17-22, que correspondem a detalhes ampliados do cromatograma da Figura 16, para fins de melhor visualização do critério de fracionamento) que também apresentam a numeração das frações cromatográficas de acordo com a ordem sequencial de eluição.

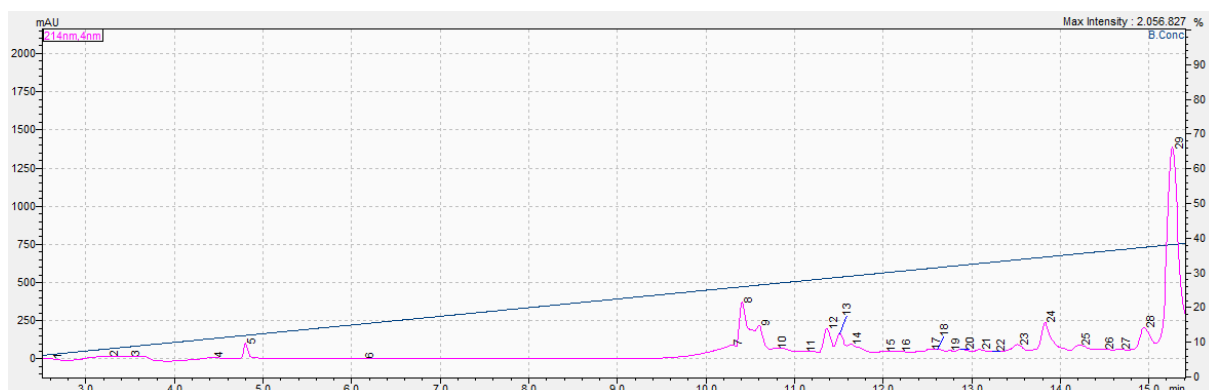


Figura 17. Perfil do cromatograma da Fração 1 (F1) do veneno de *T. obscurus*. Tempo de retenção inicial e final ($\approx 2,6 - 14,9$ min.) e quantidade de frações (≈ 27).

Na Figura 17 demonstra que no tempo coletado referente a F1, foi possível identificar 27 frações, entretanto 6 deles possuíram uma maior concentração relativa, estimada pela absorbância, em relação aos outros.

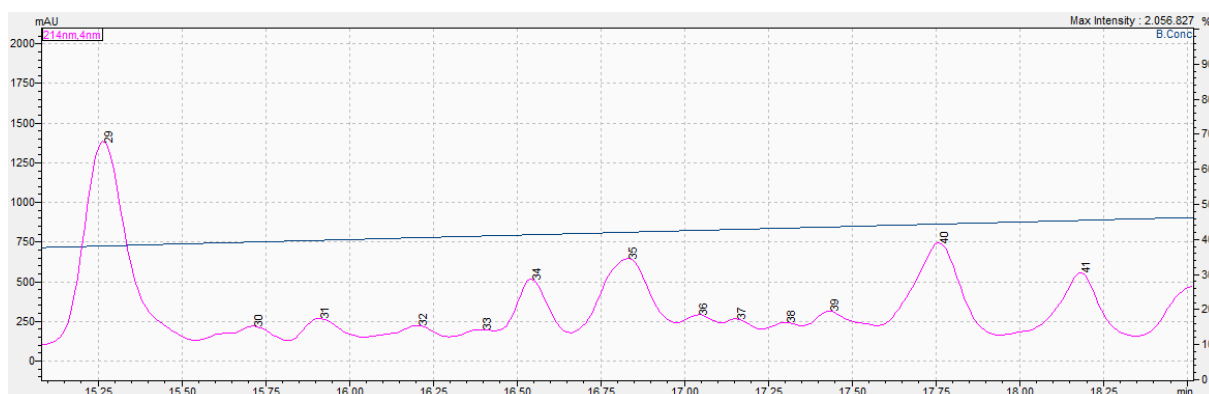


Figura 18. Perfil do cromatograma da Fração 2 (F2) do veneno de *T. obscurus*. Tempo de retenção inicial e final ($\approx 15,3 - 18,3$ min.) e quantidade de frações (≈ 13).

A Figura 18 demonstra que para F2, foi possível identificar 13 frações. Dessas, 5 possuíram maiores concentrações relativas.

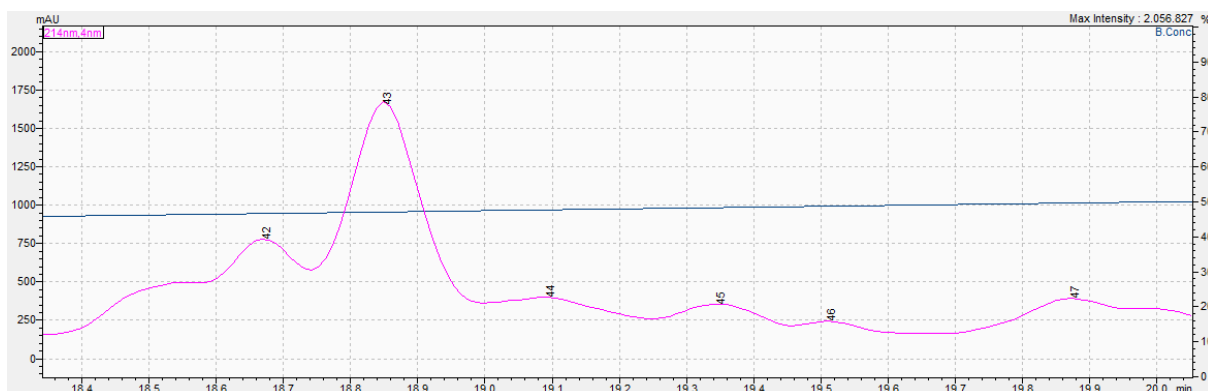


Figura 19. Perfil do cromatograma da Fração 3 (F3) do veneno de *T. obscurus*. Tempo de retenção inicial e final ($\approx 18,6 - 19,9$ min.) e quantidade de frações (≈ 6).

A Figura 19 demonstra que para a F3, é composta de 6 frações.

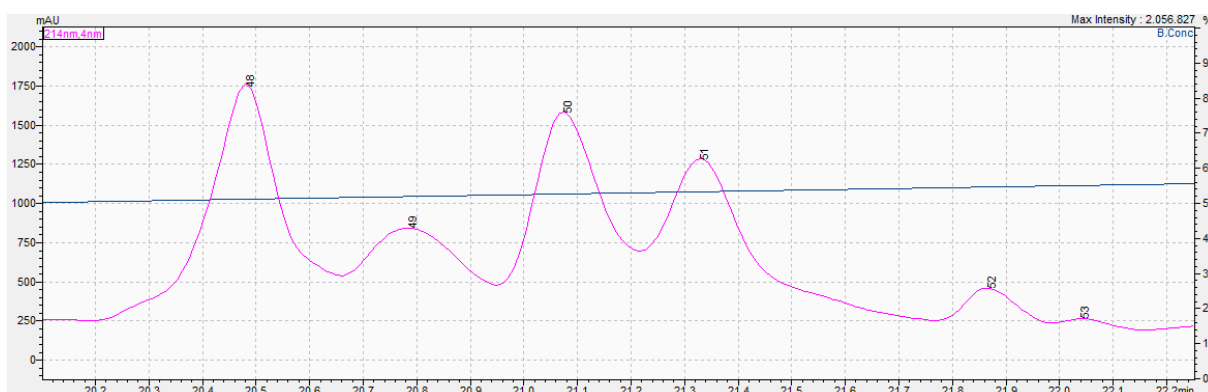


Figura 20. Perfil do cromatograma da Fração 4 (F4) do veneno de *T. obscurus*. Tempo de retenção inicial e final ($\approx 20,4 - 21,9$ min.) e quantidade de frações (≈ 6).

A Figura 20 ilustra que a F4, contém também 6 frações.

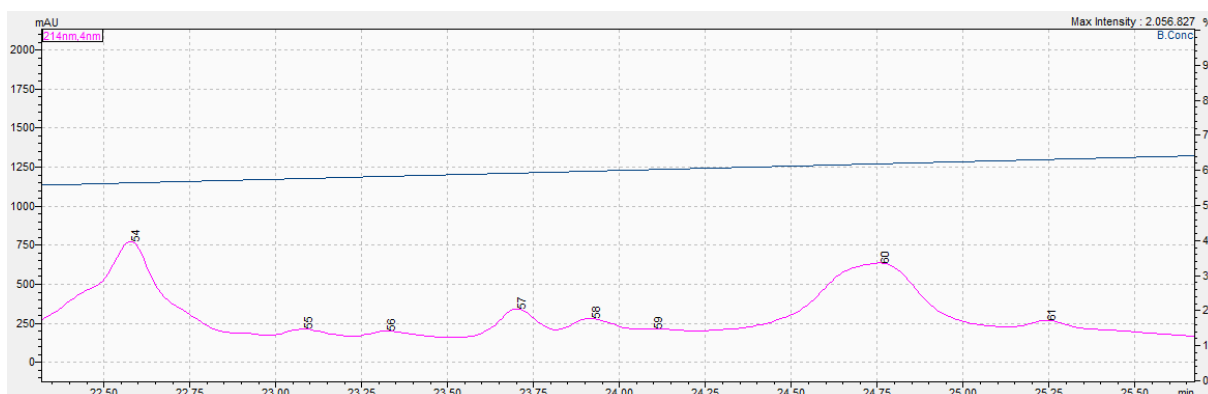


Figura 21. Perfil do cromatograma da Fração 5 (F5) do veneno de *T. obscurus*. Tempo de retenção inicial e final ($\approx 22,1 - 25,2$ min.) e quantidade de frações (≈ 8).

A Figura 21 ilustra a F5 que é composta por 8 frações.

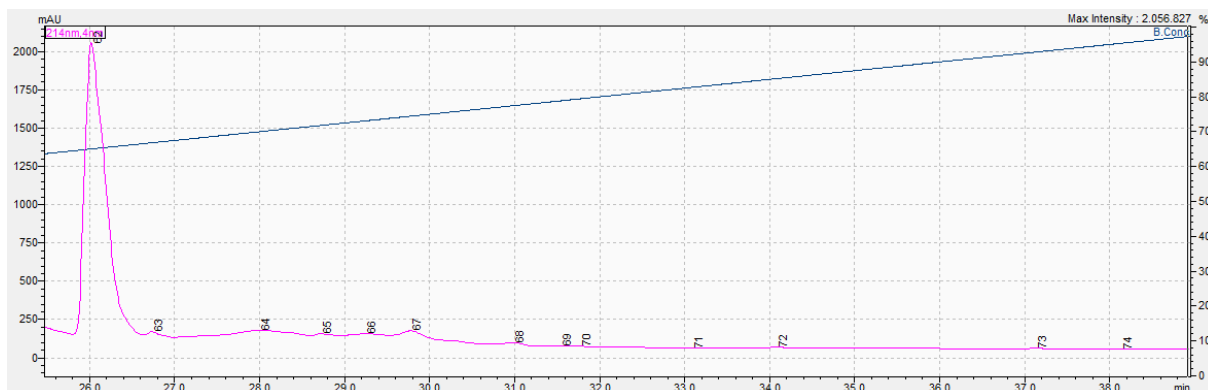


Figura 22. Perfil do cromatograma da Fração 6 (F6) do veneno de *T. obscurus*. Tempo de retenção inicial e final (≈25,9 – 37,5 min.) e quantidade de frações (≈13).

A Figura 22 descreve a F6 que é constituída de 13 frações.

4.2. Ensaio de Atividade Antimicrobiana

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado de acordo com o NCCLS (2003)¹⁴⁵. O resultado dado foi em percentual, demonstrando a inibição de crescimento microbiano visto nas frações testadas.

As seis frações foram testadas com os três microrganismos, sendo que apenas em *C. albicans* (F5 – 18,36% e F6 – 38,95%) e *S. aureus* (F5 – 16,52%) obteve os maiores percentuais de inibição (Tabela 3). Por outro lado, na maioria dos casos não houve inibição, havendo leve aumento da proliferação microbiana. Não houve valor significativo de inibição para *E. coli*.

Tabela 3. Percentual de inibição de crescimento microbiano nas frações testadas do veneno de *Tityus obscurus*.

Microrganismo	F1	F2	F3	F4	F5	F6
<i>S. aureus</i>						
ATCC 25923	-	-	-	-	↓ de 16,52%	-
<i>E. coli</i>						
ATCC 25922	↓ de 0,38%	-	-	-	-	↓ de 1,47%
<i>C. albicans</i>						
ATCC 10231	-	-	-	-	↓ de 18,36%	↓ de 38,95%

Os maiores valores de inibição ocorreram nas frações F5 e F6 e os resultados promissores deu-se para *C. albicans*. Desta forma, foi selecionada algumas frações presentes em ambas e testadas separadamente a fim de visualizar seu efeito

antifúngico individualmente. Aproveitamos dos resultados promissores para *C. albicans* e testamos essas mesmas frações para *C. tropicalis* (Figura 23).

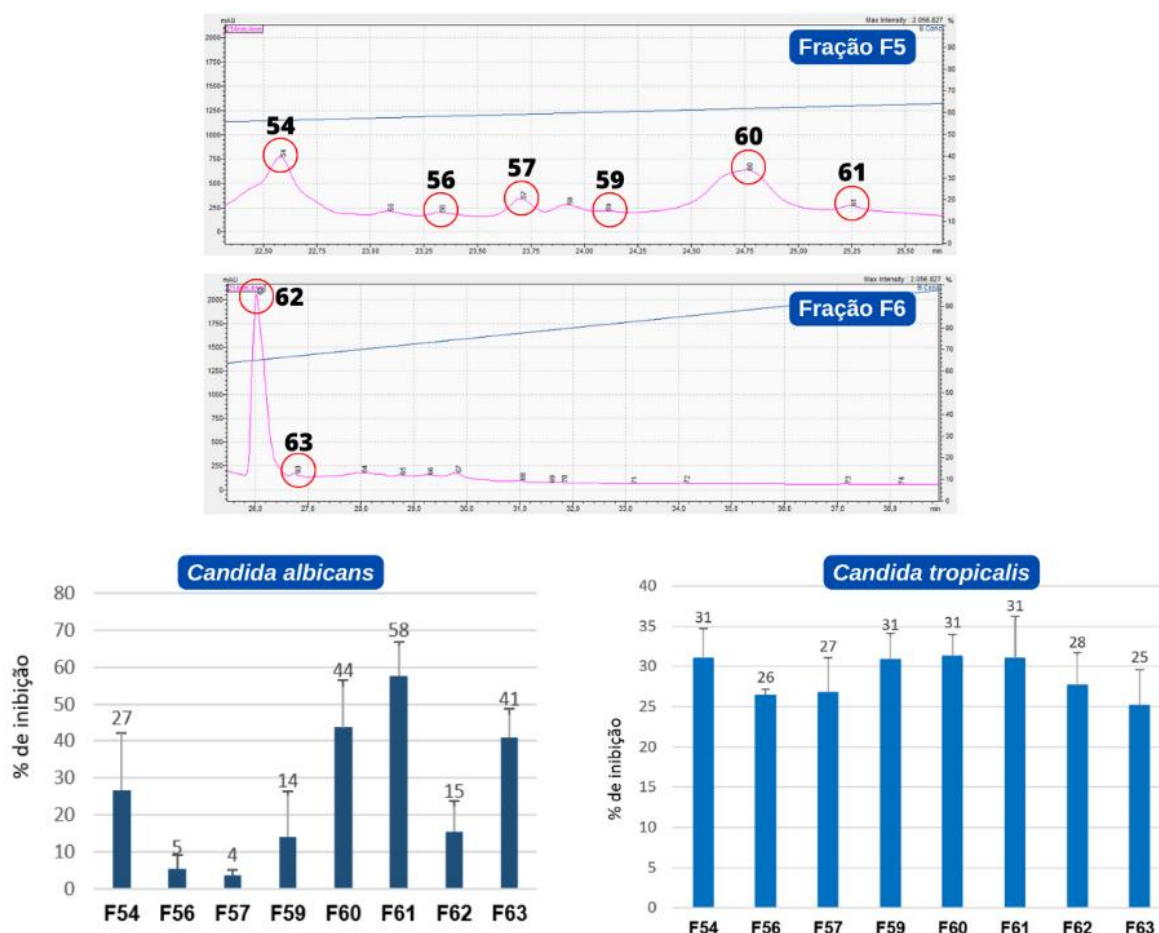


Figura 23. Frações escolhidas de F5 e F6 (em cima) e resultado da atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *C. tropicalis* nas frações testadas (embaixo).

Das frações testadas para *C. albicans*, a F61 (58%) demonstrou ter maior potencial para a inibição, assim como as frações F60 (44%) e F63 (41%). Já as frações F54, F56, F57, F59 e F62, individualmente, não trouxeram resultados significativos de inibição contra *C. albicans*.

Para *C. tropicalis*, com as frações testadas, a maior inibição foi vista nas frações F54, F59, F60 e F61 (31% em todas). Já as frações F56, F57, F62, F63 obtiveram inibição antifúngicas menores, mas ainda promissoras.

4.3. Análise proteômica

A análise da Fração 6, que foi a mais promissora em termos de atividade antimicrobiana, foi direcionada ao pico majoritário presente nesta (fração 62) e

comparado ao cromatograma completo do veneno de *T. obscurus*, esse pico foi o mais concentrado com característica apolar.

A análise proteômica da fração 62 não identificou diretamente nenhuma toxina de escorpião. Ao todo a lista das possíveis identificações contempla 259 proteínas (incluindo as identificações redundantes), contudo, as 26 primeiras foram identificadas sendo actina, metalopeptidase e fosfolipase A2 (Figura 24).

Protein Group	Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	PTM	Avg. Mass	Description
2	2	tr B4XC06 B4XC06_HAELO	113.47	14	5	5	Y	41693	Actin (Fragment) OS=Haemaphysalis longicornis OX=44386 GN=ACT PE=2 SV=1
2	1	tr Q5D579 Q5D579_IXORI	113.47	14	5	5	Y	41563	Actin (Fragment) OS=Ixodes ricinus OX=34613 PE=2 SV=1
2	3	tr G3MLM7 G3MLM7_AMBMU	113.47	14	5	5	Y	41794	Actin OS=Amblyomma maculatum OX=34609 PE=2 SV=1
2	4	tr D9IFL4 D9IFL4_RHIHE	113.47	14	5	5	Y	41824	Actin OS=Rhipicephalus haemaphysaloides OX=237073 PE=2 SV=1
2	5	tr T1KE54 T1KE54_TETUR	113.47	14	5	5	Y	41808	Actin OS=Tetranychus urticae OX=32264 GN=107362975 PE=3 SV=1
2	6	tr T1KE55 T1KE55_TETUR	113.47	14	5	5	Y	41854	Actin OS=Tetranychus urticae OX=32264 GN=107362974 PE=3 SV=1
2	7	tr C5HVZ5 C5HVZ5_9ARAC	113.47	14	5	5	Y	41810	Actin OS=Agelena silvatica OX=648239 PE=2 SV=1
2	8	tr Q3LQW2 Q3LQW2_ORNMO	113.47	14	5	5	Y	41838	Actin OS=Ornithodoros moubata OX=6938 PE=2 SV=1
2	9	tr Q6X4V4 Q6X4V4_RHIMP	113.47	14	5	5	Y	41824	Actin OS=Rhipicephalus microplus OX=6941 PE=2 SV=1
2	10	tr T1D1T4 T1D1T4_CUPSA	113.47	14	5	5	Y	41810	Putative actin OS=Cupiennius salei OX=6928 PE=2 SV=1
2	11	tr Q6QD58 Q6QD58_ORNMO	113.47	14	5	5	Y	41794	Actin OS=Ornithodoros moubata OX=6938 PE=2 SV=1
2	12	tr G3MK37 G3MK37_AMBMU	113.47	14	5	5	Y	41835	Actin OS=Amblyomma maculatum OX=34609 PE=2 SV=1
2	14	tr Q6X4W2 Q6X4W2_RHIAP	113.47	14	5	5	Y	41808	Actin OS=Rhipicephalus appendiculatus OX=34631 GN=Act1 PE=2 SV=1
2	15	tr L7M8J7 L7M8J7_RHIPC	113.47	14	5	5	Y	41824	Putative actin OS=Rhipicephalus pulchellus OX=72859 PE=2 SV=1
2	16	tr Q5CAR2 Q5CAR2_IXORI	113.47	14	5	5	Y	41824	Actin OS=Ixodes ricinus OX=34613 GN=act PE=2 SV=1
2	13	tr Q6X4W3 Q6X4W3_HAELO	113.47	14	5	5	Y	41825	Actin OS=Haemaphysalis longicornis OX=44386 GN=Act1 PE=2 SV=1
10	49	tr A0A1E1WVT4 A0A1E1WVT4_TITOB	78.39	10	4	4	Y	44074	Putative metalloproteinase OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1
10	50	tr A0A1E1WVX5 A0A1E1WVX5_TITOB	78.39	10	4	4	Y	44329	Putative metalloproteinase OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1
6	51	tr A0A1E1WVN7 A0A1E1WVN7_TITOB	70.11	4	3	3	N	45723	Putative metalloproteinase OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1
16	52	tr A0A1C9FMH2 A0A1C9FMH2_9ACAR	67.75	5	2	2	N	45012	Elongation factor 1-alpha (Fragment) OS=Proctophyllodes fuchsi OX=1611698 GN=Ef1alpha a100E PE=3 SV=1
1	169	tr A0A4V2H939 A0A4V2H939_9ARAC	66.13	6	4	4	Y	16605	Phospholipase A2 OS=Liphistius thaleban OX=1905330 PE=3 SV=1
1	170	tr A0A4Q8K5J6 A0A4Q8K5J6_9ARAC	66.13	6	4	4	Y	16245	Phospholipase A2 OS=Liphistius thaleban OX=1905330 PE=3 SV=1
1	171	tr A0A4Q8K5K0 A0A4Q8K5K0_9ARAC	66.13	6	4	4	Y	16011	Phospholipase A2 OS=Liphistius thaleban OX=1905330 PE=3 SV=1
22	84	tr A0A1E1WW02 A0A1E1WW02_TITOB	58.70	3	1	1	N	41037	Putative metalloproteinase (Fragment) OS=Tityus obscurus OX=1221240 PE=3 SV=1
8	177	tr A0A0X9P9U7 A0A0X9P9U7_9ACAR	54.13	10	3	3	Y	23515	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Fragment) OS=Hyalomma anatolicum OX=176092 GN=GAPDH PE=2 SV=1
8	179	tr A0A1Y3BLT5 A0A1Y3BLT5_EURMA	54.13	9	3	3	Y	28492	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2-like protein (Fragment) OS=Euroglyphus maynei OX=6958 GN=BLA29_009733 PE=3 SV=1

Figura 24. As 26 primeiras proteínas originadas da fração 62 (F6) do veneno bruto de *T. obscurus*.

Esta fração também contém uma neurotoxina, parcialmente semelhante a toxina To5 do próprio *T. obscurus*. Trata-se de uma β -toxina que se liga a canais de sódio, segundo a anotação disponível no UniProt (P84693 – Figura 23).

sp|P84693|SCX5_TITOB

| Protein Coverage | Supporting Peptides |

Protein Coverage:

1 MKAIFFIGC LMLIDLVAGS RSGYPVTQK CVYSCFWGSN WWCNAECTAL GGSSGYCAWP SCWCYSLPDN RNIWGSYPNN

81 CGKK

Supporting Peptides:

Peptide	Uniq	-10lgP	Mass	ppm	m/z	z	RT	Scan	#Spec	Start	End	PTM
R.SGYPVTQK.G	Y	24.79	878.4498	0.9	440.2326	2	10.79	2097	1	22	29	
total 1 peptides												

Figura 25. Identificação proteômica parcial de To5, presente na fração 62.

Com base na identificação proteômica, descrita acima, temos que a fração 62 (F6) é composto, majoritariamente por: actina (e/ou seus fragmentos), metalopeptidase, fosfolipase e uma β -toxina.

5. DISCUSSÃO

Os venenos escorpiônicos são interessantes fontes de moléculas biologicamente ativas. A diversidade peptídica observada representa um desafio metodológico, mas também um potencial para a inovação, visto que podem ser utilizadas como base para a produção de novos fármacos para tratamento de infecções e/ou doenças. Nos últimos anos, foi evidenciado que os venenos de escorpiões possuem um suprimento interessante de peptídeos antimicrobianos (AMPs)⁸⁷.

Os antibióticos são um pilar da saúde pública e desempenham um papel fundamental na melhoria da saúde e do bem-estar das pessoas em todo o mundo. No entanto, embora os antibióticos tenham sido bem-sucedidos na limitação de doenças infecciosas, seu uso aumentou exponencialmente, levando ao surgimento e disseminação da resistência aos antibióticos¹⁴⁰.

Dos resultados de inibição do crescimento antimicrobiano para as bactérias *S. aureus* (gram-positiva) e *E. coli* (gram-negativa), em sua maioria houve leve aumento do crescimento. Entretanto, houve indício de inibição para *S. aureus* na fração F5 (16,52%), porém este dado precisa ser mais bem avaliado a fim de se verificar se doses mais elevadas desta fração causa uma inibição maior.

Na literatura para *T. obscurus*, há descrita atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *Cryptococcus neoformans* (sorotipo A e D)¹³⁴. Além disso, Marques-Neto e colaboradores (2018)¹³⁶ estudaram o peptídeo ToAP2 para atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium massiliense* e esse mesmo peptídeo, juntamente com o NDBP-5.7, foi testado por Dias JN e colaboradores (2020)¹³⁵, apresentando atividade contra biofilmes planctônicos de *C. albicans*, aumentando a permeabilidade celular e gerando importantes alterações morfológicas em suas células. Os peptídeos antimicrobianos descobertos podem ser visualizados na Tabela 1 (pág. 28). No presente trabalho, utilizando a espécie fúngica *C. albicans*, a inibição visualizada das frações F5 (18,36%) e F6 (38,95%) corrobora com o resultado de inibição dos trabalhos anteriores.

As investigações realizadas por Guilhelmelli et al. (2016)¹³⁴, partiram de análises *in silico* de sequências peptídicas depositadas em banco de dados. No presente trabalho, a metodologia empregada no cromatógrafo HPLC-RP utilizando uma coluna C18 permitiu a descomplicação do veneno bruto total, obtendo 74 frações em seu total e permitiu o fracionamento de 6 frações desse veneno.

Das atividades antimicrobianas do presente estudo, a inibição mais significativa se deu em *C. albicans*, na fração F5 (18,36%) e F6 (38,95%). Para tanto, selecionamos algumas frações para teste de atividade antimicrobiana oriundas da F5 e F6 (F54, F56, F57, F59, F60, F61, F62, F63). Na F6 possui 13 frações e desses, apenas uma fração demonstrou ter maior concentração relativa e em comparação ao cromatograma completo do veneno de *T. obscurus*, essa foi a mais concentrada com característica apolar (fração número 62).

A análise individual da atividade antifúngica da fração 62 em *C. albicans*, resultou em uma inibição de 15%, enquanto as frações vizinhas F61 e F63, resultaram em 58% e 41% respectivamente. Por serem frações vizinhas, as atividades biológicas podem estar espalhadas, de forma que a fração que foi para o espectrômetro de massas pode ser levemente diferente da que foi submetida na atividade antimicrobiana. Já para *C. tropicalis*, a F62 obteve 28% de inibição, próximo ao valor máximo de inibição testado (31%). A partir da análise proteômica da fração 62, foi possível visualizar que neste contém actina, metalopeptidase, fosfolipase A2 e uma β -toxina.

A actina resultante provavelmente é debris celular, não havendo proteína completa, mas peptídeos que devem ter surgido como resultado fisiológico (decorrência de turnover), metabolismo celular, bem como o manuseio da amostra durante as fases de processamento do veneno. Quando submetido a clivagem proteolítica ou outras formas de fragmentação, o criptoma tem a capacidade de produzir peptídeos bioativos (criptídeos) e proteínas (cripteias). Adicionalmente, essas “novas” moléculas podem ter efeitos biológicos totalmente independentes ou propriedades relacionadas ou aprimoradas àquelas da molécula “original”¹⁵⁵. Existe uma ampla gama de atividades biológicas, como, funções hormonais, defesa do hospedeiro, controle da pressão arterial, neuroproteção, regulação de enzimas proteolíticas, analgésica e mais, que foram associadas aos criptídeos¹⁵⁶. Ambos os autores não encontraram na literatura peptídeos antibióticos derivados da actina, entretanto, não há impedimento que ocorra para *Tityus* sp.; para isso, são necessárias mais provas experimentais, incluindo isolamento completo destas moléculas e novo ensaio antimicrobiano, ou mesmo a síntese de análogos para demonstração do efeito biológico.

Numerosos venenos de animais demonstraram conter metaloproteínases, que são enzimas proteolíticas cuja atividade depende de íons bivalentes, muitas vezes um

Zn²⁺ no centro catalítico⁸¹. Essa classe de enzimas desempenha papéis importantes na remodelação do tecido conjuntivo, como, crescimento e desenvolvimento embrionário, angiogênese, cicatrização de feridas e processos reprodutivos^{157,158}. No entanto, as metaloproteinases derivadas de venenos são extensamente estudadas devido as suas atividades hemorrágicas e fibrinolíticas^{159,160}. As análises realizadas por de Oliveira UC et al. (2018)⁸¹ detectaram que, as metaloproteinases representaram 43,22% do total de componentes do veneno de *T. obscurus* e pode estar associada aos danos pulmonares acometida pelo envenenamento por *T. obscurus*¹²⁷. Em estudo realizado por Samy e colaboradores (2008)¹⁶¹, com veneno da víbora siberiana (*Agkistrodon halys*), as metaloproteinases exibiram propriedades antibacterianas contra *S. aureus*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis* e *Burkholderia pseudomallei*. Esses achados implicam que essas metaloproteínas inibe alvos mecanossensíveis e modifica o empacotamento da membrana para exercer sua atividade antibacteriana. Para este estudo, as metalopeptidases presentes podem ter contribuído, juntamente com outros compostos, para a inibição antimicrobiana.

As fosfolipases A2 são encontradas em muitos animais peçonhentos, como serpentes, abelhas e escorpiões, auxiliando-os na digestão de presas e na toxicidade do veneno¹⁶². Essas enzimas catalisam a hidrólise da posição sn-2 dos glicerofosfolipídeos da membrana, produzindo ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos¹⁶³. Constituem uma família considerável de enzimas que possui baixa massa molecular (14-18kDa), 5 a 8 pontes dissulfeto, uma díade His/Asp com uma histidina conservada e uma necessidade de cálcio para a atividade catalítica¹⁶⁴. Elas demonstram uma variedade de atividades biológicas em venenos animais, incluindo atividade antiangiogênica, antitumoral, cardiotoxico, miotóxico, neurotóxicos, inflamatório, hemolítica, anticoagulante e antimicrobianas^{162,165}. A atividade antimicrobiana para fosfolipase A2 em veneno escorpiônico precisa ser melhor investigada, mas observando seu efeito em outros venenos animais, há um forte indício que essa enzima possa ser responsável pela atividade antimicrobiana vistas em *S. aureus*, *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Além dos componentes anteriores, foi possível detectar nessa fração uma β -toxina de massa teórica de 9 kDa. Esta neurotoxina modifica a ativação dos canais de íons sódio voltagem dependentes, tornando o potencial mais eletronegativo permitindo o aumento da tendência da célula em responder espontânea e repetidamente, independente do potencial de membrana. As β -toxinas demonstraram

provocar respostas musculares espásticas⁵⁷. Adicionalmente a essa ação provocada no envenenamento, tem-se um exemplo de neurotoxina com atividade antimicrobiana. Seis peptídeos que atuam nos canais de sódio encontradas no veneno do escorpião *T. discrepans*, denominados de bactridinas, foram testadas contra bactérias gram positivas e gram negativas, havendo inibição do crescimento de todas as bactérias estudadas (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* e *Acinetobacter calcoaceticus*)¹⁶⁶. Da mesma forma que as anteriores, esta neurotoxina pode estar envolvida na atividade antimicrobiana vista neste estudo.

O veneno escorpiônico possui peptídeos que são classificados em dois grupos principais: os DBPs (peptídeos com ponte dissulfeto) e os NDBPs (peptídeos sem ponte dissulfeto). Apesar do dano que essas toxinas causam às células, tecidos e organismos ser seu efeito mais conhecido, elas também têm demonstrado atividades que podem ser úteis para o mercado farmacêutico, como peptídeos antibióticos, antimaláricos, anticancerígenas, com ação imunossupressora, anticonvulsivantes, inseticidas e medicamentos que controlam a arritmia, reduzem a dor e diminuem a pressão cardíaca^{47,49}.

Mesmo que as investigações das atividades biológicas têm se concentrado em peptídeos sem ponte dissulfeto (NDBPs), os DBPs podem ser de grande potencial para elucidar a riqueza de peptídeos multifuncionais de interesse biotecnológico.

De acordo com o seu funcionamento, os antibióticos podem ser divididos em duas categorias: bacteriostático, que promove a inibição do crescimento bacteriano e mantém as colônias bacterianas em sua fase estacionária, e bactericida, que erradica a população bacteriana ao interferir em funções celulares cruciais para a integridade da célula e resulta em morte celular. A capacidade de ação de cada antibiótico requer uma concentração particular¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Assim ocorre também com os fungistáticos e fungicidas. No presente trabalho exploramos a sua atividade bacteriostática e fungistática.

A literatura afirma que o antibiótico ideal deve ter um alvo seletivo, espectro de ação limitado, baixo nível de citotoxicidade, boa distribuição no local da infecção, efeito bactericida rápido (quando for o caso), poucos efeitos colaterais, múltiplas vias de administração, não interfira no sistema imunológico do hospedeiro ou levar à resistência e uma relação custo/benefício baixa¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

Mesmo com as descobertas antimicrobianas discutidas nessa sessão por outros grupos, este estudo foca na prospecção desses peptídeos AMPs, ferramenta que é pouco explorada nas pesquisas com venenos de escorpiões. Com a introdução de técnicas peptidômicas, principalmente espectrometria de massas, a prospecção de compostos biologicamente ativos avançou para um novo patamar. A sensibilidade e a resolução do equipamento agilizaram o procedimento de aquisição da sequência peptídica. Foi possível caracterizar esses compostos (isolamento e identificação) utilizando ferramentas de bioinformática.

6. CONCLUSÃO

Este estudo foi capaz de visualizar os compostos existentes do veneno bruto do escorpião *T. obscurus* em HPLC-RP.

A atividade antimicrobiana realizada foi capaz de detectar inibição do crescimento antimicrobiano para a bactéria *S. aureus* e os fungos *C. albicans* e *C. tropicalis*.

As frações F5 e F6 possuem potencial biotecnológico, de acordo com os dados aqui apresentados. E suas frações isoladas demonstrou porcentagens satisfatórias de inibição, principalmente as frações F61 com 58% (*C. albicans*) e F54, F59, F60, F61 com 31% em todas (*C. tropicalis*) para inibição antifúngica.

Foram identificados os compostos que podem estar envolvidos na atividade antimicrobiana: a actina, fosfolipase A2, metalopeptidase e uma beta-toxina, contudo devem ser realizadas mais testes para confirmação.

Devido a evolução da prospecção dos efeitos biológicos, teremos conhecimento do potencial dos peptídeos com atividade antimicrobiana presentes no veneno. Este conhecimento pode – em função do desenvolvimento das moléculas identificadas – auxiliar tratamentos adjuntos e/ou alternativos para doenças negligenciadas e para a saúde em geral.

7. ETAPAS FUTURAS

- Realizar análise proteômica para todas as frações cromatográficas;
- Refinamento da caracterização das frações com atividade antimicrobiana;
- Confirmar a presença de metalopeptidase e da fosfolipase A2 na fração ativa, através de ensaio enzimático específico para cada classe de enzima.

8. REFERÊNCIAS†

1. Rein JO. The Scorpion Files [Internet]. 2022 [citado 01 Nov 2022]. Disponível em: <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>.
2. Martins JG, Santos GC, Procópio REL, Arantes EC, Bordon KCF. Scorpions species of medical importance in the Brazilian Amazon: a review to identify knowledge gaps [Internet]. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2021 Sep 20;27 [citado 12 Jul 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/WtDht5cWKpVJ8FYrpJ9N4Wc/?format=pdf&lang=en>. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0012.
3. Lourenço WR. Scorpion incidents, misidentification cases and possible implications for the final interpretation of results [Internet]. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2016 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/ZmSz5bmtcvtdDG4Fsd7fLK/?lang=en>. doi: 10.1186/s40409-016-0075-6.
4. Chippaux JP, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal [Internet]. Acta Trop. 2008;107:71-9 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08001678?casa_token=8xTz-wyV4WsAAAAA:KlisUb5q7w14C5XnyFJze0-M25ct9jrh3qGXmUKYyHC-1jkfMIHsNELBs-B80lbTBffrcdpF8A. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.05.021.
5. Brazil TK, Porto TJ. Os escorpiões [Internet]. Salvador: EDUFBA; 2010. 84p. [citado 5 Jul 2022]. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/5109/1/Escorpioes-web.pdf>.
6. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2022 [citado 16 Nov 2022]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>.
7. Lourenço W. Scorpions from Brazilian Amazonia, with a description of two new species from 'Serra da Mocidade' National Park in the State of Roraima (Scorpiones: Buthidae, Chactidae) Arachnida. 2017;12:2-17.
8. Lourenço WR. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones) [Internet]. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2018;24(1) [citado 12 Abr 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/ZFWYcHJ7k7j8W7vzKRRBqLB/?format=pdf&lang=e>. doi: 10.1186/s40409-017-0138-3.
9. Wanless FR. On the occurrence of the scorpion *Euscorpius flavicaudis* (DeGeer) at Sheerness Port, Isle of Sheppey, Kent. Bull Br Arachnol Soc. 1977;74-6.
10. Lourenço WR, Eickstedt VR. Escorpiões de Importância Médica. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad V. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier; 2009. p198-213.
11. Barraviera B. Acidentes por animais peçonhentos. Botucatu: CEVAP – UNESP; 2007. 112p.
12. Lourenço WR. Reproduction in scorpions, with special reference to parthenogenesis [Internet]. In: Toft S, Scharff N. (Org.). European Arachnology 2000. Aarhus: Aarhus University Press. 2002;71-85 [citado 1 Jul 2022]. Disponível em: https://www.european-arachnology.org/esa/wp-content/uploads/2015/08/071-085_Lourenco.pdf.
13. Benton TG. Reproductive biology. In: Brownell P, Polis GA. (Org.). Scorpion biology and research. New York: Oxford University Press. 2001;278-301.
14. Lourenço WR. Parthenogenesis in scorpions: some history - new data [Internet]. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2008;14(1):19-44 [citado 1 Jul 2022]. Disponível em:

† As normas utilizadas para a redação desta dissertação foram as seguintes:

Normas Vancouver. Disponível em:

<https://www.btu.unesp.br/Home/sobre/biblioteca/assessoriaemtrabalhosepublicacoes/elaboracao-de-referencias-estilo-vancouver---2018.pdf>.

Normas para elaboração da dissertação. Disponível em:

<https://www.fmb.unesp.br/Home/ensino/Pos-Graduacao/mestradoacademicoedoutorado/orientacoes-gerais-.pdf>

- https://www.researchgate.net/publication/236013685_Parthenogenesis_in_scorpions_Some_history_-_New_data. doi: 10.1590/S1678-91992008000100003.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de controle de escorpiões [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. 72p. [citado 10 Jun 2022]. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_controle_escorpiones.pdf.
 16. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox). Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e faixa etária [Internet]. Rio de Janeiro: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas; 2013. 2588p. [citado 8 Out 2021]. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>.
 17. Brasil. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde [Internet]. Mar. 2019;50(11):14p. [citado 11 Jun 2022]. Disponível em: https://repositorio.observatoriodocuidado.org/bitstream/handle/handle/1993/BoletimEpidemiologico_v.50_Mar_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
 18. Brazil V. Contribuição ao estudo do envenenamento pela picada do escorpião e seu tratamento. Revista Médica de São Paulo, São Paulo; 1907;10(19):385-90.
 19. Maurano HR. Do escorpionismo [tese]. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro; 1915.
 20. Magalhães O. Contribuição para o conhecimento de picadas de escorpiões no Brasil. Anais da Faculdade Universidade de Minas Gerais; 1929;1:69-111.
 21. Magalhães O. O escorpionismo. Rio de Janeiro. (Monografias do Instituto Oswaldo Cruz. IV. Memória). 1945.
 22. Bücherl W. Escorpionismo no Brasil. Memórias do Instituto Butantan; 1969;34:9-24.
 23. Brasil. Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Notificações por Tipo de Acidente segundo Ano acidente. Período: 2021.
 24. Wen FH, Santalucia M. Vigilância dos Acidentes por Animais Peçonhentos. Apostila do Programa de Vigilância dos Acidentes por Animais Peçonhentos da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. 2005.
 25. Pucca MB, Cerni FA, Junior ELP, Bordon KCF, Amorim FG, Cordeiro FA, et al. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail [Internet]. Toxicon. 2015;108:272-84 [citado 1 Ago 2022] Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115301185?casa_token=wlHaQehXhogAAAAA:X529RjxrDkXTxFUbwpcBRLa0Oxqu_wyKi561ei9kxQ4LVk0-W89Oi4ucZvFQd0TXO7IFIHeNVA. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.10.015.
 26. Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad V. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 2ª edição. São Paulo: Sarvier; 2009.
 27. Meijden AVD, Coelho P, Rasko M. Variability in venom volume, flow rate and duration in defensive stings of five scorpion species [Internet]. Toxicon. 2015;100:60-6 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115001087?casa_token=4F2ZScaMWo0AAAAA:OFEIHdpNsL9UEva-KsEX9G6YG68ziurm6bckdE6tjDeDosmSfOwFQ0vv2RYSS_S8EixiQNBLvA. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.04.011.
 28. Oliveira FN, Mortari MR, Carneiro FP, Guerrero-Vargas JA, Santos DM, Pimenta AM, Schwartz EF. Another record of significant regional variation in toxicity of *Tityus serrulatus* venom in Brazil: a step towards understanding the possible role of sodium channel modulators [Internet]. Toxicon. 2013;73:33-46 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113002419?via%3Dihub>. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.06.021
 29. Brasil. Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Notificações por Tipo de Acidente segundo Classificação da gravidade. Período: 2021.

30. Guia de Vigilância Epidemiológica. Capítulo 5.1: Acidentes por animais peçonhentos [Internet]. Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasil; 2004 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf.
31. Ythier E. A synopsis of the Scorpion fauna of French Guiana, with description of four new species [Internet]. ZooKeys. 2018;764:27-90.
32. Pezzotti G, Kobara M, Nakaya T, Imamura H, Miyamoto N, Adachi T et al. Raman Spectroscopy of Oral Candida Species: Molecular-Scale Analyses, Chemometrics, and Barcode Identification. Int. Jour. Of Molec. Sciences. 2022;23(10).
33. Sunagar K, Undheim EA, Chan AH, Koludarov I, Muñoz-Gómez AS, Antunes A, et al. Evolution stings: the origin and diversification of scorpion toxin peptide scaffolds [Internet]. Toxins. 2013;5(12):2456-87 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873696/>. doi: 10.3390/toxins5122456.
34. Marcussi S, Arantes EC, Soares MA. Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas. São Paulo: FUNPEC-Editora; 2011.
35. Estrada-Gómez S, Vargas-Muñoz LJ, Saldarriaga-Córdoba MM, van der Meijden A. MS/MS analysis of for scorpion venoms from Colombia: a descriptive approach. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2021;27. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0173.
36. Zahid MT, Tahir M. Nature and applications of scorpion venom: an overview [Internet]. Toxins Reviews. December 2018;39(3) [citado 4 Ago 2022]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/329811057_Nature_and_applications_of_scorpion_venom_an_overview. doi: 10.1080/15569543.2018.1530681.
37. Gwee MC, Nirthan S, Khoo HE, Gopalakrishnakone P, Kini RM, Cheah LS. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2002;29:795-801. doi: 10.1046/j.1440-1681.2002.03726.x.
38. Possani LD, Martin BM, Mocha-Morales J, Svendsen I. Purification and Chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz And Mello [Internet]. Calrsberg Res Commun.1984;46:195-205 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02906497.pdf>.
39. Vasconcelos F, Lanchote VL, Bendhack LM, Giglio JR, Sampaio SV, Arantes EC. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines [Internet]. Comp Biochem Physiol C. 2005;141(1):85-92 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045605001262?casa_token=QWpt9F8um4kAAAAA:cwdq7OmGZ61m-DN53CaSCqkjD-5ppVYubZQvXSSqmWMNtW1-62-qA8jX0JEa_vREJ5qSM7htQ. doi: 10.1016/j.cca.2005.05.012.
40. Cologna CT, Marcussi S, Giglio JR, Soares AM, Arantes EC. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. Protein Pept Lett. 2009;16(8):920-32. doi: 10.2174/092986609788923329.
41. Dias NB. Estudo peptídico e determinação do perfil de metabólitos de veneno de escorpiões da família Buthidae: *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*. Rio Claro. 2016;199p.
42. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development [Internet]. Toxicon. 2015;93:125-35 [citado 4 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7130864/>. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.11.233.
43. Rodriguez RC, Schwartz EF, Possani LD. Mining on scorpion venom biodiversity [Internet]. Toxicon. 2010;56(7):1155-61 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109005285?casa_token=mloBpS4jJooAAAAA:NvcJAYQN3nWcwRToxGmhZwgNua3eFPzdhi6_IXuY7gjRNxMtbAW8cXr_sh6cLOBSCAGIO9ecHg. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.010.

44. Escoubas P, Quinton L, Nocholson GM. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2008;43(3):279-95 [citado 4 Ago 2022]. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jms.1389>. doi: 10.1002/jms.1389.
45. de La Veja RCR, Corzo G, Possani LD. Scorpion venoms as a platform for drug development. In: King GF. *Venom to Drugs: Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics*. Ed: Royal Society of Chemistry. 2015; 204:20.
46. Chen R, Chung SH. Computational studies of venom peptides targeting potassium channels. *Toxins.* 2015;7(12):5194–211.
47. Luo F, Zeng XC, Harin R, Cao ZJ, Liu H, Li WX. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into evolutionary mechanism. *Peptides.* 2005;26(12):2427-33. doi: 10.1016/j.peptides.2005.06.008.
48. Pimenta AM, Stocklin R, Favreau P, Bougis PE, Martin Euaclaire MF. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun Mass Sp.* 2001;15:1562-72. doi: 10.1002/rcm.415.
49. Zeng XC, Corzo G, Harin R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. *IUBMB Life.* 2005;57(1):13-21. doi: 10.1080/15216540500058899.
50. Sandoval MRL, Lebrum I. TSII toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopathological studies. *Brain Res Bull.* 2003;62:165-72. doi: 10.1016/j.brainresbull.2003.09.006.
51. Pessini AC, Souza AM, Faccioli LH, Gregório ZMO, Arantes EC. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *Int Immunopharmacol.* 2003;3:765-74. doi: 10.1016/S1567-5769(03)00078-X.
52. Zlotkin E. Chemistry and pharmacology of buthinae scorpion venoms. In: Bettini, S. (Ed.). *Arthropod Venoms*. Berlin: Springer-Verlag; 1978. 317-69.
53. Catterall WA. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annual Rev Pharmacol Toxicol.* 1980;20:15-43.
54. Rochat H, Bernard P, Couraud F. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: Ceccarelli, B.; Clementi, F. (Eds.) *Advances in cytopharmacology*. New York: Raven Press. 1979;3:325-334.
55. de la Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and Evolution [Internet]. *Toxicon*; 2005;15(46):831-44 [citado 1 Ago 2022] Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105003429?casa_token=TxWk38KZRhUAAAAA:dI-p_K5YHzjDN0THCZBxzghfQcGzXDsf0_WXJ85c7RrdVBNra7nPOJhAjOOup8Sy2Oh7QZe-2w. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.09.006.
56. Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alphatoxins [Internet]. *Toxicon.* 2007;49:142-58 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010106003473?casa_token=meM9e1UzMxMAAAAA:HkDgZVCHdDu4GFaWN7--CLbuLmbKh_zZfe4WtlxyryoBAXokfUBGm8qucumh3IAc_az1Ox7jLQ. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.09.023.
57. Chippaux JP. Emerging options for the management of scorpion stings [Internet]. *Drug Des Devel Ther.* 2012;6:165-73 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=13180>. doi: 10.2147/DDDT.S24754.
58. Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature.* 1982;296(5852):90-91.
59. Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature.* 1985;313:316-18.

60. Camargos TS, Restano-Cassulini R, Possani LD, Peigneur S, Tytgat J, Schwartz CA, et al. The new kappa-KTx 2 5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum* [Internet]. *Peptides*. 2011;32(7):1509-17 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978111002099>. doi: 10.1016/j.peptides.2011.05.017.
61. Cologna CT, Peigneur S, Rosa JC, Selistre-de-Araujo HS, Varanda WA, Tytgat J, et al. Purification and characterization of Ts15 the first member of a new -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 2011;58(1):54-61.
62. Mao X, Cao Z, Yin S, Ma Y, Wu Y, Li W. Cloning and characterization of BmK86, a novel K⁺-channel blocker from scorpion venom [Internet]. *Biochem. Biophys Res Commun*. 2007;360:728-34 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X07013356?casa_token=L79b8ZPVeTkAAAAA:VC_28zit8VQaLAjots42D8LHfU4Wd0Q1cT1Zjk9XXzndxARWxgdexWu2YAfsUgwGVYN8LEE2w. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.108.
63. Nirthanan S, Pil J, Abdel-Mottaleb Y, Sugahara Y, Gopalakrishnakone P, Joseph JS, et al. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom [Internet]. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(4):669-78. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295204007294?casa_token=dGj4FAippbEAAAAA:HYvhmTKR6QuqBhjrFNJCKcoNKxW-eG6Hf5a9n22kQHPj3Ojf1eSjytdqCIRg7GnPyllamx8M5w. doi: 10.1016/j.bcp.2004.10.018.
64. Srinivasan KN, Sivaraja V, Huys I, Sasaki T, Cheng B, Kumar, et al. Kappa-hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity [Internet]. *J Biol Chem*. 2002; 277(33):30040-47 [citado 1 Ago 2022] Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)75672-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)75672-X/fulltext). doi: 10.1074/jbc.M111258200.
65. Chagot B, Pimentel C, Dai L, Pil J, Tytgat J, Nakajima T, et al. An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis* [Internet]. *Biochem J*. 2005;388:263-71 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1186715/>. PMID: 15631621.
66. Debin JA, Maggio JE, Strichartz GR. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol*. 1993;264:C361-9. doi: 10.1152/ajpcell.1993.264.2.C361.
67. Fuller MD, Thompson CH, Zhang ZR, Freeman CS, Schay E, Szakács G, et al. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin [Internet]. *J Biol Chem*. 2007;282:37545-55 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)77709-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)77709-4/fulltext). doi: 10.1074/jbc.M708079200.
68. Ali SA, Alam M, Abbasi A, Undheim EA, Fry BG, Kalbacher H, et al. Structure-activity relationship of chlorotoxin-like peptides [Internet]. *Toxins*. 2016;8(2):1-18 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/2/36/htm>. doi: 10.3390/toxins8020036.
69. Soroceanu L, Gillespie Y, Khazaeli MB, Sontheimer H. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Res*. 1998;58(21):4871-9. PMID: 9809993.
70. Mamelak NA, Rosenfeld S, Bucholz R, Raubitschek A, Nabors LB, Fiveash JB, et al. Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma [Internet]. *J Clin Oncol*. 2006;24(22):3644-50 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.05.4569?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%20%200pubmed. doi: 10.1200/JCO.2005.05.4569.
71. Hockaday DC, Shen S, Fiveash J, Raubitschek A, Colcher D, Liu A, et al. Imaging glioma extent with 131I-TM-601 [Internet]. *J Nucl Med*. 2005;46(4):580-6 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/7927790_Imaging_glioma_extent_with_131I-TM-601.
72. Valdivia HH, Kirby MS, Lederer WJ, Coronado R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):12185-9. PMID: 1334561.

73. Valdivia HH, Possani LD. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. *TCM*. 1998;8(3):111-8. doi: 10.1016/S1050-1738(97)00138-2.
74. Mosbah A, Kharrat R, Fajloun Z, Renisio JG, Blanc E, Sabatier J, et al. A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins*. 2000;40:436-42. doi: 10.1002/1097-0134(20000815)40:3<436::aid-prot90>3.0.co;2-9.
75. Olamendi-Portugal T, Somodi S, Fernandez JA, Zamudio FZ, Becerril B, Varga Z, et al. Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells [Internet]. *Toxicon*. 2005; 46:418-29 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010105001960?casa_token=E19FID-qipgAAAAA:Aj_9hRMCUd18nID7FvdIK61TKln3PVJDRxuqb05X36ZtLRcV5twaOobLmbSD_sQNHNFJtngJ1Q. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.06.001.
76. Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin Eauclaire MF, Van Der Walt JJ, et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20:444-7. doi: 10.1016/S0165-6147(99)01398-X.
77. Fajloun Z, Ferrat G, Carlier E, Fathallah M, Lecomte C, Sandoz G, et al. Synthesis, 1H NMR structure, and activity of a threedisulfide-bridged maurotoxin analog designed to restore the consensus motif of scorpion toxins [Internet]. *J Biol Chem*. 2000;275(18):13605-12 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)80728-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)80728-7/fulltext). doi: 10.1074/jbc.275.18.13605.
78. Almaaytah A.; Albalas Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review [Internet]. *Peptides*. 2014;51:35-45 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978113003537?casa_token=drgQ73iDYW4AAAAA:cfwu24lnX4OzWn90NBAAA_VOWJQDaBL3cRq6hij0km4-rQtobE4gfQ5sKvJWZN9_m8X1QePklw. doi: 10.1016/j.peptides.2013.10.021.
79. Ferreira LA, Alves EW, Henriques OB. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. 1993;31:941-7. doi: 10.1016/0041-0101(93)90253-F.
80. Moerman L, Bosteels S, Noppe W, Willems J, Clynen E, Schoofs L, et al. Antibacterial and antifungal properties of alpha-helical, cationic peptides in the venom of Scorpions from Southern Africa [Internet]. *Eur J Biochem Biophys Res Commun*. 2003;31:90-7 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1033.2002.03177.x?sid=nlm%3Apubmed>.
81. de Oliveira UC, Nishiyama MY, dos Santos MBV, Santos-da-Silva AP, Chalkidis HM, Souza-Imberg A, et al. Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions [Internet]. *Plos one*. 2018 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0193739#pone.0193739.ref084>. doi: 10.1371/journal.pone.0193739.
82. Dai C, Ma Y, Zhao Z, Zhao R, Wang Q, Wu Y, et al. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychnis mucronatus* [Internet]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3967-72 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2573117/>. PMID: 18779362.
83. Zen XC, Wang SX, Zhu Y, Zhu SY, Li WX. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsh [Internet]. *Peptides*. 2004;25:143-50 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978103004108?casa_token=sWBQhmfW00kAAAAA:N2WgZd9Zb_G8VB3tsTEZDpeKemb18d7U8fLPR0AHFPEQdvO0nee77dd6ek64mR1hyclN6cF7PQ. doi: 10.1016/j.peptides.2003.12.003.
84. Rodrigues de la Veja RC, Schwartz EF, Possani LD. Mining on scorpion venom biodiversity [Internet]. *Toxicon*. 2010;53:115-61 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109005285?casa_token=MCdo5dHZvOoAAAAA:HnZUGFgaluS8s-9TN_jWXsSkJihkr40rSo-loShj1lx04DgUwogkOiDODjY6lo_-Q2B6rO28w. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.010.

85. Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24:536-47. PMID: 9809993.
86. Jenssen H, Hamill P, Hancock RE. Peptide antimicrobial agentes [Internet]. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:491-511 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00056-05>. doi: 10.1128/CMR.00056-05.
87. Hernández-Aponte C, Silva-Sanchez J, Quintero-Hernández V, Rodríguez-Romero A, Balderas C, Possani LD, et al. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus* [Internet]. *Toxicon*. 2011;57(1):84-92 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010110003752?casa_token=T5ZqZEC0MEEAAAAA:IoN_oe7f5CENvKi6CKG5bLuz31t1GvFt0YXanAFypAH_AslxVt-CXesnkShULZaYakU8ENpmQ. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.10.008.
88. Harrison PL, Abdel-Rahman MA, Miller K, Strong PN. Antimicrobial peptides from scorpion venoms [Internet]. *Toxicon*. 2014;88:115-137 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010114001688?via%3Dihub>. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.06.006.
89. Liu G, Yang F, Li F, Li Z, Lang Y, Shen B, et al. Therapeutic Potential of a Scorpion Venom-Dreived Antimicrobial Peptide and Its Homolgs Against Antibiotic-Resistan Gram-Positive Bacteria [Internet]. *Front Microbiol*. 2018;9:1159 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987058/>. doi: 10.3389/fmicb.2018.01159.
90. Torres-Larios A, Gurrola GB, Zamudio FZ, Possani LD. Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus* [Internet]. *Eur J Biochem*. 2000;267:5023-31 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x?sid=nlm%3Apubmed>. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01556.x.
91. Conde R, Zamudio FZ, Rodriguez MH, Possani LD. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom [Internet]. *FEBS Lett*. 2000;471:165-8 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2800%2901384-3?sid=nlm%3Apubmed>. doi:10.1016/S0014-5793(00)01384-3.
92. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, et al. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator* [Internet]. *Biochem J*. 2001;359(1):35-45 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222119/pdf/11563967.pdf>. doi: 10.1042/bj3590035.
93. Dai L, Yasuda A, Naoki H, Corzo G, Andriantsiferana M, Nakajima T. IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem. Biophys Res Commun*. 2001;286(4):820-825. doi: 10.1006/bbrc.2001.5472.
94. Dai L, Corzo G., Naoki H, Andriantsiferana M, Nakajima T. Purification, structure-function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;293(5):1514–22. doi:10.1016/S0006-291X(02)00423-0.
95. Zhao Z, Ma Y, Dai C, Zhao R, Li S, Wu Y, et al. Imcroporin, a new cationic antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus* [Internet]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3472-77. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715652/>. doi: 10.1128/AAC.01436-08.
96. Gao B, Sherman P, Luo L, Bowie J, Zhu S. Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides [Internet]. *FASEB J*. 2009;23(4):1230-45 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.08-122317>. doi: 10.1096/fj.08-122317.
97. Miyashita M, Sakai A, Matsushita N, Hanai Y, Nakagawa Y, Miyagawa H. A novel amphipathic linear peptide with both insect toxicity and antimicrobial activity from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus* [Internet]. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(2):364-9 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/74/2/74_90723/_pdf/-char/en. doi: 10.1271/bbb.90723.

98. Yuan W, Cao L, Ma Y, Mao P, Wang W, Zhao R, et al. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus* [Internet]. Peptides. 2010;31(1):22-6 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978109004598?casa_token=7iTVdpE_ATwAAAAA:ZcfnfZ3ZuyvoCPvEXDpnxrMy2Eu-qnl_E3fuTUylMBSn_iea7PGE5ojj2_OgJRcOXU6SqUsXSg. doi: 10.1016/j.peptides.2009.10.008.
99. Cao L, Li Z, Zhang R, Wu Y, Li W, Cao Z. StCT2, a new antibacterial peptide characterized from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus* [Internet]. Peptides. 2012;36(2):213-20 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978112001921?casa_token=B8uZ9rt5hAIAAAAA:3Qc8KX41P4YALfBYn7msHLVB7w8masQ9qNiiA6jqe1E7WP7poTbUrNK-M-xaLKl6YKWodxorGQ. doi: 10.1016/j.peptides.2012.04.010.
100. Fan Z, Cao L, He Y, Hu J, Di Z, Wu Y, et al. Ctriporin, a new anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptide from the venom of the scorpion *Chaerilus tricostatus* [Internet]. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(11):5220-29 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3195061/>. doi: 10.1128/AAC.00369-11
101. Nie Y, Zeng XC, Yang Y, Luo F, Luo X, Wu S, et al. A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion *Heterometrus spinifer* [Internet]. Peptides. 2012;38(2):389-94 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019697811200397X?casa_token=hcT1tVMz5iYAAAAA:lwoX58gAU0jYQs3MQIRgAxTAtqjUCmHbKlxdjjsQpKQ8vkiolGD0ZYnbZGjKiL31BpG2KTzgHw. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.012.
102. Ramirez-Carreto S, Quintero-Hernandez V, Jimenez-Vargas JM, Corzo G, Possani LD, Becerril B, et al. Gene cloning and functional characterization of four novel antimicrobial-like peptides from scorpions of the family Vaejovidae [Internet]. Peptides. 2012;34(2):290-5 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978112000629?casa_token=rQox4EJnw7sAAAAA:XfLgqK8pyjFym0wVvDCFjPxGTAoQP_psU7ugZlAWxKpjcBqjmb-sSy9lXkZr23nXDm46OdEEkA. doi: 10.1016/j.peptides.2012.02.002.
103. Luna-Ramirez K, Quintero-Hernandez V, Vargas-Jaimes L, Batista CV, Winkel KD, Possani LD. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenko*: molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity [Internet]. Toxicon. 2013;63: 44-54 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112008124?casa_token=uJAj8dNf09gAAAAA:5UJ5SZDTAnV-ydG2V19k7LlcunxgO9lnKOgbTmdxmftb_5yHMS69c36j440SHOmvgNKGaHVA. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.11.017.
104. Guo X, Ma C, Du Q, Wei R, Wang L, Zhou M, et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities [Internet]. Biochimie. 2013; 95(9):1784-94 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300908413001648?via%3Dihub>. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.003.
105. Hernandez-Aponte CA, Silva-Sanchez J, Quintero-Hernandez V, Rodriguez-Romero A, Balderas C, Possani LD, et al. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus* [Internet]. Toxicon. 2011;57(1):84-92 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010110003752?casa_token=wCp4G0bNXr0AAAAA:N_ou7AHfsOW4pdx_UGORjeLt2cNVwQBWF-ncdYA_wpapvPNvXO5s5ILVlg9tnwKb8jz4eyP3JQ. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.10.008.
106. de Melo ET, Estrela AB, Santos EC, Machado PR, Farias KJ, Torres TM, et al. Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: stigmurin [Internet]. Peptides. 2015;68:3-10 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978115000613>. doi: 10.1016/j.peptides.2015.03.003
107. Harrison PL, Abdel-Rahman MA, Strong PN, Tawfik MM, Miller K. Characterisation of three alpha-helical antimicrobial peptides from the venom of *Scorpio maurus palmatus* [Internet]. Toxicon. 2016;117:30-6 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010116300538?casa_token=NAQKd1HJfi0AAAAA:iJ

UwqLbLJaY1ySB2bjpOMgy7DbGSlo5stfwoAzbub0kp5GI1EPwGQZeQICmhSmR-CCaRMt0T4Q. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.03.014.

108. Cao L, Dai C, Li Z, Fan Z, Song Y, Wu Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative in vitro and in vivo [Internet]. PLoS One. 2012; 7(7):e40135 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3390344/>. doi: 10.1371/journal.pone.0040135.
109. Zeng XC, Wang SX, Zhu Y, Zhu SY, Li WX. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch [Internet]. Peptides. 2004; 25(2):143-50 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978103004108?casa_token=zMzbMGNokkcAAAA:KLXCqwtYr1jaPQEWHT4CxLJHkSkz_BPtsMc-BfedEzYQWhw9gw0VWVEvyPMZTAnEY_d9cm7Jw. doi: 10.1016/j.peptides.2003.12.003.
110. Zeng XC, Wang S, Nie Y, Zhang L, Luo X. Characterization of BmKbpp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides [Internet]. Peptides. 2012;33(1):44-51 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978111004840?casa_token=Gz6D9-RhVD0AAAA:c0Jd99_g3Ms7R0W0v6JRmnMbOnTjEh68TCCThyaAZLwf1yUFXhEQBM5sdPafnJOZCg-TB64ViQ. doi: 10.1016/j.peptides.2011.11.012.
111. Liu G, Yang F, Li F, Li Z, Lang Y, Shen B, et al. Therapeutic Potential of a Scorpion Venom-Derived Antimicrobial Peptide and Its Homologs Against Antibiotic-Resistant Gram-Positive Bacteria [Internet]. From Microbiol. 2018;9:1159 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987058/>. doi: 10.3389/fmicb.2018.01159.
112. Almaaytah A, Zhou M, Wang L, Chen T, Walker B, Shaw C. Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog [Internet]. Peptides. 2012;35(2):291–9 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978112001519?casa_token=DBAbh8e6CVIAAAAA:j9-G5o4UUVeMC7d5sBbXetaOXGXRM8tDry3GhshaxPtL5OTli5rnMqam2iyDI9aITyru7u4FfWA. doi: 10.1016/j.peptides.2012.03.016.
113. Garcia F, Villegas E, Espino-Solis GP, Rodriguez A, Paniagua-Solis JF, SandovalLopez G, et al. Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics [Internet]. J Antibiot (Tokyo). 2013;66:3-10 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ja201287>.
114. Zeng XC, Zhou L, Shi W, Luo X, Zhang L, Nie Y, et al. Three new antimicrobial peptides from the scorpion *Pandinus imperator* [Internet]. Peptides. 2013;45:28-34 [citado 1 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978113001198?casa_token=vW1caKUFC90AAAA:H9BtmRT3vAIGaE7KpYzaUNxf8DEXAYDymT6Z8SdgW-Zp6OalhmoZPc3ZxaadU-70hmN2VZ0s5g. doi: 10.1016/j.peptides.2013.03.026.
115. Pardo PPO, Ishikawa EAY, Vieira JLF, Coelho JS, Dorea RCC, Abati PAM, et al. Clinical aspects of envenomation caused by *Tityus obscurus* (Gervais, 1843) in two distinct regions of Pará state, Brazilian Amazon basin: a prospective case series [Internet]. J Venom Animal Toxins incl Tropical Dis. 2014;20(1):3 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/F7vkvb46pcTv5JTZycvQFht/?lang=en>. doi: 10.1186/1678-9199-20-3.
116. Pardo PPO, Castro LC, Jennings E, Pardo JSO, Monteiro MRCC. Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil [Internet]. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(3):349-53 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/Zcq9j8vf89QTSds94w8n8Rz/?format=pdf&lang=pt>.
117. Torrez PPQ, Quiroga MMM, Abati PAM, Mascheretti M, Costa WS, Campos LP, et al. Acute cerebellar dysfunction with neuromuscular manifestations after scorpionism presumably caused by *Tityus obscurus* in Santarém, Pará/ Brazil. Toxicon. 2014;96(1):68-73. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.12.012.

118. Iserson KV, Ramcharram SDJ. Black Scorpion (*Tityus obscurus*) Fatalities in Guyana and a Literature Review. *International Emergency Medicine*. 2019;57(4):554-9. doi: 10.1016/j.jemermed.2019.07.018.
119. Borges A, Rojas-Runjaic FJ, Diez N, Faks JG, den Camp HJ, de Sousa L. Envenomation by the scorpion *Tityus breweri* in the Guayana Shield, Venezuela: report of a case, efficacy and reactivity of antivenom, and proposal for a toxinological partitioning of the Venezuelan scorpion fauna [Internet]. *Wilderness Environ Med*. 2010; 21(4):282-90 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: [https://www.wemjournal.org/article/S1080-6032\(10\)00206-1/fulltext](https://www.wemjournal.org/article/S1080-6032(10)00206-1/fulltext). doi: 10.1016/j.wem.2010.06.008.
120. Ismail M. The treatment of the scorpion envenoming syndrome: the Saudi experience with serotherapy. *Toxicon*. 1994; 32(9):1019-26. doi: 10.1016/0041-0101(94)90384-0.
121. Nencioni ALA, Neto EB, Freitas LA, Dorce VAC. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system [Internet]. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2018;24 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvatitd/a/j3xFRs78jbh7rQ43NNg4bfK/?lang=en#:~:text=The%20main%20effects%20caused%20by,from%20the%20autonomic%20nervous%20system>. doi: 10.1186/s40409-018-0139-x.
122. Batista CVF, Gómez-Lagunas F, Lucas S, Possani LD. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺-channels [Internet]. *FEBS Lett*. 2000;486(2):117-20 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2800%2902253-5?sid=nlm%3Apubmed>. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02253-5.
123. Batista CVF, Gómez-Lagunas F, Rodríguez de la Vega RC, Hajdu P, Panyi G, Gáspár R, et al. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁺-channels with distinctly different affinities [Internet]. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1601(2):123-31 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570963902004582?casa_token=Xeq5gTLKw4UAAAAA:KHgpGcHWxEdQrEL3b7PYLNA09SJcgz9KgHUePyB_cbt-51NKdRfKA7mRzPMFBXR93Qz1BETeA. doi: 10.1016/S1570-9639(02)00458-2.
124. Batista CVF, Zamudio FZ, Lucas S, Fox JW, Frau A, Prestipino G, Possani LD. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺-channels. *Toxicon*. 2002 May;40(5):557-62.
125. Batista CVF, del Pozo L, Zamudio FZ, Contreras S, Becerril B, Wanke E, Possani LD. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004 Apr 15;803(1):55-66.
126. Murgia AR, Batista CVF, Prestipino G, Possani LD. Amino acid sequence and function of a new alpha-toxin from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei*. *Toxicon*. 2004 May;43(6):737-40.
127. Duque HM, Farias Mourao CB, Tibery DV, Barbosa EA, Campos LA, Schwartz EF. To4, the first *Tityus obscurus* beta-toxin fully electrophysiologically characterized on human sodium channel isoforms. *Peptides*. 2017 Sep;95:106-15.
128. Tibery DV, Campos LA, Farias Mourao CB, Peigneur S, Cruz e Carvalho A, Tytgat J, Schwartz EF. Electrophysiological characterization of *Tityus obscurus* beta toxin 1 (To1) on Na⁺-channel isoforms. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2019 Jan;1861(1):142-50.
129. de Paula Santos-da-Silva A, Candido DM, Nencioni AL, Kimura LF, Prezotto-Neto JP, et al. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. *Toxicon*. 2017;126: 51–58. PMID:28012802.
130. Dias NB, Souza BM, Cocchi FK, Chalkidis HM, Dorce VAC, Palma MS. Profiling the short, linear, non-disulfide bond-containing peptidome from the venom of the scorpion *Tityus obscurus* [Internet]. *Journal of Proteomics*. 2018;170:70-9 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391917303214?casa_token=qYHkAJPYmHgAAAAA:bfQmopDjw7OghQdNIQy0PzV1ngdmHEJdMlznY_wTIQC4pZ3IjL0v8Pd08hz5re2MQE2VG9mNg. doi: 10.1016/j.jprot.2017.09.006.
131. Guerrero-Vargas JA, Mourão CBF, Quintero-Hernández V, Possani LD, Schwartz EF. Identification and phylogenetic analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* novel putative Na⁺-channel scorpion toxins

- [Internet]. PLoS Um. 2012; 7(2):e30478 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3280238/>. doi: 10.1371/journal.pone.0030478.
132. Stehling EG, Sforca ML, Zanchin NIT, Oyama S, Jr., Pignatelli A, Belluzzi O, Polverini E, Corsini R, Spisni A, Pertinhez TA. Looking over toxin-K⁺ channel interactions. Clues from the structural and functional characterization of alphaKTx toxin Tc32, a Kv1.3 channel blocker. *Biochemistry*. 2012;51(9):1885-94.
 133. Mourão CBF. New class of serinopeptidase inhibitor present in *Tityus obscurus* scorpion venom [thesis]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2016.
 134. Guilhelmelli F, Vilela N, Smidt KS, de Oliveira MA, Morales Alvares AdC, Rigonato MCL, et al. Activity of scorpion venom-derived antifungal peptides against planktonic cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* biofilms. *Front Microbiol*. 2016 Nov 18;7:1844.
 135. Dias JN, de Souza Silva C, de Araujo AR, Souza JMT, de Holanda Veloso Júnior PH, Cabral WF, et al. Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells [Internet]. *Sci Rep*. 2020;10(1):10327 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/342445019_Mechanisms_of_action_of_antimicrobial_peptides_ToAP2_and_NDBP-57_against_Candida_albicans_planktonic_and_biofilm_cells. doi: 10.1038/s41598-020-67041-2.
 136. Marques-Neto LM, Trentini MM, das Neves RC, Resende DP, Procopio VO, da Costa AC, et al. Antimicrobial and Chemotactic Activity of Scorpion-Derived Peptide, ToAP2, against *Mycobacterium massiliensis*. *Toxins*. 2018;10(6):219. doi: 10.3390/toxins10060219.
 137. Duque HM, Farias Mourao CB, Tibery DV, Barbosa EA, Campos LA, Schwartz EF. To4, the first *Tityus obscurus* beta-toxin fully electrophysiologically characterized on human sodium channel isoforms. *Peptides*. 2017 Sep;95:106-15.
 138. da Mata ECG, Ombredane A, Joanitti GA, Kanzaki LIB, Schwartz EF. Antiretroviral and cytotoxic activities of *Tityus obscurus* synthetic peptide. *Arch Pharm*. 2020;353(11):e2000151.
 139. Who. Strategic priorities on Antimicrobial Resistance [Internet]. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240041387>.
 140. Sekyere JO, Asante J. Emerging mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria and fungi: advances in the era of genomics. *Future Microbiol*. 2018; 22p.
 141. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [Internet]. *Lancet*. 2022;399:629-55 [citado 23 Nov 2022]. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext#seccestitle200](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext#seccestitle200).
 142. Cassettari VC, Strabelli T, Medeiros EAS. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? *Braz J Infect Dis*. 2005;9(1). doi: 10.1590/S1413-86702005000100012.
 143. dos Santos AL, Santos DO, de Freitas C, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar [Internet]. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(6):413-23 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/gHvPXyhgbzWt69YKxGqPFHk/>. doi: 10.1590/S1676-24442007000600005.
 144. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli* [Internet]. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2:123-40 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro818>.
 145. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad E. coli”. *J Lab Clin Med*. 2002;139(3):155-62. doi: 10.1067/mlc.2002.121550.153.
 146. Touchon M, Hoede H, Tenaillon O, et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths [Internet]. *PLoS Genet*. 2009 [citado 10 Ago 2022]. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000344>. doi: 10.1371/journal.pgen.1000344.]
 147. Santos NQA. Resistência Bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Enfermagem*. 2004;13:64-70.

148. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses [Internet]. Nat Med. 2004;10:122-29 [citado 10 Ago 2022]. Disponível: <https://www.nature.com/articles/nm1145>.
149. 1He X, Li S, Kaminskyj SG. Using *Aspergillus nidulans* to identify antifungal drug resistance mutations. Eukaryot. Cell. 2014;13(2):288–94.
150. Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. Fungal Genet. Biol. 2010; 47(2):117-26.
151. Kumar S, Valera MF. Molecular Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education, Formatex. 2013; 522-34.
152. Menezes EA, Mendes LG, Cunha FA. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2009; 42(3).
153. Pezzotti G, Kobara M, Nakaya T, Imamura H, Miyamoto N, Adachi T et al. Raman Spectroscopy of Oral Candida Species: Molecular-Scale Analyses, Chemometrics, and Barcode Identification. Int. Jour. Of Molec. Sciences. 2022;23(10).
154. NCCLS (2003). Disponível em: https://bvsm.sau.de.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo4.pdf.
155. Pimenta DC, Lebrun I. Cryptides: Buried secrets in proteins. Peptides. 2007; 28(12):2403-10.
156. Pizzo E, Cafaro V, Donato AD, Notomista E. Cryptic Antimicrobial Peptides: Identification methods and Current Knowledge of their Immunomodulatory Properties. Current Pharmaceutical Design. 2018; 24:1054-66.
157. Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Quesada CGV, López-Otín C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTS, a Family of metalloproteinases with desintegrin and thrombospondin-1 domains. Gene. 2002; 282:49-62.
158. Rizzo R, Trentini A, Bortolotti D, Manfrinato MC, Rotola A, Catellazzi M et al. Matriz metalloproteinase-2 (MMP-2) generates soluble HLA-G1 by cell surface proteolytic shedding. Mol. Cell Biochem. 2013; 381:243-55.
159. Azofeifa-Cordero G, Arce-Estrada V, Flores-Díaz M, Alape-Girón A. Immunization with cDNA of a novel P-III type metalloproteinase from the rattlesnake *Crotalus durissus durissus* elicits antibodies which neutralize 69% of the hemorrhage induced by the whole venom. Toxicon. 2008; 52:302-8.
160. Patiño AC, Pereañez JA, Nuñez V, Benjumea DM, Fernandez M, Rucavado A et al. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. Toxicon. 2010; 56(6):963-43.
161. Samy RP, Gopalakrishnakone P, Chow VTK, Ho B. Viper metalloproteinase (*Agkistrodon halys* Pallas) with antimicrobial activity Against multi-drug resistant human pathogens. Journ. Cell. Physiology. 2008; 216(1):54-68.
162. Krayem N, Gargouri Y. Scorpion venom phospholipases A2: A minireview. 2020;48-54.
163. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 2002; Vol 68-69:3-58.
164. Six DA, Dennis EA. The expandinh superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids. 2000;1488:1-19.
165. Soltan-Alinejad P, Alipour H, Meharabani D, Azizi K. Therapeutic potencial of bee and scorpion venom phospholipase A2 (PLA2): a narrative review. Iranian Journ. Of Med. Sciences. 47(4):300-13.
166. Díaz P, D'Suze G, Salazar V, Sevcik C, Shannon JD, Sherman NE et al. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. Toxicon. 2009; 54(6):802-17.

167. Gonçalves RM, Frihling BEF, Migliolo L. Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas: uma visão biotecnológica. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.
168. Baptista MGFM. Mecanismo de Resistência aos Antibióticos [Dissertação de Mestrado]. Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. 2013.
169. Pankey G, Sabath L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections. Oxford Journals. 2013;38: 864-5.
170. Katzung, B. Farmacologia Básica e Clínica. 10ª ed. Brasil: McGraw Hill. 2007.
171. Costa ALP, Silva-Junior ACS. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. Estação Científica (UNIFAP): Macapá. 2017;7(2):45-57.