UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

ESTUDO PEPTÍDICO E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS DE VENENOS DE ESCORPIÕES DA FAMÍLIA BUTHIDAE: *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*

Nathalia Baptista Dias

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular).

Março - 2016

NATHALIA BAPTISTA DIAS

ESTUDO PEPTÍDICO E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS DE VENENOS DE ESCORPIÕES DA FAMÍLIA BUTHIDAE: *Tityus serrulatus, Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO SERGIO PALMA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (área de concentração Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
2016

595.44 Dias, Nathalia Baptista
D541e Estudo peptídico e determinação do perfil de metabólitos de escorpiões da família Buthidae : Tityus serrulatus, Tityus bahiensis e Tityus obscurus / Nathalia Baptista Dias. - Rio Claro, 2016
197 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Mario Sergio Palma

1. Aracnídeo. 2. Peptidômica. 3. Veneno. 4. Toxina. 5. LCMS. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO PEPTÍDICO E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS DE VENENOS DE ESCORPIÕES DA FAMÍLIA BUTHIDAE: *Tityus serrulatus, Tityus bahiensis e Tityus obscurus*

AUTORA: NATHALIA BAPTISTA DIAS
ORIENTADOR: MARIO SERGIO PALMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARIO SERGIO PALMA
CEIS / IB Rio Claro

Prof. Dr. LUIZ ALBERTO BERALDO DE MORAES
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / USP

Prof. Dr. IVO LEBRUN
Instituto Butantan , Secretaria da Saúde, Laboratório de Bioquímica e Biofísica - São Paulo

Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA
Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara da UNESP / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. OSVALDO AUGUSTO BRAZIL ESTEVES SANT'ANNA
Laboratório de Imunoquímica / Instituto Butantan

Rio Claro, 29 de março de 2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Mario Sergio Palma pela dedicada orientação, confiança e esforço que foram fundamentais para a realização deste trabalho e para minha formação profissional e pessoal. Agradeço pelo trabalho que pude realizar, e mais que tudo pela amizade construída durante todos os anos de convivência.

Aos professores e funcionários do Centro de Estudo de Insetos Sociais (CEIS) e da UNESP de Rio Claro pela amizade e ajuda para realização deste trabalho e à todos os colegas de trabalho do LBEZ.

Ao programa CAPES "Toxinologia comparativa dos escorpiões de interesse médico do Brasil" pelo apoio finenceiro e à todos os professores integrantes do programa pela grande ajuda na confecção desta tese e aprendizado.

À todos os membros da banca pelas sugestões, correções e prontidão em aceitar o convite.

Aos amigos Paulo, Fernando, Marcela e Kenny, pela imensa ajuda na realização de todo o trabalho e acima de tudo pela amizade e Bibi, pelo companheirismo diário e imensa ajuda na confecção desse trabalho, além de todos os anos de amizade.

À todos os meus amigos de Rio Claro pela ajuda nos momentos difíceis e por fazerem minha vida mais completa.

Aos meus pais Maria Aparecida e Ronaldo pelo apoio, sempre presentes nas horas mais difíceis e nas mais felizes.

À toda a minha família, principalmente aos meus tios, minha amada vó Francisca e primos que sempre estão ao meu redor fazendo com que eu me sinta apoiada e amada.

À minha querida irmã Camila, pelo companheirismo, amor, respeito e por todos os momentos que passamos juntas em todos esses anos. E a minha gatinha companheira de todas as horas...Any.

À Deus por me dar forças para realizar meus sonhos e coragem para vencer os obstáculos.

"Strong is the one who believes"

RESUMO

Numerosos estudos produzidos nos últimos 30 anos, vêm elucidando estruturas e atividades biológicas de vários componentes de venenos animais, demonstrando suas complexas composições. Os venenos de escorpiões são misturas complexas de compostos biologicamente ativos, tais como: compostos de baixa massa molar, peptídeos e proteínas, sendo estas últimas as mais amplamente estudadas. Até então, pouco se conhece sobre os pequenos peptídeos e metabolitos dos venenos de escorpiões, sendo necessárias pesquisas para ampliar esse conhecimento. Este estudo visou a obtenção de um perfil peptídico detalhado dos venenos das espécies *T. serrulatus*, *T. bahienis* e *T. obscurus*, com foco principal nos pequenos peptídeos lineares, antes negligenciados em venenos de escorpiões. A extração em acetonitrila 50 % (v/v) foi uma das diferenças estratégicas para esse objetivo, e a separação e sequenciamento destes peptídeos foram realizados utilizando-se um sistema LC-ESI-IT-TOF. Os componentes peptídicos dos venenos dos escorpiões estudados estão distribuídos na faixa de massa molar de 400-4000 Da, sendo possível detectar a presença de 521 peptídeos distintos no veneno de *T. serrulatus*, 460 peptídeos no veneno de *T. bahiensis* e 517 peptídeos no veneno de *T. obscurus*. Também foi possível estabelecer os perfis peptídicos dos venenos das três espécies estudadas, assim como obter a sequencia de 66 peptídeos, dos quais alguns apresentaram semelhanças com toxinas já conhecidas de escorpiões. Treze dos novos peptídeos detectados, contendo entre 6 e 19 aminoácidos, foram sintetizados e caracterizados com relação às suas atividades biológicas em ensaios de antibiose, hemólise, desgranulação de mastócitos, LDH, ensaio de campo aberto, dor e inflamação em mamíferos, demonstrando algumas atividades principalmente com relação à hemólise, dor e locomoção de mamíferos. Este trabalho também elucidou o perfil de metabólitos nestes venenos em um sistema LCMS-Q-TOF-MS de maneira qualitativa e quantitativa. Para essa finalidade, foi realizada a padronização das condições cromatográficas com utilização de cromatografia de pareamento iônico para a melhor separação e identificação de compostos tais como aminas biogênicas, poliaminas, aminoácidos, derivados de nucleosídeos, etc., detectados nos venenos. A complexidade química demonstrada no presente trabalho corrobora com o fato de que as moléculas pequenas, tanto peptídeos quanto metabólitos, deverão agir em sinergismo com as grandes toxinas nos venenos, potencializando seus efeitos em vítimas de ferroadas por esses animais.

Palavras-chave: Peptidômica. Veneno. Toxinas. Escorpiões. LCMS.

ABSTRACT

Numerous studies produced in the last 30 years, come elucidating structures and biological activities of various components of animal venoms, showing their complex compositions. The scorpion venoms are complex mixtures of biologically active compounds, such as low molecular weight compounds, peptides and proteins, the latter being the most widely studied. To the present time not much is known about the small peptides and metabolites of scorpion venoms, requiring research to expand this knowledge. This study aimed to obtain a detailed peptide profile of the venoms of *T. serrulatus, T. bahienis* and *T. obscurus* species, focusing primarily on small linear neglected peptides in scorpion venom. The extraction in 50% acetonitrile was one of the strategic differences for this purpose and the separation and sequencing of these peptides were performed "on-line" using an LC-ESI-IT-TOF system. The peptide components of the scorpion venoms are distributed along the molar mass range of 400-4000 Da, and in this study we could detect the presence of 521 different peptides in *T. serrulatus* venom, 460 peptides in *T. bahiensis* and 517 in *T. obscurus*. It was also possible to establish the peptide profiles of the venoms of the three species studied, as well as to obtain the sequence of 66 peptides, some of which had similarities to known already toxins of scorpions. Thirteen of the newly detected peptides, containing between 6 and 19 amino acids, were synthesized and characterized with proposal to obtain their biological activities, such antibiosis, hemolysis, mast cell degranulation, LDH, open field test, pain and inflammation in mammals, showing some particularly activities in hemolysis, pain and mammals locomotion. This work also revealed the metabolites profile in these venoms with a LCMS-Q-TOF-MS system for qualitative and quantitative analysis. For this purpose, we standardized the chromatographic conditions with the use of ion pairing chromatography to better separation and identification of compounds such as biogenic amines, polyamines, amino acids, nucleosides derivatives, etc., detected in the venoms. The chemical complexity demonstrated in this study corroborates with the fact that small peptides and metabolites should act in synergism with large toxins in poisonings, increasing its effects on victims by these animals.

Key words: Peptidomics. Venom. Toxins. Scorpions. LCMS.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8

1.1 OS ESCORPIÕES E O ESCORPIONISMO 8

1.2 COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DE ESCORPIÃO E SUAS ATIVIDADES 14

1.2.1 Toxinas com ações em canais iônicos 15

1.2.2 Peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBPs) 18

1.3 NOMENCLATURA DE TOXINAS ESCORPIÔNICAS 20

1.4 ESTUDO PEPTÍDICO ATRAVÉS DO USO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS 20

1.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DOS METABÓLITOS PRESENTES NOS VENENOS DE ESCORPIÕES: DA IDENTIFICAÇÃO À QUANTIFICAÇÃO 23

2 OBJETIVOS 28

3 MATERIAIS E MÉTODOS 29

3.1 EXTRAÇÃO DO VENENO DE ESCORPIÕES 29

3.2 EXPERIMENTOS DE PEPTIDÔMICA ATRAVÉS DO SISTEMA LCMS-IT-TOF 29

3.3 INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS DE MASSAS DE PEPTÍDEOS OBTIDOS ATRAVÉS DO SISTEMA LCMS-IT-TOF 31

3.4 DERIVATIZAÇÃO ATRAVÉS DA ACETILAÇÃO DOS RESÍDUOS DE LISINA 31

3.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE METABOLITOS ATRAVÉS DO SISTEMA LC-MICROQ-TOF. 31

3.5.1 Análise dos dados de LC-ESI-micrOToF-QIII 32

3.5.2 Construção de uma biblioteca de metabolitos 33

3.5.3 Identificação dos metabólitos em amostras de venenos de escorpião 34

3.6 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA 35

3.7 PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS 36

3.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS 37

3.8.1 Atividade Hemolítica 37

3.8.2 Desgranulação de Mastócitos 37

3.8.3 Atividade de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) 39

3.8.4 Prova de Sensibilidade Bacteriana (MIC) 40

3.9 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS RELACIONADAS À DOR E INFLAMAÇÃO 41

3.9.1 Animais 41

3.9.2. Avaliação da sensibilidade dolorosa 41
3.9.3 Edema de pata 42
3.9.4 Avaliação da atividade geral dos animais analisada no modelo do Campo Aberto 43
3.9.5 Análise estatística 44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
PARTE I 46
4.1 PEPTIDÔMICA 46
4.1.1 Análises de variabilidade peptídica 46
4.1.2 Sequenciamento de peptídeos encontrados nos venenos 56
PARTE II 72
4.2 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS 72
4.3 RESULTADOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS 76
4.3.1 Hemólise 76
4.3.2 Desgranulação de mastócitos 78
4.3.3 Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH) 80
4.3.4 Antibiose 82
4.3.5 Atividades Farmacológicas de Dor e Inflamação 83
4.3.6 Avaliação da atividade geral de camundongos por campo aberto após injeção dos peptídeos sintéticos de escorpião 87
PARTE III 92
4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE METABOLITOS DOS VENENOS 92
4.4.1 Efeito do ácido Heptafluorobutírico (HFBA) no tempo de retenção de compostos polares: a cromatografia de par iônico (IPC) em fase reversa C18 92
4.4.2 Construção da biblioteca de metabólitos 95
4.4.3 Identificação dos compostos em venenos de escorpião do gênero Buthidae 101
5 CONCLUSÃO 115
REFERÊNCIAS 117
APÊNDICE A 140
APÊNDICE B 173
APÊNDICE C 180
APÊNDICE D 197

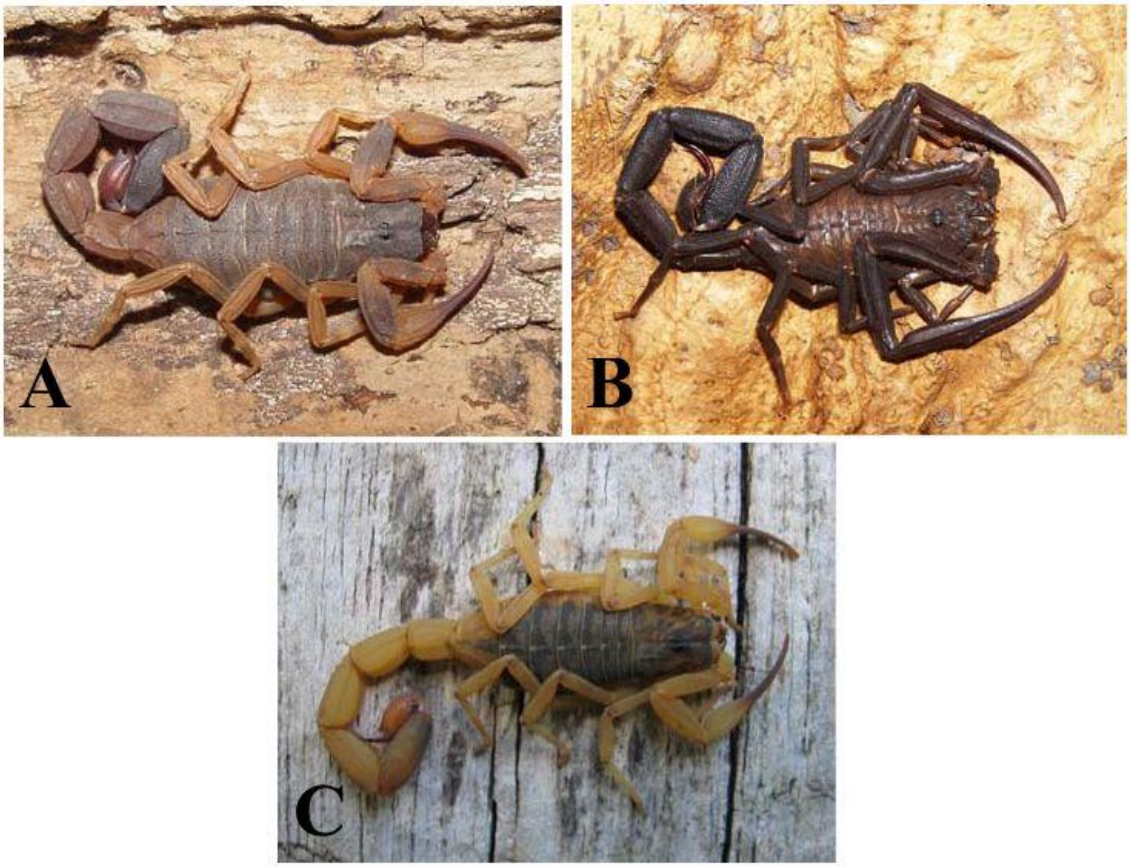
1 INTRODUÇÃO

1.1 OS ESCORPIÕES E O ESCORPIONISMO

Os escorpiões (Filo Arthropoda, classe Arachnida, Ordem Scorpionida), são os artrópodes mais antigos na terra e podem ser dividido filogeneticamente em 18 famílias distintas (ALI et al., 2016; DI et al., 2014), as quais apesar de manterem a morfologia quase inalterada, desenvolveram estratégias de caça e defesa através da utilização de venenos altamente complexos e eficientes. A estimativa de diversidade total é de 7000 espécies (CODDINGTON; COLWELL, 2001) e, de todos os escorpiões já descritos, cerca de metade ocorre na Região Neotropical (8 famílias, 48 gêneros e cerca de 800 espécies) (LOURENÇO, 2002). Desta forma acabaram tornando-se um problema de saúde pública em muitos países, devido ao número e gravidade dos casos de envenenamento (DEHESA-D´AVILA et al., 1994; CHOWELL et al., 2006).

Pelo menos trinta espécies foram identificadas em todo o mundo como potencialmente tóxicas para os seres humanos (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008). As principais famílias de escorpiões venenosos são Buthidae (a maior família com 82 gêneros e 773 espécies) e Chactidae (12 gêneros e 152 espécies). A família Buthidae apresenta em torno de 34 principais espécies consideradas potencialmente perigosas aos humanos, incluindo as espécies do gênero *Tityus*, no qual estão inclusos todos os escorpiões de importância medica do Brasil (CHIPPAUX AND GOYFFON, 2008). Embora existam 54 espécies de *Tityus sp.* no país, as espécies de importância médica incluem principalmente *T. bahiensis* (escorpião-marrom*), T. obscurus* (escorpião preto da Amazônia), *T. serrulatus* (escorpião-amarelo) e *T. stigmurus* (escorpião amarelo do nordeste) (Figura 1), sendo *T. obscurus* também conhecido como *T. cambridgei* ou *T. paraensis* (BUCARETCHI et al., 1995; CHIPPAUX; GOYFFON, 2008; LOURENÇO, 2008).

Figura 1: Escorpiões de importância médica do Brasil



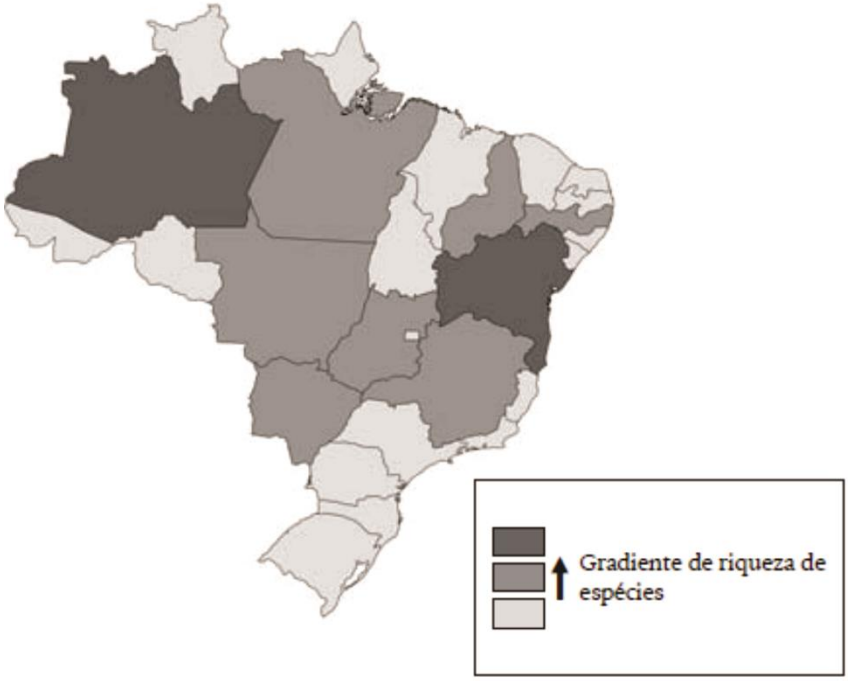
Legenda: Escorpiões de importância médica do Brasil estudados no presente trabalho: (**A)** *T. bahiensis*, (**B)** *T. obscurus* e (**C)** *T. serrulatus*.
Fonte: adaptado de BRAZIL; PORTO (2010).

Os acidentes com escorpiões são relativamente comuns, principalmente em países tropicais e subtropicais, podendo inclusive causar envenenamento letal em humanos, principalmente em crianças. Os animais do gênero *Tityus* são naturalmente habitantes do cerrado e de campos abertos, porém conseguiram se adaptar satisfatoriamente à vida domiciliar urbana, possivelmente em decorrência da rápida e desorganizada colonização das regiões ocupadas por estes animais (SOARES et al., 2002). A habilidade de sobrevivência em cidades é explicada principalmente pela alta concentração de detritos e lixo, os quais aumentam a proliferação de insetos que fazem parte da sua alimentação (PUCCA et al., 2015b).

A espécie *T. serrulatus* foi originalmente descrita no Brasil (LUTZ; MELLO, 1922) e é considerada a mais perigosa do país (PUCCA et al., 2015b). Esta espécie, conhecida como escorpião amarelo, tem ampla distribuição e está presente em estados das regiões Nordeste (BA, CE), Sudeste (MG, ES, RJ, SP), Centro-Oeste (DF, GO) e Sul (PR, RS) (GUIA..., 2004). A espécie *T. bahiensis* é encontrada principalmente na Bahia e regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil e a espécie *T. obscurus* é encontrada principalmente na região Norte e

Mato Grosso. Assim, escorpiões da família Buthidae são encontrados em praticamente todo o território brasileiro (Figura 2).

Figura 2: Gradiente de riqueza de espécies da família Buthidae no Brasil



Fonte: Adaptado de BRAZIL; PORTO, 2010.

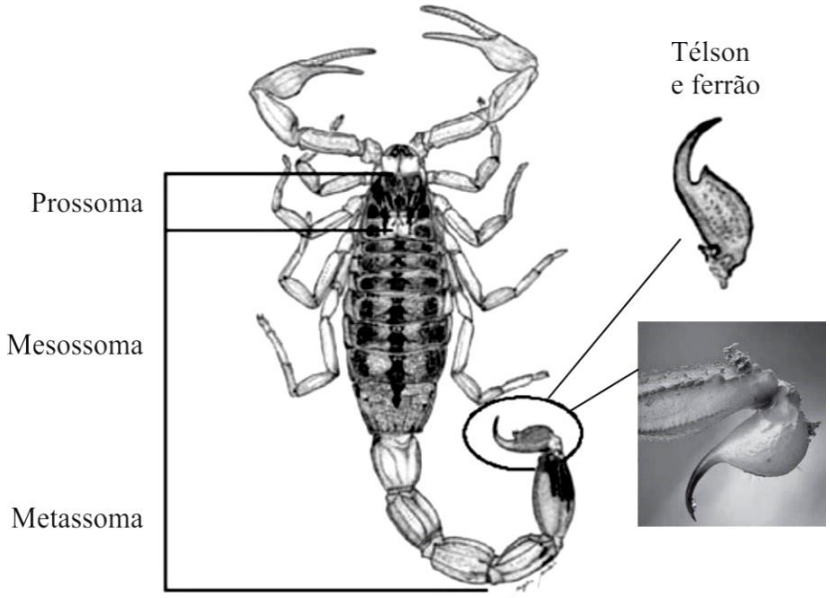
A espécie *T. serrulatus* é composta principalmente por fêmeas que se reproduzem assexuadamente (reprodução partenogenética) (SOUZA et al., 2009). Tal estratégia reprodutiva (reprodução assexuada) foi reportada para onze espécies em várias regiões do mundo, sendo cinco delas de ocorrência no Brasil: *Tityus metuendus*, *T. serrulatus*, *T. stigmurus*, *T. uruguayensis* e *T. trivittatus* (LOURENÇO, 2008). Para tanto, cada animal é responsável pela produção de um número completo de cromossomos que serão herdados por sua prole. Assim cada indivíduo se reproduz pelo desenvolvimento de óvulos sem que haja fertilização (BARRAVIERA, 1994). A condição partenogenética favorece sua proliferação e dispersão. As ninhadas podem ser de 1 a 105 filhotes, que irão manter-se no dorso da mãe (cuidado parental) até a primeira ou segunda muda, quando se dispersam, e isso leva de 5 a 30 dias dependendo da espécie (LOURENÇO, 2003). O desenvolvimento pós-embrionário, ou seja, o tempo até alcançar a maturidade sexual, varia de seis meses a sete anos. A maioria das espécies vive entre 2 e 10 anos, mas alguns escorpiões podem chegar a viver 25 anos. Seu crescimento é dependente de fatores como temperatura, disponibilidade de alimento e reprodução, sendo que os escorpiões têm maior longevidade em cativeiro do que em ambiente natural e as fêmeas vivem mais que machos. A espécie *T. serrulatus* apresenta também uma

fácil adaptação ao ambiente urbano e possui alta competitividade e dominância, características que podem desencadear um processo de redução e desaparecimento de outras espécies (SILVA et al., 2005). A espécie *T. bahiensis* é considerado a espécie modelo do gênero *Tityus* por sua reprodução ser sexuada, assim como *T.obscurus*, as quais apresentam machos e fêmeas que com características morfológicas diferenciais (OLIVEIRA et al., 2011).

Os escorpiões apresentam uma carapaça (prossoma) contendo um par de quelíceras, um par de pedipalpos (pinças) e quatro pares de pernas. O abdômen (opistossoma) é dividido entre o tronco (mesossoma) e a cauda (metassoma). No primeiro se encontram o opérculo genital, os apêndices sensoriais (pentes) e os espiráculos (aberturas externas do pulmão), no segundo localiza-se, ao final de sua extremidade, o télson, que termina em um ferrão usado para inocular o veneno, servindo-lhe tanto para a caça como para defesa de possíveis predadores (Figura 3) (MINISTÉRIO..., 2009).

O veneno dos escorpiões é o produzido e secretado por um par de glândulas de origem tegumentar situadas no télson (Figura 3). Este tem forma bulbar que termina no ferrão responsável pela inoculação do veneno.

Figura 3: Morfologia de escorpiões do gênero *Tityus*



Legenda: A imagem mostra o corpo dividido em três seções principais: prosoma, mesosoma e metasoma. O aparato de veneno (telson) e o ferrão (em detalhe) estão indicados.
Fonte: Adaptado de "Manual..., 2009".

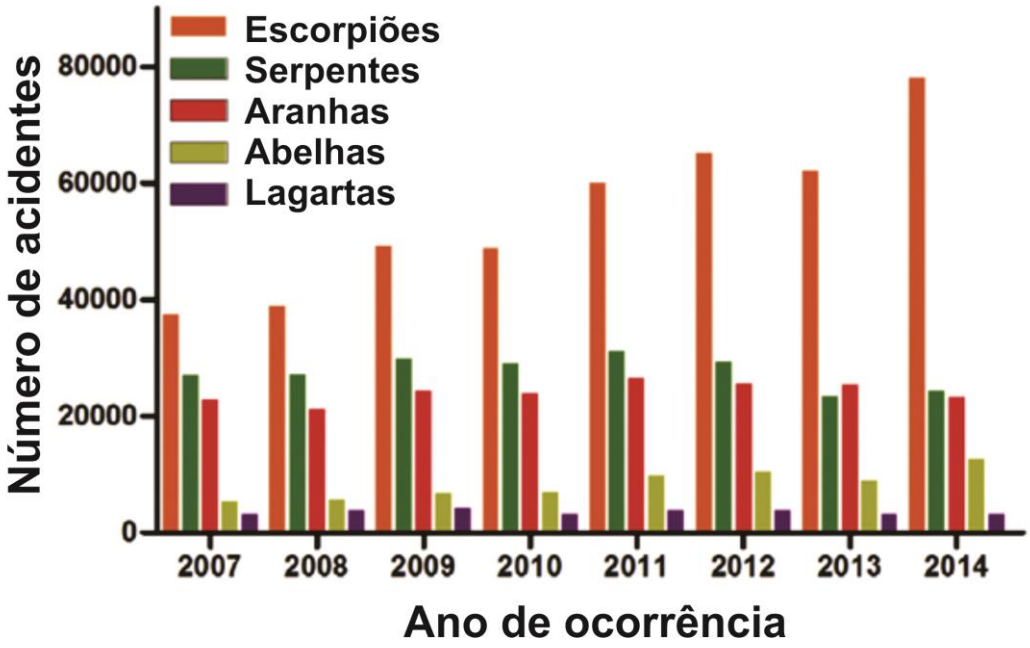
Os escorpiões inoculam o veneno pelo ferrão, para captura de suas presas e também como mecanismo de defesa (PLESSIS et al., 2008), sendo considerados animais peçonhentos. A gravidade depende de fatores como a espécie e o tamanho do escorpião, a quantidade de

veneno inoculado, a massa corporal e idade do acidentado (crianças menores que 7 anos são mais susceptíveis ao veneno), além da sensibilidade do paciente ao veneno (LIRA-DA-SILVA et al., 2000; SOARES et al., 2002).

A ocorrência tem se elevado nos últimos anos, particularmente nos estados do Nordeste, onde sua presença é a mais significativa, atingindo taxa de incidência de 12 casos por 100 mil habitantes. A maior parte dos acidentes é classificada como leve e não requer soroterapia, podendo ser tratada na unidade de saúde mais próxima do local de ocorrência. Apesar da baixa letalidade (0,2%), crianças abaixo de 14 anos têm risco mais elevado de evoluir para óbito (3,2%). Em 2003, foram registrados 48 óbitos, a quase totalidade em menores de 14 anos (GUIA..., 2004).

Dentre os acidentes com animais peçonhentos, o envenenamento por escorpiões é o de maior incidência no Brasil. Dados recentes (até o ano de 2014) demonstram um aumento significativo no número destes casos (Figura 4). A alta adaptação em ambientes urbanos (onde esses animais encontram abrigo e alimento com facilidade) e sua reprodução partenogenética são fatores que contribuem para sua dispersão e explica o aumento no número de acidentes (WEN; SANTALUCIA, 2005; PUCCA et al., 2015a).

Figura 4: Dados epidemiológicos de acidentes com animais peçonhentos no Brasil



Legenda: Número de acidentes por envenenamento entre 2007 e 2014. Dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação).
Fonte: Adaptado de PUCCA et al, 2015.

Escorpionismo é denominado o quadro de envenenamento humano causado pelo veneno escorpiônico (MANUAL..., 2003). Os sintomas do envenenamento começam em alguns minutos após a ferroada e geralmente progridem à máxima severidade em 5 horas (PETRICEVICH, 2010). Com relação aos acidentes, nos casos moderados e graves (principalmente em crianças), além da intensa dor local podem surgir manifestações sistêmicas: gerais (hipo ou hipertermia e sudorese profusa); digestivas (náuseas, vômitos, sialorréia e, mais raramente, dor abdominal e diarréia); cardiovasculares (arritmias cardíacas, hipertensão ou hipotensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e choque); respiratórias (taquipnéia, dispnéia e edema pulmonar agudo) e neurológicas (agitação, sonolência, confusão mental, hipertonia e tremores), além de manifestações renais com elevação de parâmetros bioquímicos como uréia e creatinina (ANDRADE FILHO et al., 2013; NUNAN et al., 2003). A falência respiratória que se manifesta após a ferroada escorpiônica é uma das principais causas de morte entre os pacientes como resultado de edema pulmonar agudo (ANDRADE et al., 2007; AMARAL et al., 1993; BUCARETCHI et al., 1995).

De forma geral, durante a ferroada, escorpiões são capazes de injetar entre 0,1 e 0,9 mL de veneno em suas vítimas (VAN DER MEIJDEN et al., 2015), este volume é cerca de mil vezes menor do que o volume injetado por picadas de serpentes por exemplo. A localização geográfica dos escorpiões, a dieta específica e a idade dos escorpiões podem variar significativamente a concentração das toxinas injetadas durante um acidente (PUCCA et al., 2014a; HERZIG et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013).

Para serem estudados, os venenos dos escorpiões são extraídos através de maceração da própria glândula produtora do veneno, ou ainda por estimulação elétrica do télson do animal (mais usual). Em geral apresentam viscosidade mucosa, com aspecto leitoso e parcialmente solúvel em água (MARCUSSI et al, 20011).

A toxicidade dos venenos de escorpião parece ser especifica para invertebrados, vertebrados ou ambos (POSSANI et al., 1999; INCEOGLU et al., 2005). Dentre as espécies de interesse médico no Brasil, *T. stigmurus* apresenta maior toxicidade (DL50 = 0,773 mg/Kg), seguido de *T. bahiensis* (DL50 = 1,062mg/Kg) e *T. serrulatus* (DL50 = 1,160mg/Kg). Já o veneno de *T. obscurus* tem sido considerada de média toxicidade (DL50= 12,136 mg/kg) (NISHIKAWA et al., 1994).

1.2 COMPOSIÇÃO DOS VENENOS DE ESCORPIÃO E SUAS ATIVIDADES

Ao longo de mais de 400 milhões de anos de tempo evolutivo, os escorpiões têm selecionado venenos que exercem atividades tóxicas em uma ampla gama de alvos biológicos. A diversidade de toxinas foi potenciada pelas taxas de migração lenta e estruturas populacionais diferentes combinadas com a sua longa história geológica (SUNAGAR et al., 2013).

No curso da evolução, as neurotoxinas presentes nestes venenos foram selecionadas com alta atividade biológica, específica e potente, permitindo à esses animais o ataque e imobilização de suas presas e a defesa contra seus predadores. Essas moléculas possuem a principal propriedade de se ligarem aos sítios específicos de canais iônicos de membranas celulares causando um aumento na permeabilidade celular (ELGAR et al., 2006).

Os venenos de escorpiões apresentam uma enorme variedade de atividades bioquímicas e funções farmacológicas. Consiste em uma mistura complexa composta de muco insolúvel, mucopolissacarídeos, oligopeptídeos, nucleotídeos, moléculas de baixa massa molar como serotonina ou histamina, aminoácidos livres, inibidores de proteases, liberadores de histamina, aminoácidos, lipídeos, enzimas diversas e muito peptideos básicos com ações neurotoxicas, que conferem múltiplas ações ao veneno (GWEE, 2002; POSSANI et al., 1984; VASCONCELOS et al., 2005).

A riqueza de componentes peptídicos presentes nos venenos é uma questão muito intrigante e um grande desafio para a pesquisa, especialmente quando estão relacionados à produção de novos fármacos. Numerosos estudos, produzidos principalmente durante os últimos 30 anos, vêm elucidando estruturas e atividades biológicas de vários componentes dos venenos animais, demonstrando a complexidade destes venenos em ambos os aspectos (ESCOUBAS et al., 2008).

Segundo Marcussi et al. (2011) são conhecidas dez famílias de peptídeos e proteínas escorpiônicas, as quais incluem: toxinas ligadas a canais de potássio, toxinas que agem em canais de íons cálcio, sódio, cloro e citolíticas. Além disso, também foram identificadas 12 famílias atípicas de proteínas e/ou peptídeos, nas quais fosfatases ácidas e peptídeos diuréticos estão inclusos (YIBAO MA et al., 2010). A atividade hialuronidásica catalisa a hidrólise do ácido hialurônico, tornando a matriz extracelular menos densa, facilitando a difusão das toxinas dos venenos pelos tecidos (POSSANI et al., 1977; PESSINI et al., 2001; BATISTA et al., 2007).

Essas toxinas são mais conhecidas por seus efeitos deletérios sobre as células, tecidos e organismos, mas, paradoxalmente, algumas delas têm demostrado atividades que podem ser relevantes para o desenvolvimento de compostos químicos de uso farmacêutico. Entre essas toxinas estão os peptídeos antibióticos, antimaláricos, com atividades imunossupressoras e anticancerígenos (ORTIZ et al, 2015).

Este potencial também pode ser confirmado através do crescente desenvolvimento de fármacos para o tratamento de dores, assim como o desenvolvimento de drogas para controle da arritmia e pressão cardíaca, anticonvulsivantes e antibióticos, além de agentes inseticidas (ESCOUBAS et al., 2008). A descoberta de compostos em venenos, que apresentam atividades seletivas contra receptores nervosos, representa um exemplo de aproximação desta linha de pesquisa com a busca de novas drogas (LEWIS; GARCIA, 2003). Os peptídeos antibióticos vêm atraindo muita atenção como uma nova classe de drogas, especialmente contra patógenos antibiótico-resistentes (ZASLOFF, 2002).

Grande parte dos estudos envolvendo os venenos de escorpiões é voltada para a caracterização de toxinas de alta massa molecular (peptídeos e proteínas), fazendo com que os peptídeos de cadeias menores fossem negligenciados por diversos anos de pesquisa, principalmente levando em consideração que estes eram excluídos pelos métodos de extração e separação realizados até então, utilizando-se tampões e centrifugações que os excluíam das analises.

1.2.1 Toxinas com ações em canais iônicos

Grande parte das toxinas de escorpião contém três ou quatro pontes dissulfeto e podem interagir com aguns tipos e sub-tipos específicos de canais iônicos (TYTGAT et al., 1999; POSSANI et al., 2000; ZENG et al., 2001; GOUDET et al., 2002). As neurotoxinas presentes no veneno podem alterar, por exemplo, a função de canais de sódio, potássio, cloro e cálcio (PLESSIS et al., 2008). A interação com estes canais leva à liberação de neurotransmissores em grandes quantidades no sistema nervoso central ou autonômico (SANDOVAL; LEBRUN, 2003; PESSINI et al., 2003). Esses tipos de toxinas podem ser classificados de acordo com a sua especificidade de ligação com os canais iônicos em quatro grupos diferentes:

Zhijian e colaboradores (2006), em um total aproximado de 400 neurotoxinas isoladas e caracterizadas em venenos de escorpião, classificaram cerca de 200 toxinas interagindo com

canais de íons sódio, 150 com canais de potássio, 19 com canais de íons cloreto e aproximadamente 10 com canais de íons cálcio.

Toxinas que agem em canais de íons sódio

As toxinas do veneno de escorpião que agem em canais de sódio geralmente são constituídas de peptídeos longos, formados por cadeias de aminoácidos contendo entre 60 a 70 resíduos de aminoácidos (ZLOTKIN et al., 1978; CATTERALL, 1980; ROCHAT et al., 1979). Após anos de estudos com essas toxinas, demonstrou-se que as ações em sítios específicos dos canais de sódio são as principais causadoras dos efeitos induzidos pelos venenos de escorpiões. Através de sua ação, há liberação de catecolaminas e acetilcolina, as quais atuam em diferentes receptores nos diversos tecidos das vítimas desses animais, sendo que a liberação em grande quantidade destes tipos de neurotransmissores é responsável pela maior parte dos sintomas observados no envenenamento escorpiônico (MARCUSSI et al., 2011).

As toxinas que agem em canais de íons sódio foram classificadas em dois grupos principais (α- e β-). As α-toxinas escorpiônicas possuem entre 6500 e 8500 Da e contém cerca de 58-76 resíduos de aminoácidos com uma estrutura tridimensional em α-hélice e β-pregueada antiparalela (DE LA VEGA; POSSANI, 2005). Em ambas as circunstancias, o resultado final da presença destas toxinas será um maior influxo de íons sódio no interior da célula, um aumento de sua despolarização e, como consequência, uma liberação maciça de neurotransmissores.

As α-neurotoxinas retardam a inativação dos canais de íons sódio e induzem o prolongamento da fase de despolarização do potencial de ação, são capazes de prolongar o período de abertura do canal. Em doses baixas, as α-toxinas provocam uma forte despolarização da membrana celular, seguido por uma diminuição na excitabilidade. Em doses mais elevadas elas prolongam o potencial de exitação das células e induzem paralisia e arritmia cardíaca (BOSMANS; TYTGAT, 2007).

As β-neurotoxinas, por sua vez, alteram a ativação dos canais de íons sódio voltagem dependentes, deixando o potencial mais eletronegativo e propiciando o aumento da tendência da célula em responder espontânea e repetidamente, independente do potencial de membrana (CESTELE; CATTERALL, 2000). É demonstrado que as β- toxinas causam respostas musculares espástica (CHIPPAUX, 2012).

A TsTX-I é uma das toxinas extraídas do veneno do escorpião *T. serrulatus* mais amplamente estudadas por ser extremamente tóxica e abundante. Também conhecida como

Ts1, toxina-γ, toxina-VII, essa toxina possui 61 resíduos de aminoácidos em sua sequência, com massa molarde 6890 Da (BECERRIL et al., 1997; COLOGNA, 2009; CORRÊA et al., 1997; CONCEIÇÃO et al., 2005). Sua estrutura tridimensional foi determinada por cristalografia de Raios X e revelou um domínio conservado, formado por uma alfa-hélice e folhas beta, estabilizados por pontes dissulfeto (POLIKARPOV et al., 1999). A TsTX-I é capaz de se ligar ao sítio 4 do canal de sódio de mamíferos e insetos com grande estabilidade e alta afinidade (BARHANIN et al., 1982; 1983a; 1983b; 1985; MARCOTTE et al., 1997). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que essa toxina altera o funcionamento do canal de íons sódio provocando um deslocamento da dependência de voltagem para a ativação desses canais iônicos (BARHANIN et al., 1985; VIJVERBERG et al., 1984; YATANI et al., 1988; MARCOTTE et al., 1997).

Toxinas que agem em canais de íons potássio

As toxinas que agem em canais de íons potássio (CARBONE et al., 1982; MILLER et al.,1985) geralmente são constituídas de peptídeos menores, apresentando até 40 resíduos de aminoácidos (MILLER et al., 1985) e são genericamente denominadas por KTx.

Possuem de 20 a 95 resíduos de aminoácidos, sendo que a maior parte apresenta menos de 40 resíduos em suas sequencias, com alta diversidade de tipos de aminoácidos, e possuem de 3 a 4 pontes dissulfeto intramoleculares (CAMARGOS et al, 2011; COLOGNA et al., 2011; MAO et al., 2007). Além disso, uma nova família de toxinas que age em menor intensidade em canais de íons potássio foi identificada e designada como k-KTx, as quais apresentam apenas duas pontes dissulfeto (NIRTHANAN et al., 2005; SRINIVASAN et al., 2002; CHAGOT et al., 2005).

Toxinas que agem em canais de íons cloreto

As toxinas que agem em canais de íons cloreto (DEBIN et al.,1993) são principalmente polipeptídios contendo entre 35 à 38 aminoácidos, sendo compostos por 4 pontes dissulfeto. A estrutura primaria destas toxinas apresenta similaridade de 50-74% e a localização dos resíduos de cisteínas é conservada dentro da família. Fuller et al. (2007) descreveram o peptídeo GaTx1, a primeira toxina de peçonha de escorpião que regula com alta afinidade a condutância de íons cloreto, isolada do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Exemplos destas toxinas são: I1, Ammp2, I3, I4, I5, I5A, peptídeos IBs, clorotoxina, Lqh-8/6, PBITx1, BmKCT, Bs8 e Bs14 (TYTGAT et al., 1999; ZENG et al., 2000). Recentemente um novo peptideo da familia das clorotoxinas (Bs-TX7) foi isolado a

partir do veneno do escorpião *Buthus sindicus* (família Buthidae), sequenciado, sintetizado e teve suas atividades testadas (ALI et al., 2016).

A clorotoxina isolada do escorpião *Leiurus quinquestriatus* (SOROCEANU et al., 1998) se liga especificamente a canais de íons cloreto na matrix extracelular de gliomas, e possui grande potencial para o uso em diagnóstico e tratamento de câncer. A partir dessa informação, indústrias farmacêuticas já passaram a conduzir testes de fase clínica 1 e 2, para utilização no diagnóstico por imagem e tratamento local de gliomas (MAMELAK et al., 2006; HOCKADAY et al., 2005).

Toxinas que agem em canais de íons cálcio

As toxinas que agem em canais de íons cálcio geralmente formam um grupo heterogêneo, sendo que diferem bastante quanto às suas sequencia de aminoácidos, quantidade de pontes dissulfetos, tamanho e estruturas sendo toxinas de cadeia tanto longa quanto curta (VALDIVIA; POSSANI, 1998; VALDIVIA et al., 1992; MOSBAH et al., 2000; OLAMENDI-PORTUGAL et al., 2005). Essas toxinas possuem a nomenclatura bem consolidada, inicialmente proposta por Tytgat et al. (1999) baseada no tamanho, localização das cisteínas e a similaridade de suas estruturas primárias (TYTGAT et al., 1999).

Entre as toxinas de escorpiões que agem em canais de íons Ca^{+2} estão as imperiotoxinas (IpTxA e IpTxi) do escorpião *Pandinus imperator* (VALDIVIA e POSSANI, 1998) e a maurocalcina (Mca) do escorpião *Scorpion maurus palmatus* (FAJLOUN et al., 2000), que ativam o receptor de rianodina (Ryr), um canal de liberação de íons cálcio intracelulares.

1.2.2 Peptídeos sem pontes dissulfeto (NDBPs)

Os peptídeos do veneno de escorpião que não possuem resíduo de cisteína e apresentam baixos graus de similaridade entre si formam a família dos NDBP – *Non-Dissulfide-Bridged Peptide* e possuem diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, hemolítica, iniciação da sinalização celular, modulação da resposta imune e potenciadores de bradicinina. Estes peptídeos representam os mais abundantes componentes dos venenos de escorpião (LUO et al., 2005; PIMENTA et al., 2001; ZENG et al., 2005).

Estudos de espectrometria de massas demostraram que os peptídeos de baixas massas molares representam mais de um terço de todos os compostos já determinados (DE LA

VEGA et al.; 2010). Uma vez que o principal interesse de pesquisa foi geralmente deslocado para peptídeos de maior massa molar nas frações tóxicas do veneno, a taxa de descoberta de NDBPs tornou-se atrasada em comparação com a informação disponível sobre toxinas (PUCCA et al, 2015).

O fato dos NDBPs apresentarem atividades biológicas relevantes tem atraído muita atenção por parte dos pesquisadores. Isto, juntamente com a disponibilidade de técnicas de biologia molecular, como a construção da biblioteca de cDNA, da expressão heteróloga, e ultimamente RNA-Seq resultaram no aumento de informações disponíveis sobre estes pequenos peptídeos (QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2011). Apesar de várias centenas de toxinas de natureza peptídica serem isoladas e descritas a partir de venenos de escorpião, apenas algumas dezenas de NDBPs foram caracterizados até o momento (ALMAAYTAH; ALBALAS, 2014).

Peptídeos potenciadores de bradicinina- BPPs (Ex: Peptídeo T e K12) foram isolados de algumas espécies de escorpiões, como *T. serrulatus* e *B. occitanus*, (FERREIRA et al., 1993; MEKI et al., 1995). O Peptídeo T é composto de 13 resíduos de aminoácidos e foi o primeiro a ser caracterizado como potenciador de bradicinina. Este peptídeo pode potencializar a atividade contrátil da bradicinina sobre o íleo isolado de cobaias e inibir a hidrólise da bradicinina pela enzima conversora de angiotensina encontrada no plasma de serpentes. Ele também pode inibir a conversão de angiotensina I em angiotensina II pela quinase II em tecido do íleo de cobaia, e aumentar o efeito depressor da bradicinina na pressão arterial de ratos (FERREIRA et al., 1993).

Alguns peptídeos sem pontes dissulfeto e com atividade antibiótica foram isolados e funcionalmente caracterizados a partir do veneno de escorpiões. Esses peptídeos possuem entre 13 e 47 resíduos de aminoácidos. Os peptídeos de veneno denominados paraputoporinas ISCT e IsCT2 foram considerados antibióticos e acumulam-se facilmente nas membranas celulares para formar poros (DAI et al., 2001; 2002; VERDONCK et al., 2000).

A maior parte dos peptídeos antibióticos do veneno de escorpião é hemolítica, mas apesar disso, esses peptídeos têm um grande potencial para serem utilizados em aplicações tópicas no tratamento de infecções de pele (ULVATNE, 2003) e a fim de inibir crescimentos orais de bactérias, que estão associadas com o desenvolvimento de cáries e formação de placas (CONCANNON et al., 2003).

1.3 NOMENCLATURA DE TOXINAS ESCORPIÔNICAS

Durante muitos anos ocorreu um problema de desordem na designação dos nomes e símbolos adotados para toxinas escorpiônicas. Esta falta de padronização na nomenclatura fez com que ocorressem casos de nomes diferentes para expressar a mesma toxina e nomes iguais para designar toxinas diferentes.

Um exemplo do problema com as nomenclaturas de toxinas é o primeiro fracionamento realizado com veneno de escorpião da espécie *T. serrulatus,* o qual foi realizado por Gomez e Diniz em 1966, obtendo uma fração denominada "Tityustoxina" ("TsTX"). Arantes et al. (1992), constataram que essa fração era formada por mais de um componente em sua constituição. Esses autores passaram a denominar a fração descrita por Gomez e Diniz de "tityustoxina", com aspas, para diferenciá-la de outra toxina purificada descrita por seu grupo, a tityustoxina (TsTX) sem aspas.

Toledo e Neves (1976), utilizaram o termo TsTX, seguido de um número romano, para designar cada toxina que fosse isolada posteriormente (TsTX-I, TsTX-II etc). Becerril et al. (1996) adotaram uma nomenclatura similar, utilizando a abreviação do nome *T. serrulatus* (Ts) seguido por um numeral, para diferenciação de cada toxina (Ts1, Ts2, etc).

Tytgat et al. (2009) propuseram uma nomenclatura para proteínas e peptídeos que atuam em subfamílias de canais de potássio (k-KTx). A nomenclatura proposta baseia-se no alinhamento dos resíduos de cisteinas e outros resíduos conservados, assim como na análise da árvore filogenética para estas sequencias pelo princípio de máxima parcimônia. Foi estabelecida então uma nomenclatura para as 12 subfamilias de k-KTx. A nomenclatura proposta pareceu solucionar as diversas redundâncias existentes entre estas subfamílias em termos da mesma toxina possuir diversos nomes, porém a nomenclatura não é aplicável às outras classes de toxinas escorpiônicas, já que os parâmetros utilizados não permitiriam a distinção entre toxinas que atuam em canais de sódio e de potássio, por exemplo (COLOGNA et al., 2009).

1.4 ESTUDO PEPTÍDICO ATRAVÉS DO USO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Com o avanço dos métodos de fracionamento, cromatografia e sequenciamento de peptídeos, tem sido cada vez mais precisa a caracterização dos componentes do veneno escorpiônico (PLESSIS et al., 2008). Entretanto, mesmo com o isolamento de diversas toxinas

do veneno de *T. serrulatus*, menos de 1% do total de peptídeos presentes nos venenos são conhecidos (POSSANI et al., 1999), havendo a necessidade de mais estudos até a completa elucidação de seus constituintes.

A Química Degradativa de Edman é uma técnica muito precisa, que já foi amplamente utilizada, porém é um método unidirecional. Além disso, é difícil obter informação de sequência se o N-terminal for acetilado, ou bloqueado devido à outras modificações (SADAGOPAN; WATSON, 1999). Assim, a espectrometria de massas tem sido utilizada amplamente em processos de sequenciamento de proteínas e peptídeos, a fim de identificar essas moléculas extraídas de amostras biológicas.

Desde o ano de 1980 (HUNT et al., 1986; BIEMANN, SCOBLE, 1987) a espectrometria de massas vem sendo utilizada para investigação estrutural de peptídeos e proteínas. Com o desenvolvimento de técnicas de ionização suaves, como Espectrometria de Massa por Ionização Secundária (LSIMS) (FENSELAU; COTTER, 1987), ionização por eletrospray (ESI) (DOLE et al., 1968; FENN et al., 1989) e Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser (MALDI) (HILLENKAMP et al., 1991) em combinação com o desenvolvimento da espectrometria sequencial (MS/MS), a investigação de grandes moléculas é agora acessível em muitos laboratórios (DONGRÉ et al., 1996). A dissociação (fragmentação) de peptídeos induzida por baixa energia de colisão é rotineiramente obtida em instrumentos dotados de ionização por eletrospray, acoplados a analisadores de massa do tipo triplo-quadrupolo, ion-trap (armadilha de elétrons), e Q-ToF (quadrupolo-tempo de vôo), (BAUER et al., 2000). Esse tipo de fragmentação (por CID) permite fragmentação de peptídeos preferencialmente nas ligações amida ao longo da cadeia polipeptídica, gerando sequencias de íons da série *–b* se a carga residual estiver na porção N-terminal do fragmento, ou *–y* se a carga estiver na porção C-terminal (ADAMCZYK et al., 1999).

O desenvolvimento de métodos sensíveis e seletivos de determinação de compostos é essencial para elucidar seus papéis e funções biológicas em sistemas vivos. Recentemente a cromatografia líquida/espectrometria de massa (LC/ MS) tem sido utilizada para este fim. Em particular, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequenciais (LC-MS/MS) equipada com fonte de íonização do tipo electrospray é o método mais importante, pois requer menor temperatura para ionização em comparação com outros métodos de ionização, podendo ser utilizada para estudos de compostos termicamente instáveis (SANTA, 2010). O baixo fluxo de fase móvel em cromatógrafos acoplados à espectrômetros de massas do tipo eletrospray também é algo que tem aumentado significativamente a sensibilidade

nesses equipamentos, permitindo quantidades como sub-pmol de um peptídeo ser rotineiramente sequenciado por espectrometria de massas em tandem (MS^n).

Espectrômetros de massa híbridos, combinando diferentes tipos de analisadores massas, como por exemplo "Quadrupolo-Time-of-Flight" (Q- ToF) têm sido utilizados cada vez mais em um grande número de aplicações, devido à velocidade de aquisição de dados, precisão de alta massa, poder de resolução, e alta sensibilidade (STEEN et al., 2001). A incorporação de analisadores do tipo *"ion-trap"* (ou a armadilha de íons) (IT) com TOF (IT-TOF) levou não só a um aumento no poder de resolução, mas também permitiu experimentos de espectrometria sequencial de alta performence, uma vez que o sistema IT é capaz de análises MS^n. Instrumentos com analisadores TOF exibem um poder de resolução de massa superior a 10.000, e precisão de massa menor que 5 ppm, assim, um equipamento híbrido representa uma plataforma atraente para aplicações bioanalíticas (DODONOV et al., 2000). As vantagens das técnicas de MS^n com respeito a velocidade, sensibilidade e aplicabilidade em misturas peptídicas complexas, gradualmente têm levado a substituição de técnicas como Edman por técnicas de LC-MS/MS (SEIDLER et al., 2010).

A combinação de técnicas, como a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) e Espectrometria de Massas tem sido determinante para o estudo dos componentes dos venenos animais e para o entendimento da alta complexidade farmacológica dos mesmos (KRISHNAMURTHY et al., 1996; ESCOUBAS et al., 2008). Por exemplo, estudos envolvendo venenos de aranhas do gênero *Brachypelma* por HPLC e MALDI-TOF/MS revelaram a presença de 40-50 componentes peptídicos diferentes no veneno bruto, dependendo da espécie (ESCOUBAS et al., 1997). Outros exemplos incluem o estudo de modificações N- e C- terminais em toxinas presentes no veneno da aranha *Phoneutria sp.* por MALDI-TOF MS, e LC-MS/MS, mostrando heterogeneidade e a presença de múltiplas isoformas no veneno (PIMENTA et al., 2005). Usando ainda tecnologia *off-line* de LC-MS, Nascimento et al. (2005) propuseram recentemente uma abordagem original para taxonomia e filogenia de venenos de escorpião, baseado em agrupamentos de acordo com a massa e hidrofobicidade dos peptídeos presentes nos venenos destes animais.

Trabalhos de proteômica e peptidômica utilizando-se de técnicas avançadas como LC-ESI-MS e nano ESI-MS/MS permitem a identificação rápida e sensível, e a caracterização de proteínas e peptídeos com grande eficiência. Venenos de serpentes são conhecidos por conterem cerca de 100 componentes peptídicos diferentes (CALVETE et al., 2007), enquanto venenos de escorpiões, aranhas e moluscos marinhos do gênero *Conus* têm demonstrado conterem de 300 a 1000 componentes diferentes (PIMENTA et al., 2001; ESCOUBAS et al.,

2006; NEWTON et al., 2007; BIASS et al., 2009; DAVIS et al., 2009). Mais recentemente nos trabalhos de Dias, et al. (2014) e Dias, et al. (2015) foi possível detectar a grande variabilidade peptídica inter- e intra- ninhos contida em difentes amostras de veneno da vespa social *Polybia palista*, demonstrando a gande riqueza desses compostos através de análises de LCMS e MS^n.

As toxinas, principalmente peptídeos e proteínas de escorpiões pertencentes à família Buthidae vêm sendo extensivamente estudados devido ao caráter nocivo para os seres humanos e letalidade (escorpiões nesta família são responsáveis por milhares de mortes por ano em todo o mundo). Assim, uma vasta quantidade de dados está sendo gerada a partir de toxinas peptídicas de escorpiões, sendo que até hoje pelo menos 476 sequências foram determinadas (http://www.expasy.org/sprot/toxprot/tox-protstat.html) (ESCOUBAS et al., 2008).

Em um estudo do veneno do escorpião *T. serrulatus*, Pimenta et al. (2001) a presença de 380 componentes através de filtração em gel do veneno bruto, a maior contagem obtida a partir de um veneno naquele tempo (PIMENTA et al., 2001) Resultados similares (100-200 peptídeos) foram obtidos em estudos posteriores de venenos de escorpião da América do Sul (BARONA et al., 2006), em animais do gênero Conus, que são reconhecidos por conter pelo menos 200 componentes peptídicos (OLIVERA; CRUZ, 2001), e serpentes (NAWARAK et al., 2003; CALVETE et al., 2007).

1.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DOS METABÓLITOS PRESENTES NOS VENENOS DE ESCORPIÕES: DA IDENTIFICAÇÃO À QUANTIFICAÇÃO

O termo metabolômica foi introduzido pela primeira vez por Oliver et al. (1998), que desenvolveram esse termo e definiram como a medida da mudança nas concentrações relativas, como sendo o resultado da deleção ou super-expressão de um gene em um mapa metabolômico. A metabolômica é uma abordagem analítica não-seletiva, universalmente aplicada, abrangente para a identificação e quantificação de metabólitos em um sistema biológico. Na pesquisa de produtos naturais a metabolômica é considerada a análise em grande escala de metabolitos contidos em um dado organismo durante vários estados fisiológicos (SUMNER et al., 2003).

O termo "metabólico" é usado com maior frequência na pesquisa de drogas e é frequentemente utilizado a fim de descrever o destino metabólico de uma droga administrada (FIEHN, 2001) Recentemente, algumas modificações nas denominações de adordagens

metabolômicas ocorreram, fazendo com que em análises de misturas complexas essas abordagens metabolômicas fossem definidas da seguinte maneira (FIEHN, 2001; WOLFENDER et al 2015):

1- "impressão digital (*fingerprinting*) metabolica": é a rápida classificação de amostras. Nesta abordagem não são realizadas grandes identificações e quantificações de metabólitos. O objetivo do presente método não é identificar os metabolitos individualmente, mas comparar padrões ou "impressões digitais" de metabolitos que se alteram em um determinado sistema.

2- "perfil metabólico ou perfil de metabólitos": centra-se na análise de um grande grupo de metabólitos relacionados a uma rota metabólica específica ou uma classe de compostos (WOLFENDER et al., 2009). Na maior parte dos casos, o perfil de metabólitos é mais direcionado do que o "*fingerprinting*", sendo desenvolvidas ferramentas analíticas especificas para a identificação dos compostos. O "perfil de metabólitos" é a abordagem mais antiga e estabelecida.

3- "análise de alvos metabólicos": foca na investigação de metabolitos que estão relacionados em rotas específicas. A proposta desta estratégia é observar as modificações metabólicas específicas que podem estar relacionadas a uma hipótese particular.

Na metabolômica quantitativa, os metabólitos são detectados e quantificados, sendo o método mais utilizado na "análise de alvos metabólicos". A metabolômica qualitativa, em que um perfil dos mesmos é determinado, é o método mais utilizado na análise de "perfil de metabólitos" (DUDLEY et al., 2010; DE VOS et al., 2007; LIN et al., 2011).

O metaboloma fornece desafios únicos que permitem a obtenção de informação sobre sistemas biológicos relacionados a metabólitos e, mais especificamente sobre o genoma funcional de organismos (DUNN; ELLIS, 2005). Os metabólitos constituem um conjunto enorme de arranjos atômicos quando comparados ao proteoma e ao transcriptoma. Isto fornece grandes variações nas propriedades químicas (massa molar, polaridade, solubilidade) e físicas (volatilidade) dos diferentes metabólitos (DUNN; ELLIS, 2005).

A metabolômica pode tirar uma "imagem instantânea" do estado fisiológico das células e sistemas, o que demonstra como o perfil metabólico de um sistema biológico complexo é alterado em resposta ao estresse como fatores adversos, alterações ambientais ou adaptação fisiológica alimentar (PATEL; AHMED, 2015; ZHANG et al , 2014; GIBBONS et al., 2015) .

Em comparação com as outras "Omicas", a metabolômica fornece um amplo alcance e ainda informação direta sobre a resposta celular integrada à alterações em ambientes internos

e externos com baixa demanda de material e preparação de amostras (FUHRER; ZAMBONI, 2015). Enquanto a metabolômica de alto rendimento foca no propósito de descobrir biomarcadores e busca mecanismos metabólicos, a metabolômica nomeada recentemente como “metabolômica de reprogramação” destaca o uso da abordagem metabolômica para fins de prevenção e tratamento da doença através de reconstituição de rotas metabólicas perturbadas (PENG et al., 2015a). Assim, a metabolômica é utilizada não só para descobrir o metaboloma das células ou organismos sob diferentes condições, mas também usada para avaliar a eficácia de reprogramação do tratamento metabólico exógeno, sendo denominados como metabolômica de descoberta e metabolômica de reprogramação, respectivamente (PENG et al., 2015b).

As análises realizadas por técnicas acopladas como GC-MS, LC-MS, LC-RMN de compostos de baixas massas molares, que na realidade são os metabólitos extraídos, principalmente de plantas, fungos e animais, estão sendo alvo crescente de pesquisas no mundo todo; apesar de ser uma área relativamente nova de pesquisa, existe uma considerável quantidade de literatura a respeito dessas técnicas de análise que podem ser denominadas por diversos pesquisadores de diversas formas, dependendo do alvo dos estudos, assim como metabolômica, estudo de perfil metabólico (*fingerprinting*), *footprinting* metabólico, análise metabonômica entre outros (FIEHN, 2002; FIEHN et al., 2000; GLASSBROOK et al., 2000; VAIDYANATHAN et al., 2001).

No perfil de metabólitos, existe uma forte necessidade de alta resolução cromatográfica. Redução nos tamanhos das particulas nas colunas cromatográficas permitem uma maior eficiência de separação e um tempo mais curto de análise (KNOX, 1977). No entanto, a grande limitação é a contrapressão gerada. Com a introdução de sistemas UPLC (cromatografia líquida de ultra performance) à pressões muito elevadas, os tempos de análise tornaram-se mais curtos, aumentou-se a capacidade de detecção, sensibilidade e reprodutibilidade (FEKETE et al, 2014).

A espectrometria de massas, em particular a ionização do tipo eletrospray em conjunto com técnicas de cromatografia líquida (LC/ESI-MS), oferece a habilidade de analisar um grande número de compostos, assim como uma excelente quantificação, reprodutibilidade e sensibilidade (SIUZDAK, 2003; LEINONEN et al., 2002; GELPI et al., 1995). A técnica de LC/ESI-MS permite a separação dos milhares de metabólitos presentes em biofluidos complexos, reduzindo a supressão de ionização por diminuição do número de analitos concorrentes entrando na fonte de íons do espectrômetro de massa de cada vez. Essa plataforma analítica pode se tornar ainda mais precisa quando combinada com a identificação

dos compostos através de seus espectros na faixa do ultravioleta (UV), gerados por um detector de arranjo de diodos (DAD) acoplado ao HPLC (GONG et al., 2008).

Atualmente, inúmeros metabólitos endógenos, tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, e açúcares são medidos rotineiramente, e hoje mais de 35 doenças, incluindo a fenilcetonúria, hiperfenilalaninemia, e doença em urina de recém-nascidos, são monitorados diretamente usando análise por ionização ESI-MS de metabólitos (LEVY, 1998; CHACE et al.,1993; 2002; NAYLOR; CHACE, 1999).

Em um experimento de metaboloma, geralmente, procura-se quantificar todos os metabólitos em um sistema celular, que pode ser definido como um tipo celular ou tecido em um determinado estado, em um determinado tempo. Uma característica importante dessas análises é que a análise metabolômica não é espécie-específica, portanto, a partir do momento em que se aperfeiçoam os parâmetros de análise, esses mesmos parâmetros serão aplicáveis a procariotos, fungos, plantas e animais (HOLLYWOOD et al., 2006).

Nos últimos anos, a metabolômica foi utilizada para investigar a homeostase metabólica em indivíduos saudáveis e também analisar as respostas metabólicas dinâmicas de sistemas biológicos aos desafios ambientais, tais como a estímulos tóxicos, modificações genéticas ou doenças (HOLLYWOOD et al., 2006) . É também possível identificar o órgão alvo da toxina e o mecanismo bioquímico da toxicidade por abordagens metabolômicas (NICHOLSON et al., 2002). .Muitos biofluidos são analisados pela abordagem metabolômica, como plasma, soro, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR), mas pode-se incluir sangue, leite, líquido seminal e saliva. A análise de urina também é útil para monitoramento de metabólitos de drogas e de doenças (CHAN; HO, 2000). Perfis metabólicos de fluidos biológicos podem refletir as variações normais e os impactos patofisiológicos da toxina ou a doença em sistemas orgânicos simples ou múltiplas (GHAURI et al., 1993).

Existem variações quantitativas e qualitativas na composição dos venenos, estas estão relacionadas a fatores como idade, sexo, tamanho do animal, dieta, distribuição geográfica e heterogeneidade genética. Essa variabilidade representa um problema para a repurificação de um determinado componente bioativo, o qual pode não ser encontrado novamente em trabalhos subsequentes, bem como para a reprodutibilidade dos ensaios biológicos com diferentes lotes de veneno. Assim, a espectrometria de massa tem gerado alguma luz sobre os parâmetros de variabilidade do veneno em escorpiões, aranhas, caramujos (“*cone snails*”), e especificamente serpentes (ESCOUBAS et al., 2008).

O estudo de metabolomas através do uso de espectrometria de massas já é realidade a alguns anos, sendo que já são encontrados na literatura alguns estudos de caracterização de compostos em venenos animais por abordagens metabolômicas. Um exemplo disso é o estudo de *fingerprinting* por LC/MS da variação biótopo-específica com marcadores diagnósticos chave do escorpião *Mesobuthus tamulus*, que é encontrado em dois biótopos distintos no estado Indiano de Maharastra (Índia) (um biótopo tropical ao nível do mar e um biótopo semi-árido a 600 metros acima do nível do mar). Os escorpiões dessas duas áreas geográficas mostraram diferenças marcantes na toxicidade e foram estudados com um equipamento MALDI-TOF/MS e cromatografia líquida de alto desempenho com coluna de fase reversa, acoplada à espectrometria de massas de “Electrospray” (LC/ESI-MS) (NEWTON et al., 2007).

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi fundamentado na caracterização bioquímica-metabólica e descoberta de novos compostos peptídicos, principalmente visando a descoberta de compostos com potencial farmacológico. Sendo assim, o presente trabalho se concentrou em torno da caracterização bioquímica dos peptídeos lineares (amplamente negligenciados) de venenos de três espécies de escorpiões: *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus*, ambos pertencente à família Buthidae. Para esta caracterização foram utilizadas estratégias de peptidômica e metabolômica, através da padronização de técnicas de sequenciamento peptídico por espectrometria de massas LC-MS e MS^n, as quais permitiram a detecção de compostos presentes em menores quantidades, ainda não descritos em trabalhos anteriores. Além disso, a utilização destas técnicas possibilitou o uso de menores quantidades de material biológico, menor quantidades de solvente e menor tempo de aquisição de dados quando comparado a técnicas convencionais.

A caracterização biológica de alguns dos novos peptídeos sequenciados foi investigada através de testes de atividade hemolítica, desgranuladora de mastócitos, liberação de lactato desidrogenase (LDH), atividade antibiótica e potenciais hiperalgésico e analgésico. Para isso, foram escolhidas e sintetizadas algumas sequencias peptídicas novas identificadas na fase anterior deste estudo.

Um segundo objetivo, foi a padronização da técnica de analise de "*footprinting*" metabolômico quali- e quantitativo com o uso de um sistema LC semi-micro /Q-TOF-MS e MSn, construindo-se inicialmente um banco de compostos de baixas massas molares, característicos de veneno de artrópodes (neurotransmissores, aminoácidos livres, poliaminas, nucleotídeos, nucleosídeos, ácidos orgânicos, etc), utilizando-se parâmetros como tempo de retenção cromatográfica, medidas da massa molar dos analitos em altaresolução, e de seus respectivos íons-fragmentos obtidos em condições de CID.

Sob o ponto de vista de formação de recursos humanos, este trabalho teve por objetivo a formação de recursos humanos altamente qualificados em técnicas de cromatografia líquida, espectrometria de massas, síntese de peptídeos e análise de atividades biológicas, que também se enquadram dentro dos objetivos maiores do programa Toxinologia Capes, Projeto Toxinologia comparativa dos escorpiões de interesse médico do Brasil.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EXTRAÇÃO DO VENENO DE ESCORPIÕES

As amostras de veneno foram adquiridas em colaboração com o Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, coordenado pela Profa. Dra. Valquíria Abrão Coronado Dorce. Cada amostra foi obtida através de extração por estímulo elétrico, utilizando animais da mesma espécie e de diversos lotes de coletas. Após a extração esses venenos foram liofilizados e mantidos em freezer -80ºC até sua utilização. As amostras foram pesadas e ressuspendidas em acetonitrila (ACN), grau HPLC, 50% (v/v) (MALLINKRODT), contendo p-metilsulfonil fluoreto (PMSF) 10mM. Para a análises peptidômicas, este material foi centrifugado em uma micro-centrífuga de alta rotação MSE (SANYO) a 8000 rpm por 10 minutos, em presença de solução de acetonitrila (ACN) (MALLINCKRODT) 50% (v/v) em água. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. O sobrenadante foi filtrado em filtro hidrofóbico de acetato-celulose 0,45 μm (MILLIPORE) e em seguida, liofilizado em liofilizador (HETO, modelo MLW - LGA 05) acoplado a um concentrador de amostras à vácuo (HETO) e mantido à -20º C até a utilização. Para as análises metabolômicas o material ressuspendido em acetonitrila 50%, contendo inibidor de proteases, foi centrifugado a 8000 rpm por 10 min com filtro amicon 3000 (MILLIPORE), após a filtragem com exclusão molecular o material foi liofilizado e mantido à -20º C até a utilização.

3.2 EXPERIMENTOS DE PEPTIDÔMICA ATRAVÉS DO SISTEMA LCMS-IT-TOF

As amostras da fração peptídica (40 μg cada) extraídas do veneno bruto foram analisadas por espectrometria de massas com a utilização de um sistema LCMS-IT-TOF, tanto para detecção de novos compostos peptídicos, quanto para o sequenciamento dos mesmos. Foi utilizado o sistema UFLC (SHIMADZU) contendo duas bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, amostrador automático SIL-20A$_{HT}$ e forno para coluna CTO-20A, acoplado diretamente (*"on-line"*) ao espectrômetro de massas. As análises cromatográficas foram realizadas sob gradiente de ACN de 5 a 90% (v/v), contendo 0,05% (v/v) de TFA por 90 min., utilizando-se uma coluna XBrigde^{TM} BEH300 C18 (2,1x100mm; 3,5 μm) (WATERS). A eluição dos componentes foi monitorada por absorbância ultravioleta a 214 nm, com fluxo de 0,2 mL/min.

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização "*electrospray"* (ESI), e analisador de massas híbrido formado pela combinação de sistemas *"ion-trap"* e *"Time-of-Flight*" (IT-TOF) (SHIMADZU). As analises foram realizadas no modo positivo (ESI+) e contínuo, durante todo o experimento O software *LCMS solution* (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200º C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5 V. O fluxo de gás secante (Nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (Nitrogênio) de 1,5 L/h. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de *m/z* 50 a 3000, com uma resolução de aproximadamente 15000.

Os experimentos de espectrometria de massas sequenciais, ou seja, espectros de fragmentação peptídica em condições de *decomposição induzida por colisão* (*CID)* (MS^2) foram realizados utilizando-se parâmetros de temperatura do CDL, interface, voltagem da agulha e do cone semelhantes aos citados anteriormente para MS. Foi utilizado argônio como gás de colisão, a uma pressão de 100 kPa. Os íons produzidos através dos experimentos MS/MS foram aprisionados e acumulados durante 50 mseg no "*trap"*, utilizando-se energia de colisão de 50% e freqüência de 30 kHz, para moléculas protonadas de carga +2 ($[M+2H]^{+2}$), + 3 ($[M+3H]^{+3}$) e assim sucessivamente.

Os espectros de massas obtidos foram analisados primeiramente com as ferramentas do software *LCMS solution* (SHIMADZU), utilizado para controle de aquisição e análise de dados. A rotina descrita por Cantú et al. (2008) foi utilizada para a interpretação dos espectros de massas obtidos. Os espectros contendo íons multiprotonados foram convertidos para a forma numérica com auxílio da função *Mass Table* do software LCMS solution, e então manualmente deconvoluídos para espectros contendo apenas íons monoprotonados, com o objetivo de simplificar a interpretação de tais espectros, possibilitando o assinalamento das sequências primárias dos peptídeos. Os cálculos realizados para a obtenção das sequências foram feitos utilizando uma tolerância de massa de 0,1 u.m.a. A distinção entre os resíduos isobáricos Leucina (L) e Isoleucina (I) foi resolvida em alguns casos através da utilização de íons das séries *d* e *w*.

3.3 INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS DE MASSAS DE PEPTÍDEOS OBTIDOS ATRAVÉS DO SISTEMA LCMS-IT-TOF

Os espectros de massas obtidos foram analisados primeiramente com as ferramentas do software *LCMS solution* (SHIMADZU), utilizado para controle de aquisição e análise de dados. A rotina descrita por Cantú et al. (2008) foi utilizada para a interpretação dos espectros de massas obtidos. Os espectros contendo íons multiprotonados foram convertidos para a forma numérica com auxílio da função *Mass Table* do software LCMS solution, e então manualmente deconvoluídos para espectros contendo apenas íons monoprotonados, com o objetivo de simplificar a interpretação de tais espectros, possibilitando o assinalamento das sequências primárias dos peptídeos. Também foram utilizados os softwares PEAKS STUDIO (PEAKS) e MASCOT DISTILLER (MATRIX SCIENCE). Os cálculos realizados para a obtenção das sequências foram feitos utilizando uma tolerância de massa de 0,1 u.m.a. A distinção entre os resíduos isobáricos Leucina (L) e Isoleucina (I) foi resolvida em alguns casos através da utilização de íons das séries *d* e *w*.

3.4 DERIVATIZAÇÃO ATRAVÉS DA ACETILAÇÃO DOS RESÍDUOS DE LISINA

A derivatização com anidrido acético tem como função distinguir os resíduos isóbaros de Lys e Gln, sendo que o resíduo C-terminal com amina livre também sofre acetilação. Nesta reação, ocorre a introdução de um grupamento acetil em um composto orgânico, no lugar de um hidrogênio das aminas primárias. Para tanto, as amostras de veneno bruto (1ug/ul) foram solubilizadas em 50% Anidrido Acético (Merck Química Brasil, 98%)/água deionizada, homogeneizada em vórtex (MARCONI-MA30) e incubada por 45 minutos a 37º C sob leve agitação. Em seguida, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas de forma *online* (LCMS), ou seja, analisando todos os compostos acetilados de maneira global conforme o método descrito no item 3.2. O resultado da reação foi o acréscimo de 42 Da à massa do resíduo de Lys.

3.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE METABOLITOS ATRAVÉS DO SISTEMA LC-microQ-TOF

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um equipamento semi-µLC-ESI-micrOToF-QIII (BRUKER DALTONICS) acoplado a um sistema de Cromatografia

Líquida Ultra Rápida (UFLC - SHIMADZU) constituído de duas bombas LC20 AD e um injetor automático SIL 20 AHT (SHIMADZU). Para as análises de cromatografia líquida foi utilizada uma coluna XBridge™ BEH130 C18 (2,1x100mm; 3,5µm). A temperatura da coluna foi mantida constante a 25 °C. O sistema semi-µLC foi conectado a um espectrômetro de massas do tipo ESI-micrOToF-QIII (BRUKER DALTONICS). As fases móveis utilizadas foram (A) H2O/HFBA (ácido heptafluorobutírico) 0,1% (v/v) e (B) ACN/HFBA 0,1% (v/v). O gradiente utilizado variou de 2 a 95% (v/v) de B em 90 minutos; o fluxo de solvente na coluna foi de 0,2 ml/min e o volume de amostra injetada foi de 2 µL.

A faixa de massas para o MS e MS/MS foi de *m/z* 50 a 650, a velocidade de aquisição utilizada foi de 1 Hz, os parâmetros da fonte foram: voltagem: 4500V, pressão do gás nebulizador :3bar, fluxo do gás secante: 8 l/min e a temperatura: 200°C. O tempo de pré-pulso foi ajustado para 4 µs. A energia de colisão utilizada foi de 8eV no modo MS, e de 15eV no modo MS/MS, sendo utilizada a aquisição simultânea dos dados de MS e MS/MS.

O espectrômetro de massas LC-ESI-micrOToF-QIII foi calibrado através de uma solução de Formiato de Sódio (10mM) no modo positivo, considerando um erro de até 5 ppm e um escore de calibração mínimo de 90%. Os dados adquiridos foram processados pelo software DataAnalysis v4.1 (BRUKER DALTONICS).

3.5.1 Análise dos dados de LC-ESI-micrOToF-QIII

Para as análises de perfil de metabólitos, os parâmetros foram alterados e analisados a fim de se obter um método único que possibilitasse a análise dos diferentes metabólitos em estudo. Para a análise de MS^1 e MS^2 foram testados os modos "auto MS^2" inicialmente. Neste caso apenas os íons mais intensos foram selecionados para a fragmentação, o que permitiu a identificação de diversos metabólitos nas amostras biológicas, porém não possibilitou a geração de íons fragmentos ao realizar o MS^2. Assim, o método bbCID (*Broadband Collision Induced Dissociation*) foi utilizado. Esse método possibilitou a detecção de uma grande quantidade de íons fragmentos nas análises das amostras biológicas e foi definido como padrão. Nesse método as análises de MS^1 e MS^2 foram realizadas simultaneamente no equipamento Q-Tof (BRUKER). Uma vez que os espectros de MS^1 e MS^2 foram adquiridos constantemente em todos os picos cromatográficos, houve menos perda de informações espectrais importantes. Esse método possibilitou a detecção de uma grande quantidade de íons fragmentos nas análises das amostras biológicas e foi definido como padrão.

3.5.2 Construção de uma biblioteca de metabolitos

A construção da biblioteca iniciou-se com a separação dos padrões de interesse para as análises. Os compostos utilizados foram os seguintes: 1,3-diamianopropano; 2-feniletilamina; ácido ascórbico; ácido aspártico; ácido caféico; ácido cistéico; ácido glutâmico; ácido 3,4-di-hidroxifenilacético; ácido caínico; ácido maléico; adenosina difosfato; adenina; adenosina monofosfato cíclica; adenosina 5-monofosfato; adenosina; alanina; arginina; asparagina; betaína; cadaverina; citosina; dopamina; epinefrina; espermidina; espermina; fenilalanina; gaba; glicina; glicose; glutamina; guanosina; guanosina difosfato; guanosina monofosfato; guanosina trifosfato; hidroxitripargina; histamina; hydroxyprolina; isoleucina; leucina; lisina; manose; metionina; nicotina; octapamina; polibiosideo; prolina; putrescina; sacarose; serina; taurina; timina; tiramina; tirosina; treonina;tripargina; triptofano; uracila; uridina e valina. Esses compostos foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

Para a construção da biblioteca e análise dos dados referente os compostos foram necessários basicamente algoritimos da Compass^{TM} (BRUKER DALTONICS): QuantAnalysis v2.1 e o DataAnalysis v4.1. Para o armazenamento dos dados foi necessária a utilização do algoritmo Microsoft Excel v.14 (MICROSOFT 2010).

O QuantAnalysis v2.1 é uma ferramenta dedicada a quantificação por MS^1 e MS^2. O software permite uma análise dinâmica dos dados de cromatograma, espectro de massas e a construção de curvas de calibração para uma quantificação precisa e rápida. O processo de quantificação consistiu na aquisição de dados de LC-MS/MS para os diferentes compostos que fazem parte da biblioteca. Esses compostos foram analisados separadamente, em quatro concentrações diferentes (0,015 µg/µL, 0,03 µg/µL, 0,06 µg/µL e 0,125 µg/µL), permitindo a construção de uma curva de calibração para cada composto. A partir dessa curva foi obtida a equação da reta, e o coeficiente (R) para cada padrão da biblioteca.

O DataAnalysis v4.1 (BRUKER DALTONICS) é um software de visualização e processamento de dados de LC-MS. A partir desse software foram obtidos os valores dos parâmetros utilizados para a construção da biblioteca, tais como o tempo de retenção de cada analito, o valor de *m/z* da molécula protonada de cada composto, as áreas dos picos cromatográficos de cada metabólito (que foram padronizadas com compostos sintéticos na forma de padrão primário), e os íons fragmentos mais importantes gerados para cada composto no modo MS^2. Além disso, os dados obtidos por espectrometria de alta resolução

foram utilizados para a determinação da fórmula molecular de cada composto da biblioteca e nas amostras.

3.5.3 Identificação dos metabólitos em amostras de venenos de escorpião

Após a padronização da metodologia de separação e identificação dos compostos de baixa massa molar, iniciou-se a identificação dos compostos de baixa massa molar presente nos venenos de *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. obscurus* através da utilização do software TargetAnalysis v1.3 (BRUKER DALTONICS). Para essas análises 30ug de cada veneno extraídos de acordo com o ítem 3.1 foram utilizadas.

A validação da presença dos compostos nas amostras é baseada na medida de relação massa/carga exata (de alta resolução), tempo de retenção, presença de íons qualificadores (íons fragmento) e padrão isotópico. O software TargetAnalysis calcula a massa exata de cada um dos compostos presentes na biblioteca na forma $[M+H]^+$.

O software TargetAnalysis ainda apresenta um valor de mSigma, o qual é calculado com base na correlação existente entre o padrão monoisotópico teórico e aquele medido experimentalmente no íon de interesse, o qual fornecem uma validação extra através de um escore para a presença do composto alvo.

Os desvios entre os valores dos parâmetros utilizados para validação, por exemplo variações de tempo e *m/z*, e também a presença de íons qualificadores fornecem a contagem de confiabilidade (escore) para a presença do composto alvo.

Após o término das buscas no TargetAnalysis (BRUKER DALTONICS) os resultados foram exportados para o Microsoft Excel v.14 (MICROSOFT 2010), e os resultados das buscas foram organizados em Tabelas. Todos os resultados obtidos foram checados manualmente através da verificação dos dados de espectrometria de massas e cromatografia, utilizando-se o software DataAnalysis (BRUKER DALTONICS). Posteriormente, foram realizados os cálculos dos valores quantitativos de cada composto, que foram expressos em µg do composto/ug de veneno.

Para a realização das buscas no TargetAnalysis os seguintes parâmetros foram configurados: variação no tempo de retenção de 1 minuto; tolerância de 20 mDa entre os valores de *m/z* teóricos e esperados para as moléculas na forma monoprotonada e limite da relação sinal/ruído 3:1, valor de tolerância de massa subcrítico 10mDa, tolerância de massa critico 20mDa, valor de mSigma subcrítico 50, valor de mSigma crítico 1000.

Além da calibração inicial do equipamento, também foi utilizado 20uL de formiato de sódio (10mM) como calibrante interno no tempo de retenção entre 88.2 – 88.5min dos cromatogramas.

3.6 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

A síntese dos peptídeos lineares (Tabela 1) utilizados para os bioensaios foram sintetizados no sintetizador automático mod. Prelude (PROTEIN TECHNOLOGIES INC., USA), através do método de síntese em fase sólida (MERRIFIELD, 1986), utilizando-se N-9-fluorenilmetoxicarbonil, também conhecida como estratégia Fmoc.

TABELA 1: Sequências dos peptídeos sintetizados provenientes do veneno de escorpião

NOME	SEQUÊNCIA
TyPep-1	AEIDFSGIPEDIIKQI-OH
TyPep-2	GCDALLSGDHGGLLSANGC-OH
TyPep-3	LIPNDQLRSI-OH
TyPep-4	NIALGQDQSGR-NH2
TyPep-5	DEGPKSDCKP-OH
TyPep-6	KIKEKLIEA-OH
TyPep-7	WPNKIEPGK-OH
TyPep-8	KETNAKPPA-OH
TyPep-9	IPEDIIKK-OH
TyPep-10	KIITPPIR-OH
TyPep-11	KPVEPVG-OH
TyPep-12	SESNTCG-OH
TyPep-13	NAKPPA-OH

Fonte: Dados da pesquisa

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se 100 mg de resina NovaSyn TGR, com grau de substituição de 0,2 mmol e/g. Em cada ciclo da síntese foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM), contendo N-Hidroxibenzotriazol (HOBt.H_2O, NOVABIOCHEM) e N-Metilmorfolina (NNM, ALDRICH) como agentes ativadores dos aminoácidos e Hexafluorofosfato Benzoitriazol-1-i1-oxi-tris-pirrolidino-fosfinio (PyBOP, NOVABIOCHEM) como agente acoplante, por um período de 30 minutos. Após cada ciclo de acoplamento foram realizadas cinco lavagens da resina com N-N-Dimetilformamida (DMF, SIGMA). A retirada do Fmoc foi realizada utilizando-se Piperidina (SIGMA) 30% (v/v) em DMF.

Todas as reações foram realizadas sob agitação mecânica em capela de segurança. Após a acoplagem do último resíduo de aminoácido, a resina foi lavada com metanol (MALLINCKRODT) e seca em liofilizador (HETO, modelo MLW – LGA 05). Após a secagem, foi feita a clivagem entre peptídeo/resina utilizando-se uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 82,5% (v/v) (MALLINCKRODT), Anisol 5% (v/v) (SIGMA), Etanoditiol 2,5% (v/v) (ALDRICH), Fenol 5% (m/v) e água ultrapurificada 5% (v/v), durante 2 horas sob agitação mecânica. Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-Peptídeo foi filtrada para a retirada da resina e centrifugada a 4º C (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico (SYNTH). O material sedimentado foi então re-suspendido em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada MilliQ Advantage A10 (MILLIPORE) para então ser purificado através de cromatografia líquida. O controle de qualidade foi feito por analises de espectrometria de massas (ESI-MS). O rendimento da síntese de cada peptídeo foi de aproximadamente 30%.

3.7 PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A purificação dos peptídeos provenientes da síntese manual foi feita através de cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (RP-HPLC, *Reversed-phase High Performance Liquid chromatrography*) utilizando um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-8A, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-20A, constituído por duas bombas LC-8A (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com *"loop"* de 2 mL, um sistema controlador Shimadzu (modelo SCL 10Avp) e coluna preparativa Shimpack C-18 PREP-ODS(K) 30 x 250 mm (SHIMADZU). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, sendo **A**: água, contendo 0,1% TFA (v/v); e **B**: ACN (MALLINCKRODT) contendo 0,1% TFA (v/v). O fluxo do solvente para todos os peptídeos foi de 10mL/min. Para todos os peptídeos foi utilizada uma eluição isocrática com fase móvel constituída de 20% B.

As frações coletadas, correspondendo ao pico de absorbância, foram reunidas e parcialmente evaporadas em equipamento Rotavapor, sendo que o material restante foi seco em Speed-vac e pesado.

3.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.8.1 Atividade Hemolítica

Os experimentos de atividade hemolítica foram realizados segundo método descrito por De Souza (2006), com algumas modificações e número de repetições de n=5.

Foram adicionados cerca de 500 µL de sangue extraído da cauda de ratos Wistars fêmeas em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85%, $CaCl_2$ 10 mM) sob leve agitação por 15 minutos, em agitador magnético (MA-089 MARCONI).

A suspensão de eritrócitos foi centrifugada em presença de solução salina, em uma centrífuga clínica (Z-200A HERMLE) a 3000 rpm durante 15 minutos para lavagem das células. Esta operação foi repetida por mais duas vezes.

O sobrenadante da última centrifugação foi descartado e o concentrado de hemácias obtido ao final das centrifugações foi considerado como sendo 100% de células. Foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 4% diluindo-se a suspensão concentrada descrita acima, com solução salina isotônica. Essa suspensão a 4% foi utilizada nos testes de atividade hemolítica.

Foram montadas baterias de ensaios em microplacas (COSTAR), onde cada orifício foi preenchido com os diferentes peptídeos, solubilizados em solução salina. A cada orifício foram adicionados 90 µL da suspensão de eritrócitos perfazendo um volume final de 100 µL. Para o controle de 0% de hemólise foram adicionados 10 µL de solução salina a 90 µL da suspensão de eritrócitos; para o controle de 100% de hemólise, foram adicionados apenas 10 µL de solução salina acrescida de 1% (v/v) de Triton X-100 (SIGMA) a 90 µL de suspensão de eritrócitos.

Cada placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas sob agitação. Após este período de incubação, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm em uma centrífuga Compacta Avanti 30 (BECKMAN). O sobrenadante de cada preparação foi utilizado para a montagem de uma nova placa, para realização das leituras de absorbância (540 nm) em uma leitora de microplacas (VERSAmax Tunable Microplate Reader).

3.8.2 Desgranulação de Mastócitos

Os testes de desgranulação de mastócitos foram feitos segundo metodologia de Hide et al. (1993) com algumas modificações e número de repetições de n=5. Foram testados os três peptídeos nas concentrações variando de $3x10^{-4}$ a $5x10^{-1}$ µg/µL em triplicata e utilizou-se o

peptídeo HR1 como peptídeo padrão para desgranulação (TUICHIBAEV et al., 1988), também nas mesmas concentrações.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Foram preparadas as seguintes soluções para a realização dos testes de desgranulação de mastócitos:

Solução MCM-1 (*mast cell medium*)

Para 100 mL de solução MCM-1, foram colocados 0,877 g de NaCl (MERCK), 0,028 g de KCl (MERCK), 0,043 g de NaH_2PO_4 (SYNTH), 0,048 g de KH_2PO_4 (SYNTH), 0,10 g de glicose (SYNTH), 0,10 g de BSA (SIGMA), 90 μL de $CaCl_2$ (1M) (VETEC) e 100 mL água mili Q.

Solução MCM-2

Para a solução MCM-2 utilizou-se 100 mL de MCM-1 e 50 μL de Liquemine (Heparina Sódica 5000 UI/0, ROCHE).

Solução SH

Dissolveu-se 0,588 g de Citrato trissódico (MERCK) em 10 mL de água bidestilada. O pH foi ajustado para 4,5 com solução de HCl (1M) (SYNTH). A 10 mL desta solução de citrato trissódico (pH 4,5), foram adicionados 0,0034 g de p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminidina (SIGMA).

ISOLAMENTO DOS MASTÓCITOS

Os ratos Wistar fêmeas foram anestesiados com 300 μL de solução 1/1 dos anestésicos Quetamina e Xilasina, aplicado via subcutânea, e em seguida decapitados para retirada do sangue. Foi feito um corte longitudinal no abdômen para expor a cavidade peritonial. Os órgãos foram afastados e fez-se a lavagem desta cavidade com 20 mL de solução MCM-2, para se extrair o fluído contendo os mastócitos em suspensão. Este fluído foi coletado com auxílio de uma seringa e armazenado em banho de gelo. Repetiu-se este procedimento por três vezes.

O fluído peritonial foi centrifugado à velocidade de 100 g por 5 min, a 4º C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento de células foi ressuspendido em 2 mL de MCM-1 e centrifugado novamente sob as mesmas condições. O sobrenadante foi novamente retirado e ressuspendido em 2 mL de MCM-1. Esta suspensão de células foi utilizada para o ensaio de desgranulação de mastócitos.

Foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer com auxílio de uma solução corante 0,05% (v/v) de cristal violeta em HCl (3,6 M). Ajustou-se a concentração para 4,5 x 10^5 células/mL.

ENSAIO DE DESGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS

Preparou-se microplacas (COSTAR) colocando-se 90 μL da suspensão de mastócitos e 10 μL das soluções com diferentes concentrações de cada peptídeo. Para o valor de referência "zero%" de desgranulação foram adicionados 10 μL de água bidestilada e 90 μL da suspensão de mastócitos, para que a diluição do fluído peritonial fosse a mesma em toda a placa. Para o valor de referência "100%" de desgranulação adicionou-se 10 μL de água bidestilada contendo Triton X-100 1% (v/v) e 90 μL da suspensão de mastócitos.

Esta microplaca foi incubada por 15 min a 37º C em banho-maria para que houvesse o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Passado esse tempo, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado a 1000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante removido e utilizado na sequência das análises.

Com os sobrenadantes, montou-se uma nova placa, com cada orifício contendo 50 μL de sobrenadante e 50 μL de SH. Esta placa foi incubada por 6 horas, a 37º C.

Após a incubação, descartou-se 50 μL de cada orifício e acrescentou-se 150 μL de solução Tris 0,2 M (SIGMA). A medida de desgranulação foi feita através da leitura de absorbância a 405 nm, em leitora de placas (VERSAmax Tunable Microplate Reader).

3.8.3 Atividade de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)

Essa atividade mede a liberação da lactato desidrogenase dos mastócitos, para o meio extracelular, como indicador de lise dos mastócitos pelo peptídeo. A LDH é uma enzima citoplasmática, que catalisa a redução reversível do piruvato a lactato, utilizando NADH como coenzima. A atividade de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos extraídos

da cavidade peritoneal de ratos Wistar, como descrito para os ensaios de desgranulação e número de repetições de n=5. Incubou-se 20 μL do sobrenadante da suspensão de mastócitos com 800 μL de tampão UV-LDH [Reagente 1 (TRIS 50 mM pH 7,4, ácido pirúvico 1,2 mM, EDTA 5 mM) 80% (v/v). Reagente 2 (NADH 0,18 mM) 20% (v/v)] por 5 minutos a 25°C. Após esse período, a cinética de consumo do substrato NADH foi monitorada pela medida do decréscimo da absorbância a 340 nm, durante 10 minutos a 25°C. Os resultados foram inicialmente calculados como unidades catalíticas (micromols de NADH consumidos por min. a 25°C, pH 7,4). Esses valores foram convertidos em atividade relativa, através da atividade de LDH total (100%) da suspensão de mastócitos lisados, na presença de Triton X-100 0,1% (v/v).

3.8.4 Prova de Sensibilidade Bacteriana (MIC)

Os testes para verificação de atividade antimicrobiana dos peptídeos foram realizados através da determinação da concentração inibitório mínima (MIC). Os experimentos foram montados em micro-placas de 96 canais e a visualização dos resultados foi feita utilizando-se o cromóforo cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) (MALLINCKRODT), segundo metodologia descrita por Coyle et al. (2003) e Meletiadis et al. (2000).

Os peptídeos foram testados contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 117333), *Enterobacter aerogines* (CCT 2572) e *Escherichia coli* (ATCC 1457), obtidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais – C.E.I.S. (IBRC/UNESP). Foram utilizados: meio de cultivo Müller-Hinton (DIFCO), meio de cultivo Müller-Hinton Broth (DIFCO) para manutenção e cultivo desses microrganismos. Toda a manipulação dos microrganismos foi feita em câmara de fluxo laminar vertical (PACHANE) e todo material utilizado no cultivo foi esterilizado em autoclave vertical AV30 (PHOENIX), por 20 minutos à 121 ºC e 1 atm.

Para a realização do experimento, os inóculos foram preparados em solução salina (NaCl 0,9%) à partir de colônias novas (colônias de 18 horas). A concentração desses inóculos foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland. Foram adicionados 200 μL de inóculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido, sendo essa suspensão utilizada para a montagem das micro-placas.

Em cada orifício da placa foram colocados 10 μL de solução de peptídeo (diluído em água esterilizada em diferentes concentrações), 50 μL da suspensão de inóculo e 40 μL de meio Müller-Hinton líquido.

Para o valor de referência zero, foram colocados 90 μL de meio Müller-Hinton líquido e 10 μL de água esterilizada. Para o valor de referência 100%, foram colocados 10 μL de água e 50 μL da suspensão de inóculo e 40 μL de meio Müller-Hinton líquido. Foi montada uma placa para cada espécie de microrganismo mencionado acima. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 34º C, por 18 horas. Após este período, acrescentou-se a cada orifício 10 μL de TTC 0,5% (m/v) em água estilizada. As leituras foram realizadas após 3 horas de re-incubação das placas em estufa a 34º C.

3.9 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS RELACIONADAS À DOR E INFLAMAÇÃO

3.9.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando entre 18-21g fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica do Centro de Estudos de Insetos Sociais da Unesp, Campus de Rio Claro-SP. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada com temperatura ambiente de 20 ± 3º C e ciclo claro/escuro (12:12 h), por um período de 1 a 3 dias antes dependendo do experimento. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animal (CEUA – IB – UNESP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Rio Claro, Decisão CEUA 13/2014.

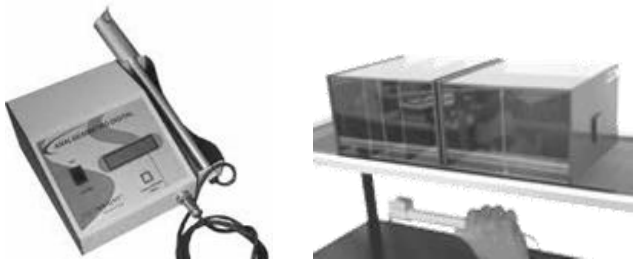
3.9.2. Avaliação da sensibilidade dolorosa

Os animais foram submetidos, para avaliação da sensibilidade dolorosa, ao teste do von Frey eletrônico (Insight Equipamentos Ltda.) (Figura 5A). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas (Figura 5B). Foi realizada uma medida eletrônica de pressão utilizando um transdutor de pressão ligado por um cabo a um contador digital de força (em gramas). A precisão do aparelho é de 0,1g, mantida até a força de 80g e calibrado para força máxima de 150g. O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado utilizando-se uma ponteira descartável de polipropileno adaptada. A indução da flexão dorsal da articulação tíbio-társica, seguida da retirada da pata, foi feita através da aplicação de uma força perpendicular crescente aplicada na área central da

superfície plantar do membro posterior dos animais. Os resultados são registrados como uma medida eletrônica de pressão captada automaticamente no momento do levantamento do membro, mostrando a intensidade da força aplicada. O teste foi repetido até que se obtivessem três medidas subsequentes, de tal forma que a variação entre as medidas não fossem superiores a 1g. Como controle positivo foi utilizado a carragenina. As medidas foram realizadas no tempo zero (antes das aplicações de salina e peptídeos) e nos tempos 60, 180 e 300 minutos após a administração, via intraplantar, dos peptídeos (25 μg em 25 μL) e salina 25 μL (0,9% NaCl), sendo este último o controle negativo.

Figura 5: Instrumentação utilizada para os ensaios de dor e inflamação.

A **B**

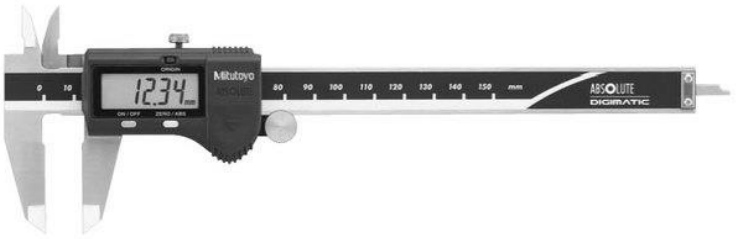


Legenda: (A) Foto do equipamento Von Frey eletrônico (Insight Equimpamentos Ltda.) e (B) figura mostrando a medida da pressão aplicada à pata dos camundongos.
Fonte: http://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item_id=562_cat_id=5_Electronic%20Von%20Frey.php. Acesso em: 17/02/2016.

3.9.3 Edema de pata

O efeito edematogênico foi avaliado através da aplicação intraplantar (em uma das patas) de peptídeos (25μg em 25 μL de salina), carragenina 1% (25 μL), ou salina (controles, 25 μL). Os dados foram tomados nos tempos zero (antes das injeções dos peptídeos ou carragenina) e nos tempos 60, 180 e 300 min após a injeção, utilizando um Paquímetro digital (Figura 6) de especificação 0-150X0,01 mm (modelo CD-6’’CSX-B, MITUTOYO SUL AMERICANA LTDA).

Figura 6: Paquímetro digital utilizado para as medidas de volume de pata nos camundongos



Fonte: http://www.brusfer.com.br/products/paquimetro-digital-mitutoyo-cd-6-150mm. Acesso em : 17/02/2016.

O aumento percentual do volume das patas foi calculado através da expressão:

$A\ (\%) = (Vf - Vi) \times 100 / Vi$

Onde: *A (%)* = aumento percentual do volume da pata;

Vi = volume inicial da pata;

Vf = volume da pata após a injeção dos peptídeos, carragenina ou salina.

O resultado final foi obtido subtraindo-se os valores controles (animais injetados com salina) dos valores testes (animais injetados com os peptídeos).

3.9.4 Avaliação da atividade geral dos animais analisada no modelo do Campo Aberto

Para a avaliação da atividade geral dos ratos foi utilizado o método do Campo Aberto (BROADHURST, 1960). A avaliação da atividade geral foi realizada através da administração intraperitoneal (i.p.) dos peptídeos (10mg/Kg), comparando os resultados obtidos com o grupo controle constituídos por animais que receberam salina.

O campo aberto para camundongos é uma arena de cartolina plastificada com formato cilíndrico de 40 cm de altura e base de 40 cm de diâmetro. A base da arena é subdividida em 25 regiões aproximadamente iguais, demarcadas por 3 circunferências concêntricas, intersectadas por segmentos de retas radiais.

A avaliação da atividade geral dos animais foi determinada por dois parâmetros:

1) Frequência de Locomoção (LO): cada unidade de medida correspondente ao ato de o animal penetrar, com as 4 patas, em uma das divisões da arena.

2) Frequência de Levantamento (LE): cada unidade de medida correspondente à postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores.

Após 15 minutos da injeção i.p., os animais foram colocados, individualmente, no centro da arena para e foram realizadas as medidas de LO e LE, por um período de três minutos. A cada troca de animal foi realizada a higienização da arena utilizando-se álcool 5%.

Os animais foram devidamente acondicionados na sala de experimentação um dia antes do experimento para a habituação, com água e ração *ad libitum*, ciclo claro/escuro (12:12h) e temperatura a 20±3°C.

3.9.5 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média ± SEM. Os dados foram estatisticamente examinados utilizando ANOVA de duas vias (itens 3.12.2 e 3.12.3) ou de uma via (item 3.12.4), seguida por meio de análise de variância associada ao teste de Tukey ($p< 0,05$) (KLEINBAUM et al., 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta tese foram divididos em três partes:

PARTE I:

4.1 PEPTIDÔMICA

4.1.1 Análises de variabilidade peptídica

4.1.2 Sequenciamento de peptídeos encontrados nos venenos

PARTE II:

4.2 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

4.3 RESULTADOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 Hemólise

4.3.2 Desgranulação de mastócitos

4.3.3 Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

4.3.4 Antibiose

4.3.5 Atividades Farmacológias de Dor e Inflamação

4.3.6 Avaliação da atividade geral de camundongos por campo aberto após injeção dos peptídeos sintéticos de escorpião

PARTE III:

4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE METABÓLITOS DOS VENENOS

4.4.1 Efeito do ácido Heptafluorobutírico (HFBA) no tempo de retenção de compostos polares: a cromatografia de par iônico (IPC) em fase reversa C18

4.4.2 Construção da biblioteca de metabólitos

4.4.3 Identificação dos compostos em venenos de escorpião do gênero Buthidae

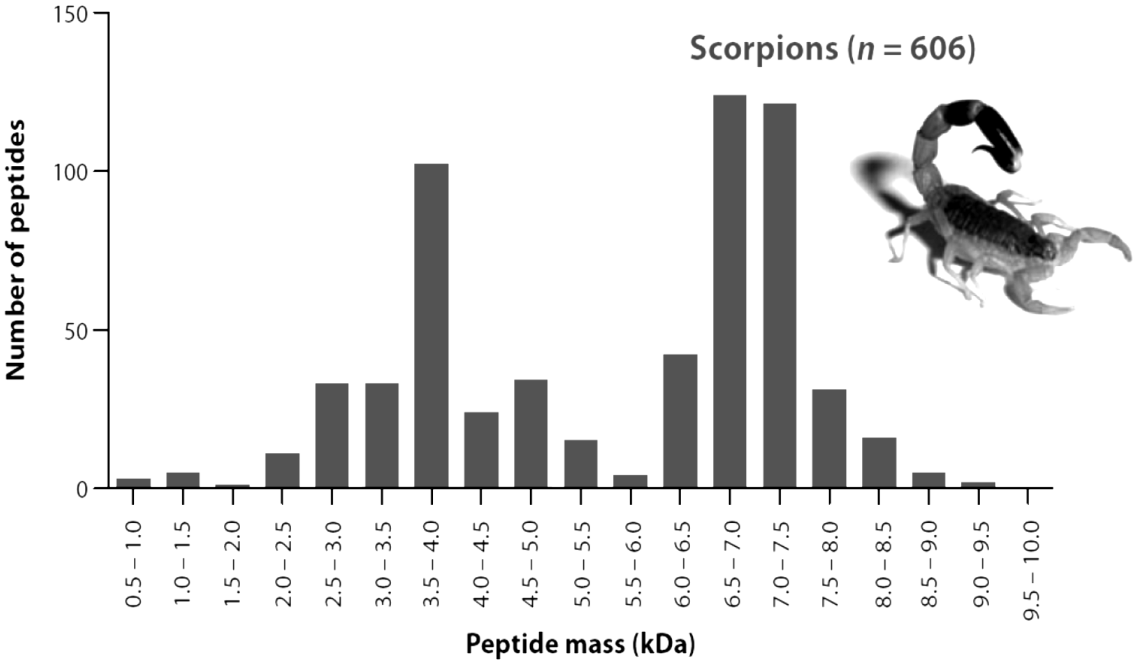
PARTE I

4.1 PEPTIDÔMICA

4.1.1 Análises de variabilidade peptídica

Existe um número considerável de toxinas de escorpiões do mundo inteiro depositadas em bancos de dados (Figura 7). Quando os dados depositados no banco Uniprot (http://www.uniprot.org/) são analisados, observa-se cerca de 360 depósitos de proteínas e peptídeos (todos entre 7 e 863 aminoácidos) somente isolados de escorpiões, sendo que 104 são provenientes de *T. serrulatus*, 75 de *T. bahiensis* e 33 de *T. obscurus*. Apesar de várias toxinas serem isoladas e descritas a partir de venenos de escorpiões, apenas poucos peptideos entre 500 e 3.000Da foram descritos em todas as espécies de forma geral (Figura 7), sendo que somente 30 peptídeos das espécies *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. obscurus* que estão nesta faixa de massa foram descritos (Tabela 2).

Figura 7: Distribuição em massa de peptídeos de venenos de escorpiões



Legenda: Dados foram calculados a partir do UniProt (http://www.uniprot.org/). Bases de dados foram acessados em 26 de março de 2012, e classificados em intervalos de 500 Da.
Fonte: Adaptado de KING; HARDY, 2013.

Tabela 2: Peptídeos de venenos de escorpiões do gênero *Tityus sp*

CÒDIGO DE ACESSO	ACESSO NO UNIPROT	NOME DO PEPTÍDEO	ESPÉCIE	Nº AA
P56610	SCX4_TITBA	Toxin Tb4	*T. bahiensis* (Brazilian scorpion)	19
P86827	NDB4U_TITSE	Venom peptide 6	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	7
P86828	NDB4V_TITSE	Venom peptide 7	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	8
P86826	NDB4T_TITSE	Venom peptide 3	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	9
C0HJJ9	TS20_TITSE	Peptide Ts20	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	10
Q9TWR4	NDB11_TITSE	Bradykinin-potentiating peptide T	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	13
P86825	NDB4S_TITSE	Venom peptide 1	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	13
P86824	HYTL_TITSE	Hypotensin-like peptide	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	14
P0DMD6	TSNP_TITSE	Natriuretic peptide TsNP	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	21
P84190	NDBH2_TITSE	Hypotensin-2	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	25
P84189	NDBH1_TITSE	Hypotensin-1	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	25
P86271	KA20_TITSE	Toxin Ts16	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	29
P0C176	SCKP3_TITSE	Peptide TsPep3	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	29
P0C174	SCKP1_TITSE	Peptide TsPep1	*T. serrulatus* (Brazilian scorpion)	29
P84677	SC29_TITOB	Toxin To29	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	8
P84678	SC31_TITOB	Toxin To31	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	8
P84683	SC40_TITOB	Toxin To40	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	9
P84676	SC27_TITOB	Toxin To27	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84679	SC33_TITOB	Toxin To33	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84684	SC41_TITOB	Toxin To41	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84682	SC39_TITOB	Toxin To39	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84680	SC35_TITOB	Toxin To35	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84686	SC46_TITOB	Toxin To46	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84689	SC56_TITOB	Toxin To56	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84681	SC37_TITOB	Toxin To37	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84690	SC58_TITOB	Toxin To58	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84692	SC64_TITOB	Toxin To64	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84691	SC61_TITOB	Toxin To61	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P84694	SC83_TITOB	Toxin To83	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	10
P83243	KA131_TITOB	Potassium channel toxin alpha-KTx 1...	*T. obscurus* (Amazonian scorpion) (*Tityus cambridgei*)	23

Legenda: Peptídeos de venenos de escorpiões do gênero *Tityus sp*.de massas molares até 3000Da (sequencia máxima de 29 resíduos de aminácidos) já depositados no UNIPROT. Dados coletados do Uniprot: (http://www.uniprot.org/). O banco de dados foi acessado em 08 de Dezembro de 2015.
Fonte: Dados da pesquisa.

Os estudos realizados anteriormente com peptídeos presentes nos venenos de escorpiões demonstraram a eficácia no isolamento de toxinas do veneno, porém em sua maior parte, os peptídeos menores foram negligenciados pela abordagem realizada com extração em solução aquosa, uma vez que através de utilização de soluções tampões muitos peptídeos lineares menores são descartados. Assim, o presente estudo teve início com a solubilização do

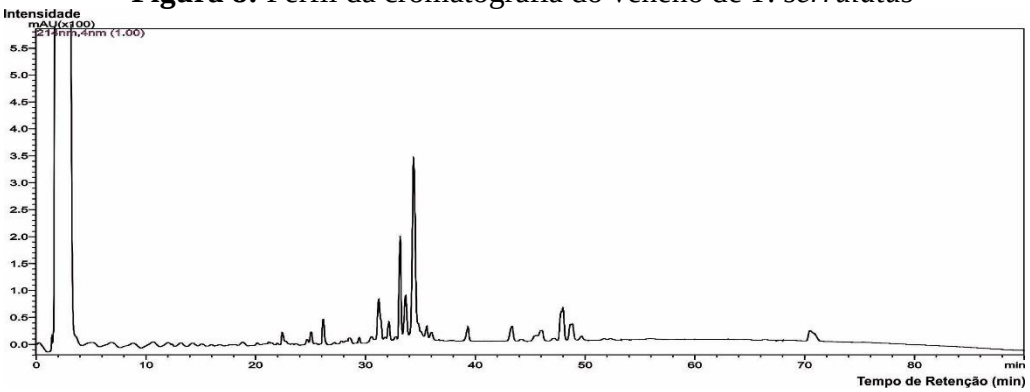
veneno bruto em acetonitrila 50% (v/v), a fim de isolar os peptídeos menores, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos.

Inicialmente neste trabalho, foram realizados vários experimentos para verificar as melhores condições cromatográficas, para se fazer uma varredura cromatográfica ampla dos peptídeos presentes na porção peptídica do veneno das três espécies de escorpião em estudo, sendo que o gradiente de 5 a 90% (v/v) ACN durante 90 minutos foi o que apresentou melhor separação cromatográfica, tanto no cromatograma UV quanto no cromatograma de íons totais *("Total Ion Cromatogram" = TIC)*. Além disso, a boa qualidade dos cromatogramas foi fundamental para que as análises de amostras diferentes pudessem ser comparadas entre si, principalmente para estabelecer as frações cromatográficas características do veneno e as principais diferenças entre as amostras.

Foi desenvolvido um "cromatograma controle" (branco), nas mesmas condições da amostra, onde se injetou apenas o solvente das amostras, o qual foi descontado das analises. Em paralelo a porção peptídica do veneno foi injetada, onde foram otimizadas as condições de ionização, "aprisionamento" dos íons formados (*traping*) e de otimização das condições de dissociação induzida por colisão (*CID*) em baixas energias, de maneira a se conseguir séries completas de íon-fragmentos dos tipos *b* e/ou *y*, a fim de facilitar o sequencimento dos peptídeos sob investigação.

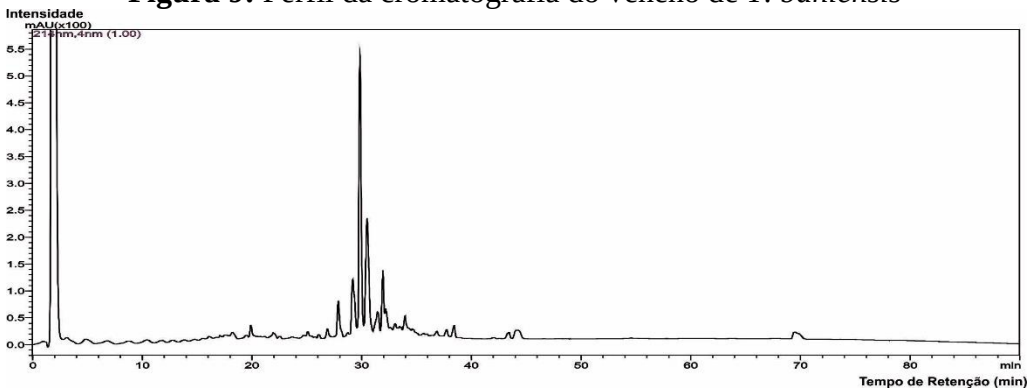
Primeiramente, foram analisados os cromatogramas dos três diferentes venenos que foram realizados em triplicata. Estas amostras correspondem somente às porções peptídicas dos três venenos estudados (40 µg/amostra) extraídos na presença de ACN 50% (v/v). Os cromatogramas estão representados nas figuras de 8 a 10, para as espécies de *T. serrulatus, T. bahiensis* e *T. obscurus,* respectivamente.

Figura 8: Perfil da cromatografia do veneno de *T. serrulatus*



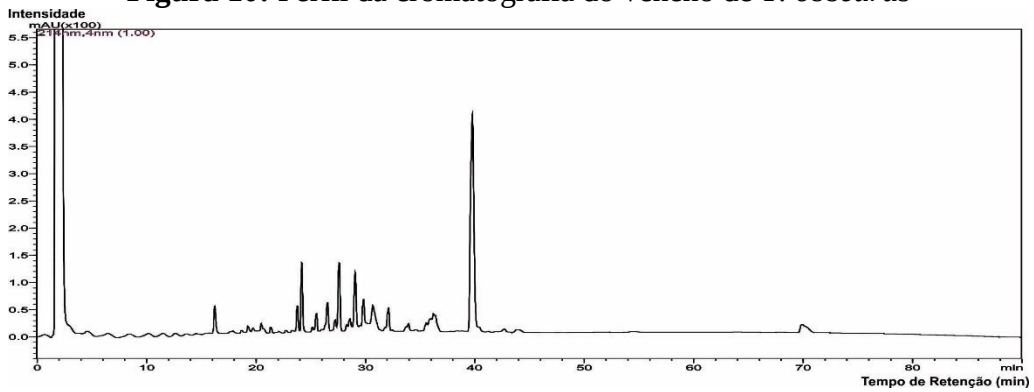
Legenda: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra de veneno de *T. serrulatus* (40 µg), obtido em coluna XBrigdeTM BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 9: Perfil da cromatografia do veneno de *T. bahiensis*



Legenda: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra de veneno de *T. bahiensis* (40 µg), obtido em coluna XBrigdeTM BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 10: Perfil da cromatografia do veneno de *T. obscurus*



Legenda: Perfil da cromatografia de fase reversa da amostra de veneno de *T. obscurus* (40 µg), obtido em coluna XBrigde^{TM} BEH300 C18(2,1x100 mm), sob gradiente de 5 a 90% ACN (v/v) [contendo TFA 0,05% (V/V)], com fluxo de 0,2 mL/min.
Fonte: Dados da pesquisa.

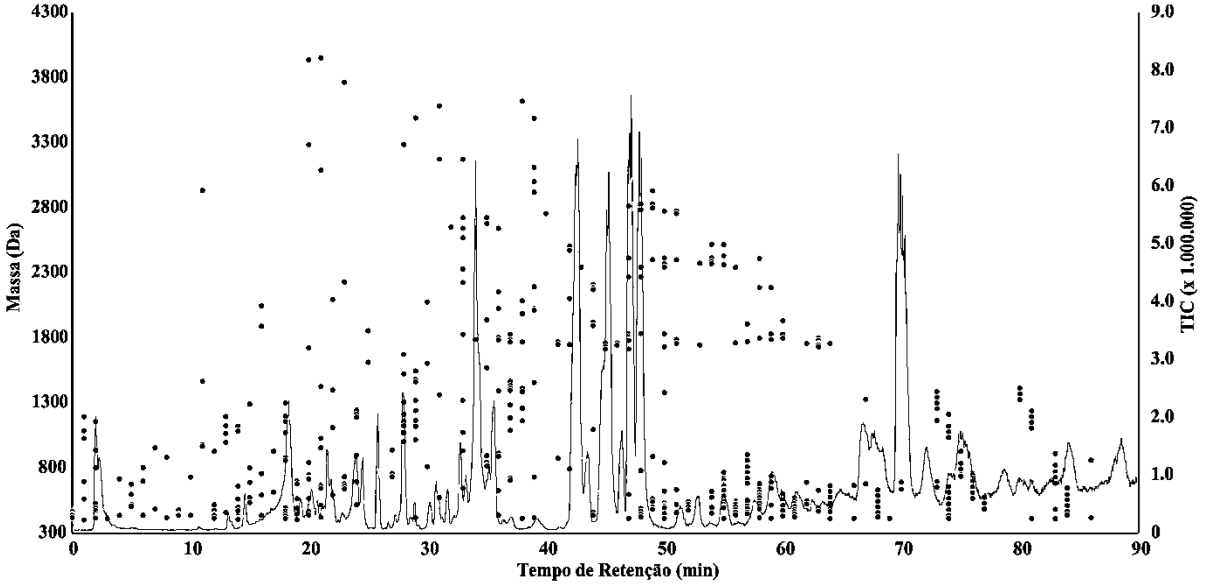
Os cromatogramas apresentaram várias diferenças quando comparados entre si. Para que fosse possível detectar os compostos menos abundantes nos venenos, foram comparados os Cromatogramas de Íons Totais (*TIC*).

Para identificação das diferentes massas molares presentes em cada amostra, os cromatogramas de massas foram analisados minuto a minuto (considerado como uma janela analítica individual). A utilização de ionização ESI gera íons de múltiplas cargas, que são ainda mais favorecidas pelo uso de analisador IT, tornando relativamente laboriosa a tarefa de identificar cada peptídeo presente, em cada janela de tempo. Este procedimento de busca dos compostos peptídicos em uma janela de tempo, foi realizado manualmente pela falta de um software específico para tal tipo de análise, e também para que não houvesse dúvidas quanto à deconvolução dos espectros de cada íon; somente aqueles íons que apresentaram envelope de picos com resolução monoisotópica é que foram considerados nas análises. Considerou-se compostos diferentes aqueles que, dentro de cada janela de tempo, apresentaram valor de massa molar diferindo em pelo menos 1 Da.

Esta forma de análise também foi realizada por Davis e colaboradores (2009), onde a diversidade peptídica de diferentes indivíduos da mesma espécie, e entre espécies diferentes de animais do gênero Conus foi estudada. Também foi realizado um estudo bem semelhante com o veneno de vespas da espécie *Polybia paulista*, sendo que as análises foram realizadas com vespas de ninhos diferentes e com vespas do mesmo ninho em épocas do ano diferentes (DIAS et al, 2015).

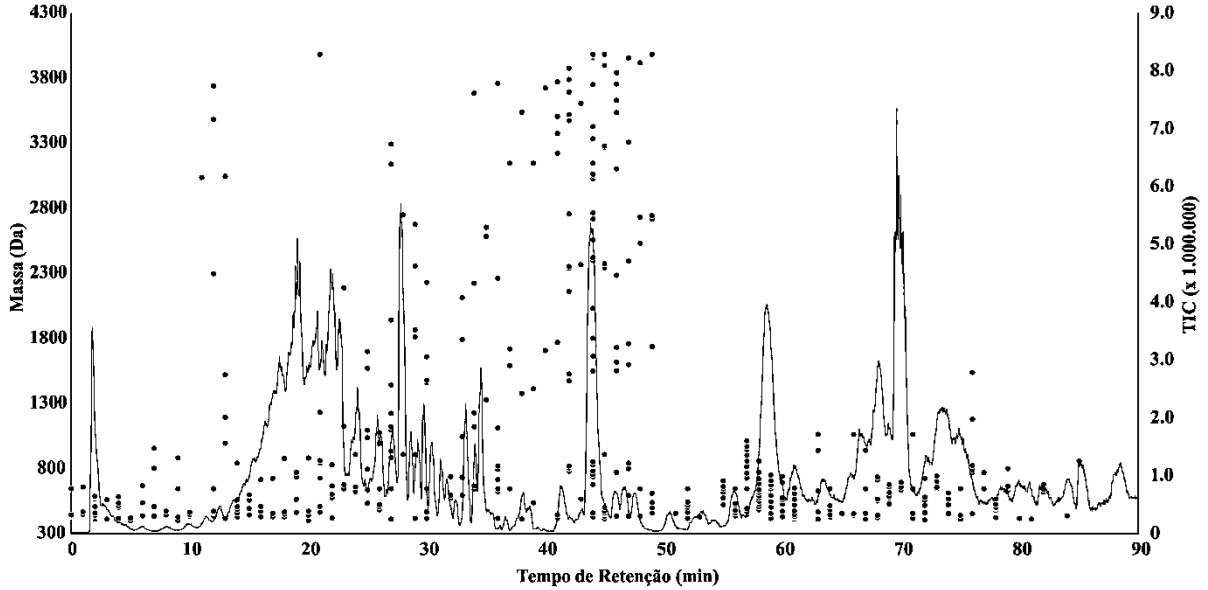
Os cromatogramas de íons totais estão representados juntamente com a representação da dispersão das diferentes massas molares encontradas em cada janela de tempo, nas três diferentes amostras de venenos (Figuras 11, 12 e 13).

Figura 11: Cromatograma de íons totais (TIC) da porção peptídica do veneno de *T. serrulatus*



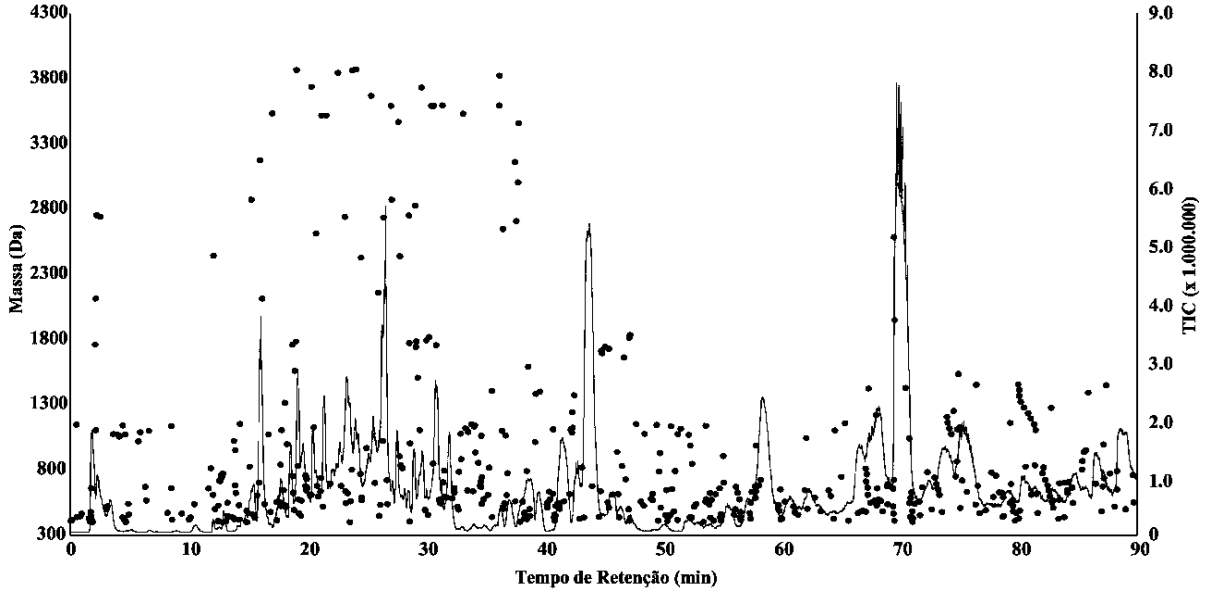
Legenda: Identificação das massas molares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 4000 Da (pontos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 12: Cromatograma de íons totais (TIC) da porção peptídica do veneno de *T. bahiensis*



Legenda: Identificação das massas molares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 4000 Da (pontos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.
Fonte: Dados da pesquisa.

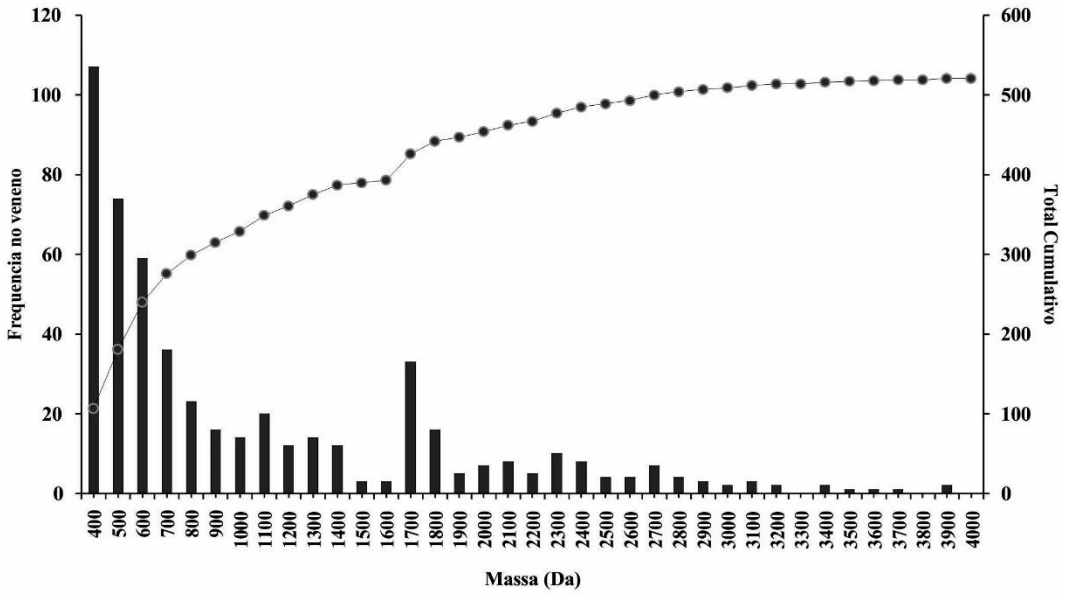
Figura 13: Cromatograma de íons totais (TIC) da porção peptídica do veneno de *T. obscurus*



Legenda: Identificação das massas molares de todos os peptídeos observados no intervalo de 400 a 4000 Da (pontos), em cada janela de tempo, durante os 90 minutos de eluição.
Fonte: Dados da pesquisa.

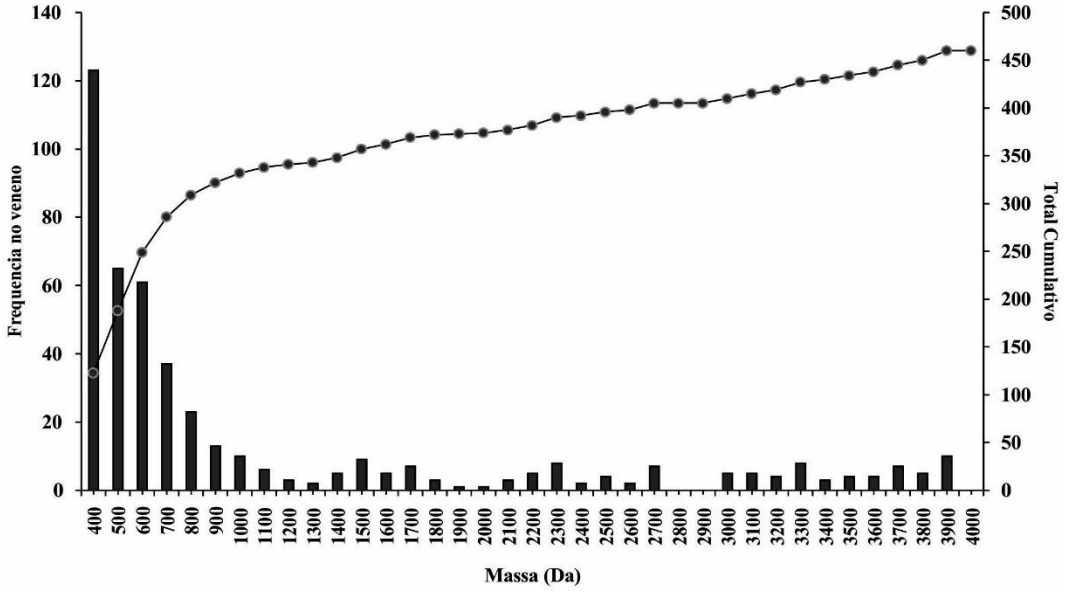
As análises dos cromatogramas de massas (TIC) de cada uma das amostras, e a comparação entre as massas molares presentes em cada amostra analisada revelaram a existência de muitas massas molares diferentes nos venenos, sendo que o perfil de dispersão mostrou-se bastante diferente entre as amostras de veneno. As massas molares obtidas para cada um dos peptídeos foram obtidas através da deconvolução de espectros que continham íons multiprotonados, para forma de íons monoprotonados. Com estes dados foi possível realizar a análise de frequência com que cada intervalo de massas dos componentes peptídicos foram encontrados em cada amostra, sendo estes dados representados nas Figuras 14, 15 e 16.

Figura 14: Diagrama de frequência com que os intervalos de massas peptidicas foram observados no veneno de *T. serrulatus*



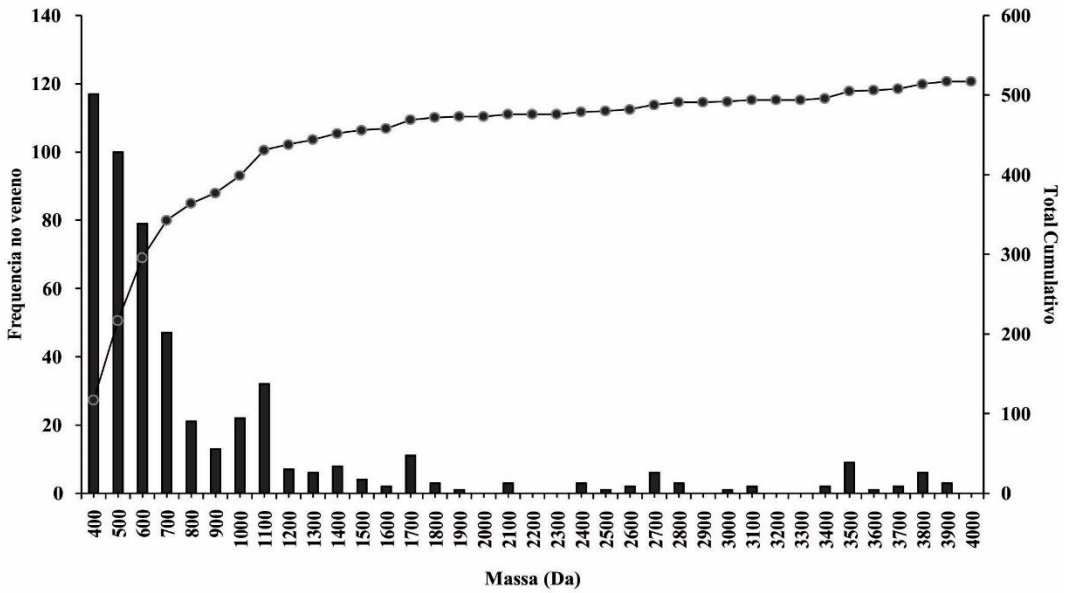
Legenda: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molar (no intervalo de 100Da) encontrada no veneno de *T. serrulatus*. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 15: Diagrama de frequência com que os intervalos de massas peptidicas foram observados no veneno de *T. bahiensis*



Legenda: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molar (no intervalo de 100Da) encontrada no veneno de *T. bahiensis*. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 16: Diagrama de frequência com que os intervalos de massas peptidicas foram observados no veneno de *T. obscurus*

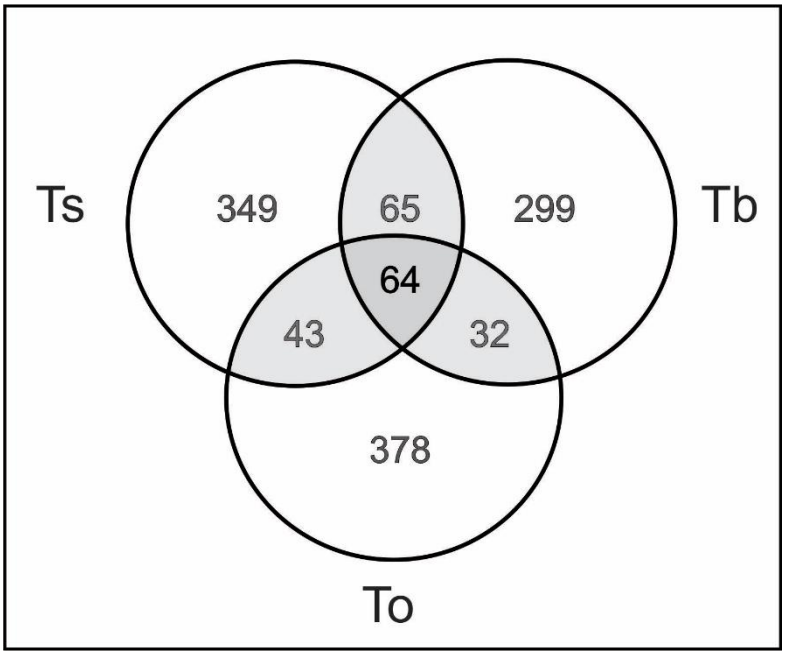


Legenda: O diagrama de barras corresponde à frequência de cada faixa de massa molar (no intervalo de 100Da) encontrada no veneno de *T. obscurus*. A linha com pontos negros corresponde ao número total acumulado de peptídeos detectados na amostra.
Fonte: Dados da pesquisa.

As análises de distribuição e abundância peptídica possibilitaram um melhor entendimento da complexidade da composição peptídica dentro dos venenos. Foi possível detectar a presença de 521 peptídeos distintos no veneno de *T. serrulatus*, 460 peptídeos no veneno de *T. bahiensis* e 517 peptídeos no veneno de *T. obscurus*.

Foram observadas maiores quantidades de peptídeos com os valores de massas entre 400-500 Da, 500-600 Da, 600-700 Da e 1700-1800 Da em *T. serrulatus*; 400-500 Da, 500-600 Da, 600-700 Da e 700-800 Da em *T. bahiensis*; e 400-500 Da, 500-600 Da, 600-700 Da, 700-800 Da, 1000-1100 Da e 1100-1200 Da em *T. obscurus*. Além disso, a comparação dos perfis cromatográficos e das curvas de abundância peptídica das amostras revelou muitas diferenças nos tempos de retenção e massas dos peptídeos. Este fato sugere a existência de diferenças de composição e número de peptídeos em função das espécies de *Tityus sp*.

Figura 17: Diagrama de Venn



Legenda: Diagrama de Venn demonstrando o número de massas molares comuns nos venenos de *T. serrulatus* (Ts), *T. bahiensis* (Tb) e *T. obscurus* (To).
Fonte: Dados da pesquisa.

Através do diagrama de Venn total pode-se observar que 64 massas molares são comuns entre as três espécies (Ts, Tb e To), 65 peptídeos são comuns entre Ts e Tb, 32 peptídeos comuns entre Tb e To, enquanto que 43 peptídeos foram comuns entre Ts e To. Dos peptídeos únicos sequenciados para cada espécie foram encontrados 349 para Ts, 299 em Tb e 378 em To.

O padrão de semelhanças e diferenças deve estar ligado ao modo reprodutivo das espécies e também a fatores como localização geográfica e alimentação desses animais. Este fato cria um enorme polimorfismo genético, que provavelmente resulta numa grande biblioteca peptídica em potencial, no veneno de cada uma das espécies em estudo. Desta maneira, o padrão de semelhanças e diferenças no perfil peptídico total dos venenos, revela a enorme riqueza química desses venenos, assim como as diferenças relevantes quanto aos perfis peptídicos desses venenos. Mesmo com o isolamento de diversas toxinas em trabalhos anteriores, menos de 1% do total de peptídeos presentes são conhecidos, havendo a necessidade de mais estudos até a completa elucidação de seus constituintes.

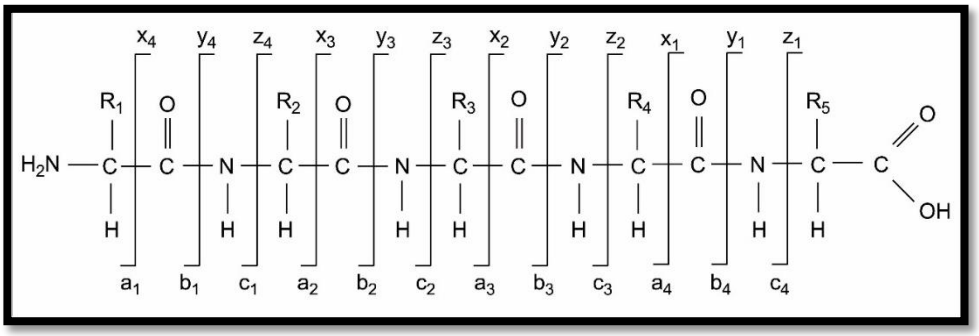
4.1.2 Sequenciamento de peptídeos encontrados nos venenos

Levando-se em consideração a vasta gama de peptídeos presentes nos venenos das três espécies estudadas (*T. serrulatus, T. bahiensis e T. obscurus)* demonstrados na primeira parte desta tese, foram escolhidos os íons moleculares mais intensos, para uma investigação mais detalhada quanto à sequencia primaria.

Todas as análises espectrometricas foram realizadas no modo positivo (ESI+), uma vez que este modo apresenta uma sensibilidade mais elevada nas analises de peptídeos, quando comparadas com análises feitas no modo negativo. Além disso, o modo positivo é capaz de gerar espectros com maior riqueza de íons fragmentos específicos para uma determinada sequência. Em contrapartida, espectros MS/MS de íons negativos contêm pouca informação sobre a sequência e são normalmente mais difíceis de interpretar (SEIDLER et al., 2010).

Durante o processo de fragmentação das cadeias peptídicas em condições de *CID*, ocorre a formação dos íons-fragmentos, que recebem uma nomenclatura específica dependendo da região da molécula que retêm a carga residual (próton). Quando a carga residual permanece no lado N-terminal, são gerados os íons do tipo *a, b* e *c* (dependendo de qual ligação química foi desfeita), por outro lado, quando a carga residual permanecer no lado C-terminal, são gerados os íons do tipo *x, y* e *z* (dependendo de qual ligação química foi fragmentada). Os pares de íons *a/x, b/y* e *c/z* são correspondentes a fragmentos opostos e complementares entre si. Desta forma, por exemplo, sempre uma série de íons do tipo *b* é completar à série de íons do tipo *y*. Essa complementaridade e a presença de várias séries de íons permitem comprovar através de simulações de fragmentação, se uma sequência obtida está realmente correta. A nomenclatura mais aceita para anotação de íons pertencentes às sequências peptídicas está representada na Figura 18, como foi originalmente proposto por Roepstorff e Fohlman (1984) e posteriormente modificada por Biemann (1990).

Figura 18: Esquema de fragmentação peptídica

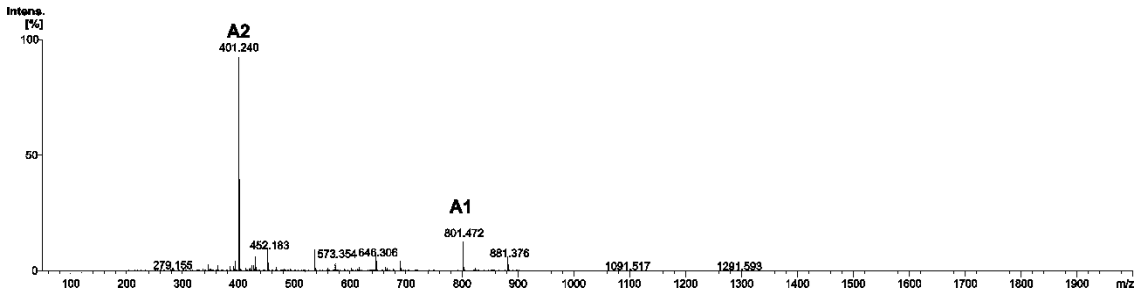


Legenda: Nomenclatura das principais séries de íons formados através de fragmentaçao peptídica: íons *a*, *b*, *c*, *x*, *y*, e *z*. Rearranjos de hidrogênio estão omitidos nesta anotação simplificada. R1, R2 e R3 representamas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos.
Fonte: Adaptado de BIEMANN, 1990.

Para este trabalho foram escolhidos alguns peptídeos do veneno de *T.serrulatus* para se estudar os padrões de fragmentação, gerados com a utilização de um espectrômetro de massas do tipo ESI-IT-TOF e para a padronização da forma de interpretação dos espectros de massas sequenciais (MS^n), que foram utilizados para o sequenciamento peptídico.

O primeiro peptídeo estudado foi o que apresentou massa molar 800,472 Da (Figura 19). Este peptídeo foi encontrado com tempo de retenção de 15 minutos no cromatograma de massas, sendo visualizado nos experimento de MS através do íon de *m/z* 401,240 na forma $[M+2H]^{+2}$ e *m/z* 801,472 na forma $[M+1H]^{+1}$.

Figura 19: Espectro MS do peptídeo de massa 800,4Da



Legenda: Espectro MS^1 referente ao peptídeo de massa molar 800,472 Da observado no tempo de retenção de 15 min; $\mathbf{A_1}$ e $\mathbf{A_2}$ correspondem aos íons de *m/z* 801,472 e 401,240 na forma $[M+H]^{+1}$ e $[M+2H]^{+2}$, respectivamente.
Fonte: Dados da pesquisa.

Espectros que são provenientes de fonte de ionização do tipo ESI, normalmente formam íons com múltiplas cargas (+2,+3,+4, etc), especialmente quando o experimento é realizado em instrumentos equipados com analisadores de massas do tipo *íon-trap*. Devido à sua arquitetura funcional de construção, este tipo de analisador propicia colisões de baixa

energia entre os íons favorecendo a transferência de carga entre os mesmos, privilegiando os íons contendo mais de uma carga (PRENTICE et al., 2011).

A fim de interpretar os espectros de MS e MS/MS, foi necessário deconvoluir e reconstruir cada espectro original, para a forma de íons monoprotonados $[M+H]^{+1}$. Essa deconvolução e a reconstrução foram feitas de forma manual, com a utilização da ferramenta *"mass table"*, presente no software "*LCMS solution v.3.6"* (SHIMADZU). A função *"mass table"* disponibiliza uma planilha, com as informações de valores *m/z*, intensidade e carga de cada íon presente no espectro de MS^2, além da informação de quais íons são monoisotópicos. Apesar da maior parte do *"mass table"* conter informações corretas, o tratamento manual do espectro é necessário, pois algumas vezes ocorrem erros na indicação dos valores de massa monoisotópica, pelo algoritmo de processamento de dados do instrumento. Sendo assim, cada espectro de MS^2 teve seus íons conferidos manualmente com relação à carga e relação massa/carga (*m/z*), para evitar possíveis erros na interpretação. Este processo junto à deconvolução dos íons foi realizado com a utilização da planilha de dados Excel (MICROSOFT 2010), sendo esta fundamental para a transformação de todos os íons de múltiplas cargas em íons monoprotonados. Para este processo foi utilizada a seguinte equação:

$$\textbf{Massa (Da)} = (\boldsymbol{m/q} \times \boldsymbol{q}) - \boldsymbol{q} \quad \text{(Equação 1)},$$

onde $\boldsymbol{m}$**=** massa**;** $\boldsymbol{q}$**=** carga e $\boldsymbol{m/q}$=*m/z* (relação *m/z* obtida no espectro de massas)

Essa equação foi utilizada para se calcular a massa molar do peptídeo e para a deconvolução dos espectros, sendo que a mesma foi adicionada como uma ferramenta no software. Além disso, no processo de deconvolução dos espectros de fragmentação em condições *CID* (MS^2), para a determinação da sequência dos peptídeos, foram considerados somente os íons que possuíam distribuição isotópica completa. Foram utilizados apenas os valores de *m/z* monoisotópicos dos íons gerados.

Para gerar fragmentação das moléculas em suas ligações peptídicas foram determinadas condições experimentais ideais (ex: energia e gás de colisão), seguido da identificação das diferenças de massas entre os picos consecutivos de fragmentos correspondentes às massas dos resíduos de amino ácidos naturais (–NH–CHR–CO–). Como resultado da fragmentação das ligações peptídicas, são obtidas principalmente séries de íons *b* e *y* (complementares entre si), de modo que a diferença de valores de *m/z* entre dois íons consecutivos da mesma série, revela a massa de um resíduo de aminoácido, e portanto a identidade do mesmo. Enquanto as séries de íons -*b* e -*y* resultam diretamente da clivagem das

ligações peptídicas, os íons *a* são formados pela perda neutra de monóxido de carbono dos íons *b* (diferença de 27,9949 *u.m.a* relativo ao íon *b* correspondente) (TABB et al., 2003; DONGRE.et al.,1996). Considerando todos os íons que teoricamente podem ser produzidos em condições de *CID*, os íons *b* e *y* correspondem à grande maioria dos íons experimentalmente observados. Dessa forma, foi possível o reconhecimento de uma ou mais séries de íons (dos tipos *b* e/ou *y* principalmente), os quais por sua vez, permitem a determinação das sequências dos peptídeos.

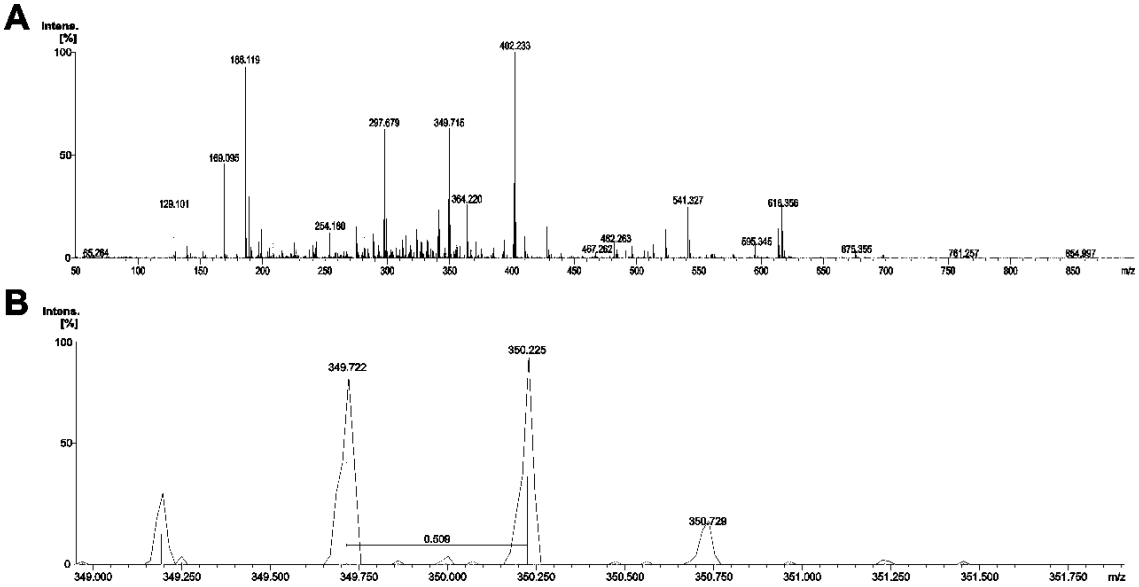
Os experimentos de peptidômica foram realizados em um instrumento dotado de sistema IT (ion-trap), onde os íon-fragmentos gerados são formados através de aplicação de frequência de excitação ressonante para o íon-precursor, correlacionada a uma relação massa-carga (*m/z*), o qual é então fragmentado por colisões com o gás argônio no interior do *trap*. Isso normalmente resulta em fragmentações em uma direção única, desde que os íons produtos possuam massas diferentes do íon-precursor. Eles já não estão em ressonância com a frequência de excitação e, portanto, sofrem menos colisões adicionais e, geralmente, menos fragmentação (DREXLER et al., 2007). O resultado é um espectro constituído de íon-produtos com menos íons (pertencentes a somente algumas séries), porém com maiores intensidades relativas. Este fenômeno foi descrito previamente (JOHNSON; YOST, 1990) para moléculas pequenas, onde os processos de *CID* foram diretamente comparados entre *"ion-trap"*, triplo-quadrupolos e quadrupolos, e mostrou-se que o *"ion-trap"* tem maior eficiência de fragmentação, coleta, seleção de massa, e transmissão de íon-fragmentos para o detector. No entanto, análises de MS^2 em um IT são feitas "*in time*", ou seja, ocorre um processo em série para a coleta, o isolamento de íons-precursor, fragmentação e detecção de íons fragmento (SHIPKOVA et al., 2008).

A seleção dos íons para a fragmentação foi realizada de forma automática, porém para a interpretação foram utilizados valores das moléculas monoprotonadas e de menor carga possível, uma vez que quanto maiores os valores de carga mais complexos os espectros de fragmentação, porém em equipamentos do tipo ESI os íons de carga +2 geralmente são os mais abundantes, assim a maior parte das fragmentações foi obtida através de precursores com duas cargas. O exemplo a seguir mostra como foi realizada a seleção dos íons e a interpretação, sendo que a mesma rotina foi repetida para os outros peptídeos encontrados que estão inclusos no Apêndice A.

O espectro MS^2 do peptídeo pertencente ao peptídeo de massa 800,472 Da (Figura 20), foi obtido através da seleção do íon-precursor de *m/z* 401,240 na forma $[M+2H]^{+2}$, para fragmentação em condições ideais de *CID*. A Figura 20A mostra o espectro MS^2 não

deconvoluído deste íon, com íons apresentando múltiplas cargas. A Figura 20B corresponde à ampliação de uma região espectral contendo o íon de *m/z* 349,722 (pertencente ao espectro 19A). Pode-se observar que o íon de *m/z* 349,722 na forma $[M+2H]^{+2}$ (Figura 20A e 20B) corresponde ao íon de *m/z* 698.444 na forma $[M+H]^{+}$ (Figura 21). A Figura 20B mostra ainda em detalhe ampliado o envelope de picos monoisotópicos do íon de *m/z* 349,722. Nesta ampliação é possível observar a diferença de *m/z* entre os espectros centróides de picos vizinhos com valor de 0,5 unidades. Essa diferença é característica de íons de carga +2. A Figura 21 mostra o espectro de MS^2 deconvoluído e reconstruído para todos os íons observados no espectro da Figura 20A.

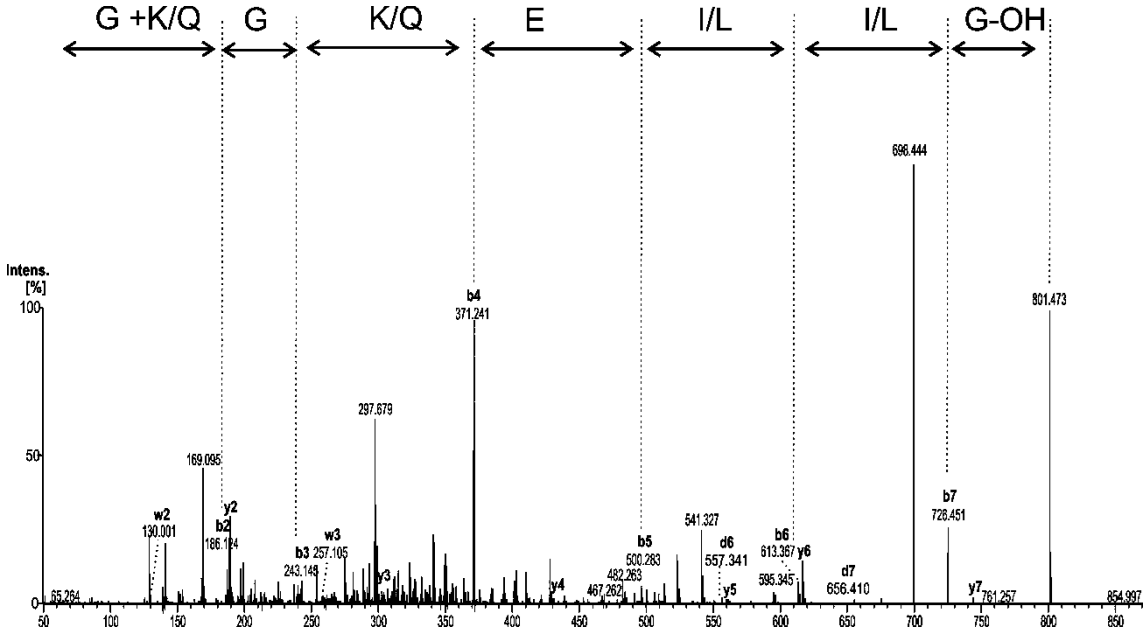
Figura 20: Espectro MS^2 não deconvoluido do peptídeo de massa 800,472 Da



Legenda: A: Espectro MS^2 não deconvoluído do peptídeo de massa molar 800,472 Da no tempo de retenção de 15 minutos. Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de *m/z* 401,240 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. **B:** Ampliação do espetro MS/MS mostrando o envelope monoisotópico do íon de *m/z* 349,722 na forma de $[M+2H]^{+2}$. A faixa na Figura **B** demonstra a diferença de 0,5 Da, o que caracteriza íons de carga +2.
Fonte: Dados da pesquisa

A molécula protonada foi identificada no espectro (Figura 19) como sendo o íon de *m/z* 801,472 na forma $[M+H]^{+}$. Uma série completa de íons *b* pode ser observada no espectro: *m/z* 726,451 (b_7), *m/z* 613,367 (b_6), *m/z* 500,283 (b_5), *m/z* 371,241 (b_4), *m/z* 243,145 (b_3) e *m/z* 186,124 (b_2). Como esperado o íon b_1 não foi encontrado, sendo b_2 o mais frequente neste tipo de análise (HUNG et al., 2007). A subtração dos valores de *m/z* entre os valores consecutivos de íons *b* permitiu a determinação da sequência do peptídeo, com algumas ambiguidades relacionadas aos resíduos isóbaros I/L e K/Q.

Figura 21: Espectro MS^2 deconvoluído do peptídeo de massa molar 800,472 Da



Legenda: Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de *m/z* 401,240 na forma $[M+2H]^{+2}$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo *b* a partir da molécula protonada de *m/z* 801,472 na forma $[M+H]^{+}$, bem como sua interpretação.
Fonte: Dados da pesquisa.

Todas as sequências peptídicas obtidas neste trabalho foram obtidas através de cálculos manuais realizados com os valores monoisotópicos dos íons pertencentes aos espectros MS/MS com a utilização de planilhas excel, além do processamento dos dados através de alguns softwares como Mascot Distiller e Peaks. Esta mesma rotina foi utilizada por DIAS, et al. (2012) na analise peptidômica do veneno da vespa *P. paulista*.

A sequência determinada para o peptídeo de massa molar 800,472 Da, levando-se em consideração as séries de íons *b* e *y* foi: G Q/K G Q/K E I/L I/L G (Figura 21). A massa molar do peptídeo (800,472 Da), com a sequência mostrada acima, é compatível com o resíduo C-terminal na forma livre, uma vez que existe a perda de 18 unidades de massa. Caso a perda fosse de 17 unidades de massa a porção C-terminal seria amidada (NH_3). Assim, a sequência deste peptídeo é: G Q/K G Q/K E I/L I/L G-OH, sendo denominado mais adiante como Typep-57.

A distinção entre os resíduos de I e L pode ser realizada através da observação dos fragmentos iônicos do tipo -*d* e/ou *w* com a utilização de alta energia de colisão durante a obtenção dos espectros *CID* dos peptídeos. Dessa forma, torna-se possível analisar íons resultantes da fragmentação parcial das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, identificados pelos íons do tipo -*d* e/ou -*w*. Por exemplo, os íons do tipo -*d* correspondem à

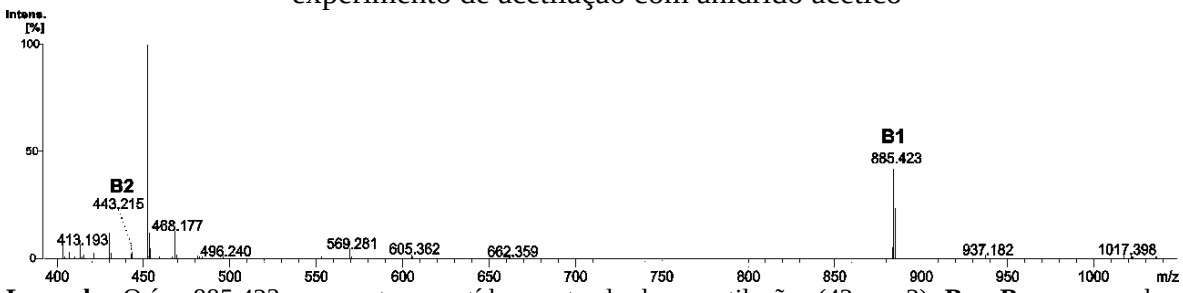
clivagem α da cadeia lateral do resíduo de aminoácido C-terminal. Aqueles do tipo *w* também podem ser formados nesse processo, se a posição do resíduo de I for adjacente ao sítio de clivagem no esqueleto de carbonos α da cadeia peptídica. Neste caso, a massa molar desses íons será 14 Da maior em relação à fragmentação da cadeia lateral do resíduo de L (MENDES et al., 2004).

Apesar das condições experimentais do protocolo utilizado não envolverem elevada energia de colisão, foi possível observar a presença de fragmentos iônicos do tipo *-d* e *-w*. Fragmentações simuladas também foram criadas a partir da utilização do *software* Protein/Peptide Editor no BioLynx/Mass Lynx (v 3.2) da Micromass, com diferentes combinações de I e/ou L em posições ambíguas das sequências possíveis encontradas. Em seguida, essas sequências simuladas foram comparadas aos espectros experimentais, auxiliando na identificação de fragmentos iônicos tanto da série *-d* como também da série *-w*. Assim, no presente trabalho esse método de investigação dos íons *d* e *w* para distinguirmos os resíduos I/L foi utilizada dentro da sequência polipeptídica.

Para exemplificar, a sequência de aminoácidos do peptídeo de massa 800,472 Da (Figura 21) possui duas ambiguidades com relação à distinção dos resíduos de I/L: uma na posição 6 e outra na posição 7. Após deconvolução do espectro MS/MS foi possível observar a presença dos íons *d6* (*m/z* 557,341), *d7* (*m/z* 656,410), *w2* (*m/z* 130,001), e *w3* (*m/z* 257,105), permitindo a distinção dos resíduos de I/L nas posições 6 e 7 da cadeia de aminoácidos. Assim, a posição 6 foi determinada com o aminoácido Isoleucina (I) e a posição 7 com o aminoácido Leucina (L).

A distinção entre os resíduos de glutamina e lisina foi realizada por meio da reação de derivatização com anidrido acético, seguida por analise ESI-MS e MS^2. A reação do peptídeo com anidrido acético resultou na modificação da massa molar para 884,423 Da (Figura 22), indicando um aumento de 84 Da na massa molar do peptídeo (42 Da x 2), devido à ocorrência de duas reações de acetilação nos grupamentos -amino dos resíduos de Lys. Esse resultado indica a presença de dois resíduos de Lys ao invés de Gln na sequência desse peptídeo, uma vez que a cadeia lateral do resíduo de Gln não sofre reação de acetilação. Portanto, a sequência do peptídeo de 800,472 Da de tempo de retenção de 2 minutos em relação aos resíduos isóbaros K/Q e I/L é: G K G K E I L G -OH. O C- terminal foi considerado na forma livre (-OH) pois nenhuma modificação foi encontrada para esse peptídeo.

Figura 22: Espectro MS^1 referente ao peptídeo de massa molar 800,472 Da após experimento de acetilação com anidrido acético



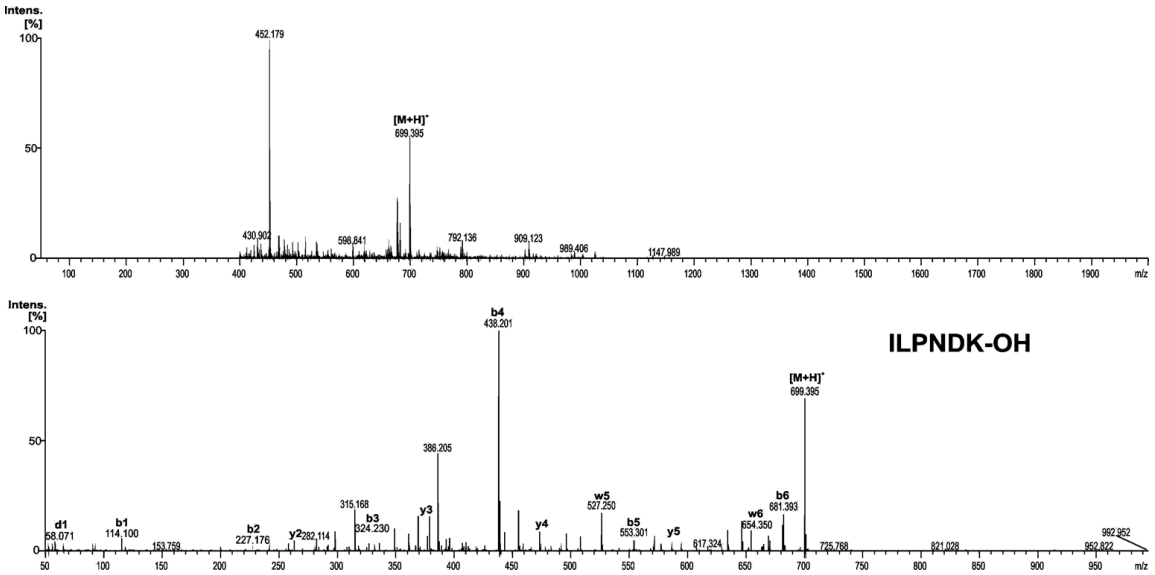
Legenda: O íon 885,423 representa o peptídeo contendo duas acetilações (42 u x 2); $\mathbf{B_1}$ e $\mathbf{B_2}$ correspondem aos íons de *m/z* 885,423 e 443,215 na forma $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{+2}$, respectivamente.

Fonte: Dados da pesquisa.

Além do peptídeo demonstrado anteriormente, outros peptídeos foram encontrados nos experimentos de LC-MS no presente trabalho para os três diferentes venenos de escorpiões, e foram também utilizados para corroborar a padronização da forma de interpretação dos espectros a ser aplicada nos novos peptídeos. Para simplificar a visualização dos espectros foi utilizada a formatação mais usual em periódicos científicos, a qual consiste os íons com suas respectivas series de íons representadas acima dos mesmos.

Para exemplificar, no tempo de retenção de 20 min nos cromatogramas de *T. serrulatus* e *T. obscurus* um peptídeo de massa molar 698,395 Da foi detectado. A molécula protonada foi identificada nos espectros MS^1 e MS^2 (Figura 23) como sendo o íon de *m/z* 699,395 na forma $[M+H]^+$. Assim como nos peptídeos demonstrados anteriormente nesse trabalho, a subtração dos valores de *m/z* entre os valores consecutivos de íons *b* permitiu a determinação da sequência do peptídeo e o experimento de acetilação do veneno permitiu a distinção dos resíduos de K/Q.

Figura 23: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo de massa molar 698,395 Da



Legenda: Foi selecionado para fragmentação o íon-precursor de *m/z* 699,395 na forma $[M+H]^+$, sendo o espectro ESI adquirido na forma contínua, no modo positivo. O espectro mostra uma série contínua de íons fragmentos do tipo *b* a partir da molécula protonada de *m/z* 699,395, bem como sua interpretação.
Fonte: Dados da pesquisa.

Os espectros MS^1 e MS^2 referentes aos peptídeos isolados dos venenos das três espécies de escorpiões (*T. serrulatus, T. bahiensis* e *T. obscurus*) e suas respectivas interpretações de sequencias estão inclusos no Apêndice A desta tese. A Tabela 3 tras de maneira simplificada todos os peptídeos que tiveram suas sequências elucidadas no presente trabalho. No total foi possível determinar a sequencia de 66 peptídeos, sendo que como mostrado na parte I deste trabalho, muitos outros peptídeos são ainda desconhecidos nestes venenos. O fato deste número de sequencias não ser maior é devido à tarefa de interpretação manual necessária dos espectros de fragmentação, que consome um tempo muito longo de trabalho. Hoje contamos com ajuda de softwares que podem simular as sequências, porém são identificados muitos erros de cálculos e identificações, fazendo com que a interpretação manual, apesar de laboriosa, seja indispensável.

Tabela 3: Peptídeos lineares dos venenos de escorpiões do gênero *Tityus*, sequenciados no presente trabalho

(Continua)

NOME	*SEQUÊNCIA*	*MASSA MOLAR (Da)*	*TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)*	*ESPÉCIE*		
				TS	**TB**	**TO**
TyPep-1	AEIDFSGIPEDIIKQI-OH	1786.944	34	x		x
TyPep-2	GCDALLSGDHGGLLSANGC-OH	1758.770	51	x	x	x
TyPep-3	LIPNDQLRSI-OH	1167.634	74			x
TyPep-4	NIALGQDQSGR-NH2	1156.746	18			x
TyPep-5	DEGPKSDCKP-OH	1074.571	33	x		
TyPep-6	KIKEKLIEA-OH	1070.671	52			x
TyPep-7	WPNKIEPGK-OH	1067.578	37			x
TyPep-8	KETNAKPPA-OH	954.512	8	x	x	x
TyPep-9	IPEDIIKK-OH	954.588	21	x		
TyPep-10	KIITPPIR-OH	936.536	34			x
TyPep-11	KPVEPVG-OH	724.471	20	x	x	x
TyPep-12	SESNTCG-OH	696.260	26	x	x	x
TyPep-13	NAKPPA-OH	596.318	78			x
TyPep-14	KHFGKDSNFPF-NH2	1321.599	29	x		
TyPep-15	ILTGKLKCK-OH	1002.603	28	x		x
TyPep-16	GLREKHVQ-OH	965.542	11	x		
TyPep-17	GKGKEILGK-NH2	928.582	12	x		
TyPep-18	ILPNDK-OH	698.395	20	x		x
TyPep-19	KQLLKEALAPEPAPEPAPEPAPEAAPEA APEPAAAAPE-OH	3764.937	23	x		
TyPep-20	KEALAPEPAPEPAPEPAPEAAPEAAPEP AAAAPE-OH	3282.681	20	x		
TyPep-21	AEIDFSGIPEDIIKQIKETNAKPPA-NH2	2722.461	35	x		
TyPep-22	AEIDFSGIPEDIIKQIKETNAKPP-NH2	2652.330	32	x		
TyPep-23	AEIDFSGIPEDIIKQIKETNA-OH	2330.162	33	x		
TyPep-24	KLVALIPNDQLRSILKAVVH-OH	2226.318	33		x	
TyPep-25	SCKRECSGSKRQK-OH (Parte da sequencia)	2188.286	58		x	
TyPep-26	YIAEDNTHGHGCPEGTSHR-NH2	2078.070	30	x		
TyPep-27	GKGKEILGKIKEKLIEA-OH	1853.130	25	x		
TyPep-28	DREFTGISVTVLKLFT-OH	1824.954	44	x		
TyPep-29	KCNCVTGLSWLLQLQV-OH	1803.956	42	x		
TyPep-30	VYWLPAVLGSLLGFTP-OH	1731.998	45	x	x	x
TyPep-31	KQLLKEALAPEPAPEP-OH	1730.970	63	x		
TyPep-32	AEIDFSGIPEDIIKQ-OH	1673.842	28	x		
TyPep-33	KEALAPEPAPEPAPE-OH	1545.776	29	x		
TyPep-34	RPPHNPGFLTVYN-OH	1510.710	29			x
TyPep-35	VMEAPALNVGTSKVS-OH	1501.778	19	x		
TyPep-36	KHFGKDSNFPFGT-OH	1480.668	29	x		
TyPep-37	KFPIGVPTEYGCPA-OH	1477.768	30		x	
TyPep-38	VCLSSMDAPTKHW-OH	1473.820	20	x		
TyPep-39	ADVDFTGIADSIIK-OH	1463.760	29		x	
TyPep-40	ETCVDVQVPAKWA-NH2	1443.762	25		x	
TyPep-41	HLLAPNKHYPNQ-OH	1430.686	29		x	

Tabela 3: Peptídeos lineares dos venenos de escorpiões do gênero *Tityus*, sequenciados no presente trabalho

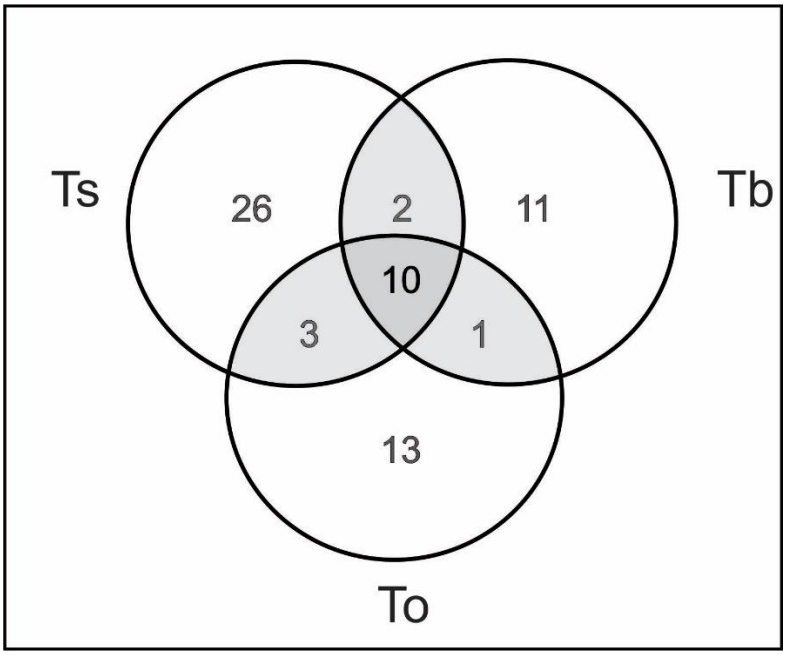
(Conclusão)

TyPep-42	VFVRTGCHFLHC-NH2	1416.693	32	x		
TyPep-43	PHWLFFGVSVLC-OH	1403.752	39			x
TyPep-44	GKGKEILGKIKE -OH	1298.780	18	x		
TyPep-45	APEAAPEPAAAAPE-OH	1290.616	15	x		
TyPep-46	K/QIKETNAKPPA-OH	1195.688	1		x	
TyPep-47	VTLTLPPAES-NH2	1025.672	14			x
TyPep-48	TAKNATKPAA-NH2	970.536	25	x	x	
TyPep-49	AMTPFTNAG-NH2	907.433	22	x		
TyPep-50	KETNAKPP-OH	883.488	8	x	x	x
TyPep-51	SLPGVLPVA-NH2	851.397	46		x	
TyPep-52	DLETLNH-OH	840.287	21		x	
TyPep-53	LFGAFALV-OH	837.455	81			x
TyPep-54	IFGAFIGI-OH	836.578	75	x		
TyPep-55	HERLLGP-OH	820.455	35	x	x	x
TyPep-56	TVPDLEM-NH2	802.526	87			x
TyPep-57	HGCIGCGR-NH2	800.364	6			x
TyPep-58	GKGKEILG-OH	800.472	15	x		
TyPep-59	PCFTLPG-OH	733.388	26		x	x
TyPep-60	SLPVGSL-OH	671.419	23		x	
TyPep-61	NAKPP-OH	525.299	61	x	x	x
TyPep-62	K/QPVVG-OH	498.313	33			x
TyPep-63	SILK/Q-OH	459.322	45	x	x	x
TyPep-64	K/QIDA-OH	445.267	19	x	x	
TyPep-65	NAKP-OH	428.245	14		x	
TyPep-66	K/QPPA-OH	411.243	3	x	x	x

Legenda: Nome, sequência de aminoácidos e massa molar (Da), tempo de retenção(minutos) dos peptídeos encontrados no presente estudo. As três ultimas colunas demonstram a detecção desses peptídeos nas três espécies estudadas [*T. serrulatus* (TS), *T. bahiensis*(TB) e *T. obscurus*(TO)].
Fonte: Dados da pesquisa.

Utilizando as sequencias peptídicas dos venenos de escorpiões obtidas no presente trabalho (Tabela 3) foi possível construir um diagrama de Venn (Figura 24) para esses dados.

Figura 24: Diagrama de Venn



Legenda: Diagrama de Venn demonstrando o número de peptídeos comuns identificados no presente trabalho nos venenos de *T. serrulatus* (Ts), *T. bahiensis* (Tb) e *T. obscurus* (To).
Fonte: Dados da pesquisa.

Através do diagrama de Venn (Figura 24) pode-se observar que 10 sequencias são comuns entre as três espécies (Ts, Tb e To), 2 peptídeos são comuns entre Ts e Tb, 1 peptídeo foi comum entre Tb e To, enquanto que 3 peptídeos foram comuns entre Ts e To. Dos peptídeos únicos sequenciados para cada espécie foram encontrados 26 para Ts, 11 em Tb e 13 em To.

Após determinadas as sequencias peptídicas, foram realizadas buscas através do software de alinhamento e busca local de sequencias proteicas –BLASTp: (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Além do blastp, as sequencias foram submetidas à buscas no PepBank (http://pepbank.mgh.harvard.edu/) e The Antimicrobial Peptide Database (APD) (http://aps.unmc.edu/AP/main.php).

As sequências peptídicas contendo menos que 8 resíduos de aminoácidos não foram comparadas à sequencias dos bancos de dados, uma vez que sequências reduzidas não possuem número de aminoácidos na cadeia suficientes para gerar identificações confiáveis. Este fato ocorreu para os peptídeos TyPep-1, TyPep-9 ao TyPep-14, TyPep-18, e dos peptídeos TyPep-52 ao TyPep-66. As imagens referentes às buscas dos outros peptídeos estão inclusas no Apêdice B.

Através desssas buscas em bancos de dados pode-se perceber que alguns dos peptídeos sequenciados possuem muitas semelhanças com hipotensinas de venenos de escorpião. Como exemplo temos os peptídeos TyPep-1 que parece ser um fragmento da toxina Hipotensina-1 isolada de *T. serrulatus* e que possui o código de acesso P84189 no Uniprot. Outros peptídeos isolados TyPep-8, -21, -22, -23, -32, -39 e -46 também apresentaram alta similaridade com as hipotensinas I e II depositadas nos bancos de dados (Apêndice B: B1 à B8), porém ainda não haviam sido isolados dos venenos.

As hipotensinas e fragmentos isolados com a presença de acetonitrila foi um dado muito interessante encontrado no presente trabalho. Em um primeiro momento podemos nos questionar se serão esses peptídeos produtos de clivagens durante o processo de manipulação dos venenos (artefatos de manipulação). Porém, como foram utilizados inibidores de proteases desde as primeiras manipulações dos venenos, e as extrações ocorreram de forma a isolar somente peptídeos e não as maiores toxinas desses venenos, esta hipótese de clivagem acaba por tornar-se um tanto difícil. Um fato importante neste sentido é a presença de peptídeos com a porção C- terminal Amidada (-NH2) (Ex: TyPep-21 e -22), o que faz com que nesses casos a hipótese de clivagem proteolítica artefatual seja descartada totalmente, uma vez que a amidação é uma modificação pós-traducional específica e que tem sua importância química e biológica fundamental na atividade de peptídeos em organismos.

TyPep-39 é um peptídeo com característica de hipotensina que foi descrito por Rates et al. (2008) em *T. serrulatus* (Cód. Acesso: P86824). Porém, no presente trabalho somente foi possível detectá-lo e sequenciá-lo no veneno de *T. bahiensis*, onde ainda não havia sido descrito.

O peptídeo TyPep-46 é um fragmento ainda não descrito de hipotensina I, que foi isolado e sequenciado no veneno de *T. bahiensis.* Este fragmento não faz parte da região N-terminal da hipotensina original, região com mais fragmentos estudados anteriormente.

O peptídeo TyPep-8 sequenciado no presente trabalho é um caso bem interessante de fragmento de hipotensina. Verano-Braga et al. (2010) realizaram um estudo com diversos fragmentos da hipotensina I (KETNAKPPA, KPP, KPP, entro outros), e notaram que a porção C-terminal das hipotensinas é a responsável por potencializar a atividade da bradicinina e promover liberação de NO. Neste trabalho foi possível detectar esse fragmento (TyPep -8) no veneno bruto das três espécies de escorpião estudadas (TS, TB e TO), fazendo com que a sua importância no veneno seja evidenciada.

Os peptídeos TyPep-19, -20, -31 e -33 (Apêndice B: B9 à B12)geraram identificações de hipotensinas do tipo “PAPE” muito comuns em venenos de escorpião mas algumas ainda

não descritas. Esses peptídeos normalmente contém sequência em “tandem” de resíduos de prolina (P), ácido glutâmico (E) e alanina (A). O peptídeo TyPep-19 já havia sido descrito como um peptídeo secretado pela glândula de veneno de *Tityus serrulatus* e foi nomeado “Pape-peptide”, possuindo código de acesso “P86821” no Uniprot. Porém no presente trabalhao, além desse peptídeo encontramos um fragmento dele que não havia sido descrito anteriormente e foi denominado TyPep-20.

O peptídeo TyPep -45 (Apêndice B: B13)foi relatado previamente nos trabalhos de Batista et al. (2007) e Rates et al. (2008) nas espécies *T. serrulatus* e *T. stigmurus* e também foi identificado neste trabalho. Este fragmento de hipotensina foi testado em ensaios de eletrofisiologia e não demonstrou atividade significativa em canais iônicos, portanto foram considerados como peptídeos não tóxicos. Porém, a presença desse peptídeo é constante em ao menos duas espécies de Tityus, sendo composto muito abundante nos venenos, o que faz com que seja intrigante sua presença nos venenos.

Ainda não existem muitos estudos envolvendo desses fragmentos de hipotensina, sendo que suas atividades necessitam ser compreendidas para que possamos entender a importância real da grande diversidade e abundancia desses fragmentos nos venenos de escorpião. As hipotensinas são moléculas potencializadoras da ação da bradicinina (também denominadas BPPs), que promoverem forte hipotensão quando testadas em ratos. Essa redução de pressão pela família das hipotensinas encontradas em venenos de escorpião provavelmente está envolvido com o processo de liberação de NO em vasos sanguíneos (VERANO-BRAGA et al., 2008). Esses peptídeos com características de hipotensinas em conjunto nos venenos devem ter uma ação muito efetiva e sinérgica em suas presas e vítimas, fazendo com que estes sofram efeitos de queda súbita de pressão (choque convulêmico), como já bem estabelecido clinicamente em quadros pós-envenenamento, onde as vítimas apresentam quadros de hipotensão (CHIPPAUX; GOYFROON, 2008).

Os peptídeos TyPep-6, -16, -17, -24, -27 e -44 (Apêndice B: B14 à B19)tiveram grande similaridade com sequencias de toxinas do tipo “Beta-like-toxins” ou também chamadas de toxinas que atuam em canais de potássio (Exemplos de códigos de acesso:P86822, P0C2F3, P86822 e P69940). Todas essas toxinas escorpiônicas já conhecidas apresentam pouca importância toxicológica, mas associadas com outras toxinas, como por exemplo, aquelas que atuam em canais de sódio, elas propiciam potente ação tóxica à peçonha em decorrência do efeito sinérgico (GWEE et al., 2002). Elas atuam nos canais de duas maneiras conhecidas:1- modulando a porção sensível à voltagem ou 2- através de ligação com a porção extracelular do mesmo, causando a obstrução do poro condutor e impedindo a

passagem dos íons (GARCIA et al., 1991). Assim, os peptídeos do presente trabalho que se mostraram semelhantes a essas toxinas devem ser examinados futuramente a fim de mapear suas possíveis atividades biológicas. Vale ressaltar que os peptídeos TyPep-6 e TyPep -24 não foram encontrados em *T. serrulatus*, o qual contém o deposito da maior parte das toxinas maiores já descritas, eles foram isolados no presente trabalho nos venenos de *T. obscurus* e *T. bahiensis*, respectivamente.

Muitas vezes as toxinas que se mostraram semelhantes às sequencias peptídicas submetidas ao BLAST não foram isoladas dos mesmos organismos. O peptídeo TyPep-3 (Apêndice B: B20)por exemplo mostrou semelhança com uma toxina isolada do veneno de *Tityus trivittatus*, um escorpião tipicamente encontrado na Argentina. Esta toxina de código de acesso ABU94955 possui massa de 9807 Da contendo 87 resíduos de aminoácidos, sendo descrita também como pertencente ao grupo das toxinas que agem em canais de potássio, porém não há muitas informações sobre ela.

O peptídeo TyPep-4 (Apêndice B: B21), isolado neste trabalho no veneno de *T. obscurus*, quando submetido ao blastp mostrou semelhança com o um alérgeno 5 isolado do veneno de *T. serrulatus.* Esse alérgeno possui código de acesso P85840 e massa de 24047 Da porém não existem muitas informações sobre sua função biológica, sabendo-se porém que essa família de proteínas é responsável por importantes reações imunológicas em vítimas de ferroadas.

O peptídeo TyPep-5 (Apêndice B: B22) possui a mesma sequência inicial de uma toxina isolada por Batista et al. (2004) no veneno de *T. obscurus*, porém no presente estudo o peptídeo de sequência semelhante foi isolado e sequenciado no veneno de *T. serrulatus.* A toxina original é uma toxina de 4103.1 Da, bem maior que peptídeo encontrado neste trabalho, porem os autores não conseguiram determinar a sequência completa desta proteína e nada se sabe sobre possíveis atividades biológicas da mesma.

Os peptídeos TyPep-14 e TyPep-36 (Apêndice B: B23 e B24) demonstraram similaridade com o peptídeo “Venom peptide-1” de código de acesso P86825 isolado do veneno de *T. serrulatus* (RATES et al., 2008). Esse peptídeo não foi estudado quanto suas atividades biológicas, porém suspeita-se ser antibiótico (UNIPROT, 2015). No presente trabalho encontramos tanto a sequência completa (TyPep-36) quanto a aparente perda dos resíduos G e T na porção C-terminal da sequência original (TyPep-14).

O peptídeo TyPep-25 (Apêndice B: B25) isolado do veneno de *T. bahiensis* possui sequencia idêntica ao peptídeo OcyKTx3 isolado do veneno do escorpião *Opisthacanthus cayaporum* (SCHWARTZ et al., 2008), ou seja, aparentemente apesar de serem escorpiões de

famílias diferentes, esse peptídeo se mostrou comum entre essas duas espécies. Não existe porém estudos sobre atividade biológica desse peptídeo.

Os peptídeos TyPep -2, -7, -15, -16, -28, -29, -30, -34, -35, -37, -38, -40, -41, -42, -43, -47, -48, -49 e -51 não apresentaram similaridade com nenhuma proteína que fizesse sentido estar no veneno, sendo necessário sintetizá-los para que suas possamos entender seus papeis nos venenos.

Pelos parâmetros utilizados neste trabalho, não conseguimos definir com absoluta certeza se os peptídeos encontrados são transcritos na glândula de veneno, ou se são produtos de clivagens pelas metalopeptidases do veneno, apesar da utilização de inibidores de proteases. Porém julgamos que sua presença no veneno sugere algum papel significativo, uma vez que a dinâmica do veneno é extremamente relevante para a produção de moléculas bioativas que tem efeitos significativos no envenenamento. Atualmente, os peptídeos de venenos animais têm atraído maior atenção da comunidade científica, principalmente com base no potencial de desenvolvimento do novas drogas para uso farmacêutico destas moléculas, dada a seletividade e especificidade de ação em processos fisiopatológicos. De acordo com estas características, apesar destas moléculas serem classificadas como toxinas, as mesmas podem ser utilizadas como drogas, ou protótipos para o desenho de novas drogas, em patologias humanas (LEWIS; GARCIA, 2003).

PARTE II

4.2 SÍNTESE E PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Foram escolhidos para caracterização funcional treze peptídeos sequenciados à partir do estudo peptidômico com venenos de escorpiões (Parte I deste trabalho). A tabela abaixo mostra as sequencias sintetizadas, as respectivas massas molares e ocorrência nas espécies de escorpião estudadas. A seleção de algumas sequencias foi baseada na homologia das mesmas com toxinas já conhecidas, discutido na Parte I deste trabalho. Por outro lado, algumas sequencias não apresentaram homologia nenhuma com sequencias já depositas, sendo escolhidas para uma investigação inicial de possíveis atividades biológicas.

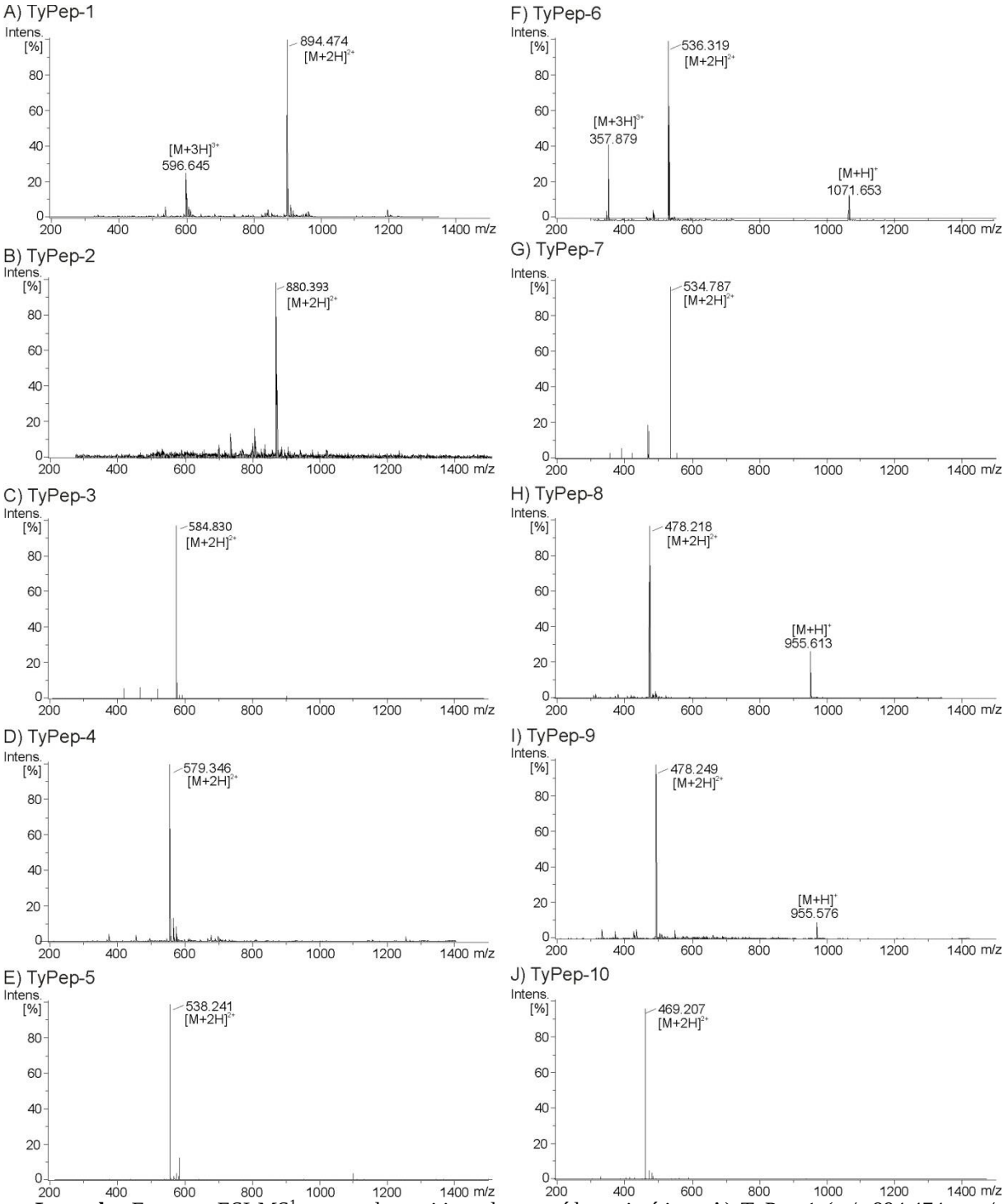
Tabela 4: Nome, sequência de aminoácidos e massa molar (Da) dos peptídeos sintetizados

NOME	SEQUENCIA	MASSA MOLAR (Da)	ESPÉCIE		
			TS*	TB**	TO***
TyPep-1	AEIDFSGIPEDIIKQI-OH	1786,948	x		x
TyPep-2	GCDALLSGDHGGLLSANGC-OH	1758,786	x	x	x
TyPep-3	LIPNDQLRSI-OH	1167,660			x
TyPep-4	NIALGQDQSGR-NH2	1156,692			x
TyPep-5	DEGPKSDCKP-OH	1074,482	x		
TyPep-6	KIKEKLIEA-OH	1070,653			x
TyPep-7	WPNKIEPGK-OH	1067,574			x
TyPep-8	KETNAKPPA-OH	954,613		x	x
TyPep-9	IPEDIIKK-OH	954,576	x		
TyPep-10	KIITPPIR-OH	936,414			x
TyPep-11	KPVEPVG-OH	724,444	x	x	x
TyPep-12	SESNTCG-OH	696,273	x	x	x
TyPep-13	NAKPPA-OH	596,322			x

Legenda: *TS: *Tityus serrulatus*; **TB: *Tityus bahiensis*; ***TO: *Tityus obscurus*.
Fonte: Dados da pesquisa.

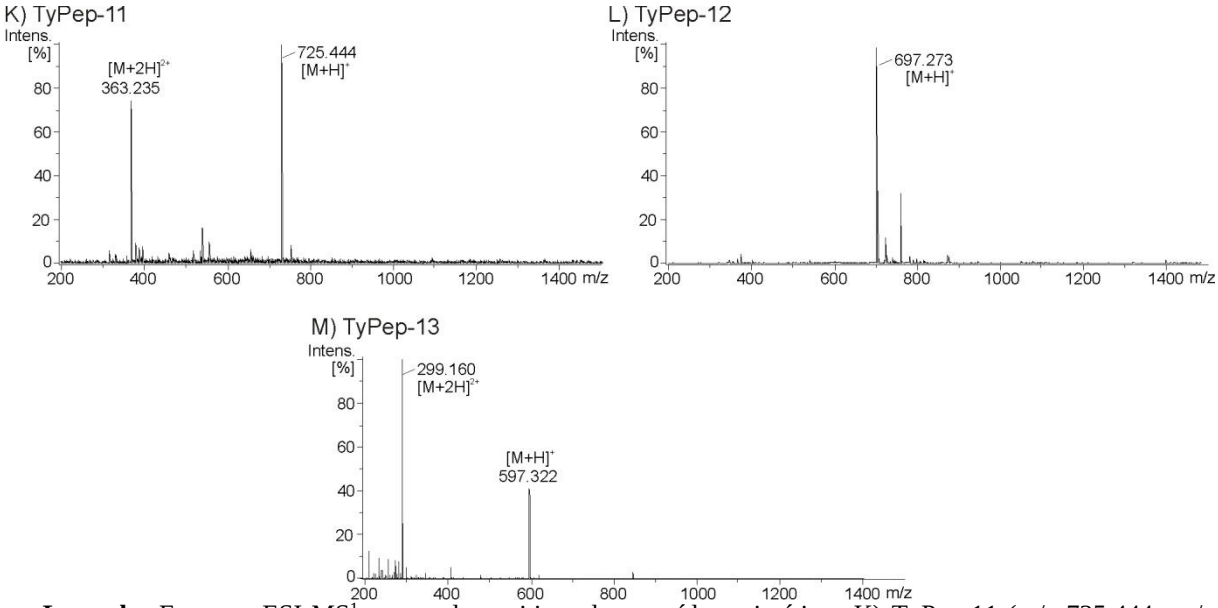
Os peptídeos obtidos à partir da síntese em fase sólida foram purificados através de cromatografia líquida (HPLC), sob fase reserva, em condições isocráticas, de 50% (v/v) de ACN [contendo TFA 0,1% (v/v)]. Após o término da purificação de todos os peptídeos, foram feitas as análises de espectrometria de massas. Esses experimentos foram realizados tanto para a confirmação das massas corretas, quanto para verificar a pureza de cada amostra, sendo que os espectros de massas adquiridos estão apresentados nas Figuras 25 e 26.

Figura 25: Espectros de massas ESI+ dos peptídeos sintéticos



Legenda: Espectro ESI-MS[1], no modo positivo, dos peptídeos sintéticos A) TyPep-1 (*m/z* 894,474 e *m/z* 596,645), B) TyPep-2 (*m/z* 880,393), C) TyPep-3 (*m/z* 584,830), D) TyPep-4 (*m/z* 579,346), E) TyPep-5 (*m/z* 538,241), F) TyPep-6 (*m/z* 1071,65, *m/z* 536,319 e *m/z* 357,879), G) TyPep-7 (*m/z* 534,787), H) TyPep-8 (*m/z* 955,613 e *m/z* 478,218), I) TyPep-9 (*m/z* 955,576 e *m/z* 478,249) e J) TyPep-10 (*m/z* 469,207).
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 26: Espectros ESI-MS[1] dos peptídeos sintéticos



Legenda: Espectro ESI-MS[1], no modo positivo, dos peptídeos sintéticos K) TyPep-11 (m/z 725,444e m/z 363,235), L) TyPep-12 (m/z 697,273) e M) TyPep-13 (m/z 596,322 e m/z 299,160).
Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 25A mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-1. Podem ser observados os íons com valores de *m/z* 894,474 ($[M+2H]^{2+}$) e *m/z* 596,645 ($[M+3H]^{3+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa molar de 1786,948 Da. A Figura 25B mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-2. Pode ser observado o íon com valor de *m/z* 880,393 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1758,786 Da. A Figura 25C mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-3. Pode ser observado o íon com valor de *m/z* 584,830 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1167,660 Da. A Figura 25D mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-4. Pode ser observado o íon com valor de *m/z* 579,346 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1156,692 Da. A Figura 25E mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-5. Pode ser observado o íon com valor de *m/z* 538,241 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1074,482 Da. A Figura 25F mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-6. Podem ser observados os íons com valores de *m/z* 1071,653 ($[M+H]^{+}$), *m/z* 536,319 ($[M+2H]^{2+}$) e *m/z* 357,879 ($[M+3H]^{3+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1070,653 Da. A Figura 25G mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-7. Pode ser observado o íon com valor de *m/z* 534,787 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 1067,574 Da. A Figura 25H mostra o espectro de massas referente ao peptídeo

TyPep-8. Podem ser observados os íons com valores de *m/z* 955,613 ($[M+2H]^{2+}$) e *m/z* 478,218 ($[M+3H]^{3+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 954,613 Da. A Figura 25I mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-9. Podem ser observados os íons com valores de *m/z* 955,576 ($[M+2H]^{2+}$) e *m/z* 478,249 ($[M+3H]^{3+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 954,576 Da. A Figura 25J mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-10. Pode ser observado o íon com valor de *m/z* 469,207 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 936,414 Da. A Figura 26K mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-11. Podem ser observados os íons com valores de *m/z* 725,444 ($[M+H]^{+}$) e *m/z* 363,235 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 724,444 Da. A Figura 26L mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-12. Pode ser observado o íon com valor de *m/z* 697,273 ($[M+H]^{+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 696,273 Da. A Figura 26M mostra o espectro de massas referente ao peptídeo TyPep-13. Podem ser observados os íons com valores de *m/z* 597,322 ($[M+H]^{+}$) e *m/z* 299,160 ($[M+2H]^{2+}$). Após a deconvolução deste espectro, foi obtido o valor de massa de 596,322 Da.

Assim, pode-se observar que os peptídeos sintetizados possuem massas moleculares compatíveis com as massas teóricas. Além disso, os espectros de fragmentação dos peptídeos sintéticos foram analisados e comparados aos dos peptídeos naturais, confirmando desta forma que foram corretamente sintetizados (dados não mostrados).

As atividades ensaiadas foram hemólise, desgranulação de mastócitos, liberação de LDH, antibiose, ação nociceptiva e edematogênica. Os resultados estão apresentados a seguir.

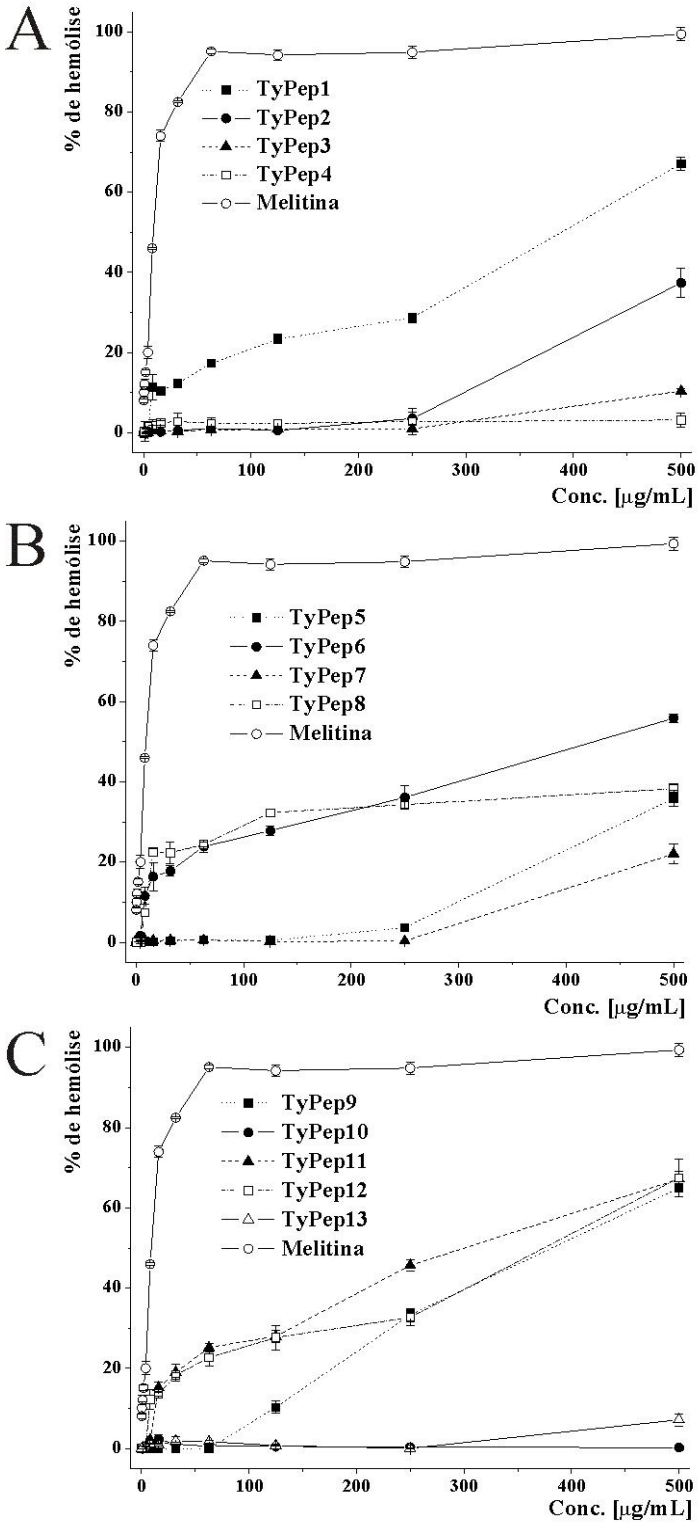
4.3 RESULTADOS DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 Hemólise

Os testes de hemólise foram utilizados utilizando como padrão o peptídeo Melitina (KATSU et al., 1988). Um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana é a Melitina, sendo este um dos componentes mais abundantes do veneno da abelha *Apis mellifera*. Este peptídeo foi descrito como sendo hemolítico, constituído por 26 resíduos de aminoácidos e com estrutura anfipática (PÉREZ-PAYÁ et al., 1997). Além disso, foi observado que o mesmo é capaz de assumir várias conformações e estados de agregação diferentes, em soluções aquosas de diferentes composições (PÉREZ-PAYÁ et al., 1995).

Os resultados dos ensaios de hemólise foram expressos em porcentagem, sendo estes valores obtidos através da comparação com um controle de 100% feito pela incubação dos eritrócitos em solução de Triton X-100 (1%, v/v). A Figura 27 mostra as curvas de atividade hemolítica em função da concentração para os treze peptídeos sintéticos e para o padrão de hemólise utilizado.

Figura 27: Atividade hemolítica



Legenda: Atividade hemolítica dos peptídeos (A) TyPep-1, TyPep-2, TyPep-3, TyPep-4, (B) TyPep-5, TyPep-6, TyPep-7, TyPep-8, (C) TyPep-9, TyPep-10, TyPep-11, TyPep-12 e TyPep-13, em doze concentrações diferentes, variando de 1 a 500 µg/mL. O padrão Melitina foi apresentado em ambos os gráficos para efeito de visualização. Teste foi realizado utilizando-se eritrócitos de ratos *Wistar*.
Fonte: Dados da pesquisa.

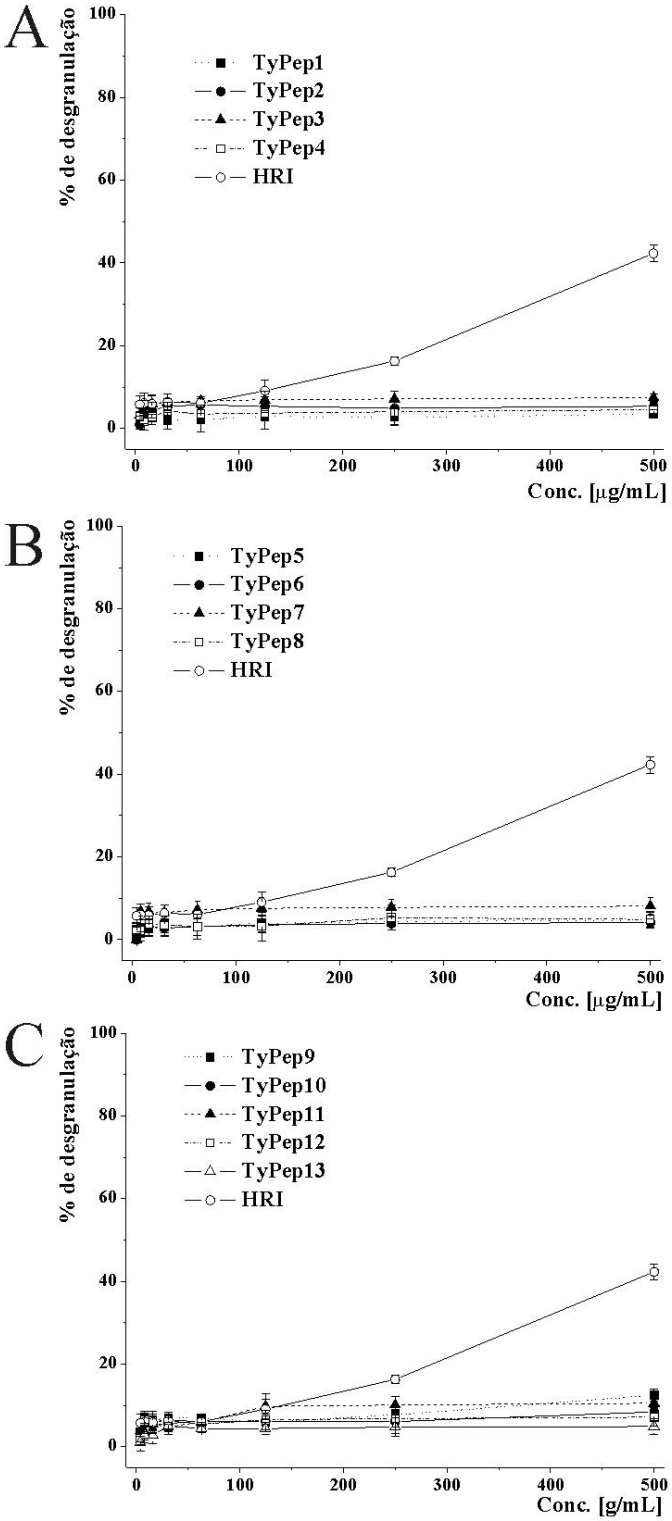
Sabe-se que a atividade hemolítica é dependente de perturbações na membrana dos eritrócitos causada pelos peptídeos. Os resultados obtidos a partir dos testes de hemólise demonstram que apenas uma parte dos peptídos apresenta alguma atividade hemolítica, com é o caso do peptídeo TyPep-9, TyPep-11 e TyPep-12, atingindo 65,0 %, 67,2% e 67,5%, respectivamente, na concentração de 500 µg/mL. Embora a melitina, um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana, utilizado como padrão, apresentou 95% de atividade hemolítica em concentrações bem mais baixas, como 63 µg/mL. Nesta concentração, os peptídeos que apresentaram atividade mais intensa foram TyPep-1, com 17,3% de hemólise, TyPep-6, com 23% de hemólise, TyPep-11, com 25,2% e o peptídeo TyPep-12, com 22,7% de hemólise. Os demais peptídeos aprestam atividade próxima de 0%, ou seja não apresentaram nenhuma atividade hemolítica significativa.

4.3.2 Desgranulação de mastócitos

O ensaio de desgranulação de mastócitos foi realizado utilizando-se mastócitos peritoneais de ratos *Wistar*. As amostras foram ensaiadas em diferentes concentrações, variando de 1 a 500 µL/mL. Os resultados foram expressos em porcentagem de desgranulação. O padrão utilizado para este ensaio foi o peptídeo HR1 (INLKAIAALVKKVL$_{\text{-NH2}}$) que é um mastoparano isolado do veneno da vespa *Vespa orientalis*, causador de desgranulação de mastócitos e, consequentemente, inicia a liberação de histamina (TUICHIBAEV et al., 1988).

A Figura 28 representa a atividade de desgranulação de mastócitos peritoneais em função das concentrações de cada um dos peptídeos; tal atividade foi expressa em porcentagem, sendo valores obtidos através da comparação com o controle 100% realizado pela incubação dos mastócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v).

Figura 28: Atividade desgranuladora de mastócitos



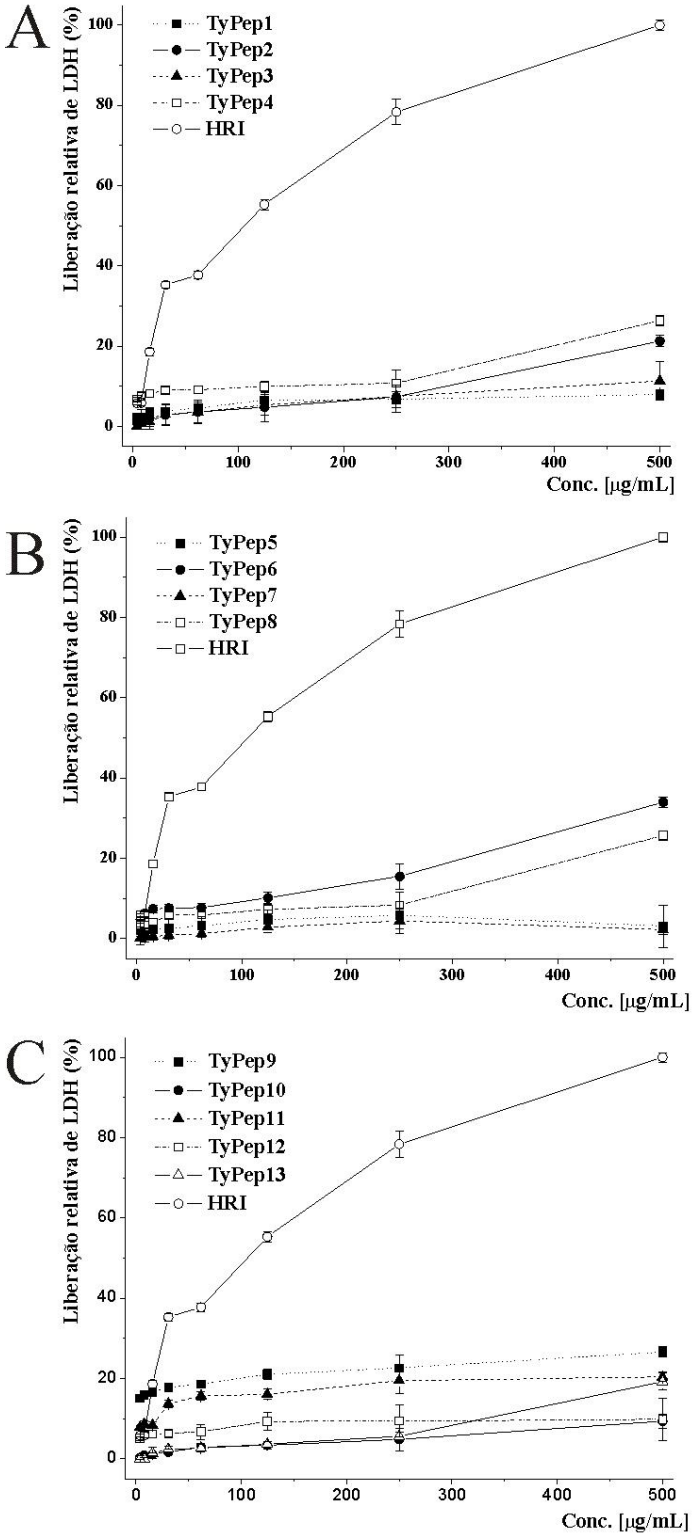
Legenda: teste avaliado para mastócitos peritoneais de ratos *Wistar* dos peptídeos sintéticos e HRI (padrão), em doze concentrações diferentes, variando de 1 a 500 µg/mL. (A) TyPep-1, TyPep-2, TyPep-3, TyPep-4, (B) TyPep-5, TyPep-6, TyPep-7, TyPep-8, (C) TyPep-9, TyPep-10, TyPep-11, TyPep-12 e TyPep-13.
Fonte: dados da pesquisa.

Os mastócitos são células contendo vários grânulos que contêm histamina e outros potentes agentes biologicamente ativos; quando expostos a substâncias estranhas, liberam os grânulos citoplasmáticos ocasionando a desgranulação (HIGASHIJIMA et al., 1990; MENDES et al., 2005). Os resultados demonstram que a desgranulação apresentada não ultrapassa o valor de 10%, mesmo na concentração mais alta. Já na presença do peptídeo padrão, HRI, podemos constatar a ocorrência de 50% de desgranulação na concentração de 500 µg/mL.

4.3.3 Atividade de liberação de lactato desidrogenase (LDH)

A atividade de LDH foi realizada com a suspensão de mastócitos, coletados da cavidade peritoneal de ratos *Wistar*, assim como descrito para os ensaios de desgranulação. Os resultados de medidas de liberação de LDH de mastócitos estão demonstrados na Figura 29, e foram expressos em porcentagem, valores obtidos através da comparação com o controle 100%, realizado pela incubação dos mastócitos em solução de Triton X-100 1% (v/v). O peptídeo HR1 também foi utilizado como padrão neste ensaio.

Figura 29: Atividade de liberação de LDH



Legenda: teste avaliado para mastócitos peritoneais de ratos *Wistar* dos peptídeos sintéticos e HRI (padrão), em doze concentrações diferentes, variando de 1 a 500 µg/mL. (**A**) TyPep-1, TyPep-2, TyPep-3, TyPep-4, (**B**) TyPep-5, TyPep-6, TyPep-7, TyPep-8, (**C**) TyPep-9, TyPep-10, TyPep-11, TyPep-12 e TyPep-13.
Fonte: dados da pesquisa.

A enzima lactato desidrogenase é de localização citoplasmática, e sua liberação para o meio extracelular é utilizada como indicador de lise dos mastócitos. Na presença do peptídeo padrão HR1 na concentração de 125 μg/mL, pode-se constatar a ocorrência de liberação relativa de aproximadamente 60% de LDH.

4.3.4 Antibiose

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibiótica realizado para os peptídeos sintéticos, em comparação a outros peptídeos de venenos de escorpiões, descritos em literatura, e com um antibiótico padrões (Cloranfenicol e Oxitetraciclina).

Tabela 5: Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em μg/μL, para os três peptídeos estudados no presente trabalho, peptídeos de referencia e para os padrões do experimento (Cloranfenicol e Oxitetraciclina), frente à bactérias Gram+ e Gram-.

	Valores de MIC (μg/mL)			
	Gram -		**Gram +**	
PEPTÍDEOS	***E. coli***	***E. aerogenes***	***S. aureus***	***S. pneumoniae***
TyPep-1	>500	>500	>500	>500
TyPep-2	>500	>500	>500	>500
TyPep-3	>500	>500	>500	>500
TyPep-4	>500	>500	>500	>500
TyPep-5	>500	>500	>500	>500
TyPep-6	>500	>500	>500	>500
TyPep-7	>500	>500	>500	>500
TyPep-8	>500	>500	>500	>500
TyPep-9	>500	>500	>500	>500
TyPep-10	>500	>500	>500	>500
TyPep-11	>500	>500	>500	>500
TyPep-12	>500	>500	>500	>500
TyPep-13	>500	>500	>500	>500
Cloranfenicol	4	4	8	2
Oxitetraciclina	1	2	8	2

Legenda: Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em μg/μL, para os treze peptídeos estudados no presente trabalho, peptídeos de referencia e para os padrões do experimento (Cloranfenicol e Oxitetraciclina), frente à bactérias Gram+ e Gram-.
Fonte: Dados da pesquisa

Como observado na Tabela 5 os peptídeos isolados neste trabalho não inibiram o crescimento bacteriano, tanto para bactérias Gram-positiva quanto para Gram-negativa. Nota-se ainda a alta atividade dos padrões testados Cloranfenicol e Oxitetraciclina.

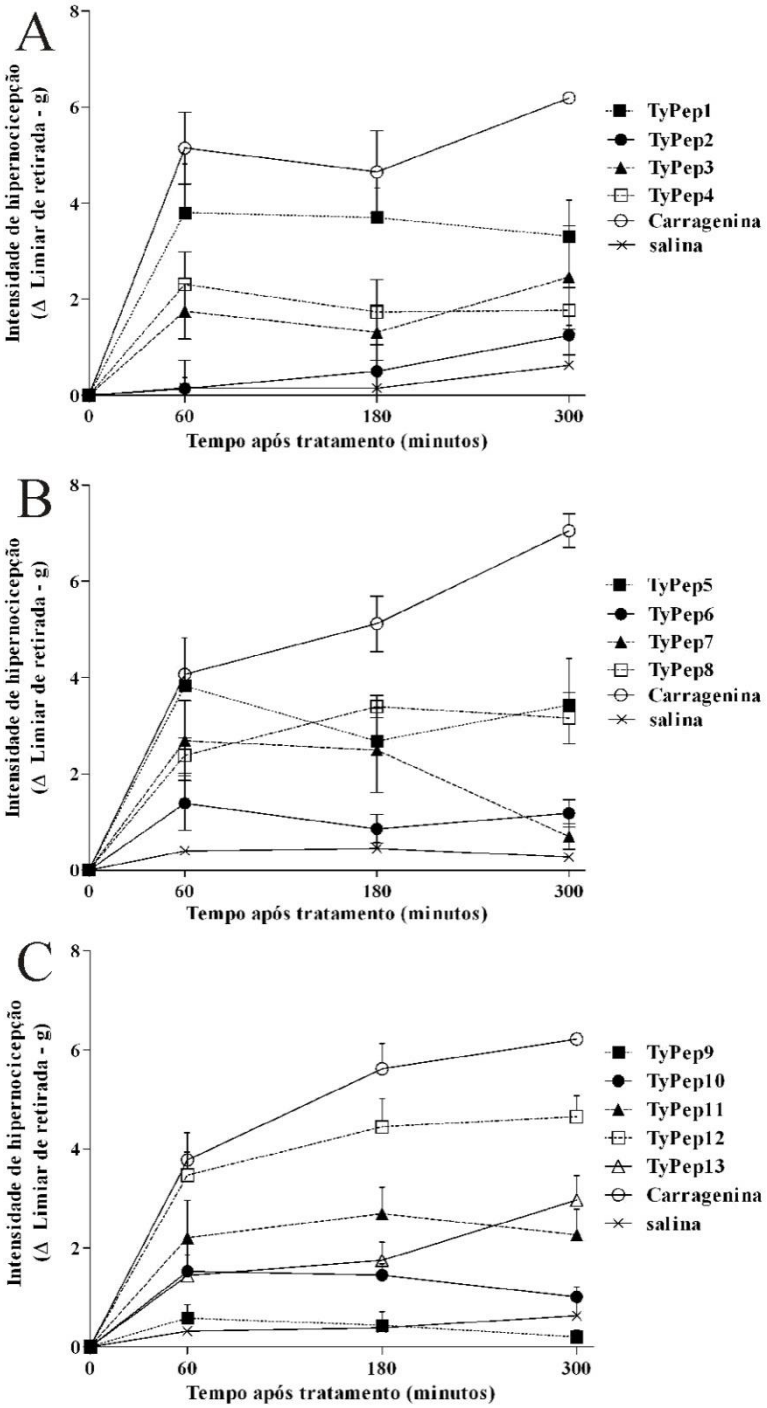
4.3.5 Atividades Farmacológicas de Dor e Inflamação

A dor é considerada um problema de saúde pública, uma vez que interfere na qualidade de vida dos pacientes. Neste sentido, dados da Organização Mundial de Saúde relatam que cerca de 40% dos pacientes que sofrem de dor não dispõem de tratamento adequado (HANKS et al., 2001; JACOX et al., 1994). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), esta é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial e/ou de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tais lesões. A dor, portanto, é um processo cognitivo e dependente da memória, aspectos culturais e psíquicos.

Os nociceptores (receptores para a dor) são terminações nervosas livres desprovidas de estruturas receptoras específicas sendo, portanto, uma continuação da própria fibra nervosa. Os neurônios aferentes primários detectam o estímulo nociceptivo ou nocivo (transdução), conduzem o impulso da periferia para a medula espinhal e transferem esses impulsos para neurônios secundários e interneurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal (transmissão sináptica) (CAVIEDES; HERRANZ, 2002). Da medula espinhal, as informações nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Soluções de cada peptídeo foram administradas (em diferentes concentrações) nos camundongos, por via intraplantar (i.pl.). A avaliação da hiperalgesia foi feita através de uma medida de intensidade de hipernocicepção, calculada através da média do limiar de retirada da pata, utilizando-se o von Frey eletrônico. Os animais controles foram administrados com o mesmo volume de salina nas mesmas condições experimentais. A carragenina (25 µg/25 µL) foi utilizada como controle positivo. Os testes foram feitos com 6 animais em cada grupo, e os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste Two-Way ANOVA. A Figura 30 mostra as curvas em função do tempo do efeito hiperalgésico. Sob cada intervalo de tempo, os dados estatísticos que tiveram resultado significativo foram representados com símbolos iguais aos de suas curvas correspondentes. A representação contendo apenas um símbolo corresponde a resultados estatísticos com significância $p<0,05$, com dois símbolos $p<0,01$ e três símbolos $p<0,001$.

Figura 30: Sensibilidade dolorosa avaliada através do teste do von Frey eletrônico após a injeção dos peptídeos



Legenda: (**A**) TyPep-1, TyPep-2, TyPep-3, TyPep-4, (**B**) TyPep-5, TyPep-6, TyPep-7, TyPep-8, (**C**)TyPep-9, TyPep-10, TyPep-11, TyPep-12 e TyPep-13, na concentração de 25µg/25µL. O limiar nociceptivo está representado pelo delta (Δ) da força (em gramas) necessária para a retirada da pata**.** As medidas foram realizadas nos tempos 0 (antes da injeção i.pl.), 60, 180, 300 minutos após a administração das amostras ou carragenina (25 µg/25 µL, i.pl.). No grupo controle foi injetado apenas solução salina estéril. Os resultados foram expressos como média ±SEM de 6 animais por grupo. Os dados dos tratamentos estatísticos destes ensaios estão mostrados na Table 6.

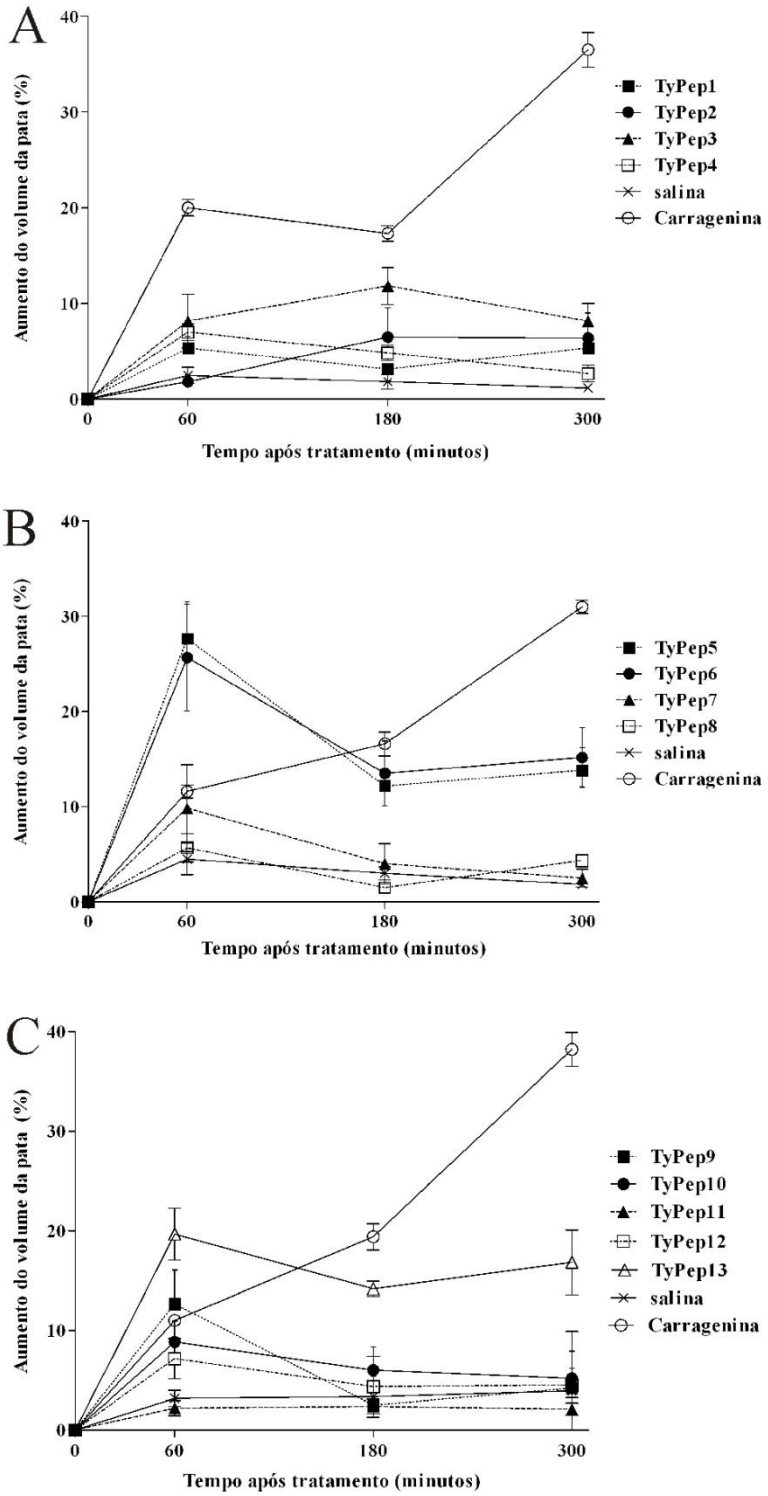
Fonte: Dados da pesquisa.

Os peptídeos TyPep-1, TyPep-5, TyPep-8, TyPep-11, TyPep-12 e TyPep-13 causaram aumento significativo na sensibilidade nociceptiva durante todos os tempos observados durante o teste. Os peptídeos TyPep-4, TyPep-6, TyPep-7 e TyPep-10 aparentemente causam um aumento significativo no limiar de dor por um período curto de tempo e intensidade leve ou moderada (significância $p<0,05$), ocorrendo um declínio nas curvas apresentadas na Figura 30. Já os peptídeos TyPep-2, TyPep-3, e TyPep-9 aparentemente não causam aumento significativo na dor. Além disso, não houve diferença significativa no limiar nociceptivo dos animais tratados com salina durante todo o período observado.

As propriedades inflamatórias de determinadas moléculas podem ser investigadas através de teste *in vitro* ou *in vivo*. Um modelo clássico para testar a inflamação aguda é o do edema de pata induzido pela carragenina, utilizado na busca de novas substâncias antiinflamatórias (DI ROSA et al., 1971). A injeção intraplantar de carragenina produz um aumento do voluma da pata, dependente do tempo. Esse aumento é decorrente da infiltração de neutrófilos (VINEGAR et al., 1987) e da liberação local de vários mediadores inflamatórios como citocinas, ROS, RNS e prostanóides (SALVEMINI et al., 1996; OMOTE et al., 2001). A resposta edematogênica induzida pela carragenina em ratos é um evento constituído por uma fase precoce (até 2 h), desencadeada pela liberação de histamina, bradicinina e serotonina no sítio inflamatório, seguida de uma fase tardia em que predomina a ação pró-inflamatória dos prostanóides (DI ROSA et al., 1971). Embora a maioria dos estudos sobre a resposta inflamatória induzida pela injeção intraplantar de carragenina seja realizada em ratos, a resposta obtida em camundongos é bastante semelhante (HENRIQUES et al., 1987).

Em geral, foi observado a formação de edema para os peptídeos TyPep-1, TyPep-3, TyPep-4, TyPep-5, TyPep-6 e TyPep-13. Maiores intensidades são vistas para os peptídeos TyPep-5 e TyPep-13, que mantêm a atividade edematogênica durante todo o intervalo de tempo de coleta de dados, com significância $p<0,01$ no tempo de 300 minutos. Os peptídeos TyPep-3 e TyPep-6 apresentam também esse efeito até os 300 minutos, porém com significância menor (ver Tabela 6). Os peptídeos TyPep-9 e TyPep-10 apresentaram um leve aumento do volume da pata apenas até os primeiros 60 minutos do teste, com significância $p<0,5$ (ver Tabela 6).

Figura 31: Efeito edematogênico dos peptídeos



Legenda: Avaliação do aumento do volume da pata (Edema) após a injeção i.pl, dos peptídeos sintéticos na concentração de 25 µg/25 µL em camundongos. As medidas foram realizadas nos tempos 0 (antes da injeção i.pl.), 60, 180, 300 minutos após a administração das amostras ou carragenina (25 µg/25 µL, i.pl.). No grupo controle foi injetado apenas solução salina estéril (25 µL, i.pl.). Os resultados foram expressos como média ±SEM de 6 animais por grupo. Os dados dos tratamentos estatísticos destes ensaios estão mostrados na Table 6.
Fonte: Dados da pesquisa.

Em resumo, a Tabela 6 demonstra de forma simplificada os resultados obtidos e demonstrados nas Figuras 30 e 31. É possível observar que os peptídeos TyPep-5 e TyPep-13 provavelmente são uns dos componentes responsáveis pelos sintomas de dor e inflamação provenientes da ferroada desses escorpiões. Nota-se que eles causam dor e formação de edema, durante todo o intervalo de tempo de coleta de dados. Outros peptídeos com efeitos mais imediatistas, de curta duração incluem TyPep-4, TyPep-7, TyPep-9 e TyPep-10. Os peptídeos TyPep-3 e TyPep-9 apresentaram somente algum efeito edematogênico e os peptídeos TyPep-7, TyPep-8, TyPep-11 e TyPep-12 apenas efeitos nociceptivos.

Tabela 6: Resumo dos resultados estatísticos para os testes de Dor e Edema

	Hiperalgesia			**Edema**		
	60	180	300	60	180	300
TyPep-1	***	***	***	*	-	**
TyPep-2	-	-	-	-	-	-
TyPep-3	-	-	-	*	***	**
TyPep-4	*	-	-	***	**	-
TyPep-5	***	*	***	***	*	***
TyPep-6	*	-	-	***	*	**
TyPep-7	***	**	-	-	-	-
TyPep-8	***	***	***	-	-	-
TyPep-9	-	-	-	*	-	-
TyPep-10	*	-	-	*	-	-
TyPep-11	**	***	*	-	-	-
TyPep-12	***	***	***	-	-	-
TyPep-13	*	**	***	***	***	***

Legenda: *p<0,5; **p<0,01; *** p<0,001; - não significante.
Fonte: Dados da pesquisa.

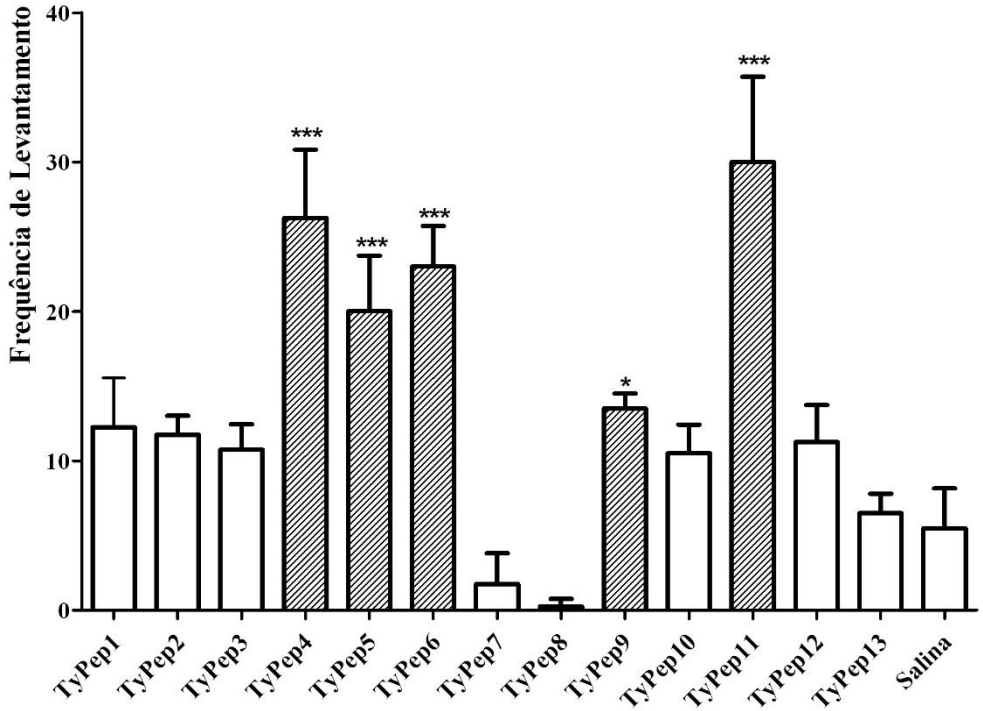
4.3.6 Avaliação da atividade geral de camundongos por campo aberto após injeção dos peptídeos sintéticos de escorpião

O campo aberto foi desenvolvido para estudo da emocionalidade em ratos. Normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como os movimentos locomotores que são os deslocamentos entre um ponto a outro da arena, os movimentos de exploração ou não locomotores que são aqueles que o animal pode realizar sem a necessidade de deslocamento como, por exemplo, elevação vertical, cheirar o ambiente e autolimpeza. Em experimentos com roedores, estes

comportamentos são essenciais para compreender o efeito de diferentes drogas psicoestimulantes e ansiolíticas. (PRUT; BELZUNG, 2003; EILAM, 2003).

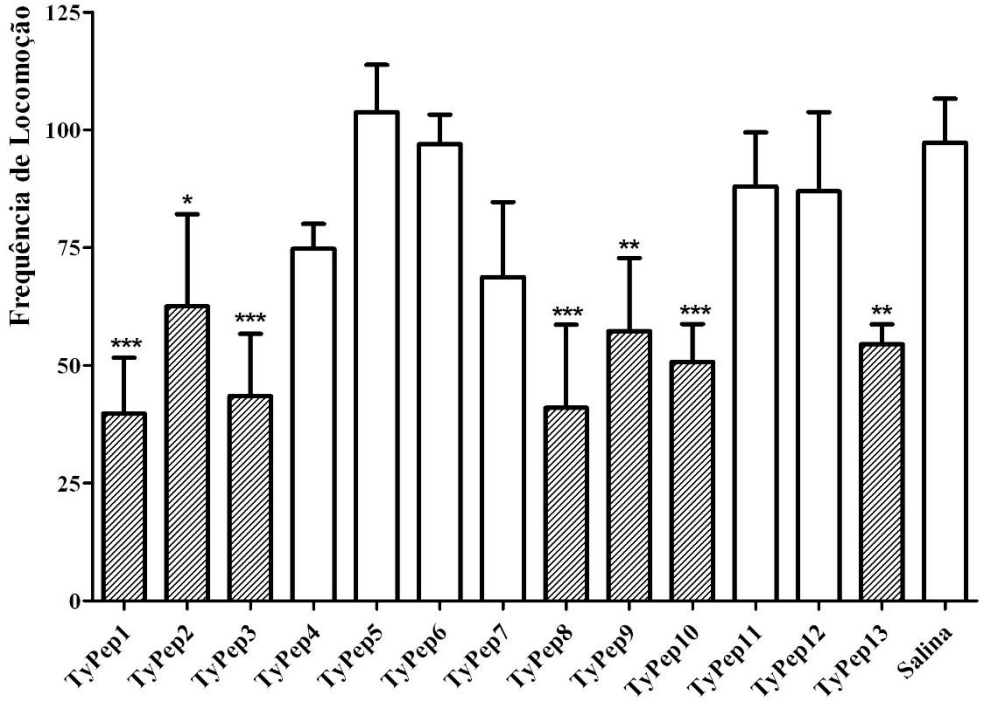
A atividade geral em camundongos foi avaliada através da observação de alterações nos comportamentos de levantamento e locomoção. As Figuras 32 e 33 mostram as médias das frequências de levantamento e frequência de locomoção. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. As amostras que apresentaram significância $p<0,5$ foram marcadas com um asterístico (*) acima das barras, enquanto que a significância $p<0,01$ e $p<0,001$, com (**) e (***), respectivamente.

Figura 32: Frequências de Levantamento



Legenda: Avaliação da frequência de Levantamento dos camundongos 15 minutos após a administração i.pl. dos peptídeos sintéticos; * $p< 0,05$; ** $p<0,1$; *** $p<0,001$ em relação ao grupo controle (salina).
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 33: Frequências de locomoção



Legenda: Avaliação da frequência de Locomoção dos camundongos 15 minutos após a administração i.pl. dos peptídeos sintéticos; * p< 0,05; ** p<0,1; *** p<0,001 em relação ao grupo controle (salina).
Fonte: Dados da pesquisa.

Observa-se através do gráfico de barras (Figura 32) que em geral ocorre um aumento na frequência de levantamento. Porém, apenas os peptídeos TyPep-4, TyPep-5, TyPep-6 e TyPep-11 mostraram uma alteração significativa do comportamento de levantamento em relação ao grupo controle tratado apenas com salina, com valore de p<0,01, p<0,05, p<0,05 e p<0,001, respectivamente. Os camundongos tratados com os peptídeos TyPep-1, TyPep-2, TyPep-3, TyPep-7, TyPep-8, TyPep-9, TyPep-10, TyPep-12 e TyPep-13 não apresentaram alteração significativa no levantamento.

Por outro lado, os dados obtidos no experimento de frequência de locomoção (Figura 33) mostram uma redução no deslocamento geral dos indivíduos. Os testes estatísticos demonstraram que os peptídeos TyPep-1 (p<0,001), TyPep-2 (p<0,05), TyPep-3 (p<0,001), TyPep-8 (p<0,001), TyPep-9 (p<0,01), TyPep-10 (p<0,001) e TyPep-13 (p<0,01) provocaram uma diminuição significativa no deslocamento dos camundongos dentro da arena. Os demais peptídeos não apresentaram diferenças significativas estatisticamente na locomoção, não alterando esse comportamento dos camundongos.

O método de campo aberto tem sido utilizado para avaliação do efeito de inúmeras drogas, incluindo compostos com efeitos ansiolíticos (benzodiazepinas, ligantes de

serotonina, neuropeptídeos), também compostos com efeito estimulante (Anfetamina, cocaína), sedativos (neurolépticos), ou indutores de prostração (drogas epileptogênicas). Um aumento na locomoção central ou no tempo gasto na parte central do dispositivo, sem modificação de locomoção total e de exploração vertical pode ser interpretado como um tipo de efeito ansiolítico, enquanto o contrário, que é uma diminuição dessas variáveis, está associado com efeitos ansiogênicos. O aumento da locomoção pode ser considerado um efeito estimulante, enquanto que a diminuição na atividade vertical e locomoção estão relacionados com sedação ou prostração (PRUT; BELZUNG; 2003).

O teste do Campo Aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural de um animal em um ambiente novo é explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente novo (MONTGOMERY, 1958). Os peptídeos do presente trabalho aparentemente estão tendo efeito na locomoção, sendo que este efeito é considerado ansiolítico, como dito anteriormente. Este fato corrobora com o efeito do veneno total, que visa paralisar avítima dos escorpiões evitando a fuga da mesma, no comportamento típico de caça desses escorpiões ou ate mesmo na defesa.

O escorpionismo grave caracteriza-se por falência cardiovascular, podendo ocorrer ainda edema pulmonar, sendo estas as causas mais comuns de óbitos para este tipo de acidente. Bradicardia, taquicardia, aumento da contração do miocárdio, arritmias e hipertensão são comuns nestes casos. A hipertensão arterial é bastante comum e pronunciada em animais e crianças. Geralmente é causada pela liberação de catecolaminas das suprarenais resultando em aumento da força de contração do miocárdio e da resistência vascular periférica. A liberação de renina, seguida da produção de angiotensina II, pode ser outro fator que contribui para a hipertensão (KRISHNAMURTHY, 1996).

A hipotensão arterial, que geralmente segue a hipertensão inicial, é um processo grave nos envenenamentos. Alguns mecanismos foram propostos para explicar tal fato como efeito colinérgico, síndrome da depleção de catecolaminas, efeito beta2-vasodilatador, hipovolemia secundária (redução do volume sanguíneo), e ainda algum efeito causado por cininas ou prostaglandinas presentes nesses venenos (MARCUSSI et al., 2011). Além da hipertensão e hipotensão, existem ainda os casos de ocorrência de arritmias cardíacas, causadas principalmente pela liberação de acetilcolina e estimulações beta-adrenérgicas.

Verano-Braga et al. (2008) caracterizaram compostos com atividade potenciadora de bradicinina, chamodos de TsHpt (Hipotensinas de *T. serrulatus*). TsHpt-I, um membro desta família, apresentou atividade potenciadora do efeito hipotensor da bradicinina e vaso-dilatador. Aparentemente, a presença de peptídeos desta família promove hipotensão

transiente e rápida, seguido posteriormente por um efeito de potencialização BK retardada. Foi demonstrado ainda que a hipotensão transiente rápida pode ocorrer devido à libertação de NO (óxido nítrico / monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), forte mediador do efeito hipotensor das cininas) (VERANO-BRAGA et al., 2010).

Uma vez que as hipotensinas possem todos esses efeitos já bem estabelecidos e alguns dos peptídeos em estudo são fragmentos dessas toxinas, portanto eles podem ser os responsáveis pór potencializar esse efeito, mas deverá haver estudos mais aprofundados futuramente para essas conclusões.

PARTE III

4.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE METABOLITOS DOS VENENOS

Para a determinação do perfil de metabólitos foi necessário primeiramente a padronização da cromatografia para melhor separação e condições ideais de detecção dos compostos que serviram de padrões. Estes compostos padrões utilizados na construção da biblioteca de metabólitos foram escolhidos de acordo com a vasta busca na literatura por compostos que faziam parte de venenos animais diversos realizadas previamente à construção da mesma. Uma vez que praticamente não existem trabalhos de perfil de metabólitos em venenos de escorpiões, a escolha dos compostos foi baseada em venenos animais no geral, os quais contém misturas de neurotransmissores, aminas biogênicas, carboidratos entre outros metabólitos que fazem parte do agravamento nos casos de envenenamentos.

4.4.1 Efeito do ácido Heptafluorobutírico (HFBA) no tempo de retenção de compostos polares: a cromatografia de par iônico (IPC) em fase reversa C18

O maior desafio na pesquisa farmacêutica e na descoberta de novas drogas é a separação de substâncias biológicas para posterior identificação sem perda de material e com a melhor resolução possível. Um fato que deve sempre ser levado em consideração é que grande parte destes compostos são iônicos ou polares, sendo que a adição de um reagente de pareamento iônico, ou seja, um contra-íon na fase móvel, formará "complexos" mais ou menos polares que o composto original, alterando significativamente o tempo de retenção do composto iônico. Esta técnica permite separação relativamente rápida de mistura de compostos, em uma única corrida cromatográfica, sem prévio tratamento ou derivatização da amostra (SZEPESI, 1990; DONATO et al., 2004).

Um reagente de pareamento iônico é uma molécula iônica que carrega uma carga oposta à do analito de interesse. Esse tipo de reagente possui uma região hidrofóbica para interagir com a fase estacionária e uma região carregada para interagir com o analito. As fases estacionárias utilizadas com maior frequência são compostas de resinas neutras e hidrofóbicas como poliestireno/divinilbenzeno ou sílica ligada a uma cadeia hidrofóbica. Uma vantagem da técnica é que uma única fase estacionária pode ser utilizada tanto para análise de ânions ou de cátions (DIONEX, 2000).

Os reagentes como ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico e ácido heptafluorobutírico (HFBA) além de outros ácidos carboxílicos perfluorinados são os

reagentes de par-iônico mais comumente utilizados na separação de peptídeos e proteínas por IPC (Ion Pair Chromatography)-HPLC, devido às suas altas purezas, solubilidade em água, transparência no UV até 200nm, grande reprodutibilidade e volatilidade (tornando a recuperação dos analitos relativamente fácil), dessa forma a IPC é altamente compatível com o conjunto de HPLC-MS (WYBRANIEC; MIZRAHI, 2004; CASTRO et al., 1999).

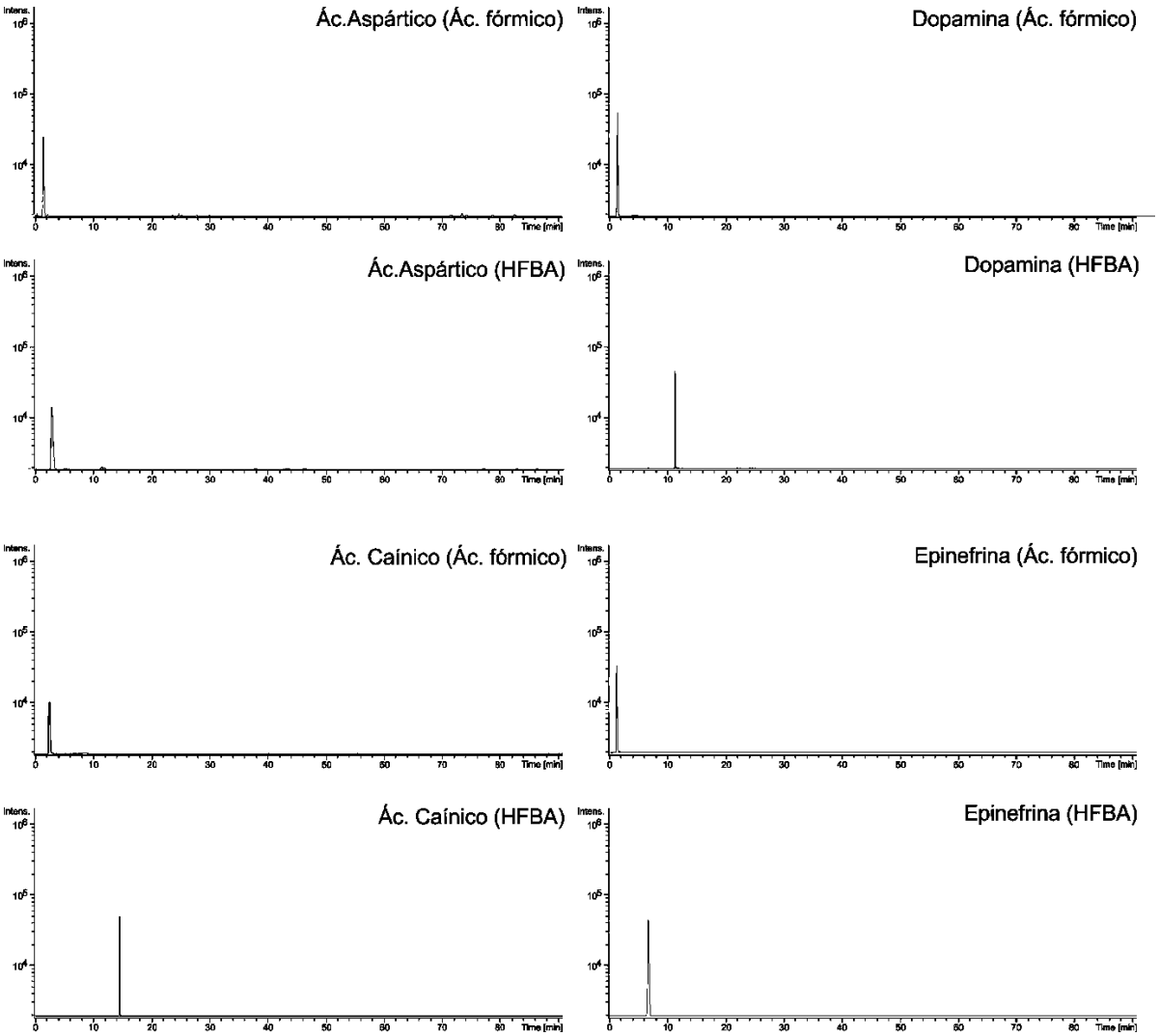
No presente trabalho, através das análises de LCMS pode-se observar que muitos compostos analisados foram eluidos no mesmo tempo de retenção (intervalo de no máximo 1 minuto). Diversas tentativas de uso de diferentes tipos de gradientes de eluição, não alteraram o tempo de eluição desses compostos, o que dificultava muito a identificação e a construção da biblioteca. Através dos testes iniciais foi possível melhorar a dispersão dos metabólitos através de um gradiente mais extenso, de 90min. Duas das condições cromatográficas testadas podem ser visualizadas na Tabela 7 (fase móvel contendo ácido fórmico ou HFBA).

Tabela 7: Condição cromatográfica utilizando-se ácido fórmico ou HFBA como reagentes de pareamento iônico na fase móvel

Tempo (min)	**ACN com Ác. Fórmico ou HFBA 0,1% (%)**	**H_2O com Ác. Fórmico ou HFBA 0,1% (%)**
0	2	98
0,1	2	98
90	95	5

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 34: Cromatografia de íons totais (TIC) dos compostos em diferentes condições (Ácido fórmico ou HFBA)



Legenda: Cromatogramas de íons totais (TIC) proveniente das análises de compostos padrões em um sistema µLC-ESI-micrOToF-QIII (Bruker Daltonics) com utilização de uma coluna XBridge™ BEH130 C18 (2,1x100mm; 3,5µm). Entre os compostos utilizados para esta padronização estão: ácido aspártico, ácido caínico, dopamina e epinefrina na presença de ácido fórmico na fase móvel e também na presença de HFBA para comparação da diferença nos tempos retenção dos compostos. Para essa análise foram utilizadas as condições cromatográficas padronizadas na Tabela 4.
Fonte: Dados da pesquisa.

Através das análises dos cromatogramas dos diferentes compostos-padrões foi possível notar um aumento favorável no tempo de retenção dos compostos polares, após a adição do ácido heptafluorobutírico (HFBA) na fase móvel da cromatografia, indicando que esse reagente possui maior capacidade de formar pareamento iônico com os compostos estudados (Figura 34).

Pode-se observar que os compostos padrões testados, quando utilizados em fases móveis contendo ácido fórmico, tiveram quase o mesmo tempo de retenção. Entretanto,

quando foi utilizado o ácido heptafluorobutílico (HFBA) foi possível observar que alguns compostos tiveram seu tempo de retenção aumentado em mais de 10 minutos (como, por exemplo, o ácido caínico e a dopamina), e outros que também tiveram seu tempo de retenção aumentado, porém de maneira menos intensa (como, por exemplo, o ácido aspártico e a epinefrina). A partir dos testes de gradiente e de diferentes fases móveis, definiu-se então que a condição cromatográfica utilizando HFBA seria a ideal para a padronização do banco de compostos e para a análise dos metabólitos em amostras complexas de venenos animais. A utilização do HFBA foi eficiente na separação cromatográfica dos 65 compostos analisados nesse trabalho, porém a ação mais notável da mudança no tempo de retenção ocorreu em compostos que eram eluidos em até 10 minutos.

4.4.2 Construção da biblioteca de metabólitos

Para a construção da biblioteca de compostos de baixas massas molares, foram escolhidas classes de compostos tais como aminoácidos, aminas biogênicas, nucleotídeos, nucleosídeos, bases nitrogenadas, neurotransmissores, ácidos orgânicos, entre outros. Foram utilizados os softwares QuantAnalysis v2.1 (BRUKER DALTONICS) e Data Analysis v4.1 (BRUKER DALTONICS). O software utilizado para a comparação dos dados da biblioteca com as amostras biológicas foi o TargetAnalysis v1.3 (BRUKER DALTONICS).

Como estratégia para construir a biblioteca de metabólitos foram adotados parâmetros iniciais como o limite de intervalo de tempo de retenção considerado entre os pontos da curva de calibração (0,5 minuto), padronizar a relação área dos picos com a concentração de cada composto e determinar as concentrações suficientes para que houvesse intensidade de sinal suficientemente bom para a construção de curvas com coeficientes da reta confiáveis. Este processo foi bastante minucioso para que todos os parâmetros fossem padronizados e otimizados para diferentes compostos.

O conjunto de dados que compõem a biblioteca de metabólitos foi transferido para o Microsoft Excel v.14 (MICROSOFT 2010) para o armazenamento em formato "*csv*", o qual contém os seguintes parâmetros: nome do composto, *m/z* das respectivas moléculas na forma monoprotonada, tempo de retenção, fórmula molecular e íons fragmentos (qualificadores).

Para o desenvolvimento do método de processamento dos dados no Target Analysis é possível estabelecer valores limiares (crítico e subcrítico) para os parâmetros mencionados anteriormente. Esses valores são utilizados para o cálculo do escore da detecção e

identificação de cada composto, sendo que os parâmetros foram classificados conforme mencionado na Tabela 8:

Tabela 8: Esquema de classificação dos parâmetros utilizados na prospecção de metabólitos

Parâmetro Mensurado	Condição	Classificação
Acurácia de Massa (M)	$0 \leq d m/z \leq MT1$	Excelente
	$MT1 < d m/z \leq MT2$	Bom
	$MT2 < d m/z$	Ruim
Valor de *mSigma* (mS)	$0 \leq mS \leq mST1$	Excelente
	$mST1 < mS \leq mST2$	Bom
	$mST2 < d m/z$	Ruim
Tempo de Retenção (TR)	$0 \leq dTR \leq TRT1$	Excelente
	$TRT1 < dTR \leq TRT2$	Bom
	$TRT2 < dTR$	Ruim
Íons qualificadores	$0 \leq d m/z \leq$ tolerância de identificação	Bom
	Tolerância de identificação $< d m/z$	Ruim

Legenda: dTR: Diferença entre tempo de retenção esperado e o medido em minutos; TRT1: Valor de tolerância subcrítico para o tempo de retenção; TRT2: valor do tempo de retenção crítico; d*m/z*: diferença entre o valor de *m/z* calculado e mensurado em mDa; MT1: valor de tolerância de massa subcrítico; MT2: valor de tolerância de massa crítico; mS: valor de *mSigma*; mST1: valor de *mSigma* subcrítico; mST2: valor de *mSigma* crítico.
Fonte: Dados da pesquisa.

Para a classificação de escores (pontuação) nas análises dos compostos nos venenos de escorpião foi utilizada a simbologia abaixo (Tabela 9):

Tabela 9: Esquema de classificação segundo escores

Resultados de Escore	Interpretação	Simbolo
4 parâmetros muito bons (altíssima probabilidade de identificação correta)	Identificação extremamente confiável: pelo menos 1 íon qualificador encontrado e os 3 parâmetros restantes abaixo do valor subcrítico	++++
3 parâmetros muito bons (alta probabilidade de identificação correta)	Identificação extremamente confiável	+++
2 parâmetros muito bons e 2 parâmetros bons	Identificação confiável	++
1 ou mais parâmetros ruins, independente do numero de parâmetros bons ou muito bons	Identificação não confiável	Não demonstrado

Legenda: dTR: Diferença entre tempo de retenção esperado e mensurado em minutos; TRT1: Valor de tolerância subcrítico para o tempo de retenção; TRT2: valor do tempo de retenção crítico; d*m/z*: diferença entre o valor de *m/z* calculado e mensurado em mDa; MT1: valor de tolerância de massa subcrítico; MT2: valor de tolerância de massa crítico; mS: valor de *mSigma*; mST1: valor de *mSigma* subcrítico; mST2: valor de *mSigma* crítico.
Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 10: Relação de padrões utilizados na construção da biblioteca metabolômica.

Nº	*M/Z*	TR (min)	Fórmula	ID	Q1	Q2	Q3
1	75.0843	12.00	C3H10N2	1.3Diaminopropano	58.06		
2	122.0891	21.00	C8H11N	2Feniletilamina	105.06	91.05	
3	177.0320	1.40	C6H8O6	Ac. ascorbico	141.01		
4	134.0448	2.10	C4H7NO4	Ac. aspartico	116.03	117.03	
5	181.0422	12.80	C9H8O4	Ac. caféico	163.04	135.04	
6	170.0441	1.00	C3H7NO2S	Ac. cistéico	124.00	339.01	
7	148.0604	2.80	C5H9NO4	Ac. glutamico	130.05	102.05	84.04
8	169.0422	9.00	C8H8O4	Ac.di-hidroxifenilacetico	123.04		
9	152.0473	6.00	C8H8O3	Ac. hidroxifenilacetico	135.03	152.05	
10	192.0582	11.50	C10H9NO3	Ac. hidroxi-indolacetico	146.06	174.06	
11	176.0633	23.00	C10H9NO2	Ac. indolacetico	130.06	158.87	
12	214.1001	14.50	C10H15NO4	Ac. caínico	196.09	168.10	150.09
13	117.0109	1.50	C4H4O4	Ac.maléico	99.01	134.04	
14	428.0294	1.50	C10H15N5O10P2	Aden. difosfato	348.07	136.06	
15	136.0618	7.30	C5H5N5	Adenina	119.04		
16	330.0525	3.00	C10H12N5O6P	Adenosina monof ciclica	136.06	177.06	
17	348.0704	1.50	C10H14N5O7P	Adenosina monofosfato	250.09		
18	268.0967	3.60	C10H13N5O4	Adenosina	136.06	136.06	
19	90.0550	3.00	C3H7NO2	Alanina			
20	175.1790	10.00	C6H14N4O2	Arginina	158.09	129.11	116.07
21	133.0608	2.00	C4H8N2O3	Asparagina	116.03	88.04	
22	118.0784	2.00	C5H10NO2	Betaína	235.16		
23	103.1230	13.20	C5H14N2	Cadaverina	86.09		
24	112.0432	4.50	C4H5N3O	Citosina	95.02		
25	154.0789	10.50	C8H11NO2	Dopamina	137.06	123.04	
26	184.0895	7.00	C9H13NO3	Epinefrina	166.09	135.08	
27	146.1652	22.00	C7H19N3	Espermidina	129.14		
28	203.2230	27.60	C10H26N4	Espermina	129.14		
29	166.0859	17.60	C9H11NO2	Fenilalanina	120.08	149.06	
30	104.0706	4.50	C4H9NO2	GABA	87.04	58.07	
31	76.0393	2.00	C2H5NO2	Glicina			
32	203.0707	1.10	C6H12O6	Glicose*	203.05	187.09	149.02
33	147.0764	2.30	C5H10N2O3	Glutamina	130.05	101.07	84.04
34	152.0567	6.00	C5H5N5O	Guanina	135.03		
35	284.0989	7.00	C10H13N5O5	Guanosina	152.06	135.03	
36	444.0243	1.50	C10H15N5O11P2	Guanosina difosfato	152.06		
37	364.0653	1.50	C10H14N5O8P	Guanosina monofosfato	152.06		
38	523.9906	2.50	C10H16N5O14P3	Guanosina trifosfato **	284.00	265.10	485.55
39	288.1746	23.50	C15H21N5O	Hidroxitripargina			
40	112.0869	13.50	C5H9N3	Histamina	95.06		
41	156.0694	7.00	C6H9N3O2	Histidina	139.06	95.06	81.05
42	132.0655	1.80	C5H9NO3	Hydroxyprolina	86.06		
43	132.1019	14.00	C6H13NO2	Isoleucina	102.06	86.10	
44	132.1019	14.50	C6H13NO2	Leucina	86.09	89.00	
45	147.1055	8.50	C6H14N2O2	Lisina	130.08	84.09	
46	181.0633	1.20	C6H12O6	Manose	203.04	149.02	167.09
47	150.0510	10.50	C5H11NO2S	Metionina	102.06	133.03	104.05
48	163.1156	16.00	C10H14N2	Nicotina	132.08	120.09	106.07
49	154.0863	7.00	C8H11NO2	Octopamina	136.07	119.04	
50	302.1273	5.00	C12H19N3O6	Polibiosideo			
51	116.0706	3.00	C5H9NO2	Prolina			
52	89.1073	12.00	C4H12N2	Putrescina	72.08		
53	343.1162	1.50	C12H22O11	Sacarose	365.09	329.09	
54	106.0499	2.00	C3H7NO3	Serina	88.04	60.04	
55	177.0949	15.00	C10H12N2O	Serotonina	160.07	159.09	146.06
56	126.0219	1.20	C2H7NO3S	Taurina			
57	127.0429	3.00	C5H6N2O2	Timina	110.10		
58	138.0840	13.00	C8H11NO	Tiramina	121.06	107.05	
59	182.0738	13.00	C9H11NO3	Tirosina	165.06	164.07	136.08
60	120.0582	13.00	C4H9NO3	Treonina	103.04	85.04	
61	272.1796	31.00	C15H21N5	Tripargina	213.14	255.16	196.11
62	205.0898	21.50	C11H12N2O2	Triptofano	188.07	159.09	
63	113.0346	1.50	C4H4N2O2	Uracila	113.03	95.01	
64	352.0431	1.50	C9H13N2O9P	Uridina	227.06	213.01	195.01
65	118.0863	8.75	C5H11NO2	Valina	101.06	100.08	74.02

Legenda: Relação dos padrões utilizados para a construção da biblioteca de metabólitos, com seus respectivos valores de *m/z*, tempo de retenção em minutos (TR), fórmula molecular e valores de *m/z* dos principais íons-fragmento considerados para a biblioteca (Q1, Q2, Q3). *na forma $[M+Na]^{+}$; **na forma $[M+2Na]^{2+}$.
Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 10 contém todos os padrões de compostos de baixas massas molares agrupados por seus tempos de retenção determinados experimentalmente por cromatografia de fase reversa, contendo o reagente de par iônico ácido heptafluorobutírico (HFBA) e a medida de massa em alta resolução determinada para cada um dos compostos da biblioteca de padrões. Além disso, estão inclusos os respectivos íons moleculares na forma monoprotonada (Q1,Q2 e Q3).

A escolha dos compostos levou em consideração principalmente metabólitos que já são típicos dos venenos animais, além de conter alguns compostos ainda não descritos para venenos, principalmente de escorpiões.

Além da construção da biblioteca qualitativa, foi também realizada a padronização de uma rotina para quantificação dos compostos através do software QuantAnalysis v.2.1 (BRUKER DALTONICS). O software permitiu análise dos dados de cromatograma de íons totais (TIC), espectro de massas e a construção de curvas de calibração para a quantificação. Para a construção dessa biblioteca os compostos foram analisados separadamente, em quatro concentrações diferentes principais (geralmente: 0,125 µg/µL; 0,06 µg/µL; 0,03 µg/µL; 0,015 µg/µL), utilizando-se uma triplicata para cada concentração, a qual levou em consideração a área dos picos do cromatograma de íons totais (TIC) relativos a cada um dos compostos. Esses dados permitiram a construção de uma curva de calibração para cada composto a partir da média dessas concentrações, sendo que as curvas para todos os compostos estão inclusos no Apêndice C. A construção das curvas com quatro concentrações diferentes teve como objetivo a construção de curvas de maneira rápida e eficiente para um grande número de compostos (66). O objetivo não era ter uma quantificação à nível analítico e sim o perfil geral de metabólitos, uma vez que caso esse fosse o foco do estudo outras concentrações e outros métodos de validação seriam necessários, o que dispenderia muito tempo para a padronização e montagem da biblioteca, o que não seria possivel durante o período desta pesquisa. As curvas apresentaram coeficientes de correlação (R) muito bons após as padronizações, fazendo com que as curvas fossem extremamente confiáveis para a quantificação. Com a construção dessas curvas, foi obtido um coeficiente angular para cada composto padrão da biblioteca (Tabela 11), utilizado para a análise quantitativa e posterior comparação com os dados dos compostos presentes nos venenos através dos softwares citados anteriormente. Os coeficientes angulares diferem bastante entre os compostos devido às diferenças nas facilidades de ionização dos compostos padrões durante a espectrometria.

As curvas de calibração dos diferentes compostos foram obtidas através do software QuantAnalysis (BRUKER), considerando a equação da reta dada por: $y = ax+b$, no qual o y é

o valor da área docomposto específico no cromatograma de íon extraído; "*a"* é o coeficiente angular da reta; "*x"* é a concentração do analito de interesse (expresso em μg); "*b"* é o coeficiente linear, que em todos os casos foi igual a zero, pois todas as retas passam pela origem na curva de calibração. As curvas de calibração para os diferentes compostos da biblioteca se encontram nas Figuras do Apêndice C e os valores de coeficiente angular da reta encontram-se abaixo na Tabela 11.

TABELA 11: Tabela contendo os resultados de coeficiente angular da reta das curvas de calibração para os diferentes compostos da biblioteca.

Compostos	R^2	Coeficiente angular da reta (a)
1,3-diaminopropano	0,9973	822232,20
2-Feniletilamina	0,9668	4683414,31
Ác. 3,4-di-idroxifenilacético	0,9996	130014,14
Ác. indolacético	0,9992	4317545,72
Ác. 4-Hidroxifenilacético	0,9987	7476686,78
Ác. 5-Hidroxiindolacético	0,9999	4730558,57
Ác. Ascórbico	0,9982	1871596,34
Ác. Aspártico	0,9984	4099741,42
Ác. Caféico	0,9995	338729,54
Ác. Caínico	0,9991	16834174,30
Ác. Cistéico	0,9995	1584874,19
Ác. Glutâmico	0,9975	3009591,88
Ác. Maléico	0,9997	45232,23
Adenina	0,9991	24755875,19
Adenosina	0,9994	2861324,89
Adenosina Monofosfato	0,9998	20175839,79
Adenosina Difosfato	0,9994	3714042,35
Adenosina Monofosfato Cíclica	0,9998	21477023,48
Alanina	0,9984	120756,47
Arginina	0,9998	10196039,16
Asparagina	0,9993	1340524,52
Betaína	0,9998	3659253,11
Cadaverina	0,9998	1449831,63
Citosina	0,9976	8182604,72
Dopamina	0,9990	1989662,61
Epinefrina	0,9981	414770,91
Espermidina	0,9995	14393524,67
Espermina	0,9885	11131481,51
Fenilalanina	0,9983	18562930,91
GABA	0,9992	4436602,98
Glicina	0,9973	18741,74
Glicose	0,9740	895738,14
Glutamina	0,9978	3593696,32
Guanina	0,9998	9385739,76
Guanosina	0,9970	4567735,11
Guanosina Difosfato	0,9981	292449,24
Guanosina Monofosfato	0,9993	3011202,67
guanosina Trifosfato	0,9990	93158,47
Hidroxitripargina	0,9984	8687272,20
Hidroxiprolina	0,9990	10919598,72
Histamina	0,9981	11083225,69
Histidina	0,9985	20452959,31
Isoleucina	0,9982	16387326,50
Leucina	0,9997	11657272,49
Lisina	0,9921	13825543,75
Manose	0,9995	1159916,51
Metionina	0,9983	11500345,69
Nicotina	0,9898	55381453,46
Octopamina	0,9855	4372695,52
Polibiosideo	0,9944	24471717,20
Prolina	0,9898	9403381,00
Putrescina	0,9277	3139009,75
Sacarose	0,9990	70871,00
Serina	0,9983	373927,23
Serotonina	0,9998	12117367,34
Taurina	0,9973	2925078,95
Timina	0,9992	11452731,30
Tiramina	0,9977	5883375,68
Tirosina	0,9906	8228519,55
Treonina	0,9996	662480,58
Tripargina	0,9978	10412243,63
Triptofano	0,9996	10579447,55
Uracila	0,9992	1856194,73
Uridina	0,9935	3724146,35
Valina	0,9950	3981603,45

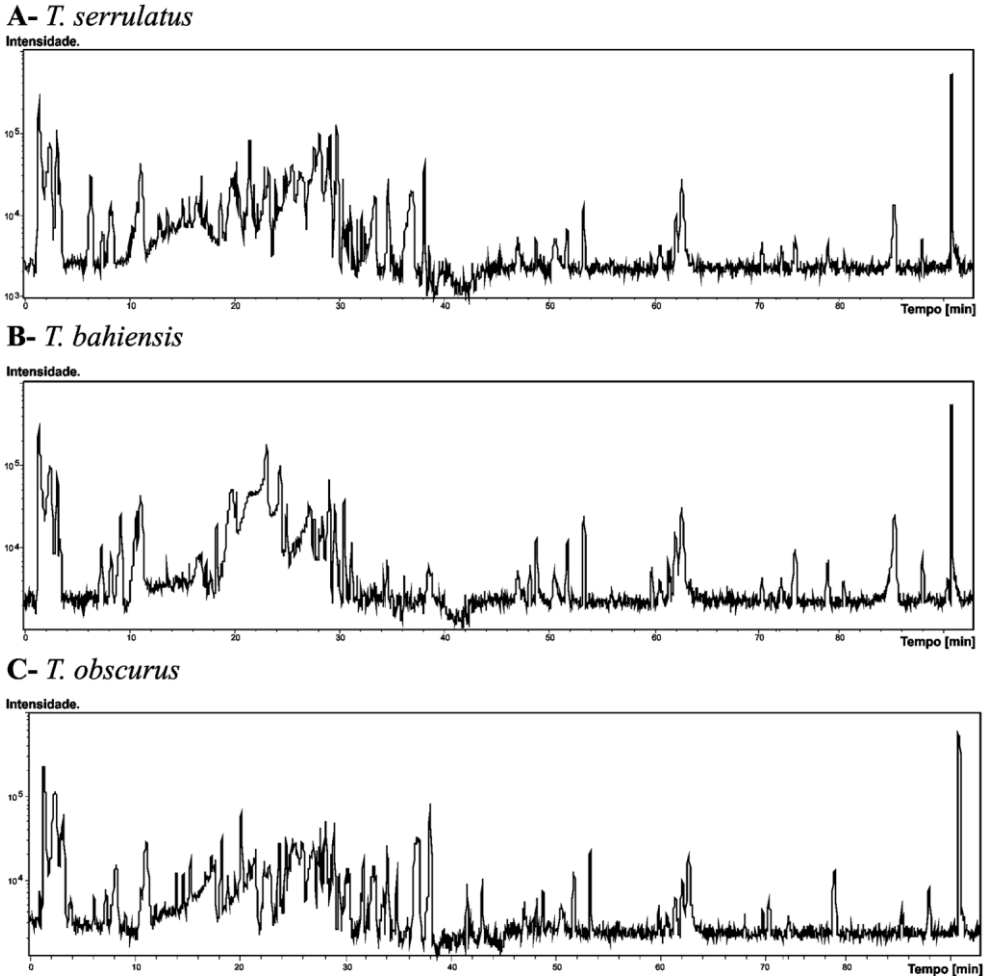
Fonte: Dados da pesquisa

4.4.3 Identificação dos compostos em venenos de escorpião do gênero Buthidae

Assim que o método de análise foi padronizado com os algorítmos apropriados (Target e Quant analysis), contendo a biblioteca e as curvas de calibração construídas, iniciou-se a análise e identificação dos metabólitos presentes nos venenos de escorpiões das três espécies em estudo.

A Figura 35 mostra o cromatograma de íons totais (TIC) das amostras dos três venenos estudados no presente trabalho: *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. obscurus*. Os compostos identificados nas análises dos venenos podem ser visualizados nas Tabelas 12, 13 e 14.

Figura 35: Cromatograma de íons totais (TIC) oriundos dos extratos de baixa massa molar dos venenos de escorpião



Legenda: Cromatograma de íons totais (TIC) oriundos dos extratos contendo compostos de baixa massa molar dos venenos de *T. serrulatus* (A), *T. bahiensis* (B), e *T. obscurus* (C), por RP-LCMS [coluna XBridge™ BEH130 C18 (2,1x100mm; 3,5µm), utilizando-se as fases móveis (A) H_2O contendo HFBA 0,1% (v/v), e (B) MeCN contendo HFBA 0,1% (v/v); gradiente de 2 a 95% de B em 90 minutos, com fluxo de 0,2 ml/min].
Fonte: Dados da pesquisa.

TABELA 12: Compostos de baixas massas molares identificados no veneno de *T. serrulatus*

(Continua)

ID	*Fórmula Molecular*	*TR mens.*	*TR esp.*	*dTR*	*m/z acurado.*	*m/z esp.*	*Err (mDa)*	*Escore*	*Área*	*[qtd] (ng/1µg de veneno)*	*Qtd em ppm*
1,3 Diaminopropano	C3H10N2	12.04	12.00	0.04	75.0824	75.0843	-0.0019	++++	678	0.027486	27.4862
Ac. aspartico	C8H8O4	2.09	2.10	-0.01	134.0501	134.0448	0.0053	++++	235	0.001911	1.9107
Ac. cainico	C10H9NO3	14.67	14.50	0.17	214.1232	214.1001	0.0231	++	5873	0.011629	11.6291
Ac. glutamico	C10H15NO4	2.06	2.80	-0.74	148.0701	148.0604	0.0097	++++	2117	0.023447	23.4473
Ac. indolacetico	C4H7NO4	23.06	23.00	0.06	176.0910	176.0633	0.0277	++	13433	0.103709	103.7086
Adenina	C10H15N5O10P2	7.54	7.30	0.24	136.0599	136.0618	-0.0019	+++	283	0.000381	0.3811
Adenosina Difosfato	C10H14N5O7P	1.31	1.50	-0.19	428.0345	428.0294	0.0051	++++	1222	0.010967	10.9674
Aden monof ciclica	C10H13N5O4	1.29	1.50	-0.21	348.0801	348.0704	0.0097	++++	777	0.001206	1.2059
Alanina	C3H7NO2	2.93	3.00	-0.07	90.0710	90.0550	0.016	+++	835	0.230491	230.4915
Arginina	C6H14N4O2	10.73	10.00	0.73	175.1802	175.1790	0.0012	+++	141137	0.461411	461.4112
Betaína	C5H10NO2	2.03	2.00	0.03	118.0800	118.0784	0.0016	++++	7823	0.009321	9.3213
Cadaverina	C5H14N2	12.94	13.20	-0.26	103.1245	103.1230	0.0015	++++	150	0.003449	3.4487
Citosina	C4H5N3O	4.65	4.50	0.15	112.0500	112.0432	0.0068	++++	2349	0.009569	9.5691
Dopamina	C8H11NO2	10.72	10.50	0.22	154.0732	154.0789	-0.0057	+++	1771	0.029670	29.6700
Epinefrina	C9H13NO3	7.10	7.00	0.10	184.1000	184.0895	0.0105	+++	437	0.035120	35.1198
Espermidina	C7H19N3	22.16	22.00	0.16	146.1500	146.1652	-0.0152	++++	6675	0.015458	15.4583
Espermina	C10H26N4	27.80	27.60	0.20	203.2245	203.2230	0.0015	+++	407	0.001219	1.2188
Fenilalanina	C9H11NO2	17.70	17.60	0.10	166.0800	166.0859	-0.0059	++++	2105	0.003780	3.7799
GABA	C4H9NO2	4.54	4.50	0.04	104.0901	104.0706	0.0195	+++	466	0.003501	3.5012
Glicina	C2H5NO2	2.34	2.00	0.34	76.0396	76.0393	0.3	+++	474	0.843038	843.0379
Glicose	C6H12O6	1.15	1.10	0.05	203.0720	203.0707	0.0013	++++	1050	0.039074	39.0739
Guanosina	C10H13N5O5	7.52	7.00	0.52	284.0900	284.0989	-0.0089	+++	393	0.002868	2.8679

TABELA 12: Compostos de baixas massas molares identificados no veneno de *T. serrulatus*

(Conclusão)

Guanosina difosfato	C10H15N5O11P2	1.30	1.50	-0.20	444.0254	444.0243	0.0011	++++	406	0.046276	46.2758
Guanosina trifosfato	C10H16N5O14P3	2.55	2.50	0.05	523.9974	523.9906	0.0068	++++	110	0.039359	39.3595
Hidroxitripargina	C15H21N5O	23.61	23.50	0.11	288.1700	288.1746	-0.0046	++++	2882	0.011058	11.0583
Hidroxy-prolina	C5H9N3	1.98	1.80	0.18	132.0534	132.0655	-0.0121	++++	530	0.001618	1.6179
Histidina	C5H9NO3	7.33	7.00	0.33	156.0828	156.0694	0.0134	+++	19403	0.031622	31.6222
Isoleucina	C6H13NO2	14.01	14.00	0.01	132.0998	132.1019	-0.0021	++++	15343	0.031209	31.2091
Leucina	C6H13NO2	13.99	14.50	-0.51	132.1043	132.1019	0.0024	++++	75982	0.217266	217.2664
Lisina	C6H14N2O2	8.48	8.50	-0.02	147.1103	147.1055	0.0048	++++	315662	0.761060	761.0599
Manose	C6H12O6	1.30	1.20	0.10	181.0701	181.0633	0.0068	++++	375	0.010777	10.7766
Metionina	C5H11NO2S	10.68	10.50	0.18	150.0654	150.0510	0.0144	+++	5679	0.016460	16.4604
Octapamina	C8H11NO2	6.04	7.00	-0.96	154.0813	154.0863	-0.005	++++	1930	0.014713	14.7125
Polibiosideo	C12H19N3O6	4.71	5.00	-0.29	302.1223	302.1273	-0.005	++++	1123	0.001530	1.5297
Prolina	C5H9NO2	3.18	3.00	0.18	116.0810	116.0706	0.0104	+++	5855	0.020755	20.7549
Taurina	C2H7NO3S	1.60	1.20	0.40	126.0300	126.0219	0.0081	+++	69395	0.790805	790.8049
Tiramina	C8H11NO	12.97	13.00	-0.03	138.0740	138.0840	-0.01	++	8612	0.048793	48.7928
Treonina	C4H9NO3	13.02	13.00	0.02	120.0700	120.0582	0.0118	+++	919	0.046240	46.2403
Triptofano	C11H12N2O2	21.90	21.50	0.40	205.1000	205.0898	0.0102	+++	14865	0.046836	46.8361
Uracila	C4H4N2O2	1.50	1.50	0.00	113.0600	113.0346	0.0254	++	355	0.006375	6.3750
Valina	C5H11NO2	8.76	8.75	0.01	118.0800	118.0863	-0.0063	++++	5065	0.042403	42.4034

Legenda: Principais compostos identificados no veneno de *Tityus serrulatus* por LC-ESI-micrOToF-QIII [coluna WATERS XBridge™BEH130 C 18 (2,1 x 10mm, 3,5 µm)] a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos utilizando-se das condições cromatográficas padronizadas [contendo HFBA 0,1% (v/v)]. [***TR*** – tempo de retenção (minutos); ***TRmens.*** – tempo de retenção medido experimentalmente (minutos); ***TResps.*** – tempo de retenção esperado (minutos); ***dTR*** – variação no tempo de retenção (minutos); ***m/z acurado***– *m/z* medido experimentalmente; ***m/z esp:*** – *m/z* teórico do composto; ***escore:*** escore da identificação de acordo com a Tabela 6; **área:** média das áreas espectrais medidas (unidade arbitrária); ***[qtd]ng/1µg de veneno*** – quantidade calculada de cada composto em 1µg de veneno; ***Qtd em ppm*** – quantidade do composto em parte por milhão de veneno]
Fonte: Dados da pesquisa.

TABELA 13: Compostos de baixa massa molar identificados no veneno de *T. bahiensis*

(Continua)

ID	*Fórmula*	*TR mens.*	*TR esp.*	*dTR*	*m/z acurado*	*m/z esp.*	*Err (mDa)*	*Escore*	*Área*	*[qtd] (ng/1µg de veneno)*	*Qtd em ppm*
2 Feniletilamina	C8H11N	21.11	21.00	0.11	122.0904	122.0891	0.0013	++++	360	0.002359	2.35852446
Ac. caféico	C8H8O3	12.87	12.80	0.07	181.0503	181.0422	0.0081	+++	155	0.015253	15.2530737
Ac. cainico	C10H9NO3	14.67	14.50	0.17	214.1010	214.1001	0.9	++++	6761	0.013387	13.38745
Ac. glutamico	C10H15NO4	2.60	2.80	-0.2	148.0611	148.0604	0.7	++++	1222	0.013535	13.534504
Ac. indolacetico	C4H7NO4	23.08	23.00	0.08	176.0711	176.0633	0.0078	+++	124	0.000957	0.957334
Ac. maléico	C4H4O4	1.46	1.50	-0.04	117.0134	117.0109	0.0025	++++	359	0.264561	264.560608
Adenosina	C5H5N5	3.75	3.60	0.15	268.0971	268.0967	0.4	++++	2543	0.029625	29.6249709
Alanina	C3H7NO2	2.93	3.00	-0.07	90.0620	90.0550	0.007	+++	494	0.136363	136.362608
Arginina	C6H14N4O2	9.98	10.00	-0.02	175.1801	175.1790	0.0011	++++	6939	0.022685	22.6852797
Citosina	C4H5N3O	4.61	4.50	0.11	112.0500	112.0432	0.0068	+++	843	0.003434	3.43411431
Dopamina	C8H11NO2	10.72	10.50	0.22	154.0801	154.0789	0.0012	++++	886	0.014843	14.8433876
Epinefrina	C9H13NO3	7.28	7.00	0.28	184.0923	184.0895	0.0028	++++	362	0.029092	29.0923651
Espermina	C10H26N4	27.81	27.60	0.21	203.2241	203.2230	0.0011	++++	401	0.001201	1.20079853
Fenilalanina	C9H11NO2	17.49	17.60	-0.11	166.0899	166.0859	0.004	++++	764	0.001372	1.37190979
Glicina	C2H5NO2	2.34	2.00	0.34	76.0382	76.0393	-0.0011	+++	169	0.300577	300.576808
Glutamina	C5H10N2O3	2.31	2.30	0.01	147.0806	147.0764	0.0042	++++	341	0.003163	3.1629458
Guanina	C5H5N5O	6.19	6.00	0.19	152.0569	152.0567	0.2	++++	659	0.002340	2.34042997
Guanosina	C10H13N5O5	6.93	7.00	-0.07	284.0945	284.0989	-0.0044	+++	1619	0.011815	11.814754
Hidroxitripargina	C15H21N5O	23.52	23.50	0.02	288.1711	288.1746	-0.0035	+++	445	0.001707	1.70747883
Hidroxy-prolina	C5H9N3	1.87	1.80	0.07	132.0665	132.0655	0.001	++++	2854	0.008712	8.71216386
Histidina	C5H9NO3	6.89	7.00	-0.11	156.0728	156.0694	0.0034	++++	440	0.000717	0.71709264
Isoleucina	C6H13NO2	14.27	14.00	0.27	132.1044	132.1019	0.0025	++++	9594	0.019515	19.5150808
Leucina	C6H13NO2	14.58	14.50	0.08	132.0998	132.1019	-0.0021	+++	62903	0.179868	179.867689

TABELA 13: Compostos de baixa massa molar identificados no veneno de *T. bahiensis*

(Conclusão)

Lisina	C6H14N2O2	8.56	8.50	0.06	147.1096	147.1055	0.0041	++++	7229	0.017429	17.4290915
Metionina	C5H11NO2S	10.68	10.50	0.18	150.0583	150.0510	0.0073	+++	1223	0.003545	3.54482098
Prolina	C5H9NO2	3.18	3.00	0.18	116.0712	116.0706	0.6	++++	180	0.000638	0.63806837
Sacarose	C12H22O11	1.55	1.50	0.05	343.0998	343.1162	-0.0164	++	688	0.323593	323.592613
Serotonina	C10H12N2O	15.00	15.00	0	177.1101	177.0949	0.0152	+++	159	0.000437	0.43738874
Taurina	C2H7NO3S	1.26	1.20	0.06	126.0209	126.0219	-0.001	++++	470	0.005356	5.3559808
Tiramina	C8H11NO	13.00	13.00	0	138.0900	138.0840	0.006	+++	247	0.001399	1.39942336
Tirosina	C9H11NO3	13.00	13.00	0	182.0803	182.0738	0.0065	+++	39163	0.158647	158.647412
Treonina	C4H9NO3	13.27	13.00	0.27	120.0601	120.0582	0.0019	++++	596	0.029988	29.9883005
Tripargina	C15H21N5	31.00	31.00	0	272.1807	272.1796	0.0011	++++	1796	0.005750	5.74964137
Triptofano	C11H12N2O2	21.61	21.50	0.11	205.0957	205.0898	0.0059	+++	2023	0.006374	6.37399382
Valina	C5H11NO2	8.78	8.75	0.03	118.0799	118.0863	-0.0064	+++	736	0.006162	6.16167171

Legenda: Principais compostos identificados no veneno de *Tityus bahiensis* por LC-ESI-micrOToF-QIII [coluna WATERS XBridge™BEH130 C 18 (2,1 x 10mm, 3,5 µm)] a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos utilizando-se das condições cromatográficas padronizadas [contendo HFBA 0,1% (v/v)]. [***TR*** – tempo de retenção (minutos); ***TRmens.*** – tempo de retenção medido experimentalmente (minutos); ***TResps.*** – tempo de retenção esperado (minutos); ***dTR*** – variação no tempo de retenção (minutos); ***m/z acurado.***– *m/z* medido experimentalmente; ***m/z esp:*** – *m/z* teórico do composto; ***escore:*** escore da identificação de acordo com a Tabela 6; **área:** média das áreas espectrais medidas (unidade arbitrária); ***[qtd]ng/1µg de veneno*** – quantidade calculada de cada composto em 1µg de veneno; ***Qtd em ppm*** – quantidade do composto em parte por milhão de veneno].

Fonte: Dados da pesquisa.

TABELA 14: Compostos de baixa massa molar identificados no veneno de *T. obscurus*

ID	*Fórmula*	*TR mens.*	*TR esp.*	*dTR*	*m/z acurado*	*m/z esp.*	*Err (mDa)*	*Escore*	*Área*	*[qtd] (ng/1µg de veneno)*	*Qtd em ppm*
1,3 Diaminopropano	C3H10N2	12.31	12.00	0.31	75.0866	75.0843	0.0023	++++	1011	0.04099	40.98598895
2 Feniletilamina	C8H11N	20.62	21.00	-0.38	122.0900	122.0891	0.9	+++	7305	0.04786	47.85839223
Ac. aspartico	C4H7NO4	2.16	2.10	0.06	134.0400	134.0448	-0.0048	+++	492	0.00400	4.000252287
Ac. cainico	C10H15NO4	14.61	14.50	0.11	214.1200	214.1001	0.0199	++++	15303	0.03030	30.30145648
Ac. glutamico	C5H9NO4	2.78	2.80	-0.02	148.0700	148.0604	0.0096	++++	1412	0.01564	15.63888681
Ac. hidroxifenilacetico	C8H8O3	5.79	6.00	-0.21	153.0800	152.0473	1.0327	+++	6201	0.02765	27.64593543
Ac. hidroxi-indolacetico	C10H9NO3	11.39	11.50	-0.11	192.0900	192.0582	0.0318	+++	8317	0.05860	58.60477765
Ac. indolacetico	C10H9NO2	23.12	23.00	0.12	177.1000	176.0633	1.0367	++++	2923	0.02257	22.566833
Ac. maléico	C4H4O4	1.68	1.50	0.18	117.0670	117.0109	0.0561	++	3358	0.002474	2474.636554
Adenosina	C10H13N5O4	3.89	3.60	0.29	268.1221	268.0967	0.0254	++++	502	0.00585	5.84810673
Adenosina Difosfato	C10H15N5O10P2	1.53	1.50	0.03	428.0474	428.0294	0.0180	++++	1380	0.01239	12.38542688
Alanina	C3H7NO2	3.10	3.00	0.1	90.0549	90.0550	-0.1	++++	12682	0.00350	3500.709706
Arginina	C6H14N4O2	10.31	10.00	0.31	175.1811	175.1790	0.0021	++++	19180	0.06270	62.70408766
Asparagina	C4H8N2O3	2.20	2.00	0.2	133.0700	133.0608	0.0092	++	558	0.01388	13.8751658
Betaína	C5H10NO2	2.32	2.00	0.32	118.0800	118.0784	0.0016	++++	26386	0.03144	31.43962252
Citosina	C4H5N3O	4.48	4.50	-0.02	112.0687	112.0432	0.0255	+++	3379	0.01376	13.76497303
Dopamina	C8H11NO2	10.49	10.50	-0.01	154.0889	154.0789	0.0100	++++	8701	0.14577	145.7701082
Epinefrina	C9H13NO3	6.89	7.00	-0.11	184.1240	184.0895	0.0345	++	150	0.01205	12.05484743
Espermidina	C7H19N3	22.11	22.00	0.11	146.1555	146.1652	-0.0097	++++	5399	0.01250	12.50330762
Espermina	C10H26N4	27.55	27.60	-0.05	203.2218	203.2230	-0.0012	++++	438	0.00131	1.311595405
Fenilalanina	C9H11NO2	17.80	17.60	0.2	166.0880	166.0859	0.0021	++++	10855	0.01949	19.49225233
GABA	C4H9NO2	4.29	4.50	-0.21	104.0934	104.0706	0.0228	++++	632	0.00475	4.748377699
Glicina	C2H5NO2	1.98	2.00	-0.02	76.0401	76.0393	0.8	++++	1249	0.00222	2221.42268
Guanosina	C10H13N5O5	7.15	7.00	0.15	284.0945	284.0989	-0.0044	++++	807	0.00589	5.889133095

Hidroxitripargina	C15H21N5O	23.19	23.50	-0.31	288.1700	288.1728	-0.0028	++++	33316	0.12783	127.8345271
Hidroxy-prolina	C5H9NO3	1.89	1.80	0.09	132.0763	132.0655	0.0108	+++	659	0.00201	2.011673435
Histamina	C5H9N3	13.65	13.50	0.15	112.0850	112.0869	-0.0019	++++	3651	0.01098	10.98055778
Histidina	C6H9N3O2	7.13	7.00	0.13	156.0808	156.0694	0.0114	++++	52077	0.08487	84.87280366
Isoleucina	C6H13NO2	14.21	14.00	0.21	132.0900	132.1019	-0.0119	++++	9054	0.01842	18.41667096
Leucina	C6H13NO2	14.52	14.50	0.02	132.1000	132.1019	-0.0019	++++	7945	0.02272	22.71829311
Lisina	C6H14N2O2	8.55	8.50	0.05	147.1100	147.1055	0.0045	++++	62893	0.15163	151.6347835
Manose	C6H12O6	1.19	1.20	-0.01	181.0700	181.0633	0.0067	++++	6642	0.19088	190.875807
Metionina	C5H11NO2S	10.48	10.50	-0.02	150.0600	150.0510	0.0090	++++	11281	0.03270	32.69756783
Octapamina	C8H11NO2	7.03	7.00	0.03	154.0910	154.0863	0.0047	+++	744	0.00567	5.671558858
Polibiosideo	C12H19N3O6	5.05	5.00	0.05	302.1289	302.1273	0.0016	++++	558	0.00076	0.760061088
Prolina	C5H9NO2	2.77	3.00	-0.23	116.0900	116.0706	0.0194	++++	1786	0.00633	6.331056174
Putrescina	C4H12N2	12.32	12.00	0.32	89.1000	89.1073	-0.0073	++++	8318	0.08833	88.32934229
Serotonina	C10H12N2O	15.12	15.00	0.12	177.1100	177.0949	0.0151	++++	54698	0.15047	150.4672273
Taurina	C2H7NO3S	1.30	1.20	0.1	126.0300	126.0219	0.0081	++++	33042	0.37654	376.5368459
Timina	C5H6N2O2	2.93	3.00	-0.07	127.0600	127.0429	0.0171	++++	24301	0.07073	70.72839762
Tiramina	C8H11NO	13.03	13.00	0.03	138.0710	138.0840	-0.0130	++	7455	0.04224	42.23765635
Tirosina	C9H11NO3	13.11	13.00	0.11	182.0800	182.0738	0.0062	++++	4543	0.01840	18.40347252
Treonina	C4H9NO3	12.98	13.00	-0.02	120.0700	120.0582	0.0118	++++	1404	0.07064	70.64358035
Triptofano	C11H12N2O2	21.45	21.50	-0.05	205.1045	205.0898	0.0147	++++	10460	0.03296	32.95698239
Uracila	C4H4N2O2	1.47	1.50	-0.03	113.0600	113.0346	0.0254	++++	3644	0.06544	65.43853666
Uridina	C9H13N2O9P	1.56	1.50	0.06	352.0512	352.0431	0.0081	++	18760	0.16791	167.9132005
Valina	C5H11NO2	8.70	8.75	-0.05	118.0800	118.0863	-0.0063	++++	25528	0.21372	213.7162437

Legenda: Principais compostos identificados no veneno de *Tityus obscurus* por LC-ESI-micrOToF-QIII [coluna WATERS XBridge™BEH130 C 18 (2,1 x 10mm, 3,5 µm)] a partir da comparação com a biblioteca de metabólitos utilizando-se das condições cromatográficas padronizadas [contendo HFBA 0,1% (v/v)]. [***TR*** – tempo de retenção (minutos); ***TRmens.*** – tempo de retenção medido experimentalmente (minutos); ***TResps.*** – tempo de retenção esperado (minutos); ***dTR*** – variação no tempo de retenção (minutos); ***m/z acurado.***– *m/z* medido experimentalmente; ***m/z esp:*** – *m/z* teórico do composto; ***escore:*** escore da identificação de acordo com a Tabela 6; **área:** média das áreas espectrais medidas (unidade arbitrária); ***[qtd]ng/1µg de veneno*** – quantidade calculada de cada composto em 1µg de veneno; ***Qtd em ppm*** – quantidade do composto em parte por milhão de veneno].
Fonte: Dados da pesquisa

TABELA 15: Compostos identificados em cada uma das espécies: *T. serrulatus* (Ts), *T. bahiensis* (Tb) e *T. obscurus* (To)

Composto	Ts	Tb	To	Composto	Ts	Tb	To
2 Feniletilamina		x	x	Guanina		x	
Ac. aspartico	x		x	Guanosina	x	x	x
Ac. caféico		x		Guanosina difosfato	x		
Ac. cainico	x	x	x	Guanosina trifosfato	x		
Ac. glutamico	x	x	x	Hidroxitripargina	x	x	x
Ac. hidroxifenilacetico			x	Hidroxy-prolina	x	x	x
Ac. hidroxi-indolacetico			x	Histamina			x
Ac. indolacetico	x	x	x	Histidina	x	x	x
Ac. maléico		x	x	Isoleucina	x	x	x
Adenina	x			Leucina	x	x	x
Adenosina		x	x	Lisina	x	x	x
Adenosina Difosfato	x		x	Manose	x		x
Adenosina monofosfato ciclica	x			Metionina	x	x	x
Alanina	x	x	x	Octapamina	x		x
Arginina	x	x	x	Polibiosideo	x		x
Asparagina			x	Prolina	x	x	x
Betaína	x		x	Putrescina			x
Cadaverina	x			Sacarose		x	
Citosina	x	x	x	Serotonina		x	x
Dopamina	x	x	x	Taurina	x	x	x
Epinefrina	x	x	x	Timina			x
Espermidina	x		x	Tiramina	x	x	x
Espermina	x	x	x	Tirosina		x	x
Fenilalanina	x	x	x	Treonina	x	x	x
GABA	x		x	Tripargina		x	
Glicina	x	x	x	Triptofano	x	x	x
Glicose	x			Uracila	x		x
Glutamina		x		Uridina			x
				Valina	x	x	x

Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados obtidos revelaram uma grande quantidade de compostos de baixas massas molares presentes nos venenos das três espécies de escorpião, a maior parte delas já descritas na literatura como componentes de outros venenos. Entretanto, existem alguns compostos que ainda não haviam sido descritos em venenos animais.

Dos 65 compostos presentes na biblioteca de metabólitos construída no presente trabalho, 58 foram identificados entre as análises das três espécies, sendo que somente os compostos: ácido ascórbico, ácido cistéico, ácido di-hidroxifenilacetico, adenosina monofosfato, guanosina monofosfato, nicotina e serina não foram encontrados. Foram identificados 41 compostos no veneno de em *T. serrulatus*, 35 em *T. bahiensis* e 47 em *T. obscurus* (Tabela 15).

Alguns desses compostos são únicos para o veneno de *T. serrulatus* (adenosina monofosfato cíclica, adenina, cadaverina, glicose, guanosina difosfato e guanosina trifosfato), outros únicos em *T. bahiensis* (ácido caféico, glutamina, guanina, sacarose e tripargina), e outros únicos em *T. obscurus* (ácido hidroxifenilacetico, ácido hidroxiindolacetico, asparagina, histamina, putrescina, timina e uridina), 25 compostos foram comuns à todas as espécies.

Os resultados obtidos nessas analises revelaram uma grande quantidade de moléculas neuroativas presentes nos venenos de escorpiões, uma parte delas já descritas na literatura como características de venenos animais. Entretanto, existem alguns compostos que ainda não haviam sido descritos nestes venenos, como derivados de bases nitrogenadas e adenosinas, encontradas nos venenos das três espécies.

Derivados de pirimidina, purina e nucleosídeos foram detectados, como a adenina (*T. serrulatus*), guanina (*T. bahiensis*), a uracila em *T. serrulatus e T. obscurus*, diferentes adenosinas, guanosina e citosina nas três espécies. Existem relatos na literatura da presença de derivados de purina, como adenosina, guanosina, inosina e 2,4,6-trihidroxipurina, em venenos de aranhas (HORNI et al., 2001). Também foram encontrados derivados de guanosina sulfatados nos venenos de aranha marrom (SCHROEDER et al., 2008). Entretanto, não existiam relatos desses compostos em venenos de escorpiões até o presente momento, sendo que são conhecidos neurotransmissores. Além disso, guasonina di e trifosfato foram isoladas no veneno de *T. serrulatus* no presente trabalho.

Foram identificados diversos compostos de baixas massas molares que podem atuar como neurotransmissores. Entre estes compostos destacam-se os compostos beta carbolínicos como hidroxi-tripargina nas três espécies em estudo e tripargina em *T. bahiensis*. Outros neurotransmissores presentes nos venenos em estudo como: glutamato, aspartato, serotonina, histamina, dopamina e epinefrina são ativos principalmente no sistema nervoso central de suas “vítimas”, potencializando o efeito do veneno quando em conjunto com as outras substâncias também presentes, sendo utilizados tanto para a captura de presas como para a defesa ativa. A serotonina não aparenta alterar a toxicidade nos venenos em geral, mas podem contribuir muito para a dor e a inflamação (RASH; HODGSON, 2002), sendo que foi identificada no presente trabalho nos venenos de *T.bahiensis* e *T.obscurus*. A dopamina, a qual foi identificada nas três espécies de escorpiões, causa aumento da frequência cardíaca, o que pode conduzir a circulação dos componentes do veneno de forma rápida em suas presas (OWEN, 1971).

A histamina é um composto que já foi descrito em venenos de escorpiões, inclusive no veneno de *T. serrulatus.* Porém no presente trabalho esse composto não foi identificado neste veneno, mas somente em *T. obscurus.* A histamina é um agente pró-inflamatório que exerce um efeito vasodilatador em vasos sanguíneos, resultando no aumento da permeabilidade vascular, queda da resistência periférica total e redução da pressão sanguínea. A vasodilatação é o efeito biológico mais importante em humanos.

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um aminoácido que ocorre no SNC em altas concentrações, desempenhando uma série de funções na bioquímica neuronal cerebral e nos fenômenos de regulação pós-sináptica e da neurotransmissão (GALE, 1992). O aminoácido glutamato é o mais abundante neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC). (CHAPMAN, 2000). A diminuição na neurotransmissão Gabaérgica no SNC contribui para a hiperexcitabilidade, que é responsável pela epilepsia por exemplo (OLSEN et al., 1999). O GABA ativa os fenômenos enzimáticos (transaminação, descarboxilação) do ciclo de Krebs, sendo sintetizado a partir do glutamato utilizando a enzima L-ácido glutâmico descarboxilase e a vitamina B6 como cofator. Este processo converte o principal neurotransmissor excitatório (glutamato) num dos principais inibitório (GABA) (OLSEN et al., 1999). O GABA foi encontrado nos venenos de *T.serrulatus* e *T.obscurus* e o glutamato nos três venenos no presente trabalho.

Foi possível identificar a 2-feniletilamina nos venenos de *T.bahiensis* e *T.obscurus*. O composto 2-feniletilamina pode induzir depressão e ansiedade, assim como drogas similares como norepinefrina e dopamina que, também possuem esta propriedade, podendo produzir alterações na atividade motora de animais, com alteração nos parâmetros de frequência de locomoção e levantamento do corpo (SOCHA et al., 2008). Baixos níveis de 2-feniletilamina (neuromodulador) são encontrados em casos de depressão e desordem do déficit de atenção (BAKER et al., 1991) e altos níveis são encontrados em quadros de esquizofrenia (POTKIN et al., 1979). Foi relatado que anfetamina, tirosina, feniletilamina e octopamina possuem efeitos qualitativamente similares sobre a liberação de dopamina endógena e [3H] dopamina (PARKER; CUBEDDU, 1988).

A octopamina encontrada nos venenos de *T.serrulatus* e *T.obscurus* é um metabólito hidroxilado da tiramina. Pode ser armazenada em altas concentrações nas vesículas sinápticas, sendo que possui atividade agonista nos receptores adrenérgicos de mamíferos, podendo inclusive causar hipotensão brusca em animais. Como exemplo os compostos octopamina, tiramina e dopamina no veneno de polvo causa hiperexcitação em caranguejo, sua presa, o que precede a paralisia do mesmo (WELSH, 1964).

Também foi possível confirmar a presença de um novo composto identificado recentemente no veneno da vespa social *Polybia paulista*, por Saidemberg et al. (2010), o polybiosideo, nos venenos de *T. serrulatus* e *T .obscurus*. A aplicação de polybiosideo no cérebro de ratos, seguida pela detecção de expressão da proteína de c-fos em algumas regiões do cérebro, indicou que o composto é neuroativo em várias áreas do cérebro. O polybiosideo provoca convulsões em ratos, mesmo quando aplicada perifericamente (SAIDEMBERG et al., 2010).

O termo aminas é descrito como sendo bases orgânicas derivadas da amônia. Na biologia, o termo está relacionado a compostos formados ou degradados durante os processos metabólicos normais dos seres vivos, apresentando diferentes funções fisiológicas e, por isso, chamadas de "aminas bioativas" ou "aminas biologicamente ativas". As poliaminas encontradas nos venenos do presente trabalho, entre elas, diaminopropano, putrescina, espermidina, cadaverina e espermina, são amplamente distribuídas em tecidos animais, em que desempenham um papel fundamental na ação da hormônios e controle da divisão celular e síntese de macromoléculas (TABOR, 1976; WILLIAMS, 1997). Muito se sabe a respeito da biossíntese e degradação das poliaminas, e sobre as propriedades moleculares das enzimas envolvidas nesse processo (WILLIAMS, 1997). As poliaminas também foram descritas por influenciarem na excitabilidade celular e na neurotransmissão por interagir com canais iônicos de potássio, em receptores AMPA e NMDA (WILLIAMS, 1997; OLIVER et al., 1998; GIAMPIETRO, 2003).

A espermina foi relatada em venenos de aranhas (GILBO; COLES, 1964) e serpentes (TU, 1977). Também têm sido detectados em venenos de aranha: espermidina no veneno da aranha funil de Sydney (DUFFIELD et al., 1979) e putrescina, espermidina e cadaverina em quatro espécies de tarântulas (CABBINESS et al., 1980). A espermina causa nefrotoxicidade (ROSENTHAL et al., 1952), respiração difícil, hipotensão, diurese (TABOR; ROSENTHAL, 1956), inibição das contrações espontânea uterinas (HASHIMOTO et al., 1973) e antagonismo de serotonina e nicotina induzindo contrações do íleo (SHAW, 1972) em animais de laboratório. Muitos destes efeitos são também mostrados pela espermidina, mas em concentrações mais elevadas. Espermidina também faz com que os sintomas de toxicidade aumentem, como tremor de cabeça e nos membros, redução do tônus muscular, paralisia dos membros posteriores, reflexos diminuídos, hipotermia e periférica vasoconstrição, em camundongos (FRIEDMAN; RODICHOK, 1970).

No presente trabalho vários aminoácidos foram encontrados nos venenos das três espécies de escorpião, entre eles: ácido glutâmico, ácido aspártico, histidina, arginina,

fenilalanina, alanina, glicina, glutamina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, asparagina, tirosina, treonina, triptofano, prolina, valina e também hidroxiprolina. Estes aminoácidos livres são componentes essenciais das proteínas, mas também podem funcionar como neurotransmissores e precursores, tais como o ácido aspártico, glicina e ácido glutâmico, entre outros (COLEMAN; NECKAMEYER, 2005; FERNSTROM; FERNSTROM, 2007). A tiramina, a qual é uma monoamina derivada da tirosina, também foi identificada nos três venenos em estudo neste trabalho.

Em trabalhos realizados anteriormente dezesseis aminoácidos livres foram encontrados no veneno do escorpião *Heterometrus scaber,* entre eles os mais abundantes foram glicina, ácido aspártico, alanina, cisteina, triptofano, ácido glutâmico e arginina. Mais de 15 aminoácidos foram encontrados em Vejovis (RUSSEL, 1968). No veneno de *Pandinus exitialis* 8 aminoácidos foram identificados por cromatografia bidimensional: ácido aspártico, serina, glicina, alanina, lisina, leucina, norvalina, leucina e fenilalanina (ISMAIL et al., 1974).

A taurina, um derivado da cisteína, é frequentemente chamada de aminoácido essencial, embora contenha um grupo sulfonato e não possua um grupo carboxila, o qual está presente em aminoácidos. A taurina não faz parte da composição de proteínas, mas possui importantes funções nos organismos. Este aminoácido atua como um substrato na conjugação de ácidos biliares no fígado, estabilização de membranas, osmorregulação, efeitos citoprotetores, possui propriedades antioxidantes, regula a concentração de cálcio intracelular, modula movimento de íons e neurotransmissores, reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias e controla a pressão sanguínea em vários órgãos (FLORA et al., 2004; AERTS et al., 2002; KONTNY et al., 2000; RACASAN et al, 2004; SINHA et al., 2009; MANNA et al., 2009; DAS; SIL, 2012; HUXTABLE, 1992; SCHAFFER et al., 2000). No presente trabalho a taurina foi encontrada nos três venenos de escorpião.

A betaína (N,N,N-trimetilglicina ou glicinabetaína), encontrada nos venenos de *T. serrulatus* e *T. obscurus*, é um osmólito intracelular essencial e um doador de radicais metil (metila). Como osmólito intracelular essa molécula atua regulando o volume celular através do contrabalanceamento de mudanças na tonicidade extracelular, e estabilizando macromoléculas contra uma grande variedade de perturbações fisiológicas (SLOW et al., 2009; ZHOU et al., 2012). Além disso, a betaína tem um papel chave no metabolismo do grupo metila, fornecendo às células um estoque de grupo metila (SLOW et al., 2009; ZHOU et al., 2012). A betaína pode ser oriunda tanto da dieta, quanto pode ser produzida no organismo através da oxidação da colina (LEVER; SLOW, 2010).

Alguns carboidratos como sacarose, glicose e manose foram detectados nos venenos deste estudo. Poucos estudos apontam as funções destes compostos em venenos animais, sendo em alguns casos esses compostos apontados como pertencentes aos aparatos de ferroar e não ao veneno propriamente dito, uma vez que esses compostos são de extrema importância para o metabolismo celular. Também podem estar funcionando para um "espessamento" do veneno, uma vez que esse se apresenta bem viscoso em sua forma natural.

O ácido caínico é uma neurotoxina com propriedades únicas e foi encontrada nos venenos. Estudos em modelos experimentais têm mostrado que a administração de ácido caínico resulta em convulsões (LOTHMAN; COLLINS, 1981), mudanças de comportamento de roedores (MIKULECKÁ et al, 2000), estresse oxidativo (GLUCK et al., 2000), ativação glial (CHO et al, 2008), produção de mediadores inflamatórios (LU et al, 2008), estresse no retículo endoplasmático (KIM et al, 2014), disfunção mitocondrial e degeneração neuronal seletiva no cérebro de roedores (CHUANG et al., 2004). Já o ácido caféico encontrado no veneno de *T.bahiensis* é conhecido como um potente antioxidante, capaz de fazer o sequestro de radicais DPPH e peroxil além de inibir a oxidação do LDL in vitro em diferentes condições (ANDREASEN et al., 2001; CARTRON et al., 2001).

Em trabalhos realizados anteriormente, a administração de ácido indolacético na dose de 50 mg/Kg de massa do animal mostra uma resposta hipoglicêmica aguda em 5 minutos (FULLER et al., 1971; SULLIVAN; STRONG, 1958). Essa aplicação também causa, com injeção da mesma dose ou maior: irritabilidade, fraqueza nas patas e miotonia (FULLER et al., 1971), lassitude e imobilidade, má formação de fetos (JOHN et al., 1979) e aumento do número de fibroblastos (SINNA, 1983). Esse composto foi encontrado no presente trabalho nos três venenos em estudo, demonstrando ser aparentemente de grande importância na composição desses venenos. Já o ácido maléico foi encontrado nas espécies *T. bahiensis* e *T. obscurus* e os ácidos hidroxiindolacético e hidroxifenilacético somente foram detectados em *T. obscurus*.

Embora não totalmente esclarecidos os motivos da seleção natural ter escolhido compostos nos venenos capazes de afetar os sistemas neuronais, algumas evidências já foram apontadas. Como exemplo, venenos que produzem dor ou desconforto no predador (Ex: vertebrados) têm como alvo sistemas monoaminérgicos, aparentemente com um propósito defensivo. Este é o caso de venenos que contém histamina ou que induzem liberação de histamina, assim como venenos que contêm serotonina (WELSH, 1964).

Uma segunda função de venenos é acelerar a distribuição dos outros componentes do veneno. Este é o caso, por exemplo, da histamina ou substâncias no veneno que induzem

liberação de histamina, a qual causa vasodilatação no sítio de injeção e, portanto, facilitam a circulação dos compostos na circulação, também a serotonina no veneno de caracol marinho, que provoca vasodilatação em suas presas (WEST et al., 1996), também a dopamina em venenos de himenópteros, que aumenta a frequência cardíaca em insetos (OWEN, 1971); e venenos que ativam o sistema nervoso simpático ou receptores adrenérgicos, aumentando assim frequência cardíaca em vertebrados.

Outro ponto a ser levado em consideração é o propósito de comprometer a capacidade da presa de organizar uma resposta eficaz de fuga. Paradoxalmente, isto é muitas vezes realizado com a ativação do sistema nervoso simpático, como na cascata de catecolaminas e outras ações envolvendo epinefrina e norepinefrina, muitas vezes causando colapso cardíaco, demonstrado por exemplo em venenos de aranha (WEISEL-EICHLER; LIBERSAT; 2003).

A hiperexcitação induzida pelos venenos imobiliza a presa até a paralisia flácida começar, a qual é caracterizada por fraqueza ou paralisia e por redução do tônus muscular. A hiperexcitação é uma estratégia comum percebida como respostas aos vários tipos de venenos animais, tais como polvo, onde a hiperexcitação da presa é produzida por monoaminas no veneno: aranhas, escorpiões, celenterados, e alguns caracóis (WELSH, 1964; KUHN NENTWIG et al., 1998; ZLOTKIN et al., 1991; OLIVERA, 1999). Aparentemente, a hiperexcitação imobiliza imediatamente a presa, de modo que a mesma não pode sair do alcance do predador, até a atuação mais lenta, ou seja, até a paralisia flácida começar. Da mesma forma, a dopamina no veneno de vespa *A. compressa* induz o “grooming” excessivo em baratas, impedindo assim a sua fuga até hipocinesia começar (LIBERSAT, 2003), o que também ocorre em presas de escorpiões.

Os venenos de escorpiões são extremamente versáteis, sendo eficazes tanto contra presas (insetos) quanto na defesa contra os predadores vertebrados. Esses venenos possuem efeitos drásticos sobre os mamíferos e um fato interessante a se especular é o porquê dos venenos evoluírem desta forma, uma vez que esses animais normalmente possuem como alvo os insetos. Outra questão a ser levantada em consideração seria o quanto os compostos, entre eles metabolitos, peptídeos e proteínas, estão agindo em sinergismo, o que pode potencializar a ação de tais componentes.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível a obtenção de um perfil peptídico detalhado dos venenos de três espécies de escorpiões: *T. serrulatus, T. bahiensis* e *T. obscurus* por uma abordagem analítica moderna e mais sensível, além de padronizar o sequenciamento destes peptídeos por espectrometria de massas sequencial de maneira totalmente *"on-line"*, fazendo com que estudos posteriores possam utilizar-se da mesma metodologia.

As análises realizadas neste trabalho foram de fundamental importância para elucidar a riqueza peptídica presente nos venenos de escorpiões, levando em consideração a massa molar e o tempo de retenção dos compostos presentes nas amostras. Estes dados revelaram o panorama geral da composição peptídica destes venenos em diferentes espécies. Foi possível detectar a presença de 521 peptídeos com diferentes tempos de retenção e massas molares em *T. serrulatus*, 460 peptídeos em *T. bahiensis*, e 571 peptídeos em *T. obscurus*.

A amostra contém diferenças nas massas molares dos peptídeos encontrados, o que está associado aos fatores ambientais e genéticos, e também pode-se considerar os sistemas de acasalamento dessas espécies, levando em consideração que a espécie *T. serrulatus* possui principalmente reprodução assexuada diferentemente de *T. bahiensis* e *T. obscurus*. As análises possibilitaram comparações entre amostras diferentes de veneno com altíssima reprodutibilidade, o que também só foi possível através da alta qualidade dos dados gerados.

A padronização das técnicas de obtenção e interpretação dos espectros *CID* em instrumentos do tipo ESI-IT-TOF possibilitou a identificação vários peptídeos presentes nos venenos. No total, foi possível sequenciar sessenta e seis peptídeos entre os três venenos, alguns apresentando grande similaridade com toxinas já conhecidas de venenos de escorpiões.

A padronização de condições cromatográficas eficientes para a separação de compostos que, na grande parte dos casos, são iônicos ou polares, foi realizada através de cromatografia de par iônico. Esta abordagem provou-se eficiente e relativamente barata se comparada a outras técnicas. Nessas condições, foi possível obter a identificação de diversos compostos presentes nos venenos destas espécies, muitos dos quais nunca haviam sido descritos como presentes nestes venenos animais. A estratégia analítica desenvolvida no presente trabalho permitirá sua aplicação imediata no estudo dos venenos de outras espécies de animais.

Devido à abundância de compostos de baixas massas molares presentes nos venenos em relação aos compostos descritos na literatura para venenos de artrópodes e até mesmo em relação aos compostos identificados no presente trabalho, pode-se afirmar que existe uma

grande quantidade de moléculas ainda a serem exploradas nos venenos destes animais, muitos dos quais podem se apresentar como novidades. Este estudo pode auxiliar no entendimento da química ecológica destes animais. Além disso, abre-se a possibilidade de que outros projetos possam utilizar a mesma técnica, tanto para comparação entre amostras quanto para identificação de novos compostos presentes em venenos animais.

Treze sequencias elucidadas foram sintetizadas e caracterizadas funcionalmente com relação à suas atividades biológias. Além disso, estes resultados demonstraram a importância da bioprospecção de produtos naturais a partir de venenos de animais, uma vez que novas moléculas podem ser encontradas e a riqueza e a diversidade desses venenos elucidadas. O desenvolvimento das técnicas para análise e interpretação dos cromatogramas de massa e dos espectros de massas sequenciais foi de fundamental importância para que fosse possível identificar os peptídeos novos neste trabalho e ajudar na realização de outros projetos que estão sendo desenvolvidos no laboratório.

A pesquisa com venenos de artrópodes esta revelando novos efeitos de componentes específicos (peptídeos e metabolitos) sobre os sistemas e celulas, e também comportamento de suas presas e vítimas. Isto pode ter um de impacto sobre a utilização de toxinas como fármacos e como modelos para desenvolvimentos de medicamentos. A descoberta de toxinas que afetam diferentes sistemas pode ser um grande avanço na identificação potenciais alvos terapêuticos, uma vez que as toxinas são com frequencia altamente específica para subtipos particulares de receptores ou canais de íon, o que as torna valiosas para elucidar funções fisiológicas ou patológicas e de receptores canais.

O presente trabalho, fazendo parte do programa “CAPES – Toxinologia comparativa dos escorpiões de interesse médico do Brasil” alcançou os principais objetivos do projeto, através da identificação e caracterização de compostos naturais de natureza peptídica e metabolica, presentes nos venenos de escorpiões da família Buthidae. Além de abrir novas vertentes de estudos estruturais e funcionais, o presente projeto alcançou os objetivos inicialmente almejados.

REFERÊNCIAS

ADAMCZY, K. M.; GEBLER, J. C.; WU, J. Charge derivatization of peptides to simplify their sequencing with an ion trap mass spectrometer. **Rapid Commun. Mass Sp.**, v. 13, n. 14, p. 1413-1422, 1999.

AERTS, L.; VAN ASSCHE, F. A. Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. **J. Perinat. Med.**, v. 30, p. 281-286, 2002.

ALI, S. A.; ALAM, M.; ABBASI, A.; UNDHEIM, E. A.; FRY, B. G.; KALBACHER, H.; VOELTER, W. Structure-activity relationship of chlorotoxin-like peptides. **Toxins**, v. 8, n. 2, p. 1-18, 2016.

ALMAAYTAH, A.; ALBALAS, Q. Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: a review. **Peptides**, v. 51, p. 35-45, 2014.

AMARAL, C. F. S.; BARBOSA, A. J. A.; LEITE, V. H. R.; TAFURI, W. L.; REZENDE, N.A. Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolocapillary membrane permeability. **Toxicon**, v. 32, p. 999-1003, 1994.

ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na Prática Clínica.** 2.ed. Belo Horizonte: Folium, 2013.

ANDRADE, M. V.; LISBOA, F. A.; PORTUGAL, A. L.; ARANTES, R. M. E.; CUNHA-MELO, J. R. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. **Comp Biochem Physiol A**., v. 146, p. 581-587, 2007.

ANDREASEN, M. F.; KROON, P. A.; WILLIAMSON, G.; GARCIA-CONESA, M. T. Esterase activity able to hydrolyse dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 49, p. 5679-5684, 2001.

ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R. What is tityustoxin? **Toxicon**, v. 30, p. 786-789, 1992.

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

BARHANIN, J.; GIGLIO, J. R.; LÉOPOLD, P.; SCHIMD, A.; SAMPAIO, S. V. *Tityus serrulatus venom* contains two classes of toxins. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12553- 12558, 1982.

BARHANIN, J.; MEIRI, H.; PAURON, D.; LAZDUNSKI M. A monoclonal immunotoxin acting on the sodium channel, with properties similar to those of a scorpion toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 1842-1846, 1985.

BARHANIN, J.; PAURON, D.; LOMBET, A.; NORMAN, R. I.; VIJVERBERG, H. P. M.; GIGLIO, J. R.; LAZDUNSKI, M. Electrophysiological characterization, solubilization and purification of the *Tityus*-gamma toxin receptor associated with the gating component of the sodium channel from rat brain. **Embo. J.**, v. 2, p. 915-920, 1983a.

BARHANIN, J.; SCHIMID, A.; LOMBET, A.; WHEELER, K. P.; LAZDUNSKI, M. J. Molecular size of different neurotoxin receptors on the voltage sensitive sodium channel. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 700-702, 1983b.

BARONA, J; BATISTA, C. V.; ZAMUDIO, F. Z.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; WANKE, E.; OTERO, R.; POSSANI, L. D. Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for NaC- and KC- channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, n.1, p. 76-84, 2006.

BARRAVIERA, B. (Ed.). **Venenos animais:** uma visão integrada. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1994.

BATISTA, C. V. F.; del POZO, L.; ZAMUDIO, F. Z.; CONTRERAS, S.; BECERRIL, B.;WANKE, E.; POSSANI, L. D. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. **J. Chromatogr.**, v. B803, p. 55-66, 2004.

BATISTA, C. V. F.; ROMÁN-GONZÁLEZ, S. A.; SALAS-CASTILLO, S. P.; ZAMUDIO, F. Z.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; POSSANI, L. D. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. **Com. Biochem. Physiol.**, v. 146, p. 147-57, 2007.

BAUER, M. D.; SUN, Y.; KEOUGH, T.; LACEY, M. P. Sequencing of sulfonic acid derivatized peptides by electrospray mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Sp.**, v. 14, p. 924-929, 2000.

BECERRIL, B.; CORONA, M.; CORONAS, F. I.; ZAMUDIO, F.; CALDERONARANDA, E. S.; FLETCHER, P. L. J. R.; MARTIN, B. M.; POSSANI, L. D. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochem J.**, v. 313, n. 3, p. 753-760, 1996.

BECERRIL, B.; MAONI, S.; POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. **Toxicon**, v. 35, p. 821-835, 1997.

BIASS, D.; DUTERTRE, S.; GERBAULT, A.; MENOU, J. L.; OFFORD, R.; FAVREAU, P.; STOCKLIN, R. Comparative proteomic study of the venom of the piscivorous cone snail *Conus consors*. **J. Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 210-218, 2009.

BIEMANN, K.; Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). **Methods Enzymol.**, v. 193, p. 886-887, 1990.

BIEMANN, K.; SCOBLE, H. A. Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins. **Science**, v. 237, n. 4818, p. 992-998, 1987.

BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 142-158, 2007.

BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os escorpiões**. Salvador: EDUFBA, 2010.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr Psychosom Med.**, v. 1, p. 63-69, 1960.

BUCARETCHI, F.; BARACAT, E. C.; NOGUEIRA, R. J.; CHAVES, A.; ZAMBRONE, F. A.; FONSECA, F. S. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 37, p. 331-336, 1995.

CABBINESS, S. G.; GEHRKE, C. W.; KUO, K. C.; CHAN, T. K.; HATT, J. E.; HUEDIBUEO, S. A.; ODBTT, G. V. Polyamines in some tarantula venoms. **Toxicon**, v. 18, p. 681-683, 1980.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics: strategy and applications. **J. Mass Spectrom.**, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CAMARGOS, T. S.; RESTANO-CASSULINI, R.; POSSANI, L. D.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J.; SCHWARTZ, C. A.; ALVES, E. M.; DE FREITAS, S. M.; SCHWARTZ, E. F. The new kappa-KTx 2 5 from the scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1509-1517, 2011.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quím. Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L. D.; MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent K+ channels by a novel scorpion toxin. **Nature**, v. 296, n. 5852, p. 90-91, 1982.

CARTRON, E.; CARBONNEAU, M. A.; FOURET, G.; DESCOMPS, B.; LÉGER, C. L. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 480-486, 2001.

CASTRO, R.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Ion-pair liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the determination of quaternary ammonium herbicides. **J. Chromatogr. A**. v. 830, n. 1, p. 145-154, 1999.

CATTERALL, W. A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 20, p. 15-43, 1980.

CAVIEDES, B. E.; HERRANZ, J. L. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. **Rev. Neurol.**, v. 35, p. 1037-1048, 2002.

CESTELE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochemie**, v. 82, p. 883-892, 2000.

CHACE, D. H.; KALAS, T. A.; NAYLOR, E. W. The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. **Annu. Rev. Genom. Hum. G.**, v. 3, p. 17-45, 2002.

CHACE, D. H.; MILLINGTON, D. S.; TERADA, N.; KAHLER, S. G.; ROE, C. R.; HOFMAN, L. F. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. **Clin. Chem.,** v. 39, p. 66-71, 1993.

CHAGOT, B.; PIMENTEL, C.; DAI, L.; PIL, J.; TYTGAT, J.; NAKAJIMA, T.; CORZO, G.; DARBON, H.; FERRAT, G. An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochem. J.**, v. 388, p. 263-271, 2005.

CHAN, E. C.; HO, P. C. High-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for the analysis of catecholamines and metanephrines in human urine. **Rapid Commun. Mass Sp.**, v. 14, p. 1959-1964, 2000.

CHAPMAN, A. G. Glutamate and epilepsy. **Am. Soc. Nutr. Sci.**, v. 130, p. 1043S-1045S, 2000.

CHIPPAUX, J. P. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 6, p. 165-173, 2012.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. **Acta Trop.**, v. 107, p. 71-79, 2008.

CHO, I. H.; HONG, J.; SUH, E. C.; KIM, J. H.; LEE, H.; LEE, J. E.; LEE, S.; KIM, C. H.; KIM, D. W.; JO, E. K.; LEE, K. E.; KARIN, M.; LEE, S. J. Role of microglial IKKβ in kainic acid-induced hippocampal neuronal cell death. **Brain**, v. 131, n. 11, p. 3019-3033, 2008.

CHOWELL, G.; DÍAZ-DUEÑAS, P.; BUSTOS-SALDAÑA, R.; MIRELES, A. A.; FET, V. Epidemiological and clinical characteristics of scorpionism in Colima, Mexico (2000-2001), **Toxicon**, v. 47, n. 7, p. 753-758, 2006.

CHUANG, Y. C.; CHANG, A. Y. W.; LIN, J. W.; HSU, S. P.; CHAN, S. H. H. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus during kainic acid-induced status epilepticus in the rat. **Epilepsia**, v. 45, n. 10, p. 1202-1209, 2004.

CODDINGTON, J. A.; COLWELL, R. K. Arachnida. In: LEVIN, S. C. (Ed.). **Encyclopedia of biodiversity**. New York: Academic Press, 2001. p. 199-218.

COLEMAN, C.; NECKAMEYER, W**.** Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*. **Arch. Insect Biochem**. **Physiol.,** v. 59, p. 12-31. 2005.

COLOGNA, C. T.; MARCURSI, S.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* venom and toxins: an overview. **Protein. Pept. Lett.**, v. 16, p. 920-932, 2009.

COLOGNA, C. T.; PEIGNEUR, S.; ROSA, J. C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; VARANDA, W. A.; TYTGAT, J.; ARANTES, E. C. Purification and characterization of Ts15 the first member of a new -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 54-61, 2011.

CONCANNON, S. P., CROWE, T. D., ABERCROMBI, J. J., MOLIN, C. M., HOU, P., SUKUMARAN, D. K., RAJ, P. A., AND LEUNG, K. P. Susceptibility of oral bacteria to an antimicrobial decapeptide. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 1083-1093, 2003.

CONCEIÇÃO, I. M.; JURKIEWICZ, A.; FONSECA, D. R.; OPPERMAN, A. R.; FREITAS, T. A.; LEBRUN, I.; GARCEZ-DO CARMO, L. Selective release of ATP from simpathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from brasilian scorpion *Tityus serrulatus.* **Br. J. Pharmacol.**, v. 144, p. 519-527, 2005.

CORRÊA, M. M.; SAMPAIO, S. V.; LOPES, R. A.; MANCUSO, L. C.; CUNHA, O. A. B.; FRANCO, J. J.; GIGLIO, J. R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin *tityustoxin*-I. **Toxicon**, v. 35, p. 1053-1067, 1997.

COYLE, B.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; GERAGHTY, M. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. **Biometals**, v. 16, n. 2, p. 321-329, 2003.

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.**, v. 293, p. 1514-1522, 2002.

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.,** v. 286, p. 820-825, 2001.

DAS, J.; SIL, P. C. Taurine ameliorates alloxan-induced diabetic renal injury, oxidative stress-related signaling pathways and apoptosis in rats. **Amino Acids**, v. 43, n. 4, p. 1509-1523, 2012.

DAVIS, J.; JONES, A.; LEWIS, R. J. Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. **Peptides**, v. 30, n. 7, p. 1222-1227, 2009.

DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Overview of scorpion toxins specific for Na^+ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. **Toxicon**, v. 15, n. 46, p. 831-844, 2005.

DE LA VEGA, R. C.; SCHWARTZ, E. F.; POSSANI, L. D. Mining on scorpion venom biodiversity. **Toxicon**, v. 56, p. 1155-1161, 2010.

DE SOUZA, B. M. **Estrutura e função de mastoparanos dos venenos de vespas**. 2006. 115f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

DE VOS, R. C. H.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J. B.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 2, p. 778-791, 2007.

DEBIN, J. A.; MAGGIO, J. E.; STRICHARTZ, G. R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. C361-C369, 1993.

DEHESA-DÁVILA, M; MARTIN, B. M.; NOBILE, M.; PRESTIPINO, G.; POSSANI L. D. Isolation of a toxin from Centruroides infamatus infamatus Koch scorpion venom that modifies Na+ permeability on chick dorsal root ganglion cells. **Toxicon**, v. 32, n. 12, p. 1487-1493, 1994.

Di ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DI, Z. Y.; YANG, Z. Z.; YIN, S. J.; CAO, Z. J.; LI, W. X.; History of study, updated checklist, distribution and key of scorpions (Arachnida: Scorpiones) from China. **Zool. Res.**, v. 35, p. 3-19, 2014.

DIAS, N. B. **O uso de um sistema LC-ESI-IT-TOF/MS e MS^n na prospecção de novos componentes peptídicos do veneno da vespa social Polybia paulista.** 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2012.

DIAS, N. B.; DE SOUZA, B. M.; GOMES, P. C.; BRIGATTE, P.; PALMA, M. S. Peptidome profiling of venom from the social wasp *Polybia paulista*. **Toxicon.**, v. 107, p. 290-303, 2015.

DIAS, N. B.; DE SOUZA, B. M.; GOMES, P. C.; PALMA, M. S. Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): a comparison of the intra- and inter-colony compositions. **Peptides**, v. 51, p. 122-130, 2014.

DIONEX. Methods development using ion-pair chromatography with suppressed conductivity detection. Technical Note 12, 2000. Disponível em: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4696-TN12_LPN0705-01.pdf>. Acesso em: 02 out. 2015.

DODONOV, A. F.; KOZLOVSKI, V. I.; SOULIMENKOV, I. V.; RAZNIKOV, V. V.; LOBODA, A. V.; ZHEN, Z.; HORWATH, T.; WOLLNIK, H. High-resolution electrospray ionization orthogonalinjection time-of-flight mass spectrometer. **Eur. J. Mass Spectrom.**, v. 6, p. 481-490, 2000.

DOLE, M.; MACK, L. L.; HINES, R. L.; MOBLEY, R. C.; FERGUSON, L. D.; ALICE, M. B. Molecular beams of macroions. **J. Chem. Phys**., v. 49, p. 2240-2249, 1968.

DONATO, E. M.; ZANOTTO, Â. R.; BERGOLD, A. M. Ion-pair HPLC applied to the assay of the vitamin B group mixture: theorical bases and method validation. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, n. 3, p. 363-371, 2004.

DONGRE, A. R.; JONES, J. L.; SOMOGYI, A.; WYSOCKI, V. H. Surface-induced dissociation: An effective tool to probe structure, energetics and fragmentation mechanisms of protonated peptides. **J. Mass Spectrom.**, v. 31, p. 339-350, 1996.

DREXLER, D. M.; BELCASTRO, J. V.; DICKINSON, K. E.; EDINGER, K. J.; HNATYSHYN, S. Y.; JOSEPHS, J. L.; LANGISH, R. A.; MCNANEY, C. A.; SANTONE, K. S.; SHIPKOVA, P. A.; TYMIAK, A. A.; ZVYAGA, T. A.; SANDERS, M. An automated high throughput liquid chromatography-mass spectrometry process to assess the metabolic stability of drug candidates. **Assay Drug Dev. Technol.**, v. 5, n. 2, p. 247-264, 2007.

DUDLEY, E.; YOUSEF, M.; WANG, Y.; GRIFFITHS, W. J. Targeted metabolomics and mass spectrometry. **Adv. Protein Chem. Struct. Biol.**, v. 80, p. 45-83, 2010.

DUFFIELD, P. H.; DUFFIELD, A. M.; CARROLL, P. R.; MOROANS, D. Analysis of the venom of the Sydney funnel-web spider, *Atrax robustes*, using gas chromatography mass spectrometry. **Biomed. Mass Spectr.**, v. 6, n. 3, p. 105-108, 1979.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends Anal. Chem.**, v. 24, p. 285-294, 2005.

EILAM, D. Open- field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behav. Brain Res.**, v. 142, p. 53-62, 2003.

ELGAR, D.; PLESSIS, J. D.; DU PLESSIS, L. Cysteine-free peptides in scorpion venom: geographical distribution, structure–function relationship and mode of action. **Afr. J. Biotechnol.,** v. 5, p. 2495-2502, 2006.

ESCOUBAS, P.; CELERIER, M. L.; NAKAJIMA, T. High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus *Brachypelma:* chemotaxonomic and biochemical applications. **Rapid Commun. Mass Sp.**, v. 11, n. 17, p. 1891-1899, 1997.

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G. M. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 43, n. 3, p. 279-295, 2008.

ESCOUBAS, P.; SOLLOD, B. L.; KING, G. F. Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 650-63, 2006.

FAJLOUN, Z.; FERRAT, G.; CARLIER, E.; FATHALLAH, M.; LECOMTE, C.; SANDOZ, G.; DI LUCCIO, E.; MABROUK, K.; LEGROS, C.; DARBON, H.; ROCHAT, H.; SABATIER, J. M. e DE WAARD, M. Synthesis, 1H NMR structure, and activity of a three-disulfide-bridged maurotoxin analog designed to restore the consensus motif of scorpion toxins. **J. Biol Chem.**, v. 275, n. 18, p. 13605-12, 2000.

FEKETE, S.; GRAND-GUILLAUME PERRENOUD, A.; GUILLARME, D. Evolution and current trends in liquid and supercritical fluid chromatography. **Curr. Chromatogr.**, v. 1, p. 15-40, 2014.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science,** v. 246, p. 64-71, 1989.

FENSELAU, C.; COTTER, R. J. Chemical aspects of fast atom bombardment. **Chem. Rev.**, v. 87, p. 501-512, 1987.

FERNSTROM, J. D.; FERNSTROM, M. H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. **J. Nutr.**, v. 137, p. 1539-1547, 2007.

FERREIRA, L. A. F.; ALVES, E. W.; HENRIQUES, O. B.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin-potentiating peptide isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 31, p. 941-947, 1993.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comp. Funct. Genome.**, v. 2, p. 155-168, 2001.

FIEHN, O. Metabolomics - the linkbetween genotypes and phenotypes. **Plant Mol. Biol**., v. 48, p. 155-171, 2002.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DÖRMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHEWAY, R.N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nat. Biotechnol.**, v. 18, p. 1157-1161, 2000.

FLORA, S. J.; PANDE, M.; BHADAURIA, S.; KANNAN, G. M. Combined administration of taurine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in the treatment of chronic lead intoxication in rats. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 23, p. 157-166, 2004.

FRIEDMAN, A. H.; RODICHOK, L. D. **Acute toxicity of spermidine and its relationship to histamine in mice.** In: Federation Proceedings. 9650 Rockville Pike, Bethesda, Md 20814-3998: Federation Amer. Soc. Exp., p. A617, 1970.

FUHRER, T.; ZAMBONI, N. High-throughput discovery metabolomics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 31, p. 73-78, 2015.

FULLER, M. D.; THOMPSON, C. H.; ZHANG, Z. R.; FREEMAN, C. S.; SCHAY, E.; SZAKÁCS, G.; BAKOS, É.; SARKADI, B.; MCMASTER, B.; FRENCH , R. J.; POHL, J.; KUBANEK, J.; MCCARTY, N. A. State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 37545-37555, 2007.

FULLER, R. W.; LACEFIEL, W. B.; KATTAU, R. W.; NICKANDER, R. C.; SNODDY, H.D. Myotonia produced by indoleacetic acid: studies with related compounds and correlation with drug levels in tissues. **Arch. Int. de Pharmacodyn. Ther.**, v. 193, p. 48-60, 1971.

GALÉ, K. GABA and epilepsy: basic concepts from preclinical research. **Epilepsia**, v. 33, n. 5, p. S3-S12, 1992.

GARCIA, M. L.; GALVEZ, A.; GARCIA-CALVO, M.; KING, V. F.; VAZQUEZ, J.; KACZOROWSKI. G. J. Use of toxins to study potassium channels. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 23, n. 4, p. 615-646, 1991.

GELPI, E. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A,** v. 703, n. 1-2, p. 59-80, 1995.

GHAURI, F. Y.; NICHOLSON, J. K.; SWEATMAN, B. C.; WOOD, J.; BEDDELL, C. R.; LINDON, J. C.; CAIRNS, N. J. NMR spectroscopy of human post mortem cerebrospinal

fluid: distinction of Alzheimer's disease from control using pattern recognition and statistics. **NMR Biomed.**, v. 6, p. 163-167, 1993.

GIAMPIETRO, D. E. P. An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. **Trends in Neurosciences**, n. 26, p. 9-11, 2003.

GIBBONS, H.; O'GORMAN, A.; BRENNAN, L. Metabolomics as a tool in nutritional research. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 26, p. 30-34, 2015.

GILBO, C. M.; COLES, N. W. An investigation of certain components of the venom of the female Sydney funnel web spider. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 17, n. 3, p. 758-763, 1964.

GLASSBROOK, N., BEECHER, C., RYALS, J. Metabolic profiling on the right path. **Nat. Biotechnol**., V. 18, p. 1142-1143, 2000.

GLUCK, M. R.; JAYATILLEKE, E.; SHAW, S.; ROWAN, A. J.; HAROUTUNIAN, V. CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 39, n. 1, p. 63-71, 2000.

GONG, W.; CAO, Y.; WANG, Y. Analysis of pharmaceutical samples of resina draconis. **Phytochem. Anal.**, v. 19, p. 499-505, 2008.

GOUDET, C.; CHI, C. W.; TYTGAT, J. An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. **Toxicon**, v. 40, p. 1239-1258, 2002.

GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Capítulo 5.1: Acidentes por animais peçonhentos. Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasil, 2004.

GWEE, M. C.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R. M.; CHEAH, L. S. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, p. 795-801, 2002.

HANKS, G. W.; CONNO, F.; CHERNY, N.; HANNA, M.; KALSO, E.; MCQUAY, H.J.; MERCADANTE, S.; MEYNADIER, J.; POULAIN, P.; RIPAMONTI, C.; RADBRUCH, L.; CASAS, J. R.; SAWE, J.; TWYCROSS, R. G.; VENTAFRIDDA, V. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. **Br. J. Cancer**, v. 84, n. 5, p. 587-93, 2001.

HASHIMOTO, H.; UNEMOTO, T.; HAYASHI, M. Inhibitory action of spermine on the contractions of rat ultras. **Am. J. Physiol.**, v. 225, n. 3, p. 743-746, 1973.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 243-249, 1987.

HERZIG, V.; WARD, R. J.; dos SANTOS, W. F. Ontogenetic changes *in Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae) spider venom. **Toxicon**, v. 44, p. 635-640, 2004.

HIDE, I.; BENNET, J. P.; PIZZEY, A.; BOONEN, G.; SAGI, D. B.; GOMPERTS, B. D.; TATHAM, P. E. R. Degranulation of individual mast cell in response to Ca2+ and guarine nucleotides: an all-or-none event. **J. Cell Biol.,** v. 123, n. 3, p. 585-593, 1993.

HIGASHIJIMA, T.; BURNIER, J.; ROSS, E. M. Regulation Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines**. J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 24, p. 14176-14186, 1990.

HILLENKAMP, F.; KARAS, M.; BEAVIS, R.C.; CHAIT ,B.T. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Anal Chem.** v.15, n.63, p. 1193-1203, 1991.

HOCKADAY, D. C.; SHEN, S.; FIVEASH, J.; RAUBITSCHEK, A.; COLCHER, D.; LIU, A.; ALVAREZ, V.; MAMELAK, A. N. Imaging glioma extent with ^{131}I-TM-601. **J. Nucl. Med.**, v. 46, n. 4, p. 580-586, 2005.

HOLLYWOOD, K.; BRISON, D.; GOODACRE, R. Metabolomic: current technologies and future trends. **Proteomics**, v.6, p. 4716-4723, 2006.

HORNI, A.; WEICKMANN, D.; HESSE, M. The main products of the low molecular mass fraction in the venom of the spider *Latrodectus menavodi*. **Toxicon**, v. 39, p. 425-428, 2001.

HUNT, D. F.; YATES, J. R.; SHABANOWITZ, J.; WINSTON, S.; HAUER, C. R. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. **Proc. Natl. Acad. Sci**. **USA**, v. 83, n. 17, p. 6233-6237, 1986.

INCEOGLU, B.; LANGO, J.; PESSAH, I. N.; HAMMOCK, B. D. Three structurally related, highly potent, peptides from the venom of *Parabuthus transvaalicus* possess divergent biological activity. **Toxicon**, v. 45, p. 727-733, 2005.

ISMAIL, M.; OSMAN, O. H.; GUMAA, K. A.; KARRAR, M. A. Some pharmacological studies with scorpion (*Pandinus exitialis*) venom. **Toxicon**, v. 12, n. 1, p. 75-82, 1974.

JACOX, A.; CARR, D. B.; PAYNE, R. New clinical-practice guidelines for the management of pain in patients with cancer. **N. Engl. J. Med.,** v. 330, n. 9, p. 651-655, 1994.

JOHN, J. A.; BLOGG, C. D.; MURRAY, F. J.; SCHWETZ, B. A.; GEHRING, P.J. Teratogenic effect of the plant hormone indole-3-acetic acid in mice and rats. **Teratology**, v. 19, p. 321-326, 1979.

JOHNSON, J. V.; YOST, R. A. Tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry: triple quadrupoles and quadrupole ion traps. **Anal. Chem.**, v. 62, n. 20, p. 2162-2172, 1990.

KATSU, T. C.; NINOMIYA, M.; KUROKO, H.; KOBAYASHI, T.; HIROTA, T.; FUJITA, Y. Action mechanism of amphipathic peptides gramicidin S and melittin on erythrocyte membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 939, n. 1, p. 57-63, 1988.

KIM, J. S.; HEO, R. W.; KIM, H.; YI, C.; SHIN, H. J.; HAN, J. W.; ROH. G. S. Salubrinal, ER stress inhibitor, attenuates kainic acid-induced hippocampal cell death. **J. Neural Transm.**, v. 121, n. 10, p. 1233-1243, 2014.

KING, G. F.; HARDY, M. C. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. **Annu Rev. Entomol.** v. 58, p. 475-496, 2013.

KLEINBAUM, D. G.; KUPPER, L. L.; MULLER, K. E.; NIZAM, A. **Analysis of repeated measures data in Brooks/Cole Publishing Company.** Applied Regression Analysis and 38 Other Multivariable Methods. New York: Brooks/Cole Publishing Company, 1998. p. 589-638.

KNOX, J. H. Practical aspects of LC theory. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 15, p. 352-364, 1977.

KONTNY, E.; SZCZEPANSKA, K.; KOWALCZEWSKI, J.; KUROWSKA, M.; JANICKA, I.; MARCINKIEWICZ, J.; MASLINSKI, W. The mechanism of taurine chloramine inhibition of cytokine (interleukin-6, interleukin-8) production by rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 10, p. 2169-2177, 2000.

KRISHNAMURTHY, T.; PRABHAKARAN, M.; LONG, S. R. Mass spectrometric investigations on *Conus* peptides. **Toxicon,** v. 34, n. 11-12, p. 1345-1359, 1996.

KUHN-NENTWIG, L.; SCHALLER, J.; NENTWIG, W. Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multi component venom of *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). **Toxicon**, v. 32, n. 3, p. 287-302, 1994.

LEINONEN, A.; KUURANNE, T.; KOSTIAINEN, R. J. Liquid chromatography/mass spectrometry in anabolic steroid analysis-optimization and comparison of three ionization techniques: electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization. **Mass Spectrom.**, v. 37, p. 693-698, 2002.

LEVER, M.; SLOW, S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. **Clin. Biochem**., v. 43, n. 9, p. 732-44, 2010.

LEVY, H. L. Newborn screening by tandem mass spectrometry: a new era. **Clin. Chem.,** v. 44, p. 2401-2402, 1998.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Ver. Drug Discov.**, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LIBERSAT, F. Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. **J. Comp. Physiol. A**, v. 189, p. 497-508, 2003.

LIN, S.; YANG, Z.; SHEN, Y.; CAI, Z. LC/MS-based non-targeted metabolomics for the investigation of general toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice. **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 301, p. 29-36, 2011.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; AMORIM, A. M.; BRAZIL, T. K. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 3, p. 239-245, 2000.

LOTHMAN, E. W.; COLLINS, R. C. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. **Brain Res.**, v. 218, n. 1-2, p. 299-318, 1981.

LOURENÇO, W. R. Scorpiones. In: ADIS, J. (Ed.). **Amazonian arachnida and myriapoda**: identification keys to all classes, orders, families, some genera and lists of known terrestrial species. Moscow: Pensoft Publishes, 2002. p. 399-438.

LOURENÇO, W. R. Parthenogenesis in scorpions: some history – new data. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 14, n. 1, p. 19-44, 2008.

LOURENCO, W. R.; EICKSTEDT, V. R. D. Escorpiões de importância médica. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo, 2003.

LU, M. O.; ZHANG, X. M.; MIX, E.; QUEZADA, H. C.; JIN, T.; ZHU, J.; ADEM, A. TNF-alpha receptor 1 deficiency enhances kainic acid-induced hippocampal injury in mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 7, p. 1608-1614, 2008.

LUO, F.; ZENG, X. C.; HAHIN, R.; CAO, Z. J.; LIU, H.; LI, W. X. Genomic organization of four novel nondisulfide-bridged peptides from scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch: gaining insight into evolutionary mechanism. **Peptides**, v. 26, n. 12, p. 2427-2433, 2005.

LUTZ, A.; MELLO, O. Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. **Outros Estudos em Zoologia**, v. 3, n. 4, p. 81-85, 1922.

MAMELAK, A. N.; ROSENFELD, S.; BUCHOLZ, R.; RAUBITSCHEK, A.; NABORS, L. B.; FIVEASH, J. B.; SHEN, S.; KHAZAELI, M. B.; COLCHER, D.; LIU, A.; OSMAN, M.; GUTHRIE, B.; SCHADE-BIJUR, S.; HABLITZ, D. M.; ALVAREZ, V. L.; GONDA, M. A. Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 22, p. 3644-3650, 2006.

MANNA, P.; SINHA, M.; SIL, P. C. Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. **Amino Acids**, v. 36, p. 417-428, 2009.

MANUAL de Primeiros Socorros. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. FIOCRUZ. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 2003.

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. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 360, p. 728-734, 2007.

MARCOTTE, P.; CHEN, L.; KALLEN, R. G.; CHAHINE, M. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion toxin gamma on voltage-gated sodium channels. **Circ. Res.**, v. 80, p. 363- 369, 1997.

MARCUSSI, S.; ARANTES, E. C.; SOARES, M. A. **Escorpiões:** Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas. São Paulo: FUNPEC-Editora, 2011.

MEKI, A. M. A.; NASSAR, A. Y.; ROCHAT, H. A bradykinin potentiating peptide (peptide K 12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. **Peptides**, v. 16, p. 1359-1365, 1995.

MELETIADIS, J.; MEIS, J. G. M.; MOUTON, J. W.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 8, p. 2949-2954, 2000.

MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, v. 45, n. 1, p.101-106, 2005.

MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 18, n. 6, p. 636-642, 2004.

MERRIFIELD, B. Solid-Phase synthesis. **Science**, v. 232, n. 4748, p. 341-347, 1986.

MIKULECKÁ, A.; KRŠEK, P.; MARES, P. Nonconvulsive kainic acid-induced seizures elicit age-dependent impairment of memory for the elevated plus-maze. **Epilepsy Behav.**, v. 1, n. 6, p. 418-426, 2000.

MILLER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R.; PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca+2-activated K+ channels from mammalian skeletal muscle. **Nature**, v. 313, p. 316-318, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. **Manual de controle de escorpiões.** Brasília, 2009. 72 p.

MONTGOMERY, K. C. The elevated pluz-maze. **Pharmacol. Method. Ethol. Psychoph.**, v. 53, s. 1, p. 334-342, 1958.

MOSBAH, A.; KHARRAT, R.; FAJLOUN, Z.; RENISIO, J. G.; BLANC, E.; SABATIER, J. M.; EL AYEB, M. e DARBON, H. A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. **Proteins**, v. 40, p. 436-42, 2000.

NASCIMENTO, Jr. E. B., COSTA, K. A.; BERTOLLO, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, L. T.; SOUZA, A. L.; GLORIA, M. B.; MORAES-SANTOS, T.; COELHO, M. M. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edemainduced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 585-593, 2005.

NAWARAK, J.; SINCHAIKUL, S.; WU, C. Y.; LIAU, M. Y.; PHUTRAKUL, S.; CHEN, S. T. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. **Electrophoresis**, v. 24, n. 16, p. 2838-2854, 2003.

NAYLOR, E. W.; CHACE, D. H. J. Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid, and amino acid metabolism. **Child Neurol**., v. 14, n. 1, p. S4-S8, 1999.

NEWTON, K. A.; CLENCH, M. R.; DESHMUKH, R.; JEYASEELAN, K.; STRONG, P. N. Mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of the Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*: biotope-specific variation in the expression of venom peptides. **Rapid Commun. Mass Sp.**, v. 21, n. 21, p. 3467-3476, 2007.

NICHOLSON, J. K.; CONNELLY, J.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 1, p. 153-161, 2002.

NIRTHANAN, S.; PIL, J.; ABDEL-MOTTALEB, Y.; SUGAHARA, Y.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; JOSEPH, J. S.; SATO, K. e TYTGAT, J. Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1, from *Heterometrus spinifer* venom. **Biochem. Pharmacol**., v. 69, n. 4, p. 669-678, 2005.

NISHIKAWA, A. K.; CARICATI, C. P.; LIMA, M. L.; dos SANTOS, M. C.; KIPNIS, T. L.; EICKSTEDT, V. R.; KNYSAK, I.; da SILVA, M. H.; HIGASHI, H. G.; da SILVA, W. D. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 989-998, 1994.

NUNAN, E. A.; MORAES, M. F. D.; CARDOSO, V. N.; MORAES-SANTOS, T. Effects of age on body distribution of tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Life Sci;** v.73, p. 319-25, 2003.

OLAMENDI-PORTUGAL, T.; SOMODI, S.; FERNANDEZ, J. A.; ZAMUDIO, F. Z.; BECERRIL, B.; VARGA, Z.; PANYI, G.; GASPAR, R. e POSSANI, L. D. Novel alpha-KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K+ channels of T cells. **Toxicon**, v. 46, p. 418-429, 2005.

OLIVEIRA, F. N. **Toxicidade da peçonha de *Tityus serrulatus* procedente do distrito federal por meio da avaliação da DL50, efeitos da peçonha e edema pulmonar induzido.** 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

OLIVEIRA, F. N.; MORTARI, M. R.; CARNEIRO, F. P.; GUERRERO-VARGAS, J. A.; SANTOS, D. M.; PIMENTA, A. M.; SCHWARTZ, E. F. 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. **Toxicon**, v. 73, p. 33-46, 2013.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B., BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends Biotechnol.**, v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.

OLIVERA, B. M. Conus venom peptides: correlating chemistry and behavior. **J. Comp. Physiol. A**, v. 185, p. 353-359, 1999.

OLIVERA, B. M.; CRUZ, L. J. Conotoxins, in retrospecto. **Toxicon.**, v. 39, n. 1, p. 7-14, 2001.

OLSEN, R. W.; DELOREY, T. M.; GORDEY, M.; KANG, M. H. GABA receptor function and epilepsy. **Adv. Neurol.**, v. 79, p. 499-510, 1999.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M.; NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Res.**, v. 912, p. 171-75, 2001.

ORTIZ, E.; GURROLA, G. B.; SCHWARTZ, E. F.; POSSANI, L. D. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon,** v. 93, p. 125-135, 2015.

OWEN, M. D. Insect venoms: identification of dopamine and noradrenaline in wasp and bee stings. **Experientia**, v. 27, p. 544-545, 1971.

PALMA, M. S.; NAKAJIMA, T. A Natural combinatorial chemistry strategy in acylpolyamine toxins from Nephilinae orb-web spiders. **Toxin Rev.**, v. 24, p. 209-234, 2005.

PARKER, E. M.; CUBEDDU, L. X. Comparative effects of amphetamine, phenylethylamine and related drugs on dopamine efflux, dopamine uptake and mazindol binding. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 245, n. 1, p. 199-210, 1988.

PATEL, S.; AHMED, S. Emerging field of metabolomics: big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 107, p. 63-74, 2015.

PENG, B.; LI, H.; PENG, X. X. Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. **Protein Cell**, v. 6, n. 9, p. 628-637, 2015b.

PENG, B.; SU, Y. B.; LI, H.; HAN, Y.; GUO, C.; TIAN, Y. M.; PENG, X. X. Exogenous alanine and/or glucose plus kanamycin kills antibiotic-resistant bacteria. **Cell Metab.**, v. 21, p. 249-261, 2015a.

PÉREZ-PAYÁ, E.; DUFOURCQ, J.; BRACO, L.; ABAD, C. Structural characterization of the natural membrane-bound state of melittin: a fluorescence study of a dansylated analogue. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1329, n. 2, p. 223-236, 1997.

PÉREZ-PAYÁ, E.; HOUGHTEN, R. A.; BLONDELLE, S. E. The role of amphipathicity in the folding, aelfassociation and biological activity of multiple subunit small proteins. **J. Biol. Chem**., v. 270, n. 3, p. 1048-1056, 1995.

PESSINI, A. C.; SOUZA, A. M.; FACCIOLI, L. H.; GREGÓRIO, Z. M. O.; ARANTES, E. C. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **Int. Immunopharmaco.**, v. 3, p. 765-774, 2003.

PESSINI, A. C.; TAKAO, T. T.; CAVALHEIRO, E. C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S. V.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, charaterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, p. 1495-1504, 2001.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators Inflamm.**, v. 2010, p. 16 (ID 903295), 2010.

PIMENTA, A. M.; RATES, B.; BLOCH, C. Jr.; GOMES, P. C.; SANTORO, M. M.; DE LIMA, M. E.; RICHARDSON, M.; CORDEIRO, M. N. Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometric analyses to solve micro-heterogeneity in post-translationally modified peptides from *Phoneutria nigriventer* (Aranea, Ctenidae) venom. **Rapid Commun. Mass Sp.**, v. 19, n. 1, p. 31-37. 2005.

PIMENTA, A. M.; STOCKLIN, R.; FAVREAU, P.; BOUGIS, P. E.; MARTIN EAUCLAIRE, M. F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid. Commun. Mass. Sp.**, v. 15, p. 1562-1572, 2001.

PLESSIS, L. H.; ELGAR, D.; PLESSIS, J. L. Southern african scorpion toxins: an overview. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 1-9, 2008.

POLIKARPOV, I.; JÚNIOR, M. S. M.; MAONI, S.; TOYAMA, M. H.; TEPLYAKOV, A. Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. **J. Mol. Biol.**, v. 290, p. 175-184, 1999.

POSSANI, L. D.; ALAGÓN, A. C.; FLETCHER JR., P. L.; ERICKSON, B. W. Purification and properties of mammalian toxins from the Brazilian scorpion *Tityus Serrulatus* Lutz and Mello. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 180, n. 394-403, 1977.

POSSANI, L. D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na^+-channels. **Eur. J. Biochem.**, v. 264, n. 2, p. 287-300, 1999.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; MOCHA-MORALES, J.; SVENDESEN, I. Purification and chemical characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus Serrulatus* Lutz And Mello. **Calrsberg Res. Commun**., v. 46, p. 195-205, 1984.

POSSANI, L. D.; MERINO, E.; CORONA, M.; BOLIVAR, F.; BECERRIL, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, v. 82, p. 861-868, 2000.

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

PRENTICE, B. M.; X.U., W.; OUYANG, Z.; MCLUCKEY, S. A. DC Potentials Applied to an End-cap Electrode of a 3-D Ion Trap for Enhanced MS Functionality. **Int. J. Mass Spectrom.**, Amsterdam, v. 306, n. 2-3, p. 114-122, 2011.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 3-33, 2003.

PUCCA, M. B.; AMORIM, F. G.; CERNI, F. A.; BORDON, K. C. F.; CARDOSO, I. A.; ANJOLETTE, F. A.; ARANTES, E. C. Influence of post-starvation extraction time and preyspecific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. **Toxicon**, v. 90, p. 326-336, 2014.

PUCCA, M. B.; CERNI, F. A.; JUNIOR, E. L. P.; BORDON, K. C. F.; AMORIM, F. G.; CORDEIRO, F. A.; LONGHIM, H. T.; CREMONEZ, C. M.; OLIVEIRA, G. H.; ARANTES, E. C. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272-284, 2015a.

PUCCA, M. B.; OLIVEIRA, F. N.; SCHWARTZ, E. F.; ARANTES, E. C.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Scorpionism and dangerous species of Brazil. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. (Ed.). **Scorpion Venoms.** Netherlands: Springer, 2015b.

QUINTERO-HERNANDEZ, V.; ORTIZ, E.; RENDON-ANAYA, M.; SCHWARTZ, E. F.; BECERRIL, B.; CORZO, G.; POSSANI, L. D. Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression. **Toxicon**, v. 58, p. 644-663, 2011.

HUXTABLE, R. J. Physiological actions of taurine. **Physiol. Rev.**, v. 72, n. 21, p. 101-163, 1992.

RACASAN, S.; BRAAM, B.; VAN DER GIEZEN, D. M.; GOLDSCHMEDING, R.; BOER, P.; KOOMANS, H. A. Perinatal L-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 44, p. 83-88, 2004.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 225-254, 2002.

RATES, B.; FERRAZ, K. K. F.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; DE LIMA, M. E.; PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* venom peptidomics: assessing venom peptide diversity. **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 611–618, 2008.

ROCHAT, H.; BERNARD, P.; COURAUD, F. (1979). Scorpion toxins: chemistry and mode of action. In: CECCARELLI, B.; CLEMENTI, F. (Eds.) **Advances in cytopharmacology**. New York: Raven Press, p. 325-334. (v. 3).

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. **Biomed. Mass Spectrom**., v. 11, n. 11, p. 601, 1984.

ROSENTHAL, S. M.; FISHER, E. R.; STOHLMAN, E. F. Nephrotoxic action of spermine. **Proc. Soc. exp. Biol. Med.**, v. 80, n. 3, p. 432-434, 1952.

RUSSELL, F. E.; ALENDER, C. B.; BUESS, F. W. Venom of the scorpion *Vejovis spinigerus*. **Science**, v. 159, n. 3810, p. 90-91, 1968.

SADAGOPAN, N.; MALONE, M.; WATSON, J. T. Effect of charge derivatization in the determination of phosphorylation sites in peptides by electrospray ionization collision-activated dissociation tandem mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 34, n. 12, p. 1279-82. 1999.

SAIDEMBERG, D. M.; DA SILVA-FILHO, L. C.; TOGNOLI, L. M.; TORMENA, C. F.; PALMA, M. S. Polybioside, a neuroactive compound from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, n. 4, p. 527-531, 2010.

SALVEMINI, D.; WANG, Z-Q.; BOURDON, D. M.; STERN, M. K.; CURRIE, M. G.; MANNING, P. T. Evidence of peroxinitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 203, p. 217-220, 1996.

SANDOVAL, M. R. L.; LEBRUM, I. TSII toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopathological studies. **Brain Res. Bull.**, v. 62, p. 165-172, 2003.

SANDOVAL, M. R., LEBRUN, I. TsII toxin isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopathologic studies. **Brain Res. Bull.**, v. 62, n. 2, p. 165-72, 2003.

SANTA, T. Isothiocyanates as derivatization reagents for amines in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Biomed Chromatogr.**, v. 9, p. 915-918, 2010.

SCHAFFER, S.; TAKAHASHI, K.; AZUMA**,** J**.** Role of osmoregulation in the actions of taurine. **Amino Acids**, v. 19, p. 527-546, 2000.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch Surg.**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHROEDER, F. C.; TAGGI, A. E.; GRONQUIST, M.; MALIK, R. U.; GRANT, J. B.; EISNER, T.; MEINWALD, J. NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. **PNAS**, v. 105, n. 38, p. 14283-14287, 2008.

SCHWARTZ, E. F.; CAMARGOS, T. S.; ZAMUDIO, F. Z.; SILVA, L. P.; BLOCH, C. JR.; CAIXETA, F.; SCHWARTZ, C. A.; POSSANI, L. D. Mass spectrometry analysis, amino acid sequence and biological activity of venom components from the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Toxicon**, v. 51, p. 1499-1508, 2008.

SEIDLER, J.; ZINN, N.; BOEHM, M. E.; LEHMANN, W. D. De novo Sequencing of Peptides by MS/MS. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 634-649, 2010.

SHAW, G. G. Some pharmacological properties of the polyamines spermine and spermidine - a reappraisal. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 198, n. 1, p. 36-48, 1972.

SHIPKOVA, P.; DREXLER, D. M.; LANGISH, R.; SMALLEY. J.; SALYAN, M. E.; SANDERS, M. Application of ion trap technology to liquid chromatography/mass spectrometry quantitation of large peptides. **Rapid Commun Mass Spectrom.**, v. 22, n. 9, p. 1359-1366. 2008.

SILVA, T. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Avaliação da DL50 e edema pulmonar induzido pelo veneno de *Tityus serrulatus* (Scorpiones; Buthidae) Procedente da Bahia, Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2005.

SILVA, T. F.; CASAIS-E-SILVA, L. L.; LIRA-DA-SILVA, R. M. Avaliação da DL50 e Edema Pulmonar Induzido pelo Veneno de *Tityus serrulatus* (Scorpiones; Buthidae) Procedente da Bahia. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 1, p.1-5, 2005.

SINHA, M.; MANNA, P.; SIL, P. C. Induction of necrosis in cadmium-induced hepatic oxidative stress and its prevention by the prophylactic properties of taurine. **J. Trace Elem. Med. Biol**., v. 23, p. 300-313, 2009.

SINNA, G. A. The effect of the plant hormone indole-3-acetic acid and chemically related-compounds on the growth of mouse fibroblast 3T3-cells. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 74, p. 433-436, 1983.

SIUZDAK, G. **The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology.** MCC Press: San Diego, 2003.

SLOW, S.; LEVER, M.; CHAMBERS, S. T.; GEORGE, P. M. Plasma dependent and independent accumulation of betaine in male and female rat tissues. **Physiol Res**., v. 58, n. 3, p. 403-410. 2009.

SOARES, M. R. M.; AZEVEDO, C. S.; DE-MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 359-363, 2002.

SOCHA, R.; KODRÍK, D.; ZEMEK, R. Stimulatory effects of bioamines norepinephrine and dopamine on locomotion of *Pyrrhocoris apterus* (L.): is the adipokinetic hormone involved? **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 151, n. 3, p. 305-310, 2008.

SOROCEANU, L.; GILLESPIE, Y.; KHAZAELI, M. B.; SONTHEIMER, H. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. **Cancer Res.**, v. 58, n. 21, p. 487-4879, 1998.

SOUZA, C. A. R.; CANDIDO, D. M.; LUCAS, S. M.; BRESCOVIT, A. D. On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae). **Zootaxa**, v. 1987, p. 1-38, 2009.

SRINIVASAN, K. N.; SIVARAJA, V.; HUYS, I.; SASAKI, T.; CHENG, B.; KUMAR, T. K. S.; SATO, K.; TYTGAT, J.; YU, C.; SAN, B. C. C.; RANGANATHAN, S.; BOWIE, H. J.; KINI, R. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Kappa-hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 33, p. 30040-30047, 2002.

STEEN, H.; KUSTER, B.; MANN, M. Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of phosphopeptides by precursor ion scanning. **J. Mass Spectrom.**, v. 36, n. 7, p. 782-790, 2001.

SULLIVAN, W. T.; STRONG, L. M. Behavioral changes in rats and guinea pigs induced by the administration of indole 3-acetic acid and 6-aminonlcotinamide. **J. Nutr.**, v. 65, n. 2, p. 199-209, 1958.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phyto-chemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.

SUNAGAR, K.; UNDHEIM, E. A.; CHAN, A. H.; KOLUDAROV, I.; MUÑOZ-GÓMEZ, S. A.; ANTUNES, A.; FRY, B. G. Evolution stings: the origin and diversification of scorpion toxin peptide scaffolds. **Toxins**, v. 5, n. 12, p. 2456-87, 2013.

SZEPESI, G. **HPLC in pharmaceutical analysis.** Boston: CRC Press, 1990. p. 49-65. (v. 1).

TABB, D. L.; SMITH, L. L.; BRECI, L. A.; VYSOCKI, V. H.; LIN, D.; YATES, J. R. Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 5, p. 1155-1163, 2003.

TABOR, C. W.; ROSENTHAL, S. M. Pharmacology of spermine and spermidine. Some effects on animals and bacteria. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 116, n. 2, p. 139-155, 1956.

TABOR, C. W.; TABOR, H. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 45, p. 285-306, 1976.

TOLEDO, D.V.; NEVES, A.G.A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comp. Biochem. Physiol**., v. 55B, p. 249-253, 1976.

TU, A. T. **Venoms: Chemistry and Molecular Biology.** Nueva York. John Wiley. 560 p. 1977.

TUICHIBAEV, M. U.; AKHMEDOVA, N .U.; KAZAKOV, I.; KORNEEV, A. S.; GAGEL'GANS, A. I. Low molecular weight peptides from the venom of the giant hornet *Vespa orientalis*, structure and function. **Biokhimiia**, v. 53, n. 2, p. 219-226, 1988.

TYTGAT, J.; CHANDY, K. G.; GARCIA, M. L.; GUTMAN, G. A.; MARTIN EAUCLAIRE, M. F.; VAN DER WALT, J. J.; POSSANI, L. D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 444-447, 1999.

ULVATNE, H. Antimicrobial peptides: potential use in skin infections. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 4, n. 9, p. 591-595, 2003.

VAIDYANATHAN, S.; ROWLAND, J.J.; KELL, D. B.; GOODACRE, R. Discrimination of aerobic endospore-forming bacteria via electrospray ionization mass spectrometry of whole cell suspensions. **Anal.Chem.**, v. 73, p. 4134-4144, 2001.

VALDIVIA, H. H.; KIRBY, M. S.; LEDERER, W. J.; CORONADO, R. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel of skeletal and cardiac muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 24, 12185-12189, 1992.

VALDIVIA, H. H.; POSSANI, L. D. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. **TCM**, v.8, n.3, p.111-118, 1998.

VAN DER MEIJDEN, A.; COELHO, P.; RASKO, M. Variability in venom volume, flow rate and duration in defensive stings of five scorpion species. **Toxicon**, v. 100, p. 60-66, 2015.

VAN DER MEIJDEN, A.; COELHO, P.; RASKO, M. Variability in venom volume, flow rate and duration in defensive stings of five scorpion species. **Toxicon**, v. 100, p. 60-66, 2015.

VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V. L.; BENDHACK, L. M.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V.; ARANTES, E. C. Effects of voltage-gated Na^+ channel toxins from *Tityus serrulatus*

venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 141, n. 1, p. 85-92, 2005.

VERANO-BRAGA, T.; FIGUEIREDO-REZENDE, F.; MELO, M. N.; LAUTNER, R. Q.; GOMES, E. R. M.; MATA-MACHADO, L. T.; MURARI, A.; ROCHA-RESENDE, C.; DE LIMA, M. E.; GUATIMOSIM, S.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1162-1171, 2010.

VERANO-BRAGA, T.; ROCHA-RESENDE, C.; SILVA, D. M.; IANZER, D.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; BOUGIS P. E.; LIMA, M. E.; SANTOS, R. A. S.; PIMENTA, A. M. C. *Tityus serrulatus* Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 371, n. 3, p, 515-520, 2008.

VERDONCK, F.; BOSTEELS, S.; DESMET, J.; MOERMAN, L.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; TYTGAT, J.; VAN DER WALT, J. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). **Cimbebasia**, v. 16, p. 247-260, 2000.

VIJVERBERG, H. P. M.; LAZDUNSKI, M. A. A new scorpion toxin with a very high affinity for sodium channels an electrophysiological study**. J. Physiol. Paris**, v. 79, p. 275-279, 1984.

VINEGAR, R.; TRUAX. J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MCKENZIE, K. K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **FASEB J.**, v. 46, p. 118-126, 1987.

WEISEL-EICHLER, A.; LIBERSAT, F. Venom effects on monoaminergic systems. **J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.**, v. 190, n. 9, p. 683-690, 2004.

WELSH, J. H. Composition and mode of action of some invertebrate venoms. **Annu. Rev. Pharmacol.**, v. 4, p. 293-304, 1964.

WEN, F. H.; 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.

WEST, D. J.; ANDREWS, E. B.; BOWMAN, D.; MCVEAN, A. R.; THORNDYKE, M. C. Toxins from some poisonous and venomous marine snails. **Comp. Biochem. Phys. C**, v. 113, n. 1, p. 1-10, 1996.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem. J.**, n. 325, p. 289-297, 1997.

WOLFENDER, J. L.; GLAUSER, G.; BOCCARD, J.; RUDAZ, S. MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. **Nat. Prod. Commun.**, v. 4, p. 1417-1430, 2009.

WOLFENDER, J. L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **J. Chromatogr. A**, v. 1382, p. 136-164, 2015.

WYBRANIEC, S.; MIZRAHI, Y. Influence of perfluorinated carboxylic acids on ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of betacyanins and 17-decarboxy-betacyanins**. J Chromatogr A.**;v. 1029, n. 1-2, p. 97-101. 2004.

YATANI, A.; KIRSCH, G. E.; POSSANI, L. D.; BROWN, A. M. Effects of New World toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. **Am. J. Physiol**., v. 254, p. 443-451, 1988.

YIBAO, M.; YONG, Z.; RUIMING, Z.; WEIPING, Z.; YAWEN, H.; YINGLIANG, W.; ZHIJIAN, C.; LIN, G.; WENXIN, L. Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. **Proteomics**, v. 10, p. 2471-2485, 2010.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZENG, X. C.; CORZO, G.; HAHIN, R. Scorpion venom peptides without disulfide bridges. **IUBMB Life**, v. 57, n. 1, p.13-21, 2005.

ZENG, X. C.; LI, W. X.; PENG, F.; ZHU, Z. H. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a Bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. **IUBMB Life**, v. 49, p. 207-210, 2000.

ZENG, X. C.; LI, W. X.; WANG, S. X.; ZHU, S. Y.; LUO, F. Precursor of a novel scorpion venom peptide (BmKn1) with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. **IUBMB Life**, v. 51, p. 117-120, 2001.

ZENG, X. C.; WANG, S. X.; ZHU, Y.; ZHU, S. Y.; LI, W. X. Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from *Buthus martensii* Karsch. **Peptides**, v. 25, p. 143-150, 2004.

ZHANG, J.; SHEN, H.; XU, W.; XIA, Y.; BARR, D. B.; MU, X.; WANG, X.; LIU, L.; HUANG, Q.; TIAN, M. Urinary metabolomics revealed arsenic internal dose-related metabolic alterations: a proof-of-concept study in a Chinese male cohort. **Environ. Sci. Technol.**, v. 48, p. 12265-12274, 2014.

ZHIJIAN, C.; FENG, L.; YINGLIANG, W.; XIN, M.; WENXIN, L. Genetic mechanisms of scorpion peptide diversification. **Toxicon**, v. 47, p. 348-355, 2006.

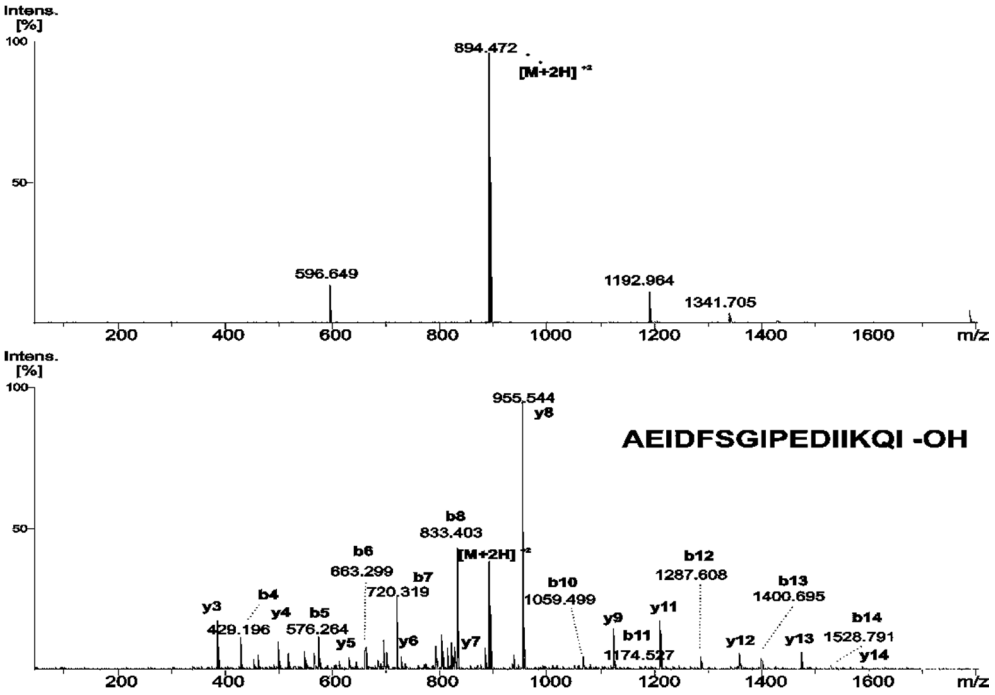
ZHOU, Y.; HOLMSETH, S.; HUA, R.; LEHRE, A. C; OLOFSSON, A. M; POBLETE-NAREDO, I.; KEMPSON, S. A.; DANBOLT, N. C. The betaine-GABA transporter (BGT1, slc6a12) is predominantly expressed in the liver and at lower levels in the kidneys and at the brain surface. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 302, n. 3, p. F316-F328, 2012.

ZLOTKIN, E. Chemistry and pharmacology of buthinae scorpion venoms. In: BETTINI, S. (Ed.). **Arthropod Venoms.** Berlin: Springer-Verlad, 1978. p. 317-369.

ZLOTKIN, E.; EITAN, M.; BINDOKAS, V. P.; ADAMS, M. E.; MOYER, M.; BURKHART, W.; FOWLER, E. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. **Biochem.**, v. 30, n. 19, p 4814-4821,1991.

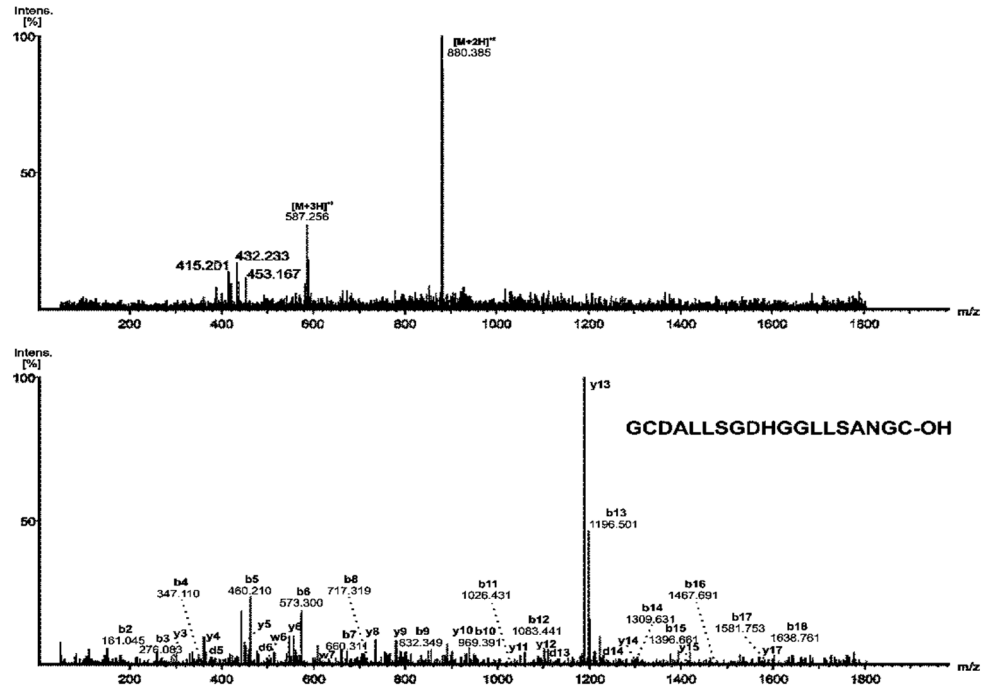
APÊNDICE A - Espectros MS^1 e MS^2 dos peptídeos sequenciados

Figura A1: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-1



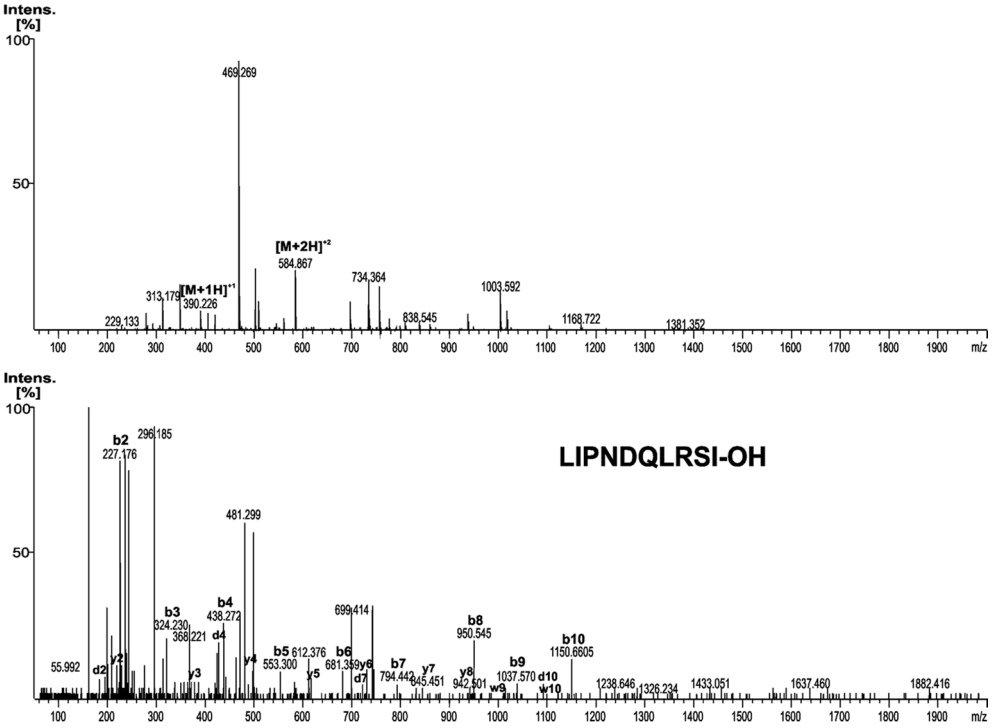
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 894,472 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A2: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-2



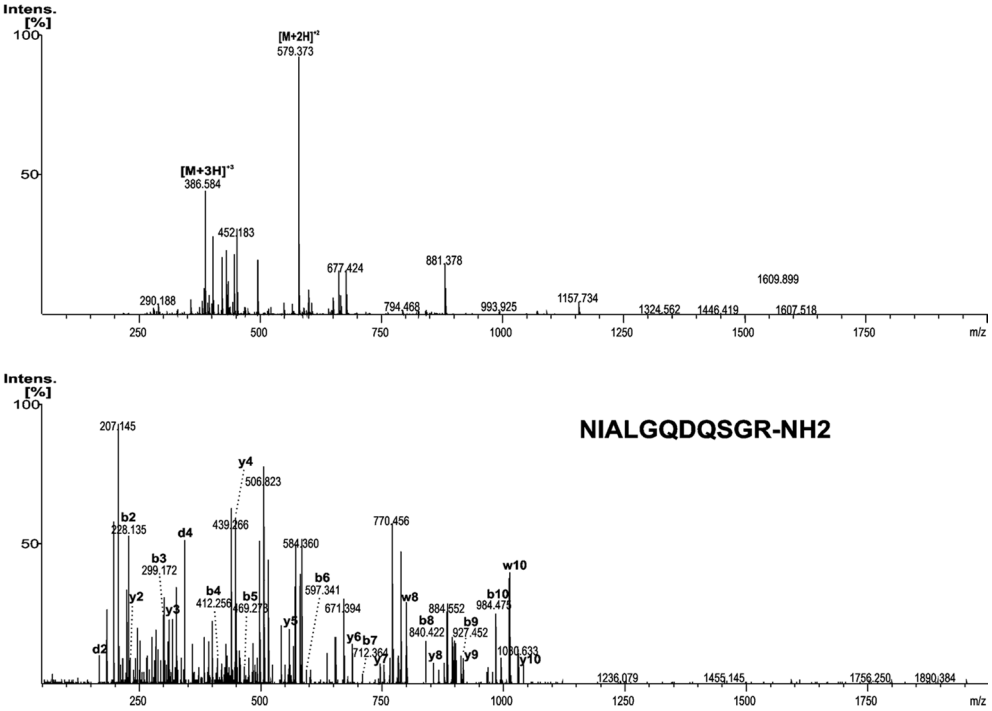
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 880,385 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A3: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-3



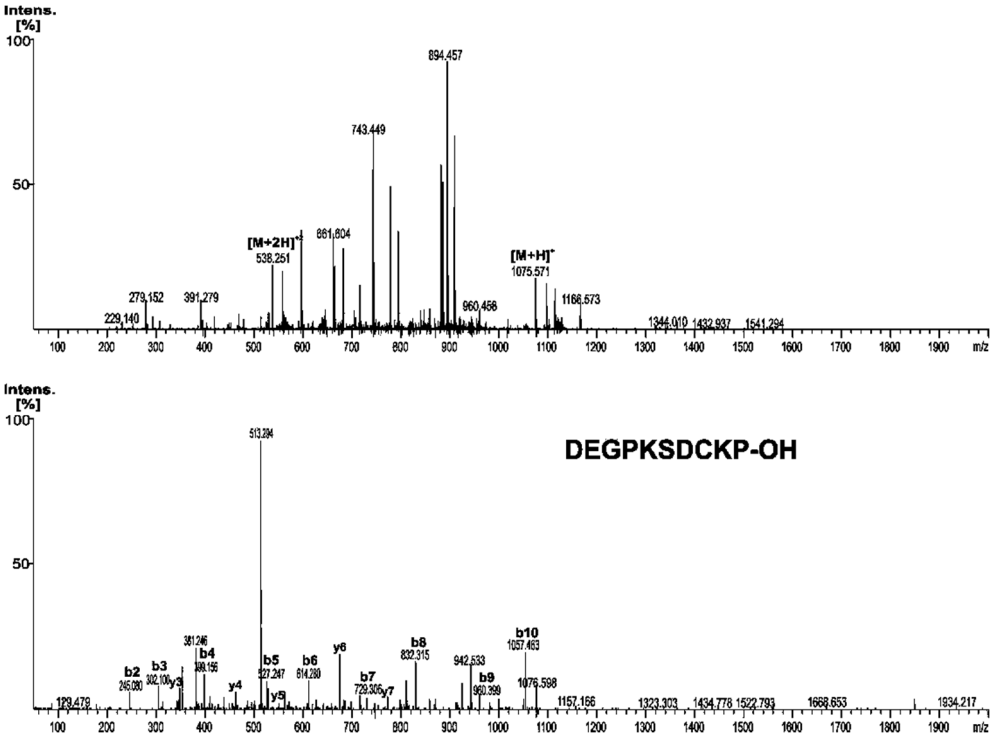
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 584,867 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A4: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-4



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 579,373 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b.*
Fonte: Dados da pesquisa.

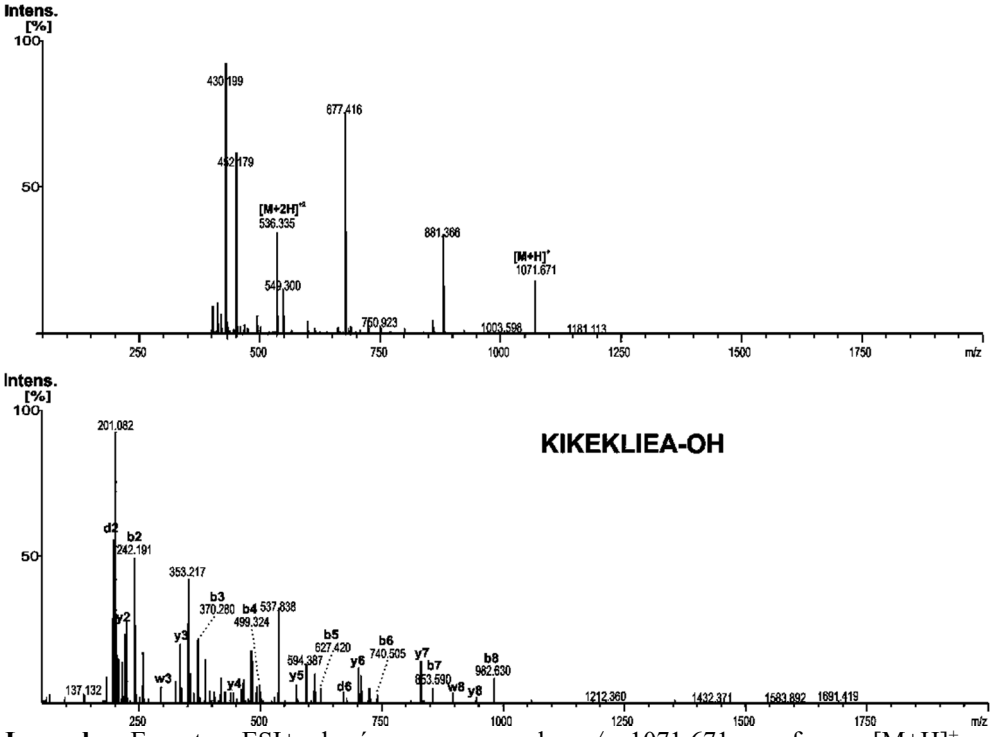
Figura A5: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-5



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1075,571 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

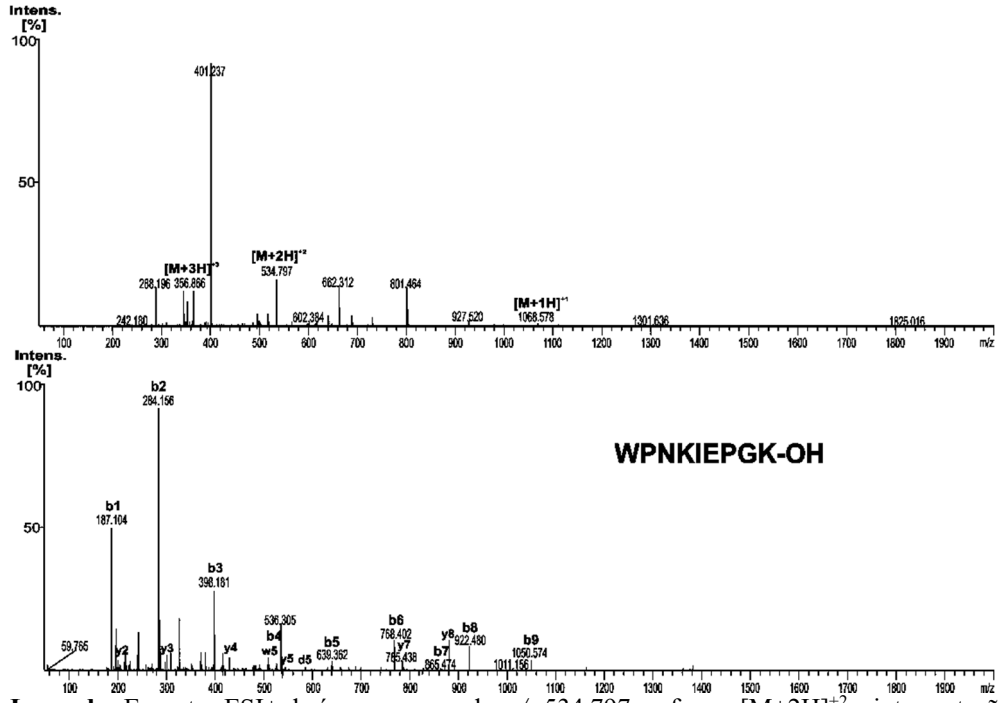
Figura A6: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-6



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1071,671 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

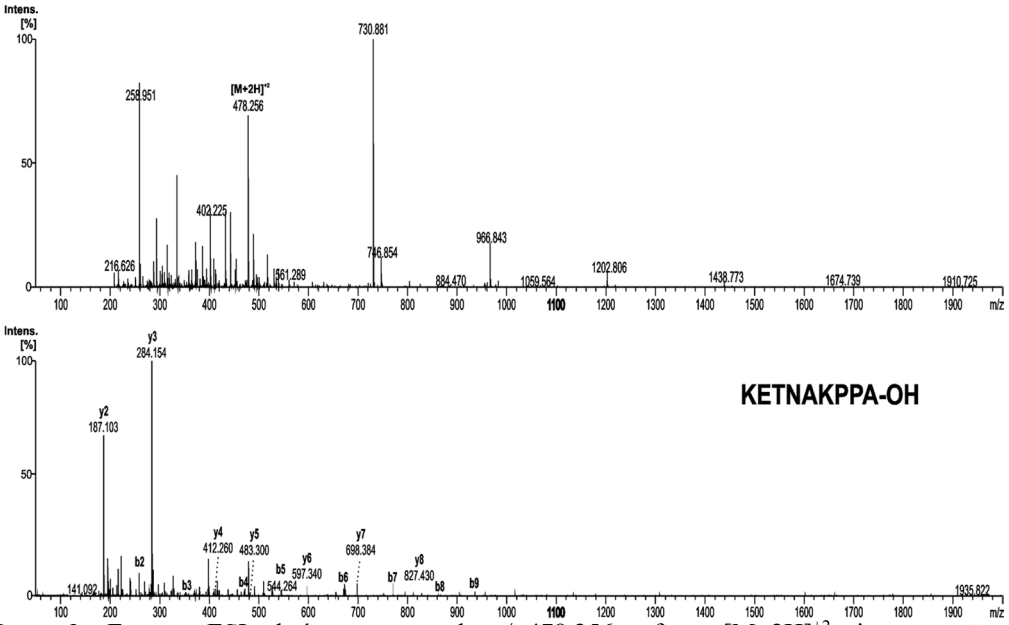
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A7: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-7



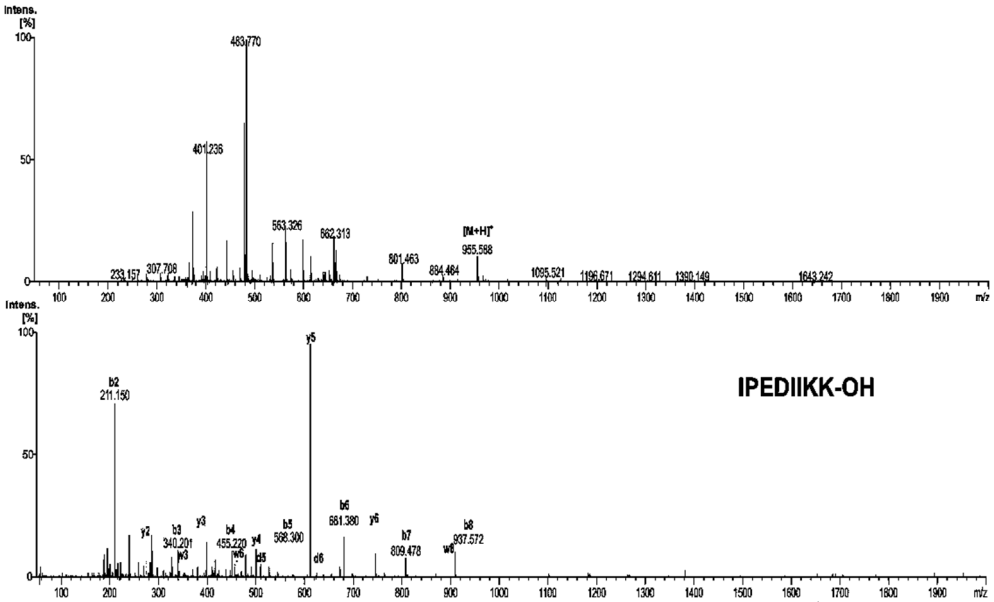
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 534,797 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A8: Espectros MS e MS/MS do peptídeo TyPep-8



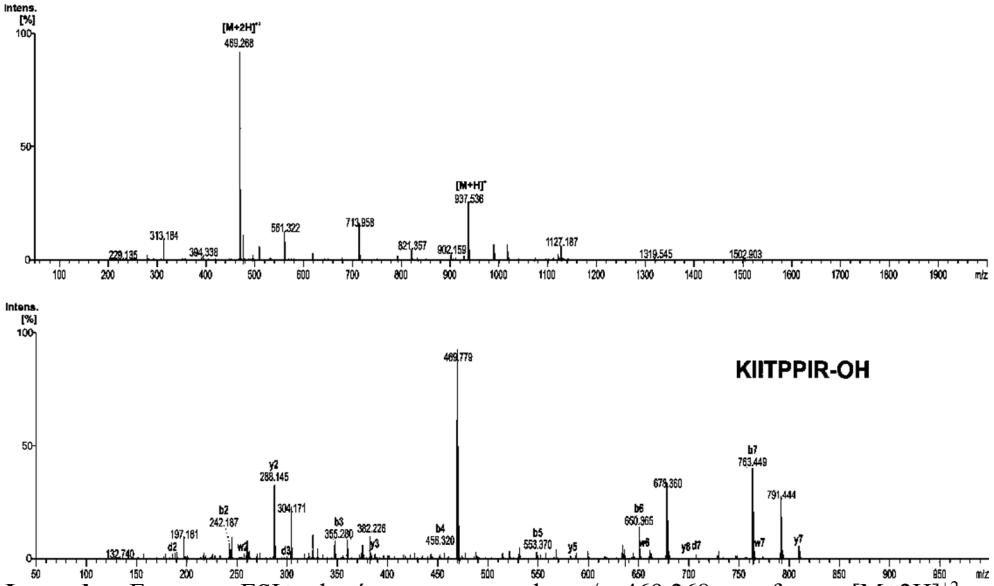
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 478,256 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A9: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-9



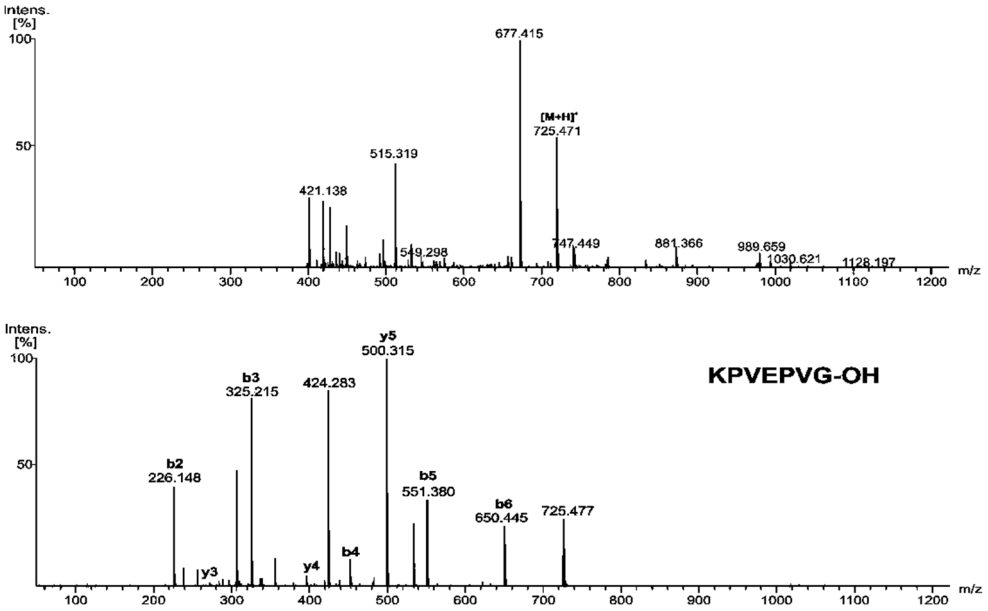
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 955,588 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A10: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-10



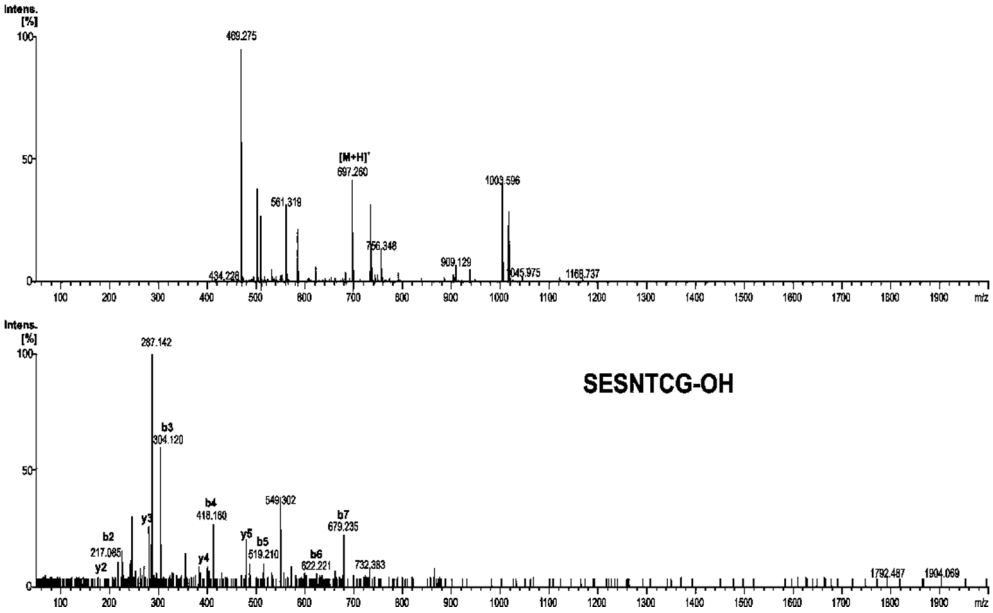
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 469,268 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A11: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-11



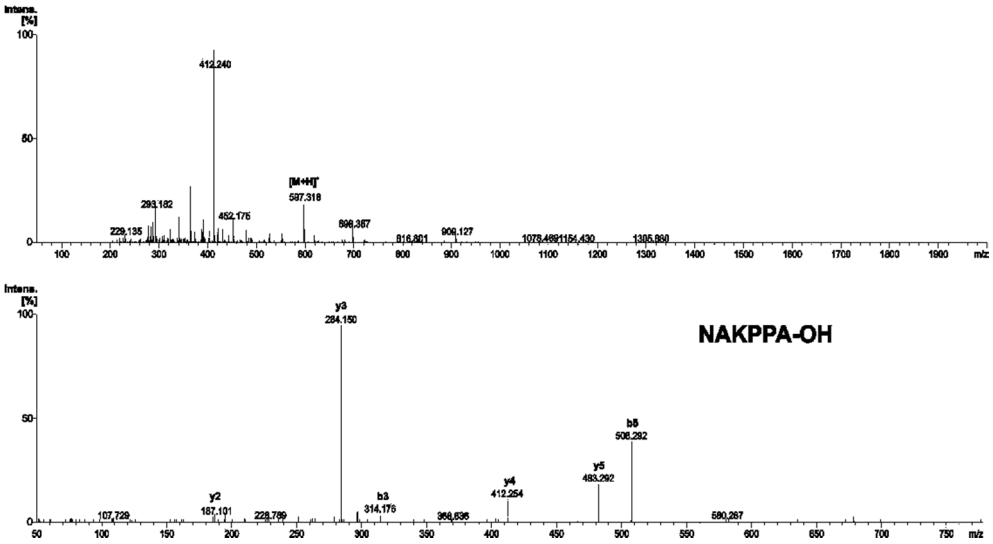
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 725,471 na forma $[M+1H]^{+1}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A12: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-12



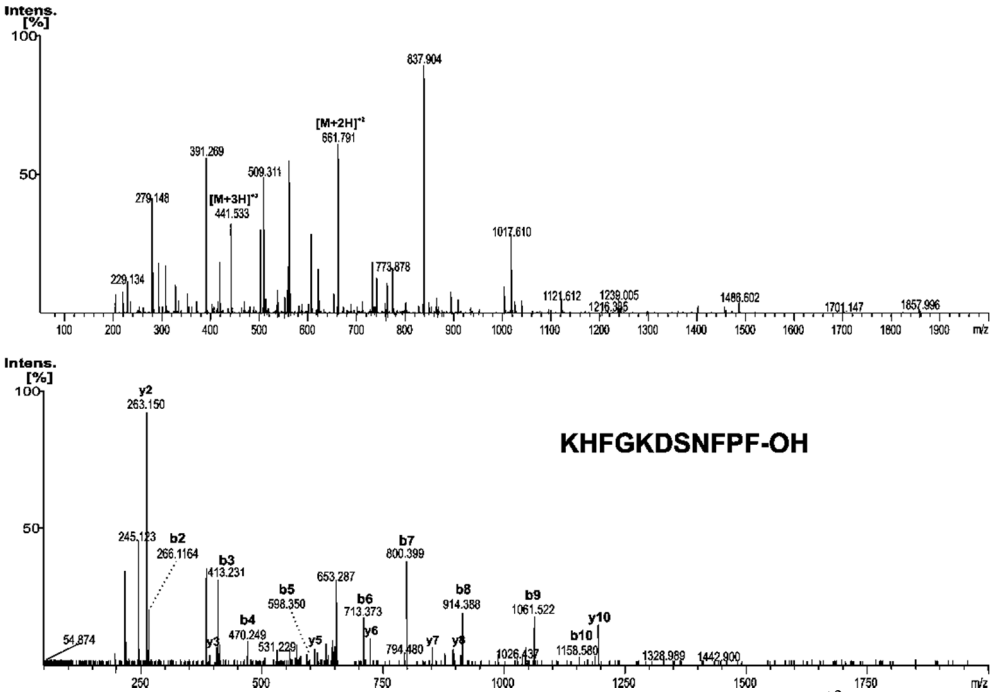
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 697,260 na forma $[M+1H]^{+1}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A13: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-13



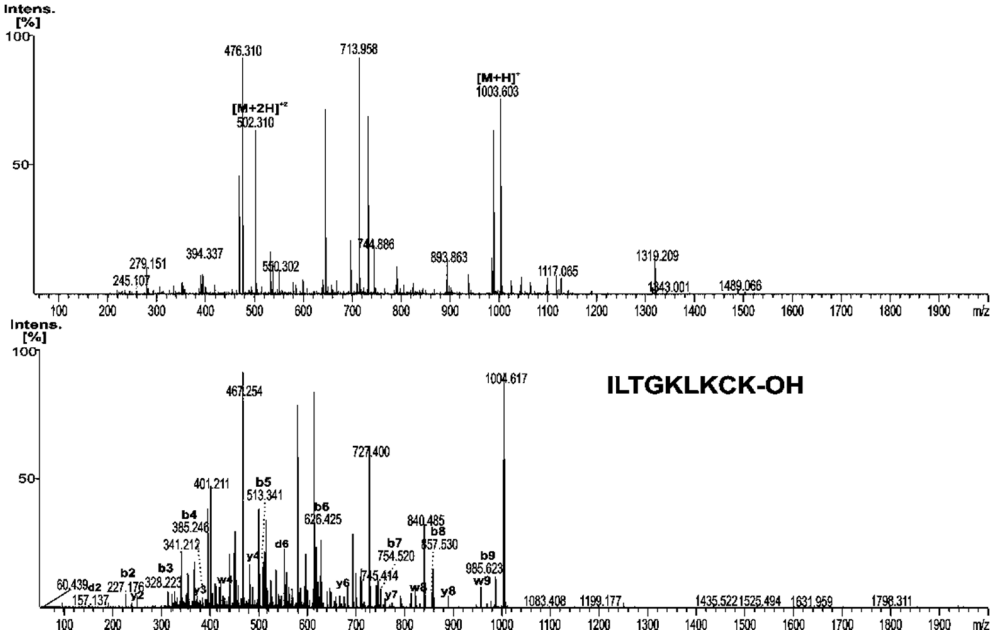
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 597,318 na forma $[M+1H]^{+1}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A14: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-14



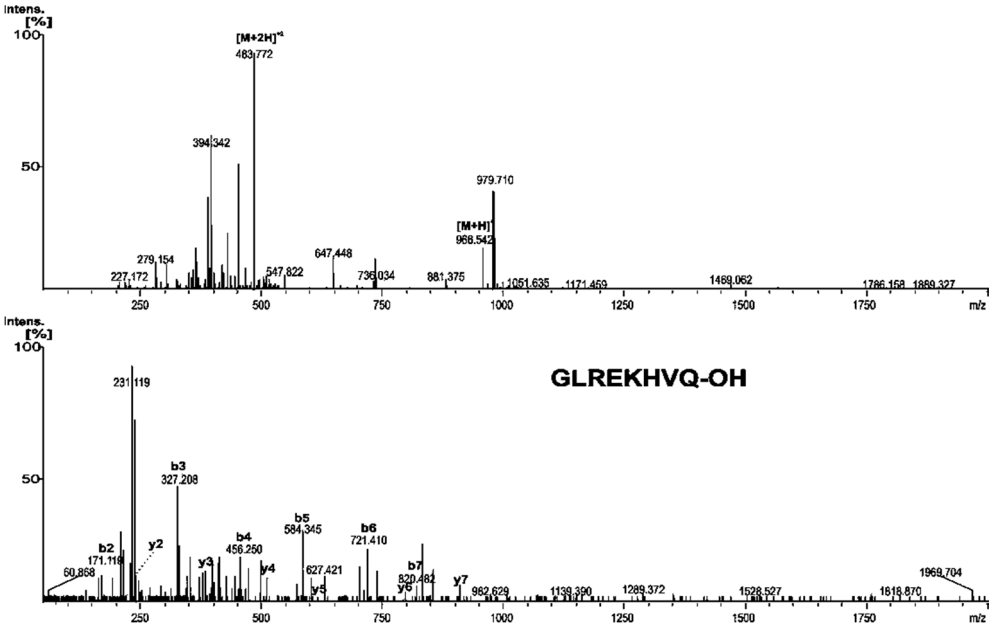
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 661,791 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A15: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-15



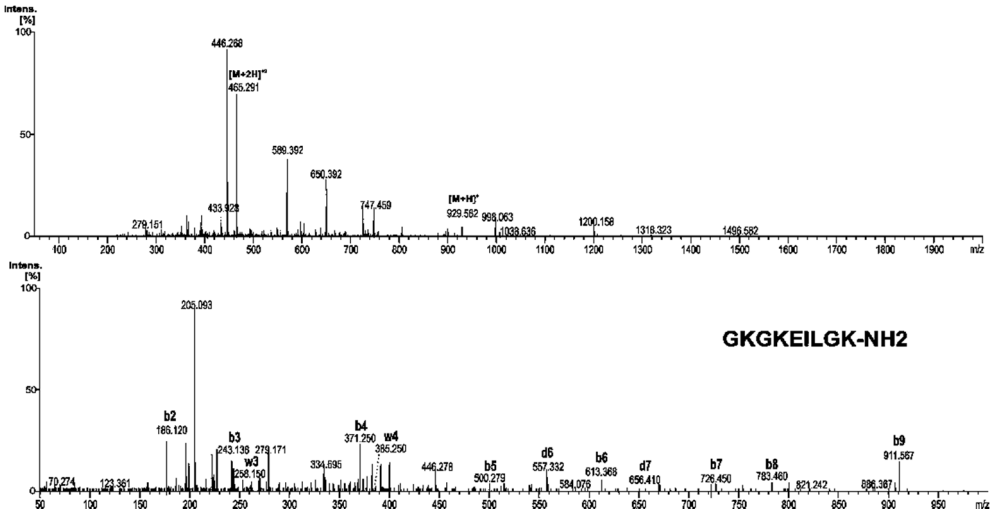
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 502,310 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A16: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-16



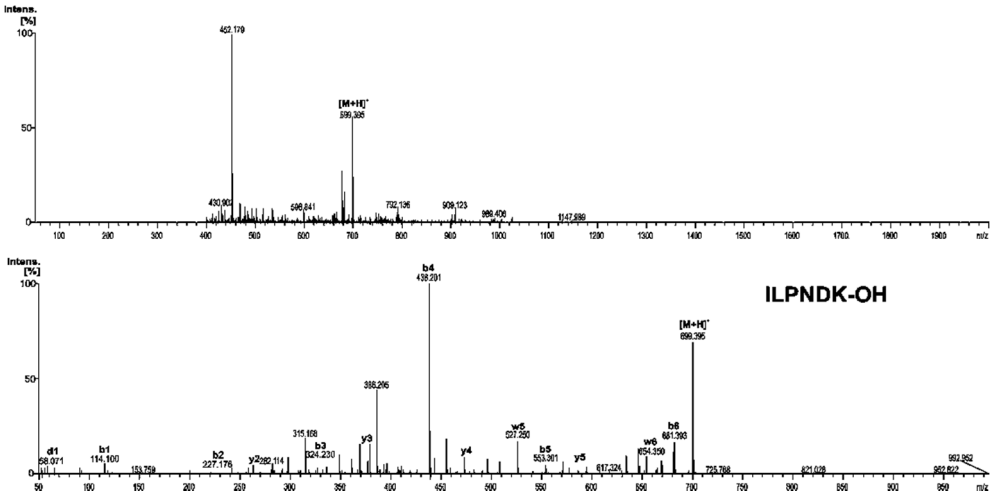
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 483,772 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A17: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-17



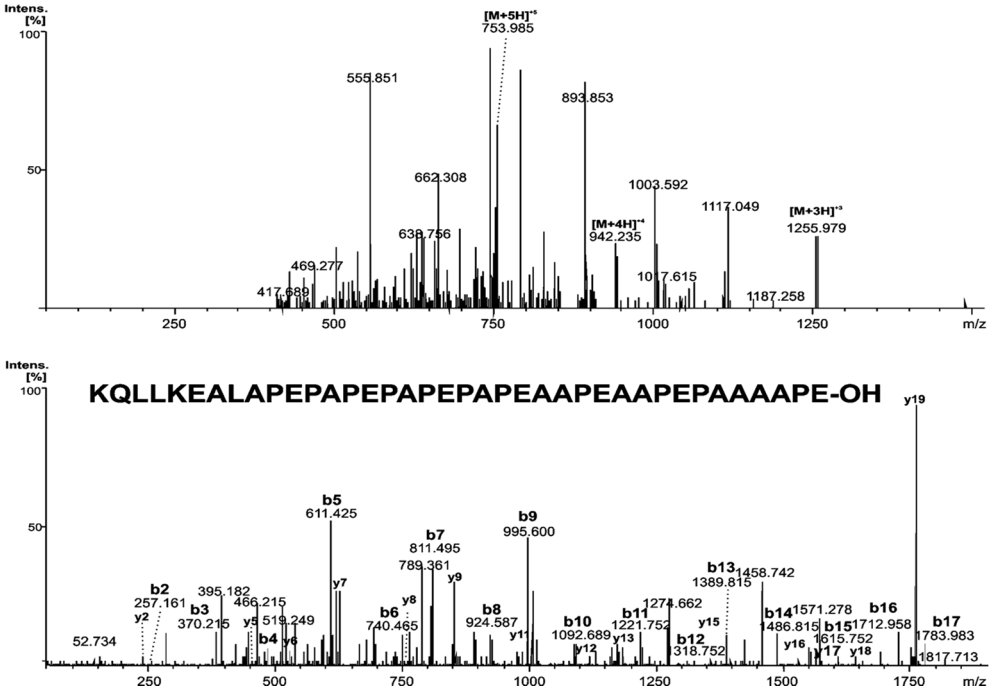
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 465,291 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A18: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-18



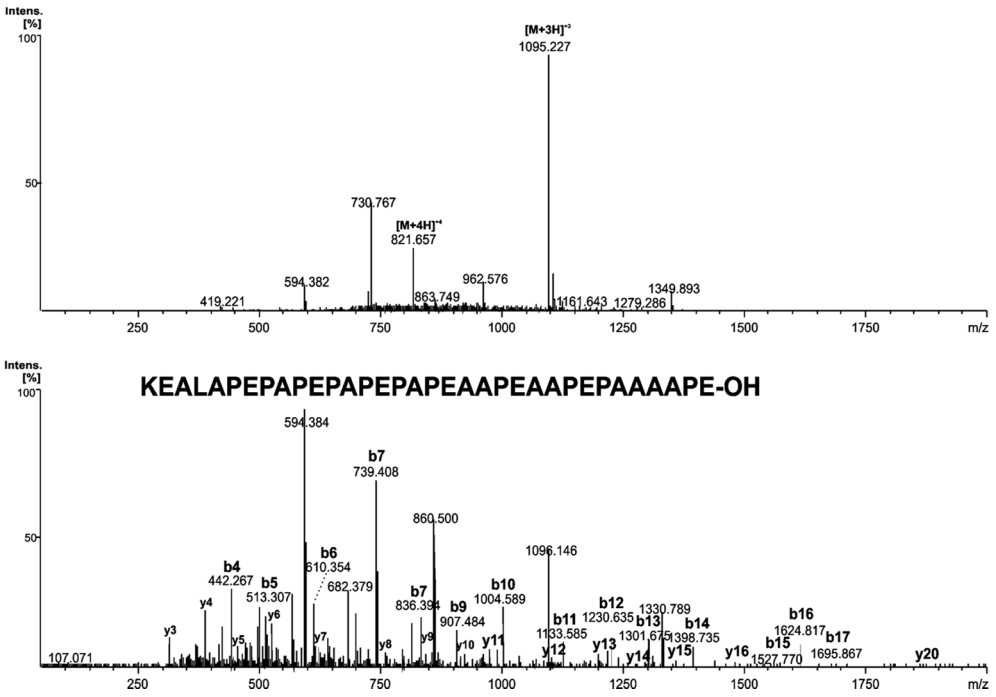
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 699,395na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b.*
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A19: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-19



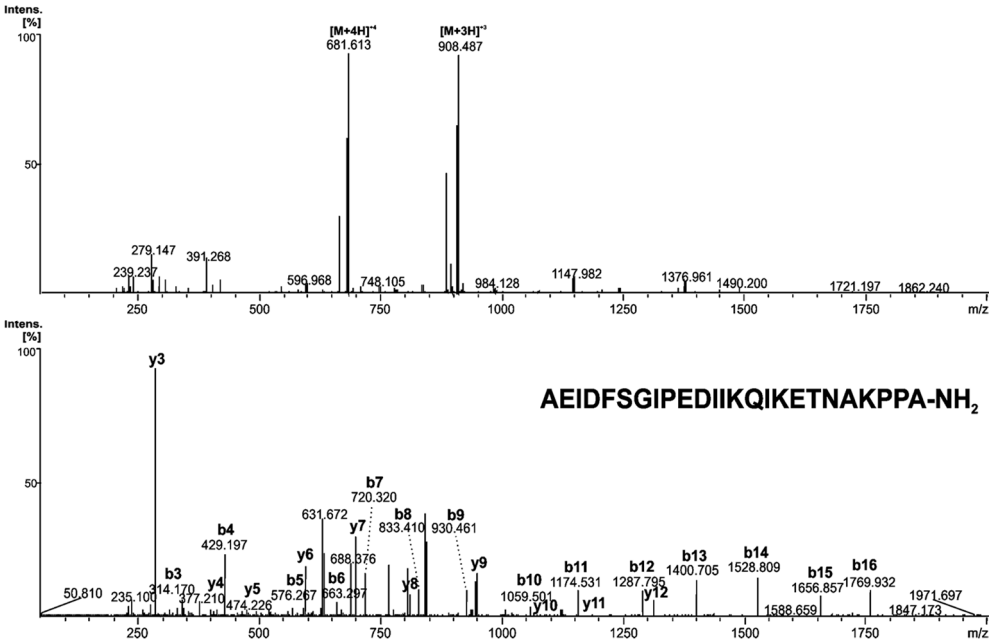
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1255,979 na forma $[M+3H]^{+3}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A20: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-20



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1095,227 na forma $[M+3H]^{+3}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

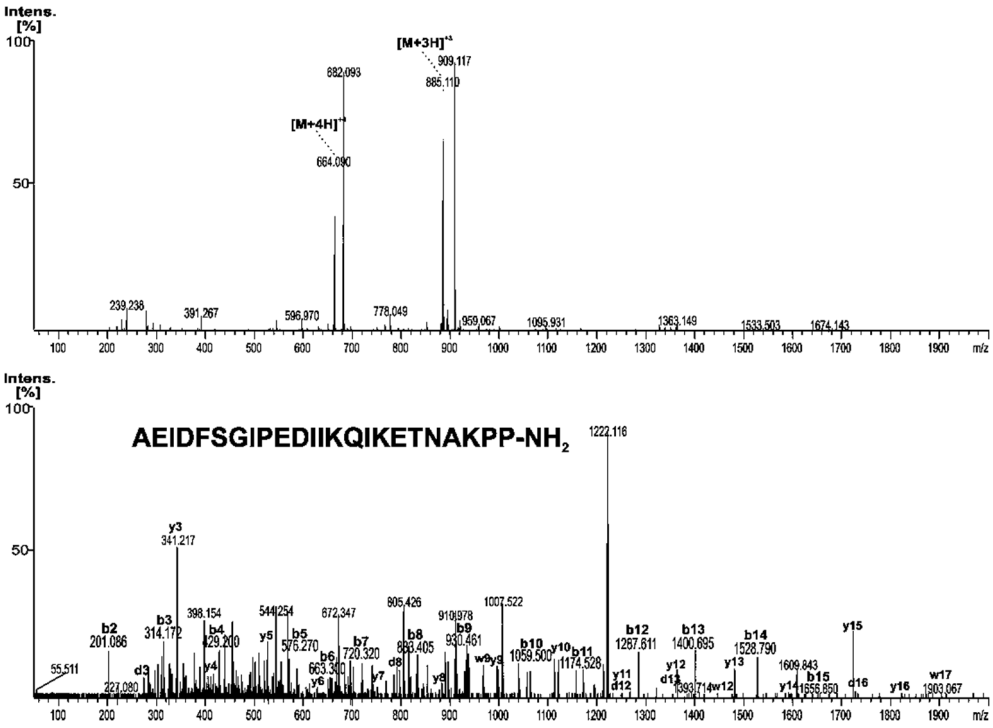
Figura A21: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-21



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 908,487 na forma $[M+3H]^{+3}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

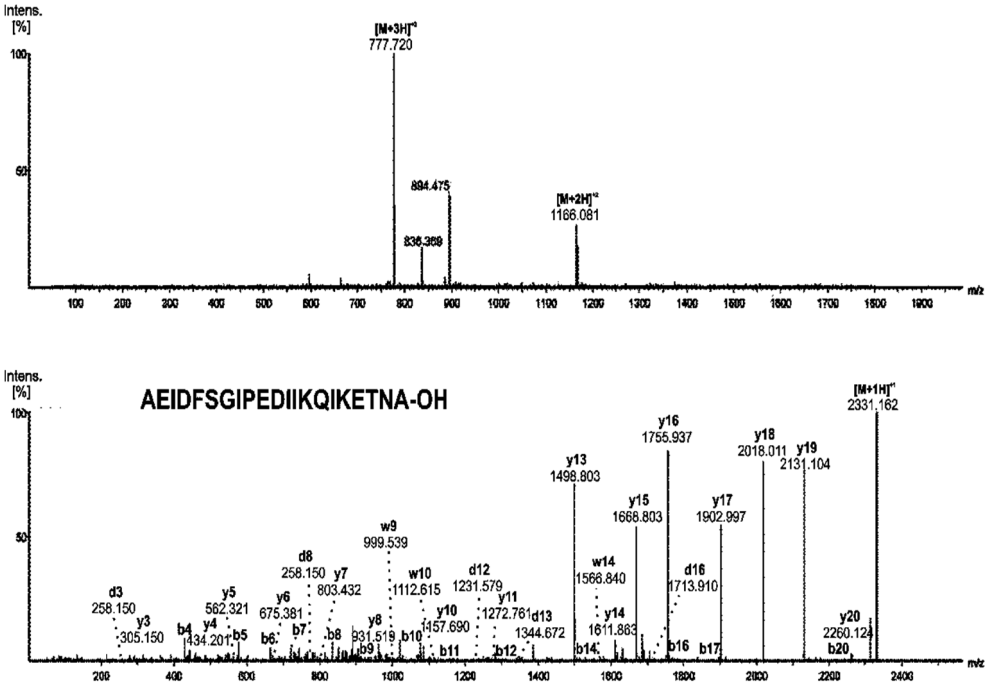
Figura A22: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-22



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 908,487 na forma $[M+3H]^{+3}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

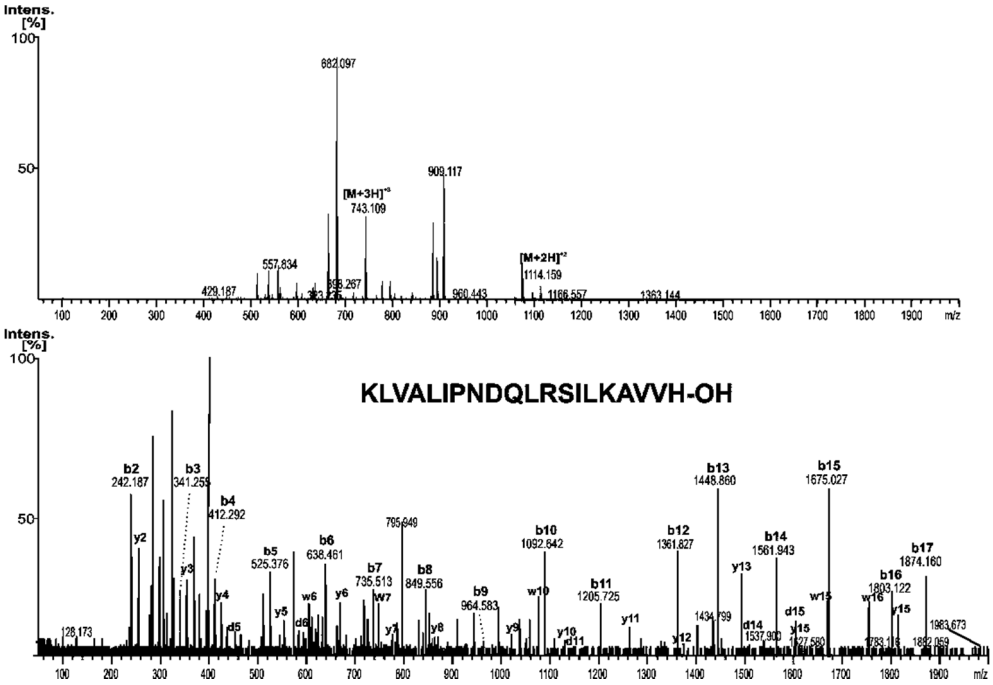
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A23: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-23



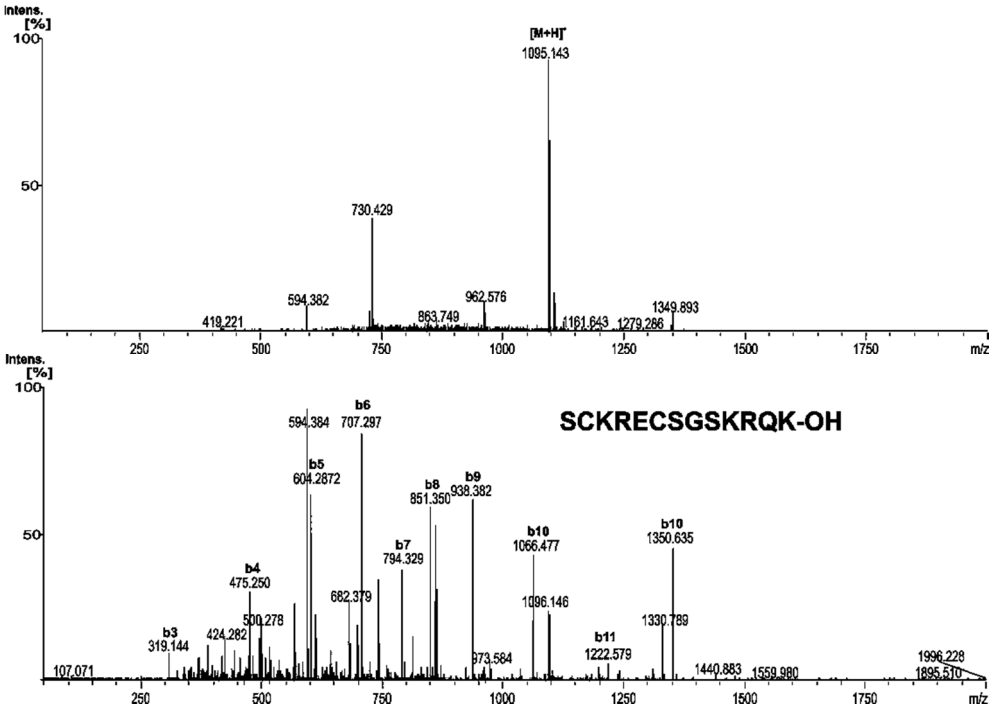
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1166,081 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A24: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-24



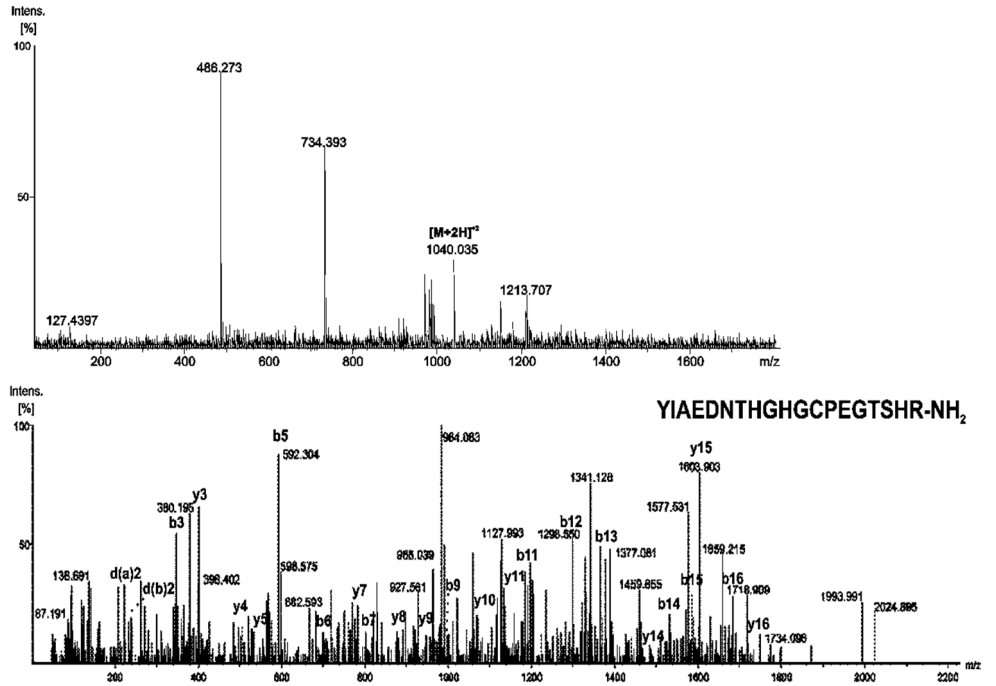
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1114,159 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A25: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-25



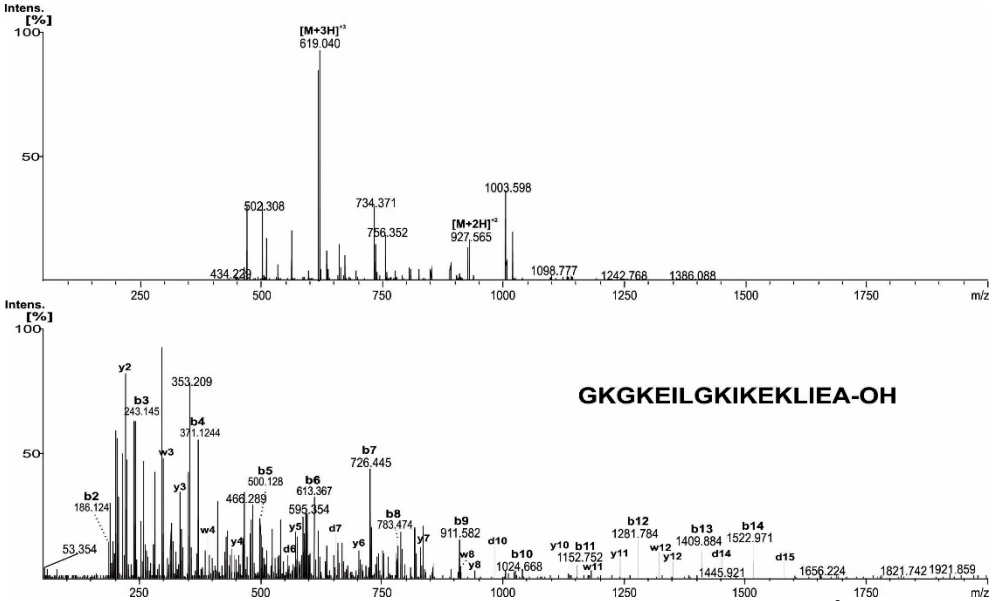
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1095,143 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A26: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-26



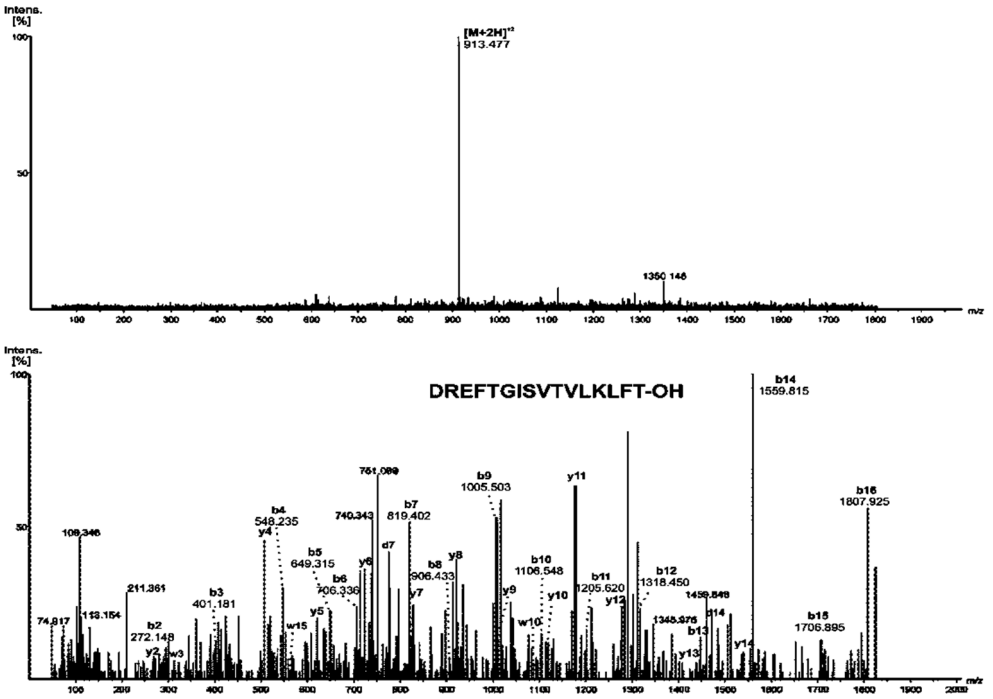
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1040,035 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A27: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-27



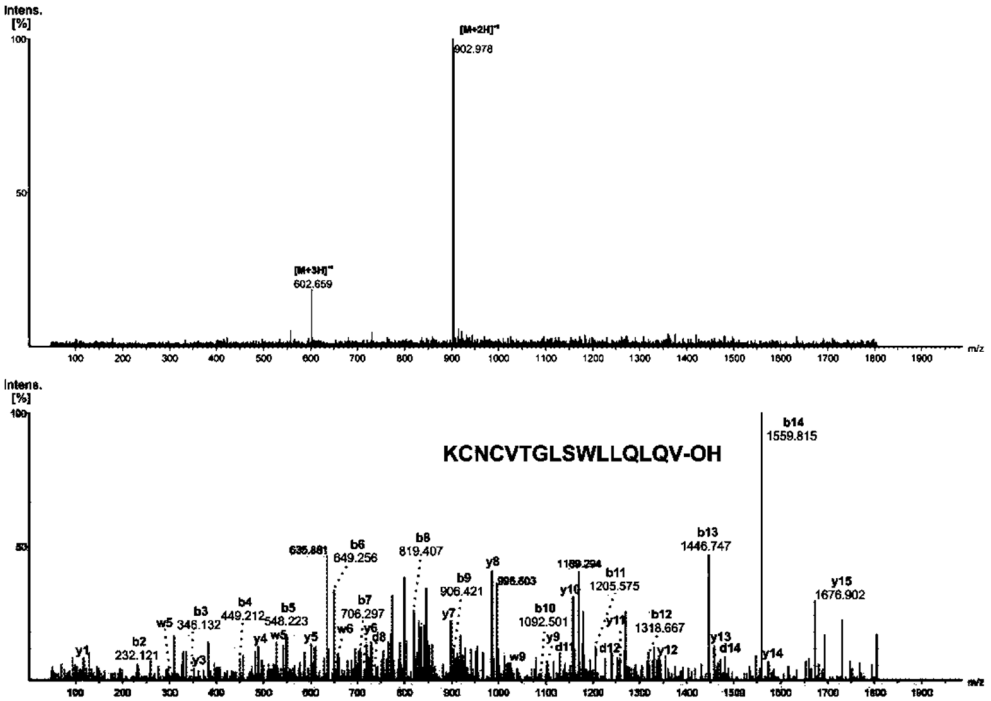
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 927,565 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b.*
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A28: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-28



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 913,477 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b.*
Fonte: Dados da pesquisa.

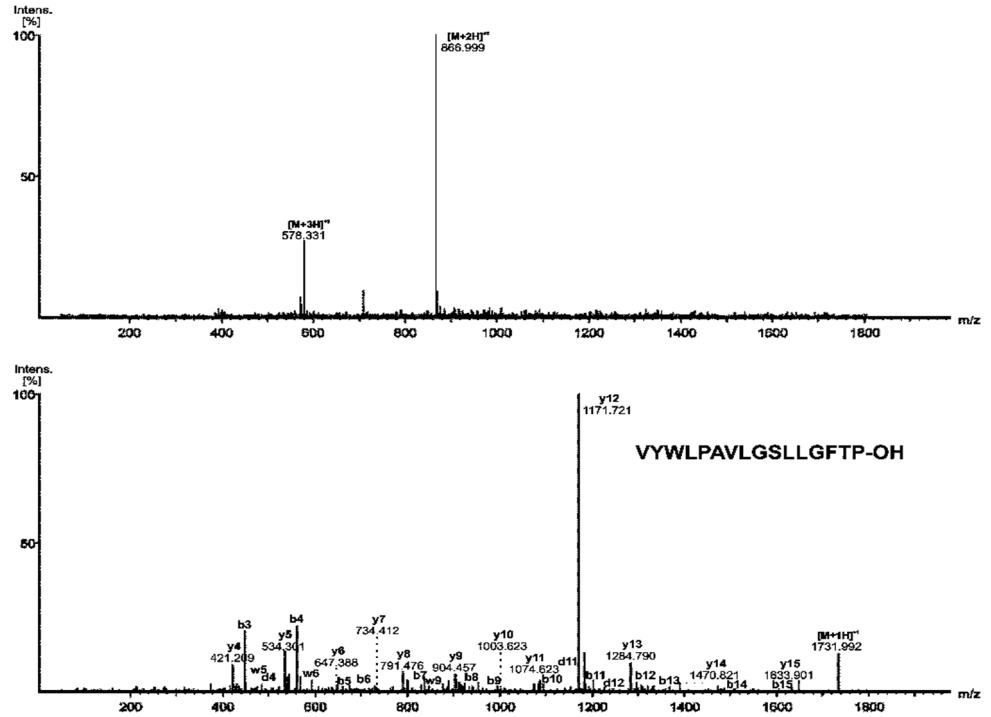
Figura A29: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-29



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 902,978 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

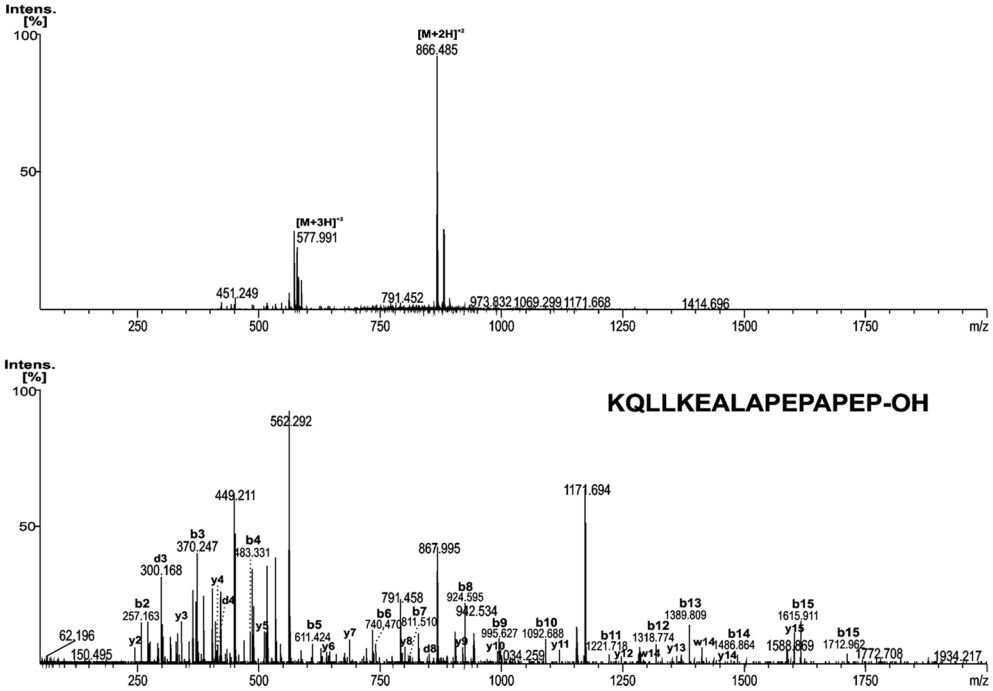
Figura A30: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-30



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 866,999 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

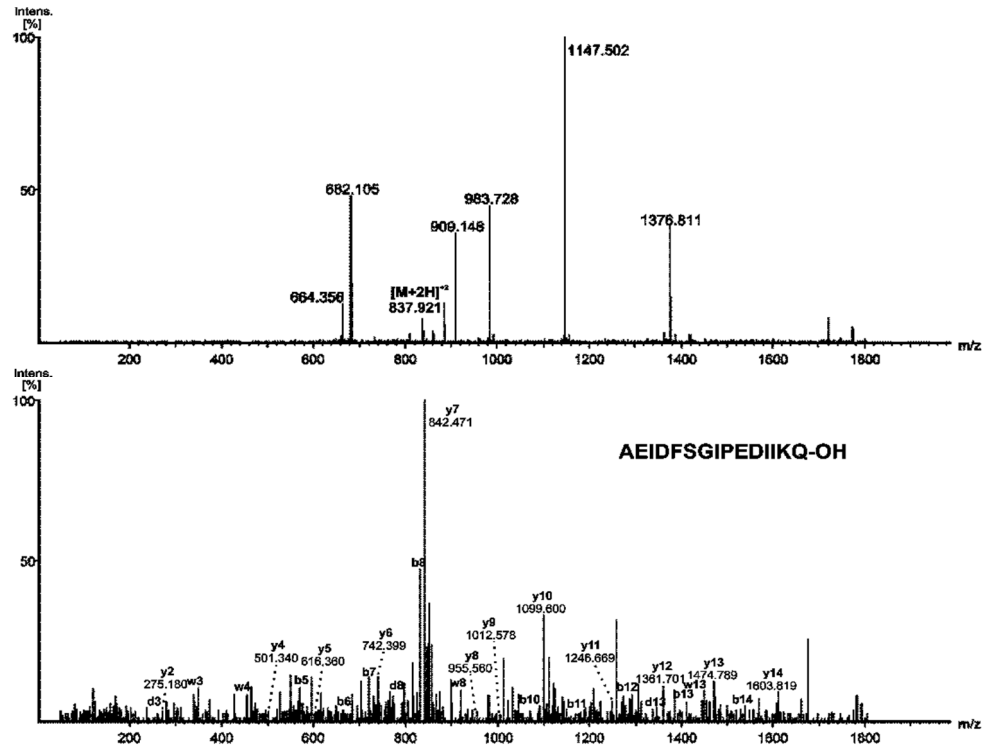
Figura A31: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-31



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 866,485 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

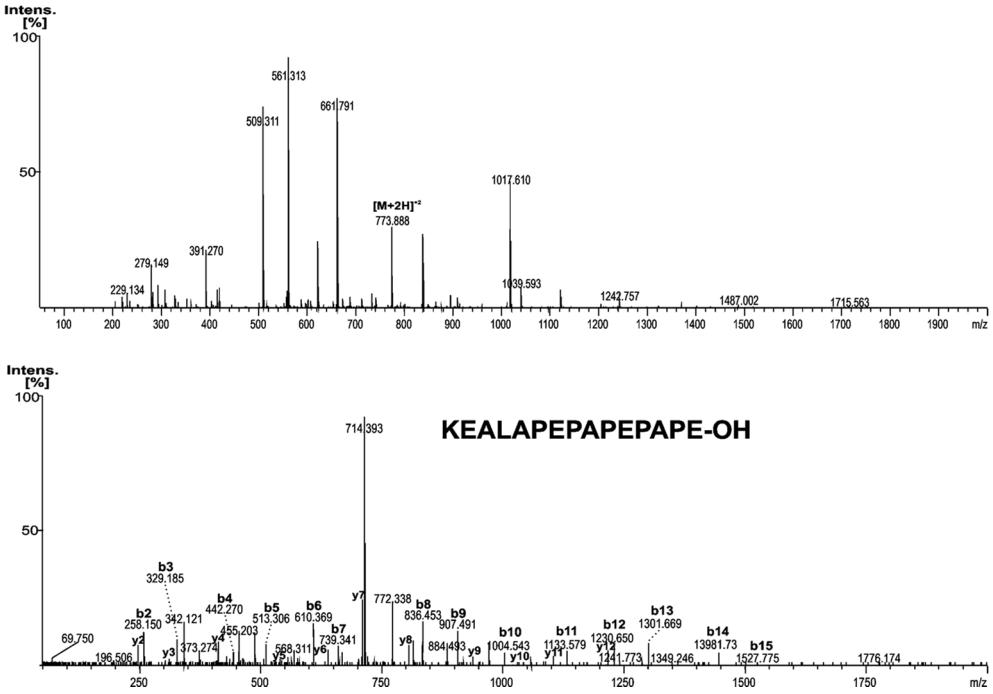
Figura A32: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-32



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 837,921 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

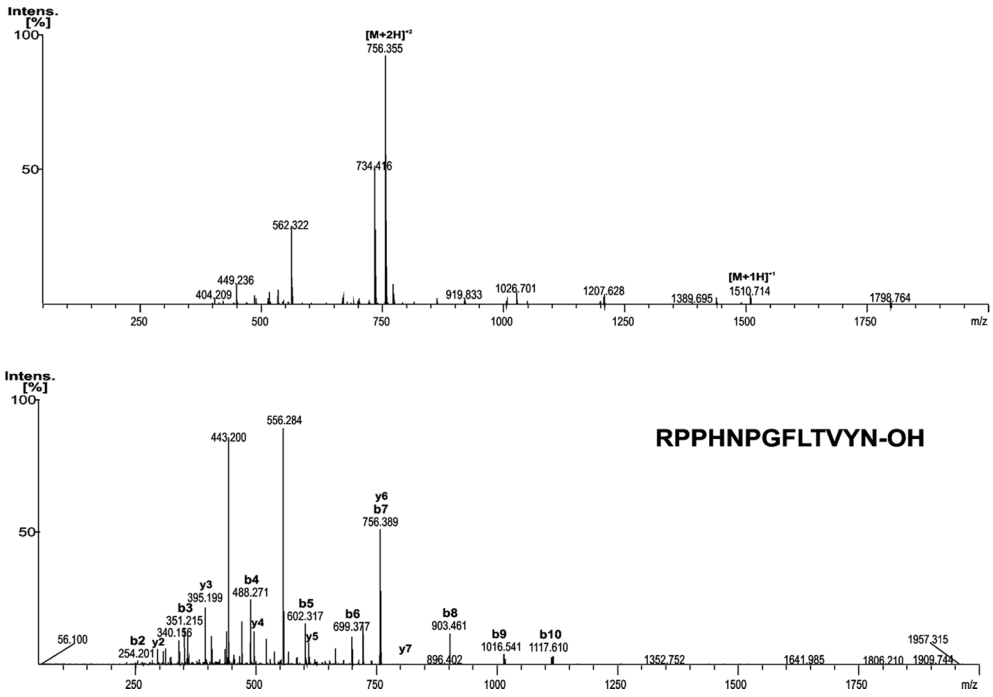
Figura A33: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-33



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 773,888 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

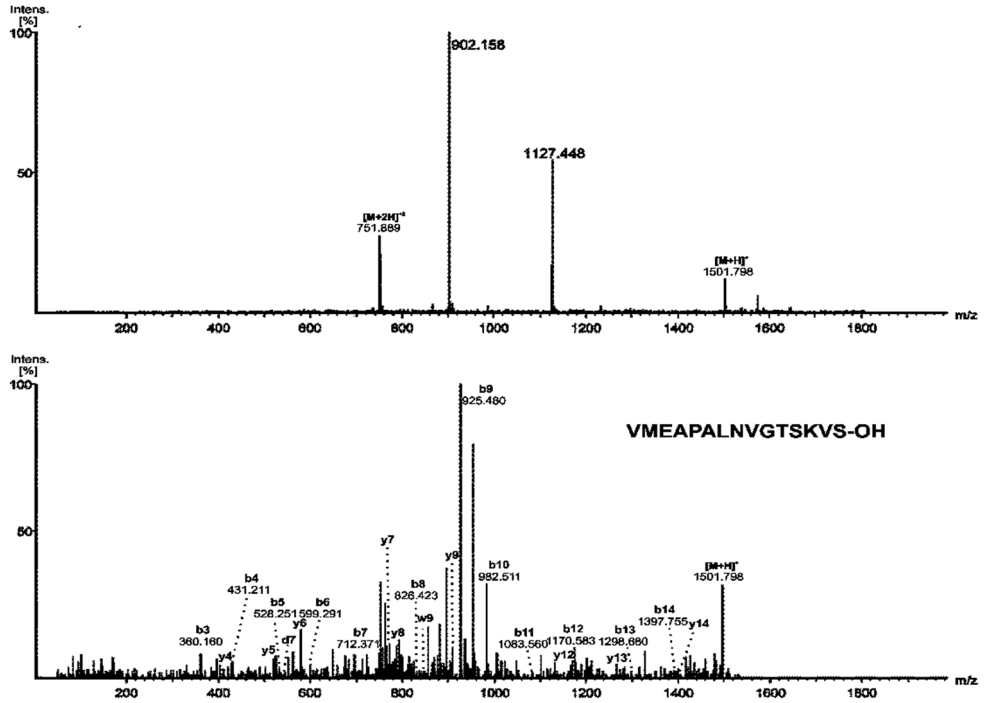
Figura A34: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-34



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 756,355 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

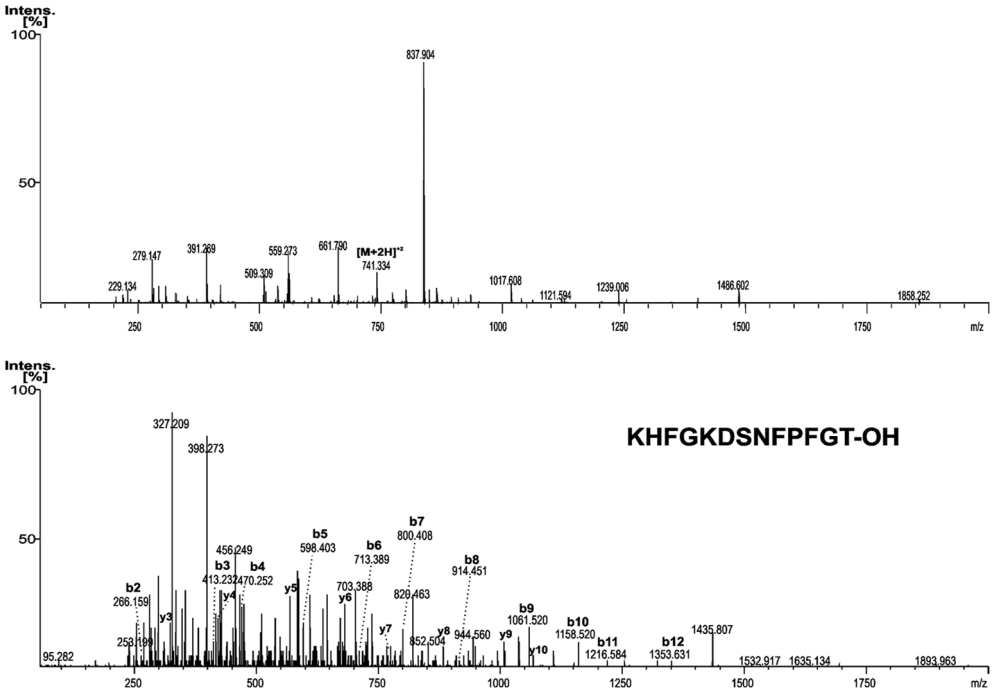
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A35: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-35



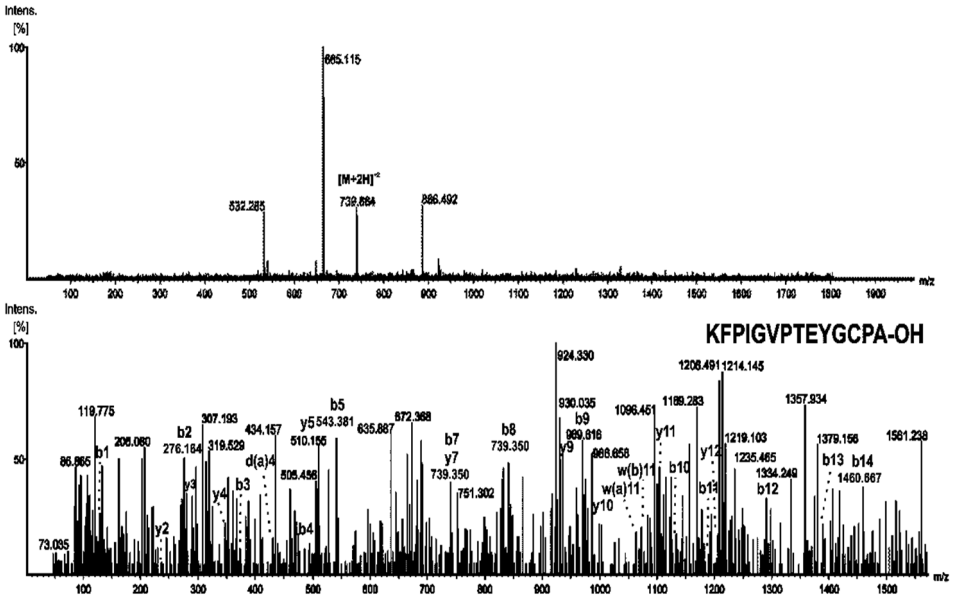
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1501,798 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b.*
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A36: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-36



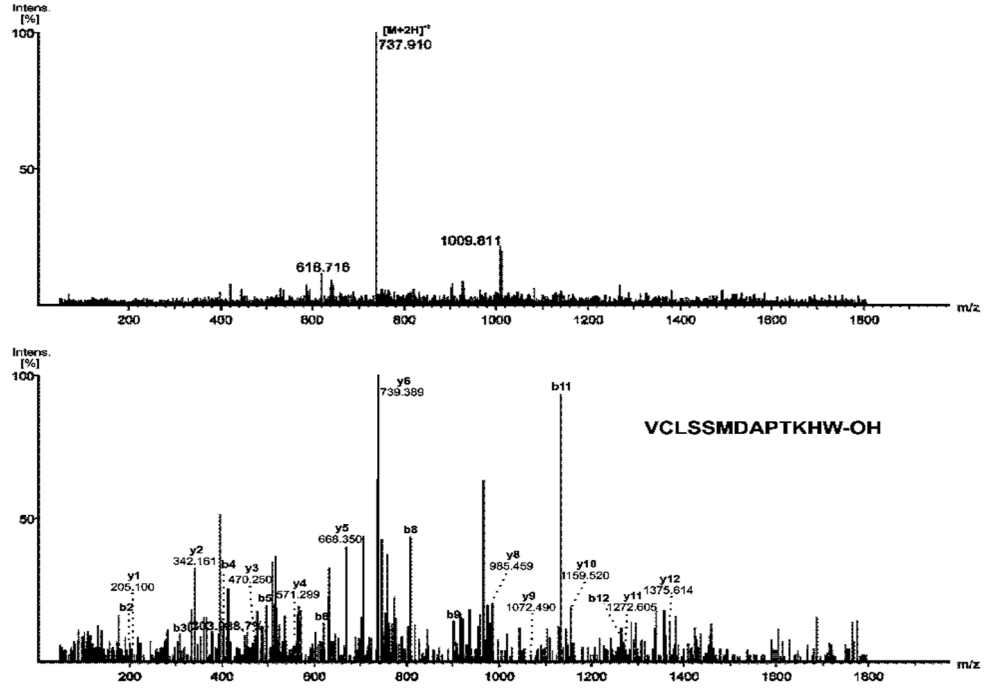
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 741,334 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b.*
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A37: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-37



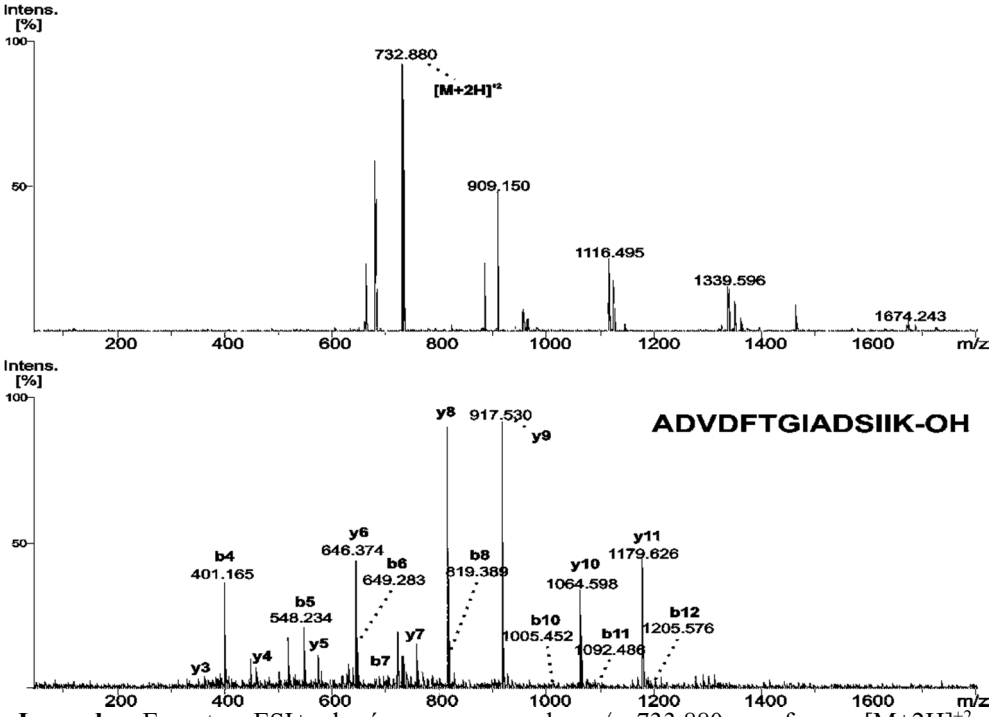
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 739,884 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A38: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-38



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 737,910 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

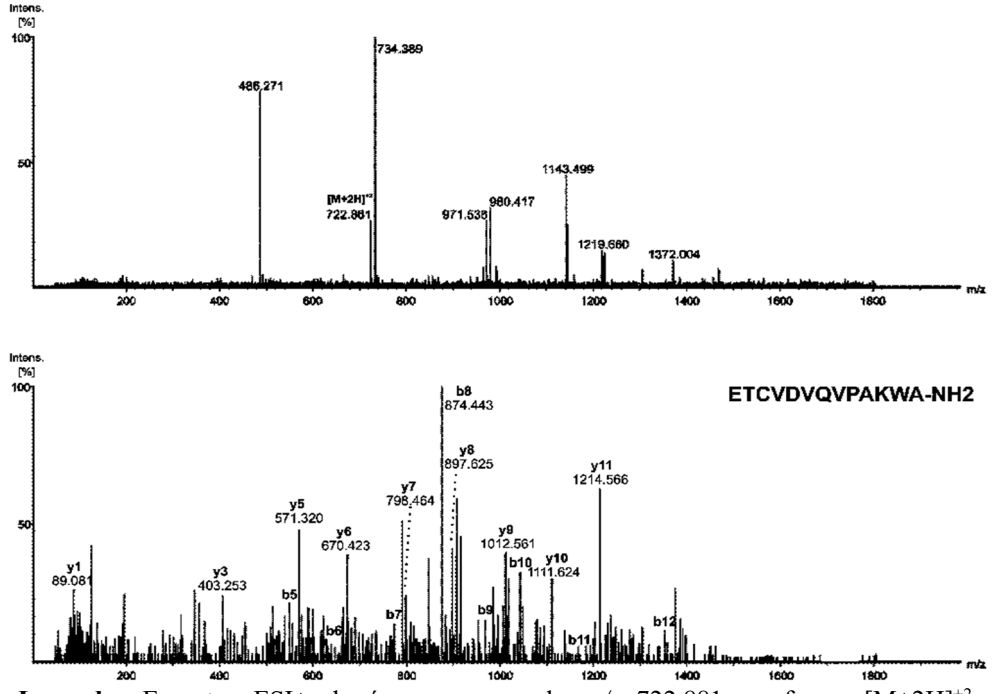
Figura A39: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-39



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 733,880 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

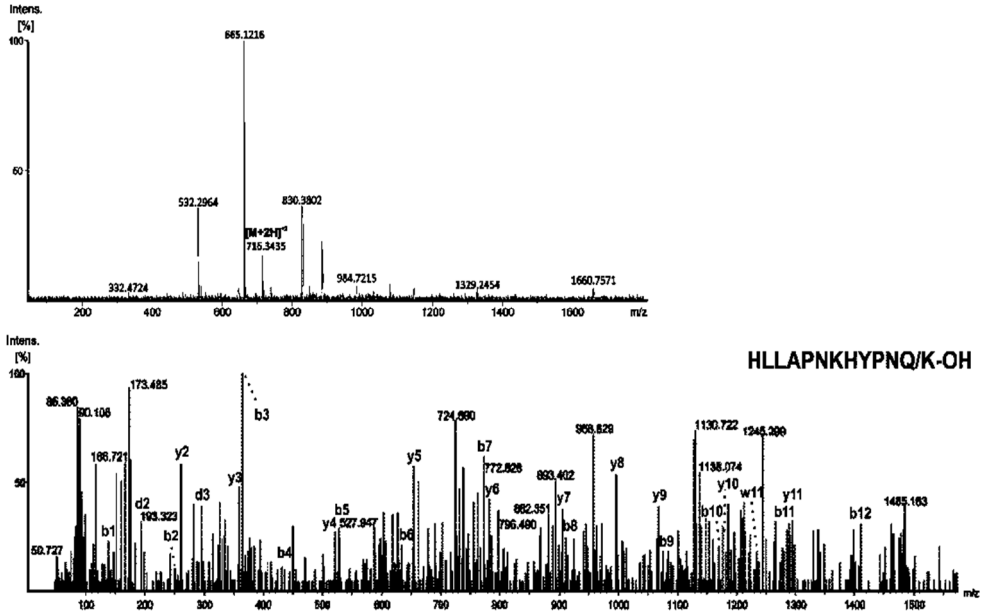
Figura A40: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-40



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 722,881 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

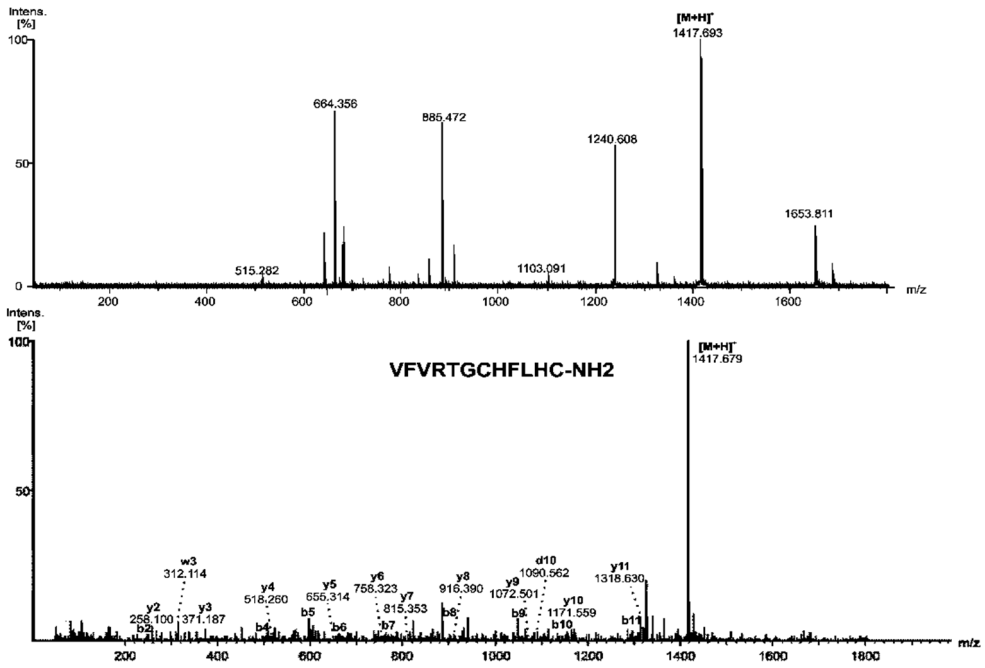
Figura A41: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-41



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 716,344 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

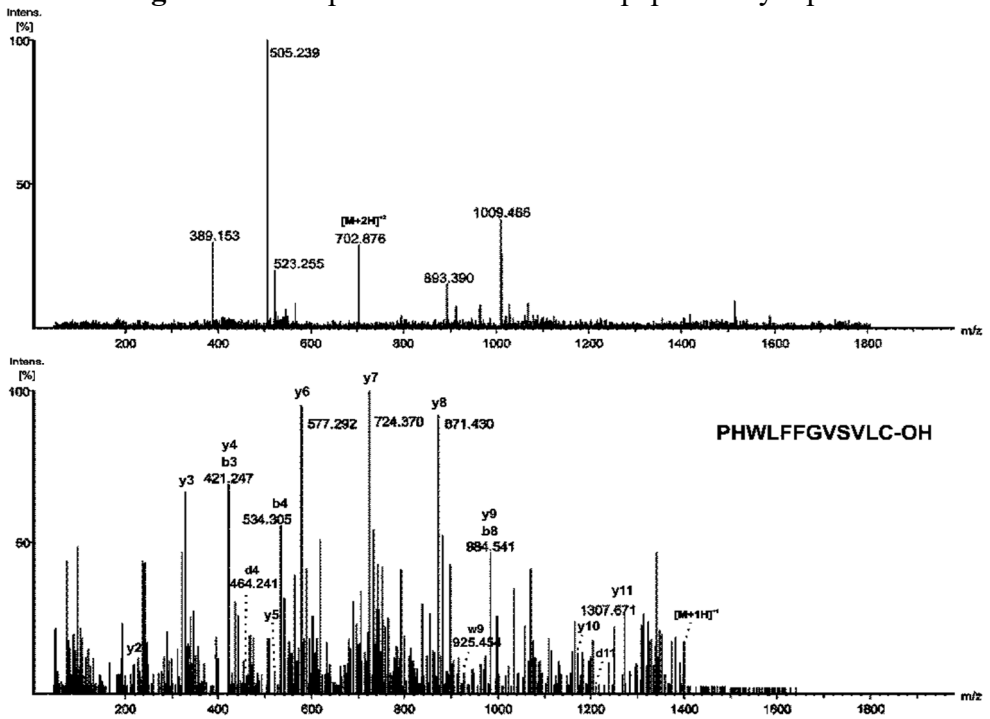
Figura A42: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-42



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 1417,693 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

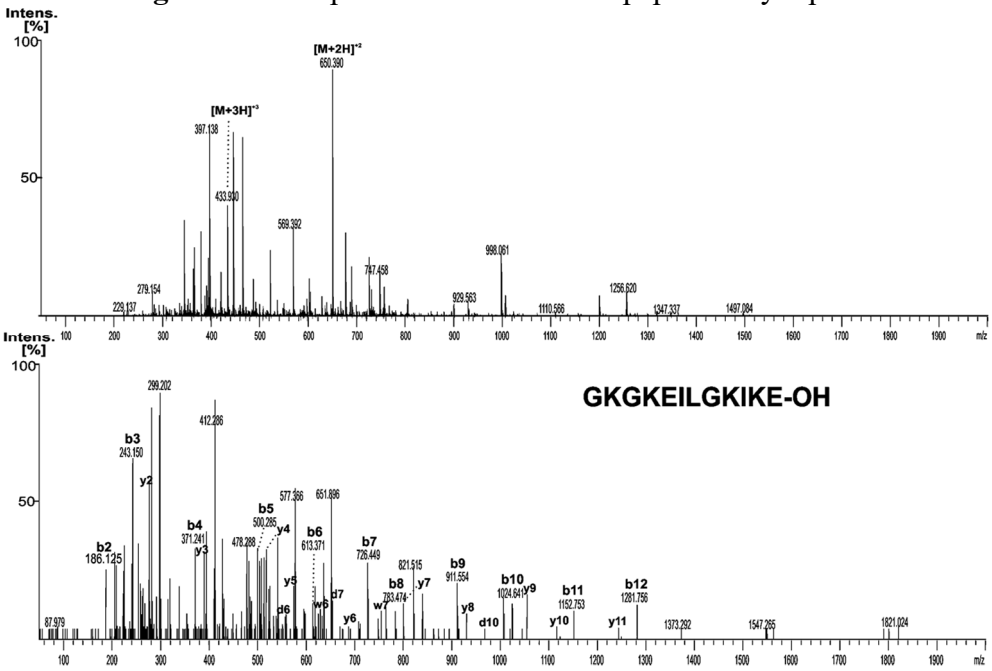
Figura A43: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-43



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 702,876 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

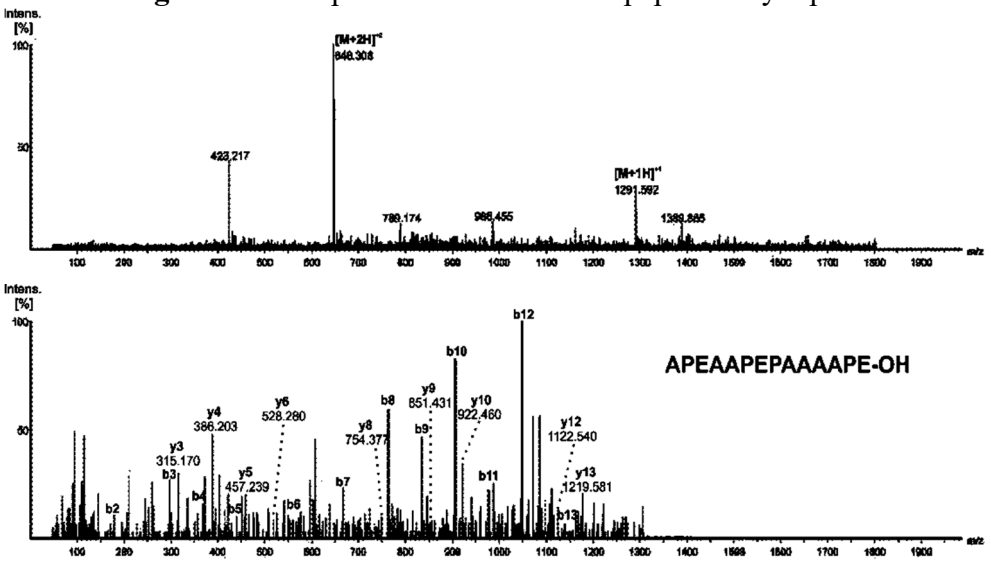
Figura A44: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-44



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 650,390 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

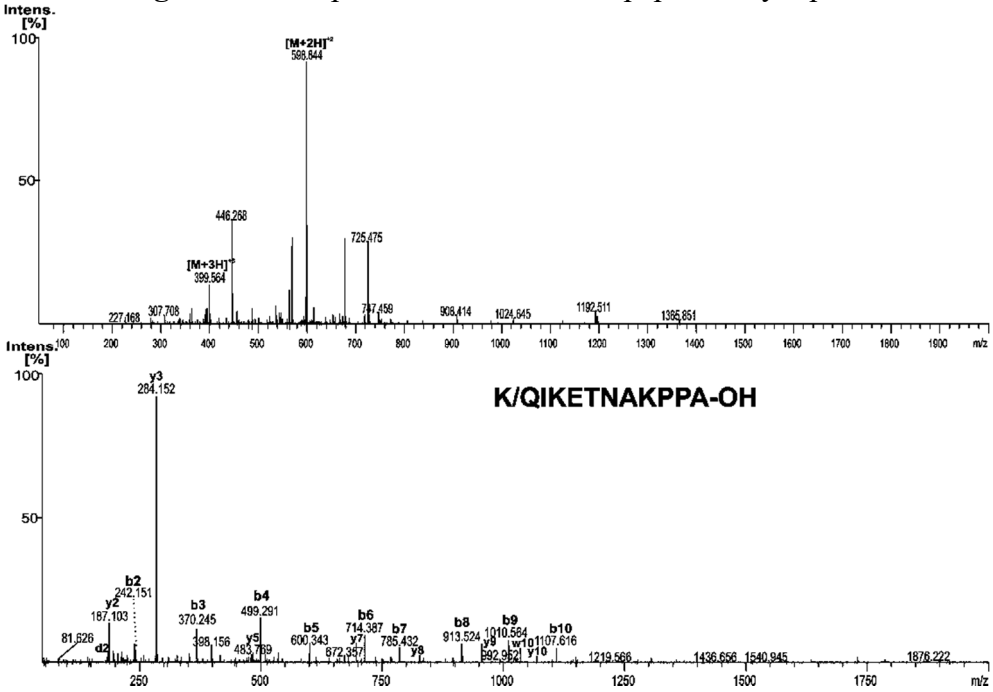
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A45: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-45



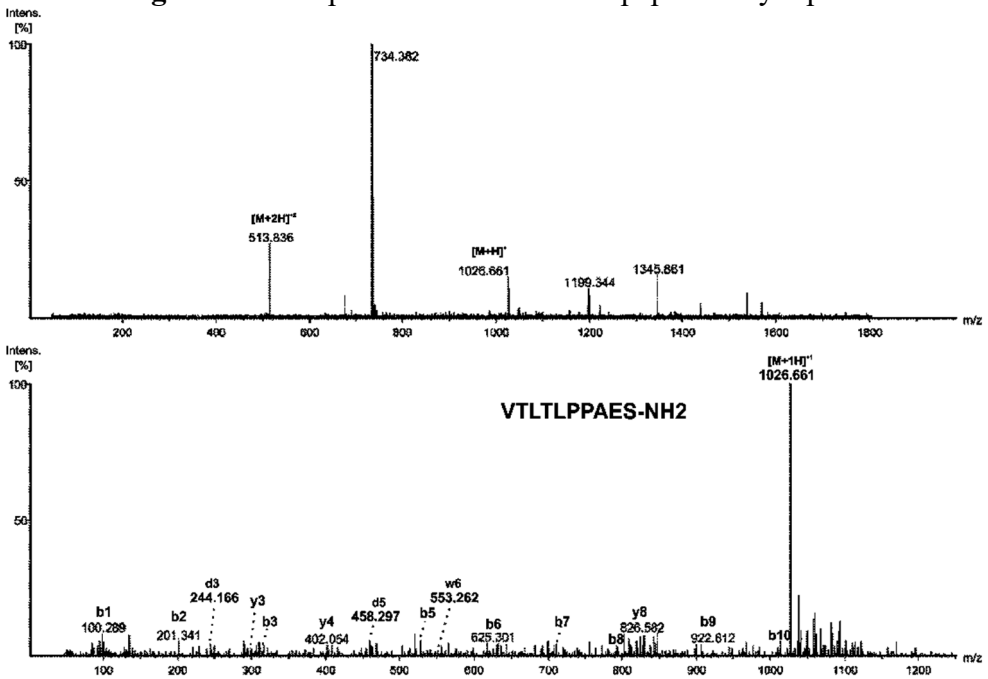
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 526,299 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A46: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-46



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 598,844 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

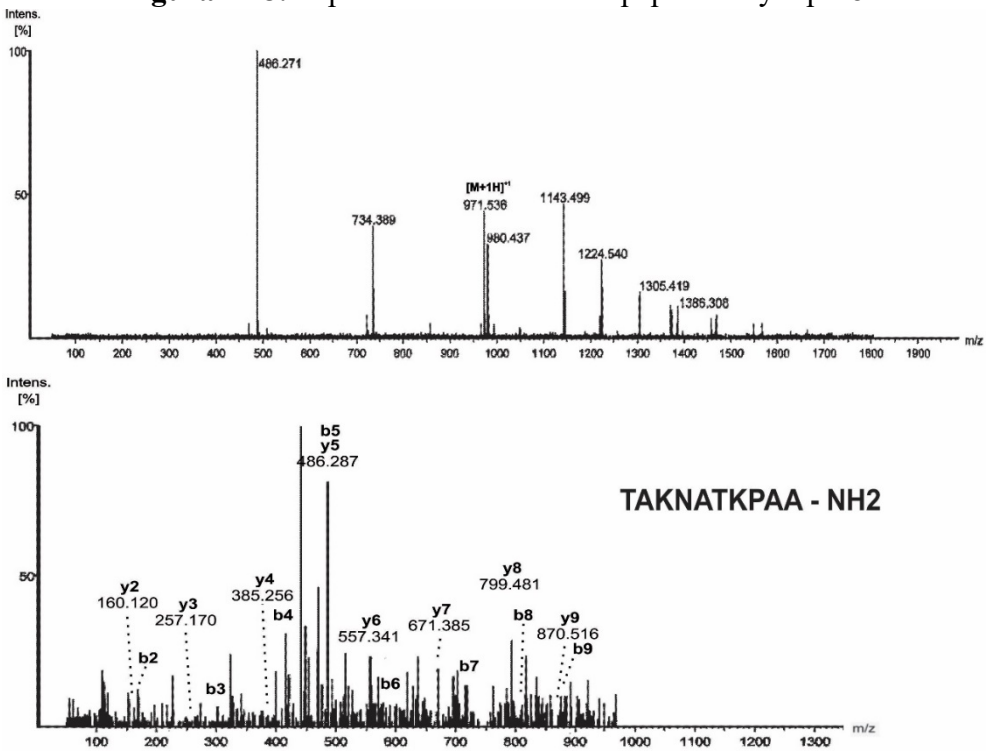
Figura A47: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-47



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 513,836 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

Fonte: Dados da pesquisa.

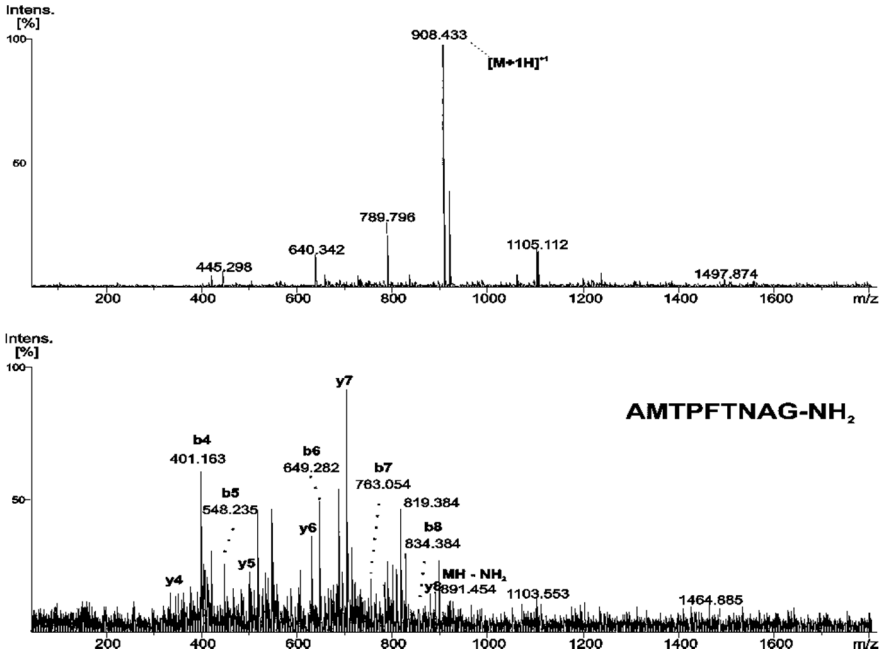
Figura A48: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-48



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 971,536 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.

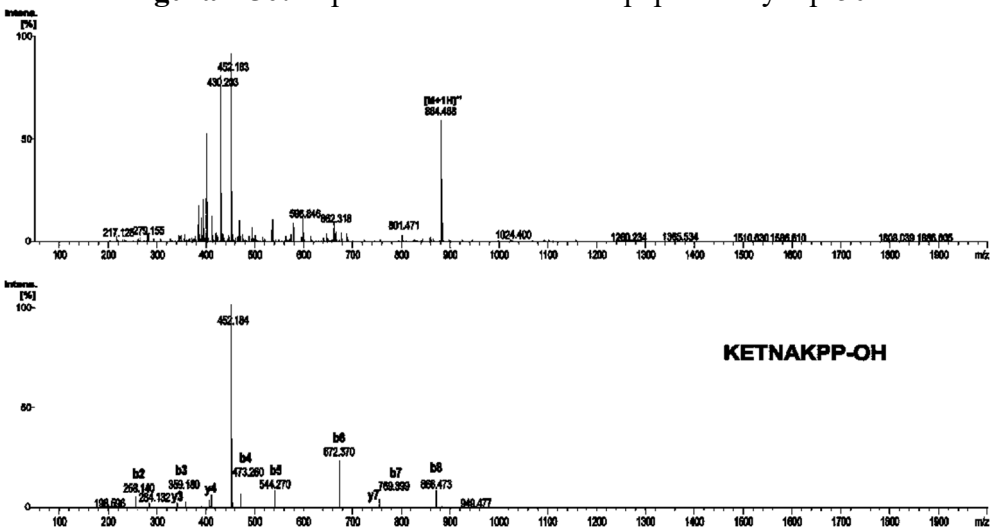
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A49: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-49



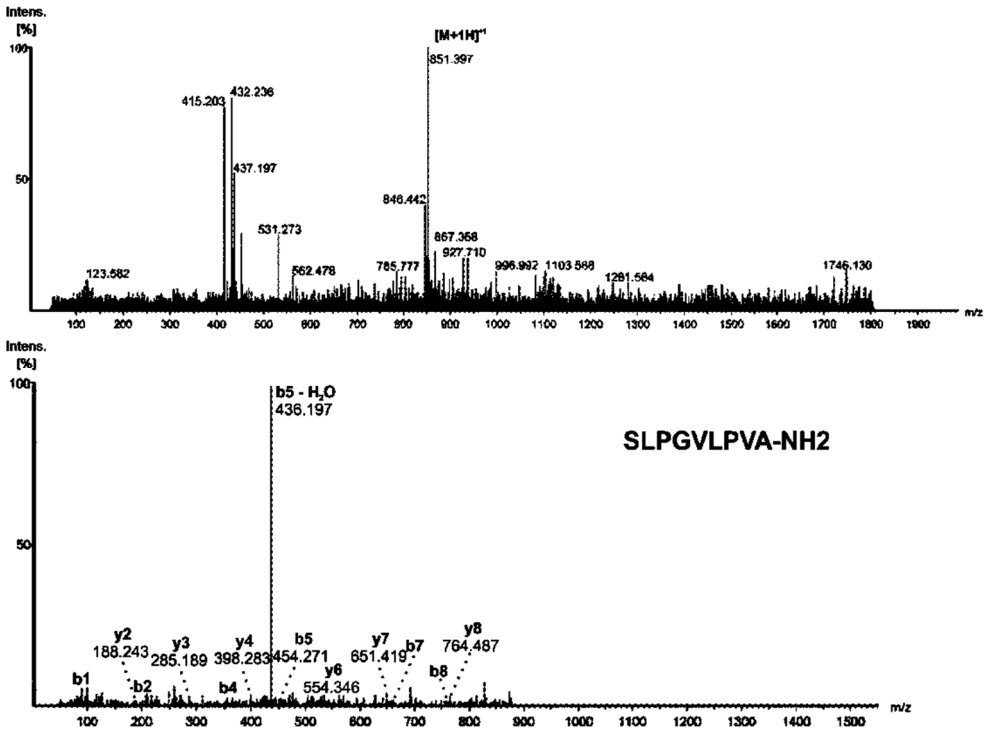
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 908,433 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A50: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-50



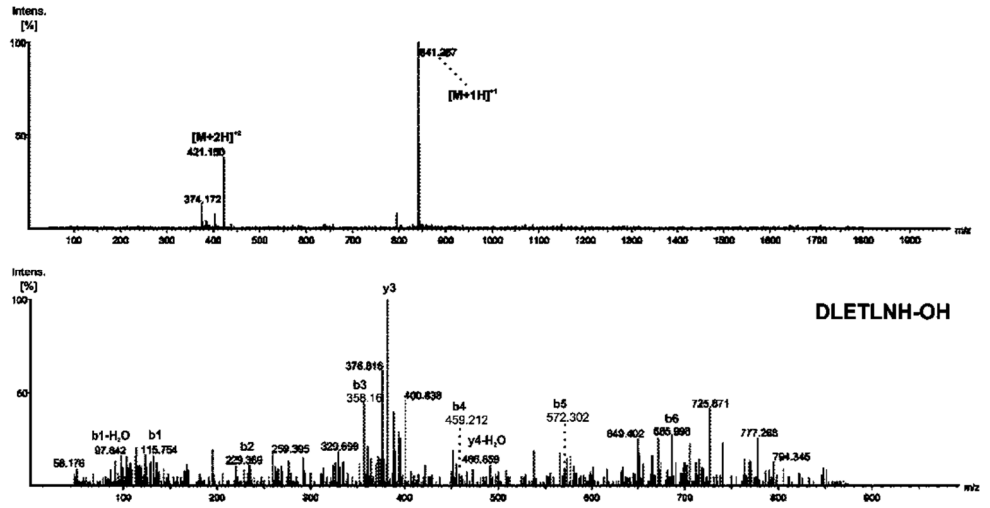
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 884.488 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A51: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-51



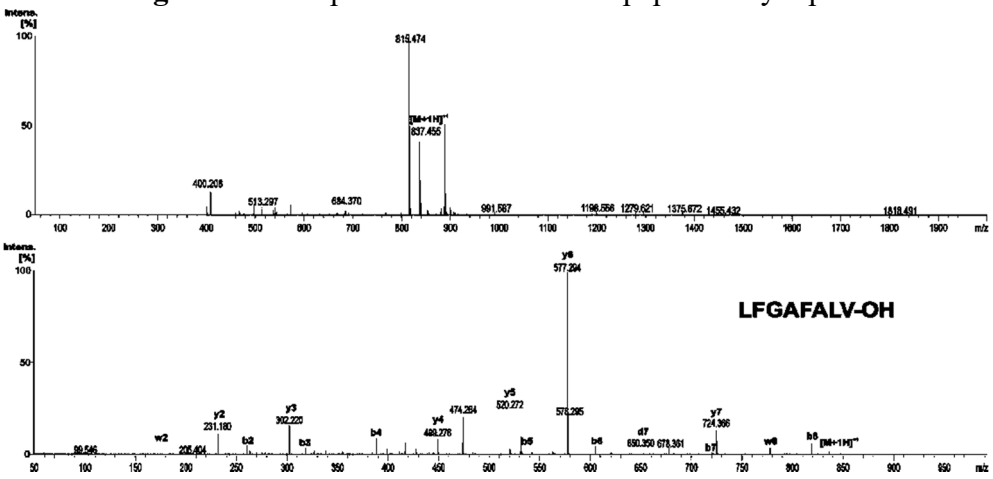
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 851,397 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A52: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-52



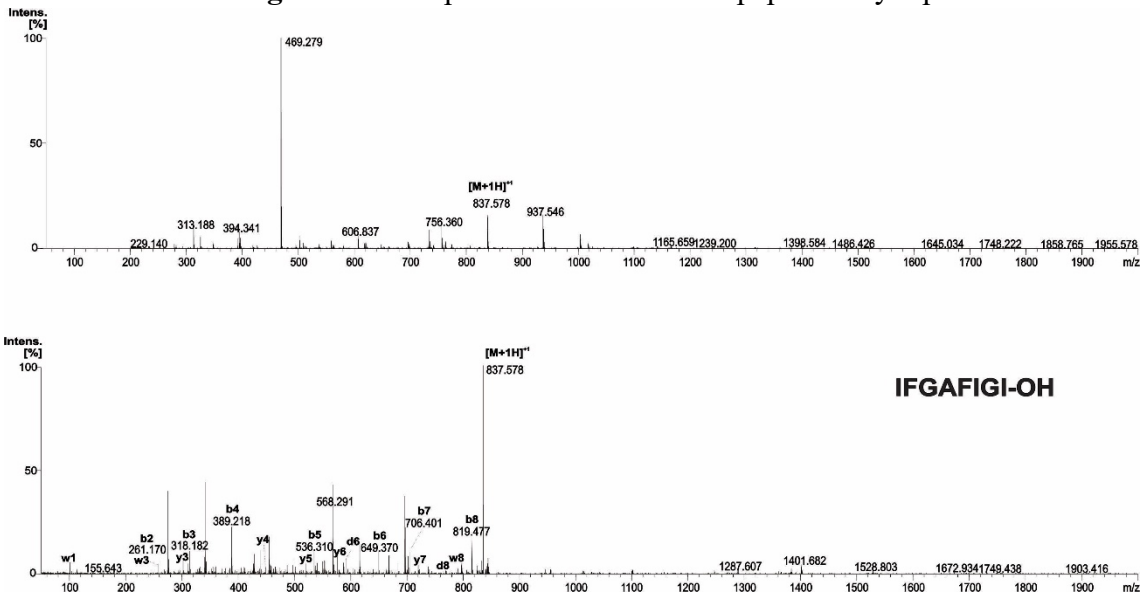
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 841,287 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A53: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-53



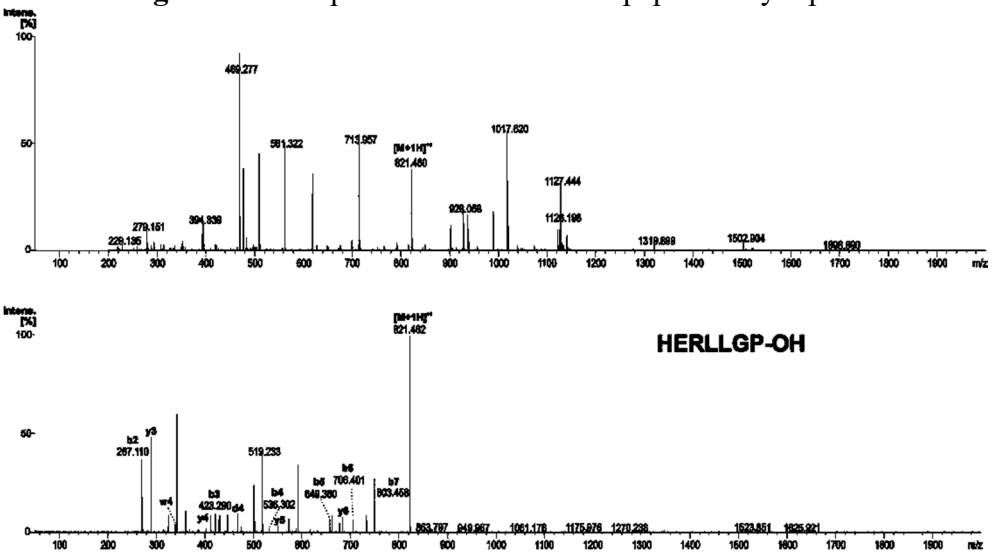
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 837,455 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A54: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-54



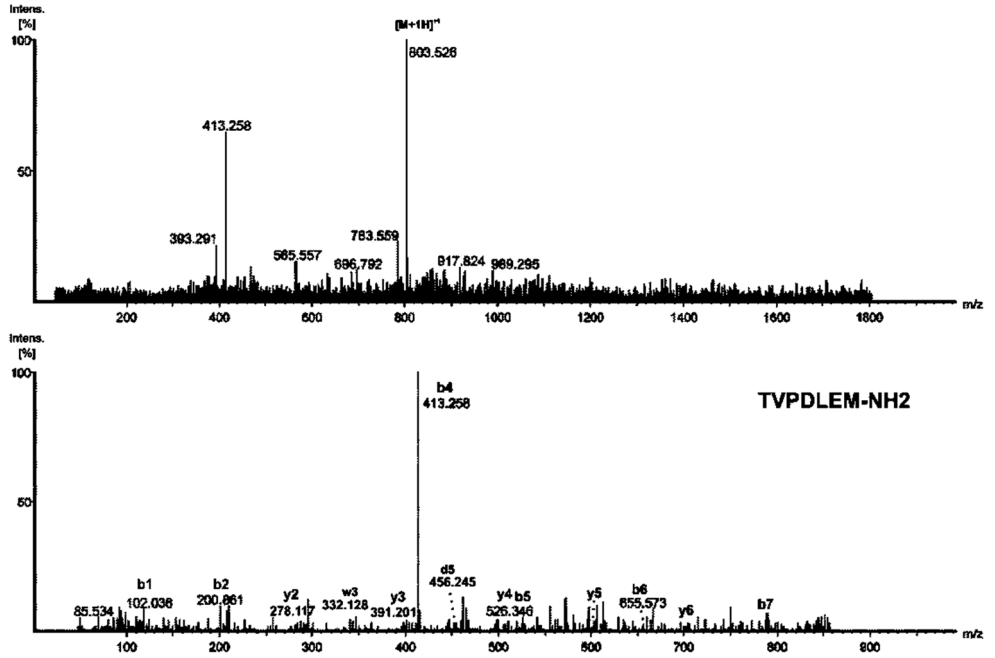
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 526,299 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A55: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-55



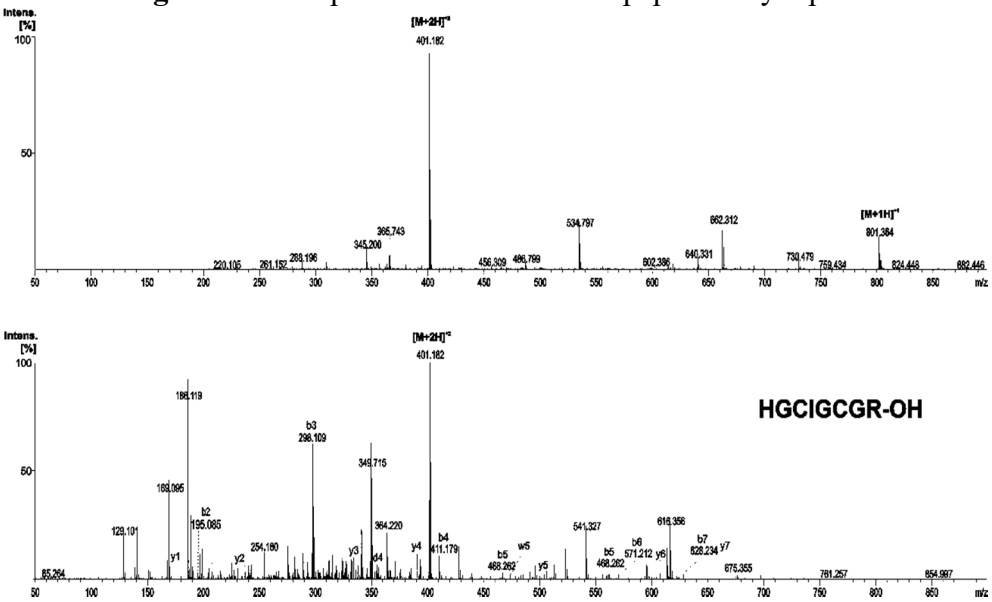
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 821,460 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A56: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-56



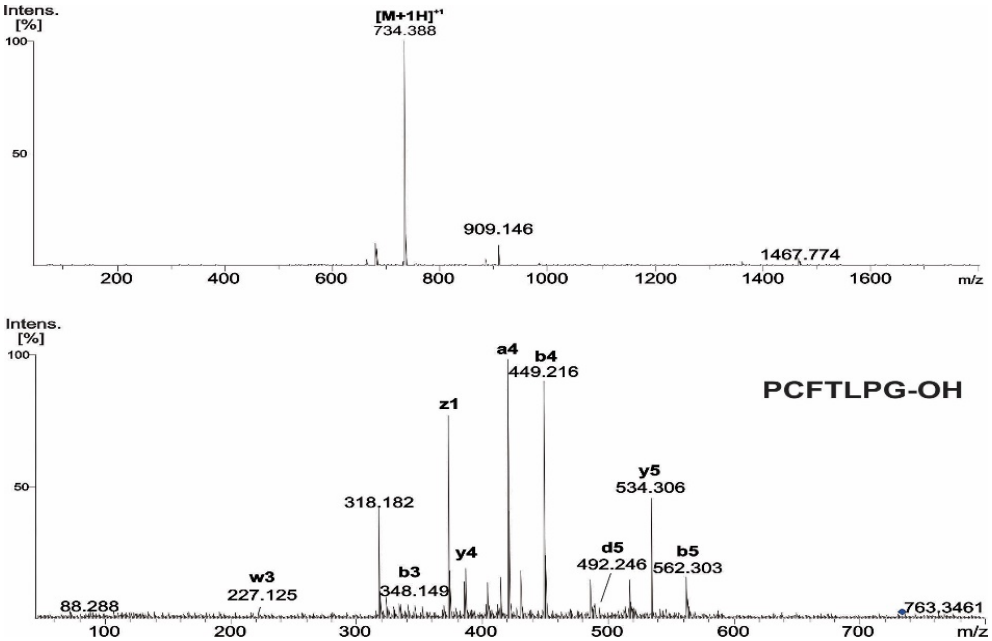
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 803,528 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A57: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-57



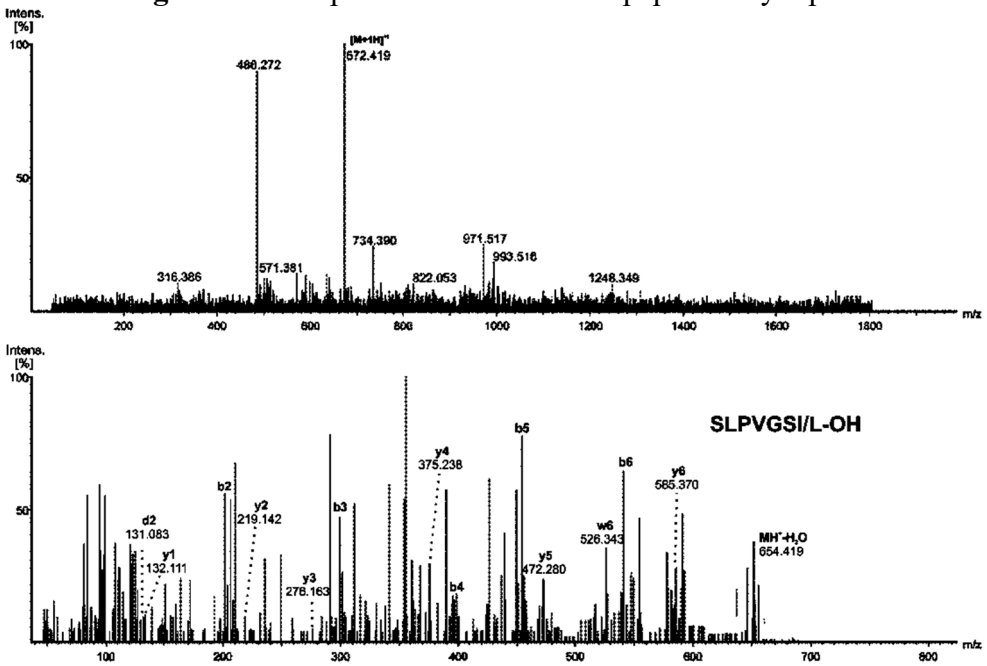
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 401,182 na forma $[M+2H]^{+2}$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b.*
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A58: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-59



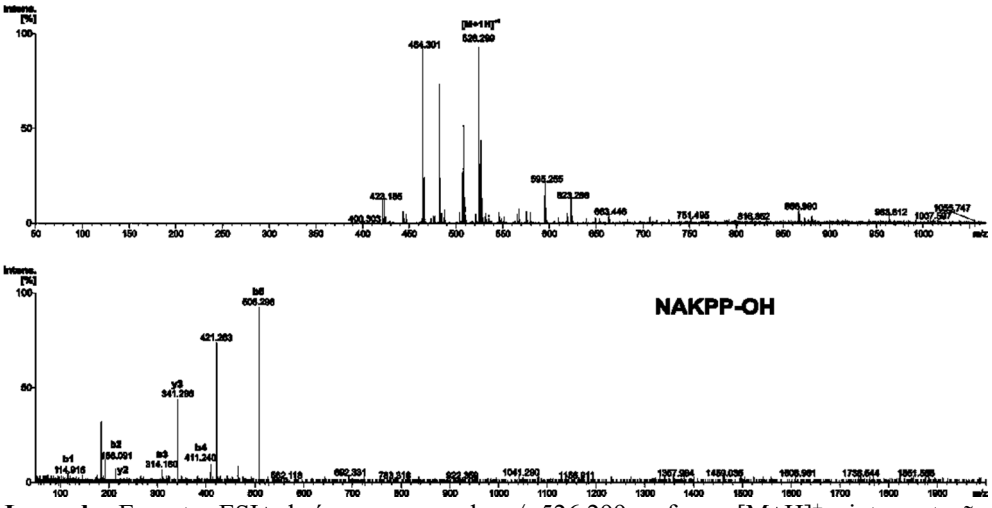
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 734,388 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b.*
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A59: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-60



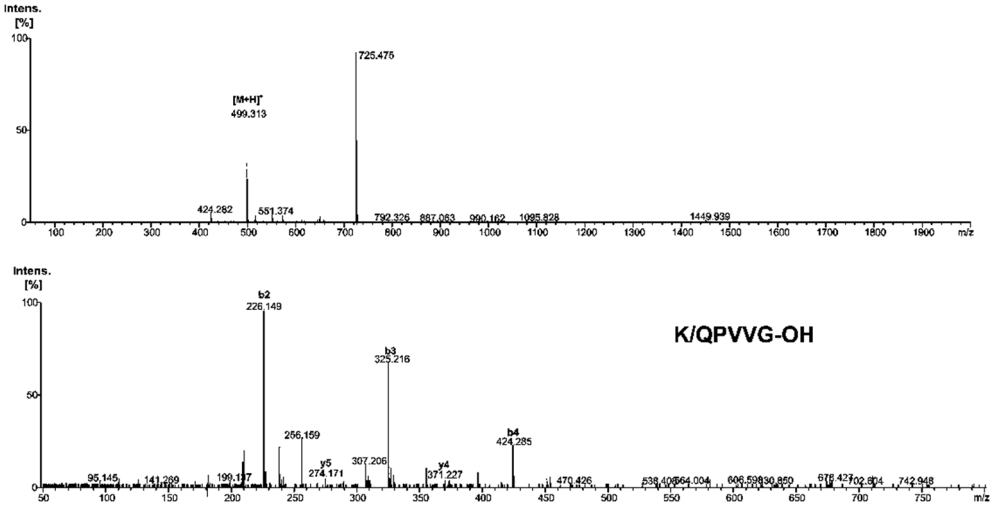
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 672,419 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A60: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-61



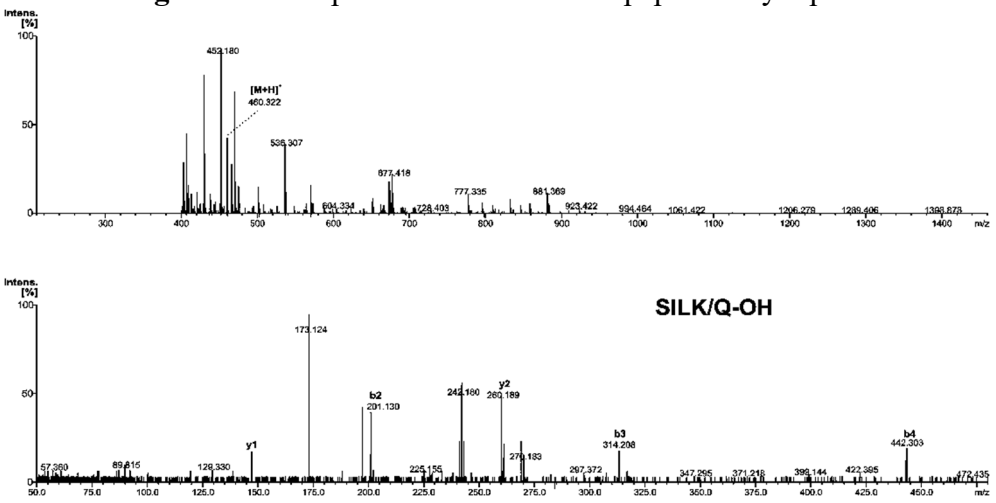
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 526,299 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A61: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-62



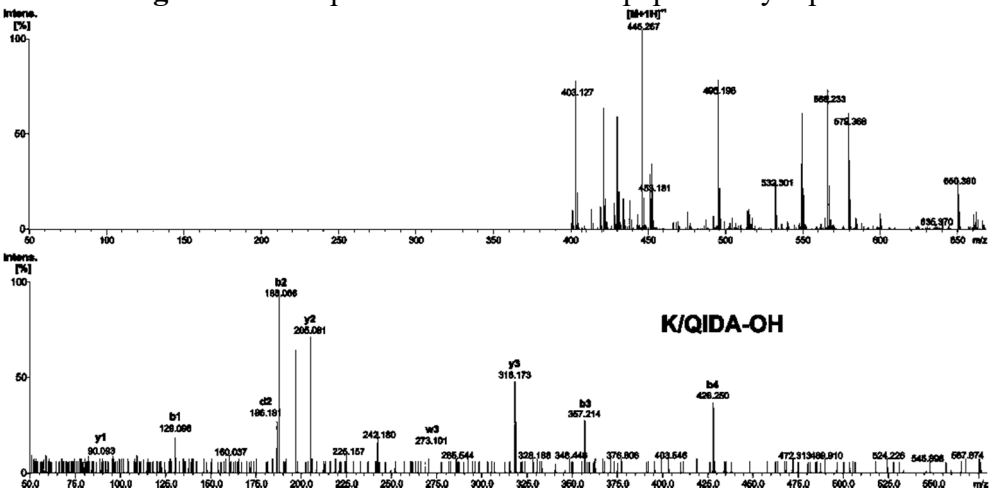
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 499,313 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A62: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-63



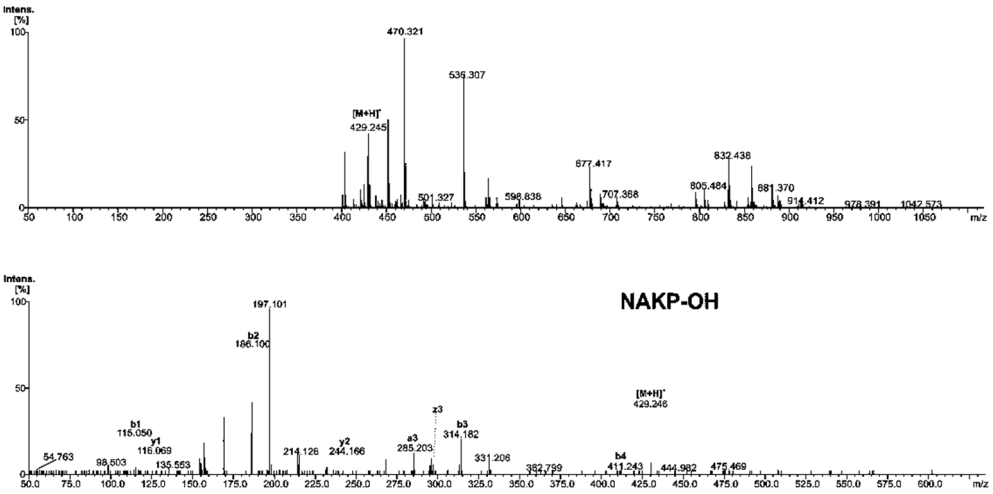
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 460,322 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A63: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-64



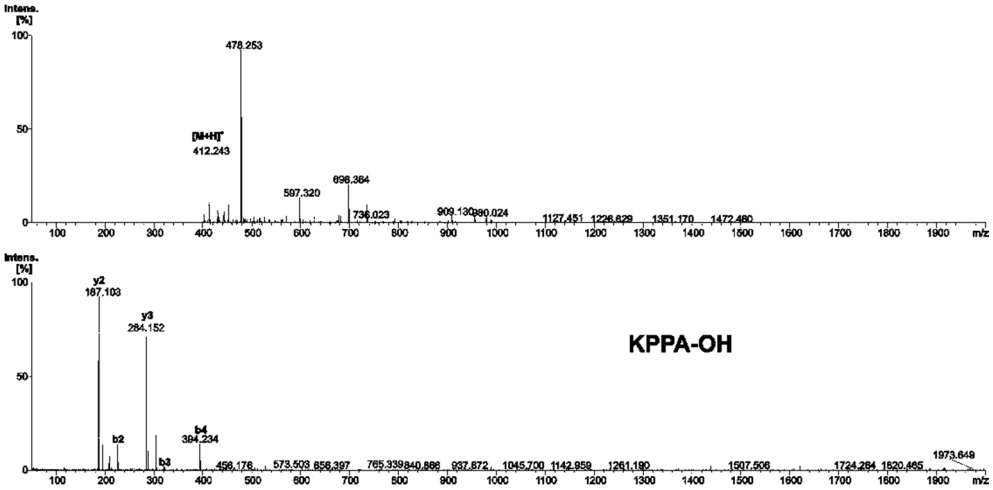
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 446,267 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A64: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-65



Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 429,245 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura A65: Espectros MS^1 e MS^2 do peptídeo TyPep-66



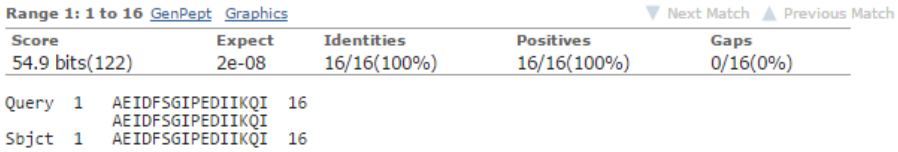
Legenda: Espectro ESI+ do íon precursor de *m/z* 412,243 na forma $[M+H]^+$ e interpretação do espectro MS^2 correspondente contendo uma série contínua de íons do tipo *b*.
Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE B - Resultado do alinhamento dos peptídeos com a ferramenta Blastp

Figura B1: Resultado da busca do peptídeo Typep-1 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Hypotensin-1; AltName: Full=Hypotensin I; Short=TsHpt-I; Contains: RecName: Full=Hypotensin-3; AltName: Full=Hypotensin III; Short=TsHpt-III.

Código de Acesso: P84189

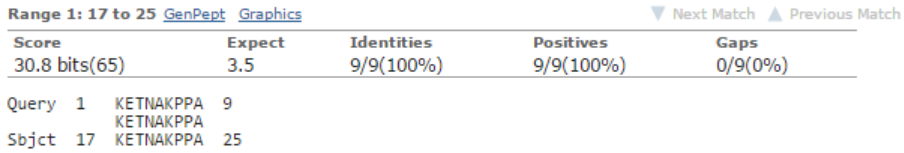


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B2: Resultado da busca do peptídeo Typep-8 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Hypotensin-2; AltName: Full=Hypotensin II; Short=TsHpt-II; Contains: RecName: Full=Hypotensin-4; AltName: Full=Hypotensin IV; Short=TsHpt-IV

Código de Acesso: P84190

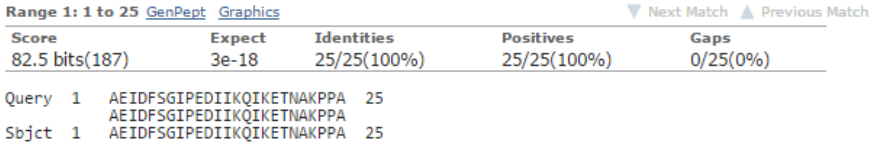


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B3: Resultado da busca do peptídeo Typep-21 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Hypotensin-1; AltName: Full=Hypotensin I; Short=TsHpt-I; Contains: RecName: Full=Hypotensin- ; AltName: Full=Hypotensin III; Short=TsHpt-III

Código de Acesso: P84189



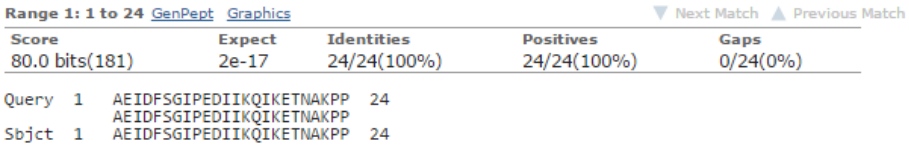
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B4: Resultado da busca do peptídeo Typep-22 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Hypotensin-1; AltName: Full=Hypotensin I; Short=TsHpt-I; Contains: RecName: Full=Hypotensin-3; AltName: Full=Hypotensin III; Short=TsHpt-III

Sequence ID: sp|P84189.1|NDBH1_TITSELength: 25Number of Matches: 1

Código de Acesso: P84189

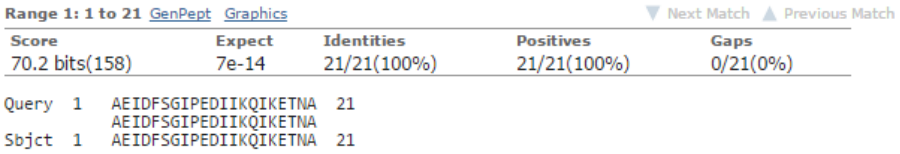


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B5: Resultado da busca do peptídeo Typep-23 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Hypotensin-1; AltName: Full=Hypotensin I; Short=TsHpt-I; Contains: RecName: Full=Hypotensin-3; AltName: Full=Hypotensin III; Short=TsHpt-III

Código de Acesso: P84189

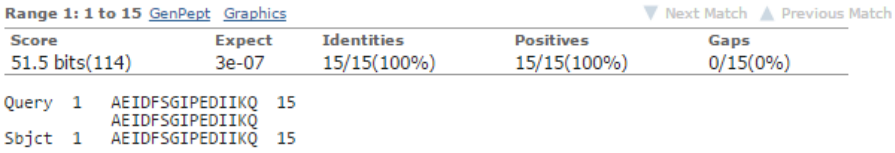


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B6: Resultado da busca do peptídeo Typep-32 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Hypotensin-1; AltName: Full=Hypotensin I; Short=TsHpt-I; Contains: RecName: Full=Hypotensin-3; AltName: Full=Hypotensin III; Short=TsHpt-III

Código de Acesso: P84189

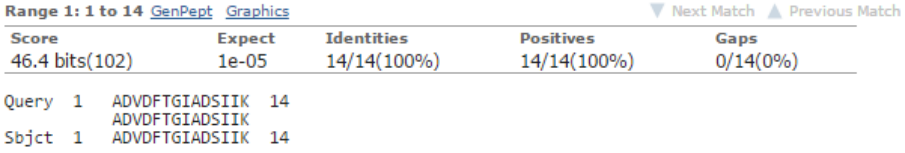


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B7: Resultado da busca do peptídeo Typep-39 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Hypotensin-like peptide, partial [Tityus serrulatus]

Código de Acesso: P86824

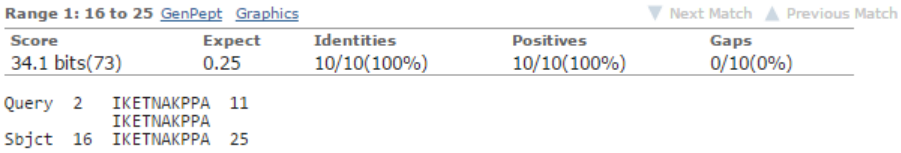


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B8: Resultado da busca do peptídeo Typep-46 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Hypotensin-2; AltName: Full=Hypotensin II; Short=TsHpt-II; Contains: RecName: Full=Hypotensin-4; AltName: Full=Hypotensin IV; Short=TsHpt-IV

Código de Acesso: P84190

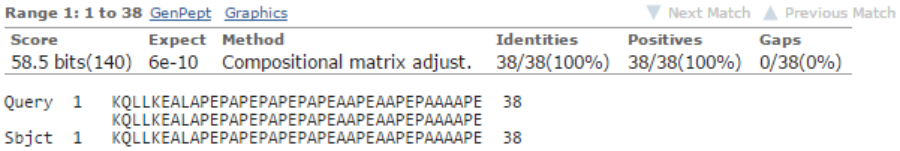


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B9: Resultado da busca do peptídeo Typep-19 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Pape peptide

Código de Acesso: P86821

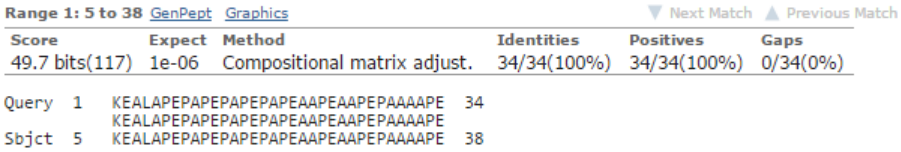


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B10: Resultado da busca do peptídeo Typep-20 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Pape peptide

Código de Acesso: P86821

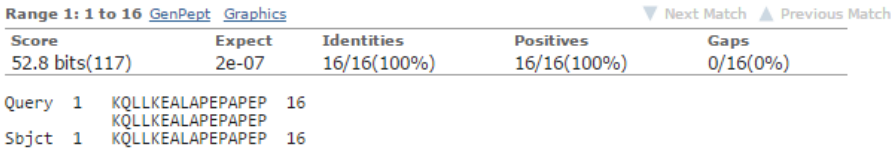


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B11: Resultado da busca do peptídeo Typep-31 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Pape peptide

Código de Acesso: P86821

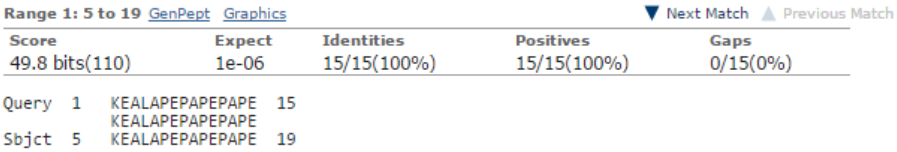


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B12: Resultado da busca do peptídeo Typep-33 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Pape peptide

Código de Acesso: P86821



Range 1: 5 to 19 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
49.8 bits(110)	1e-06	15/15(100%)	15/15(100%)	0/15(0%)

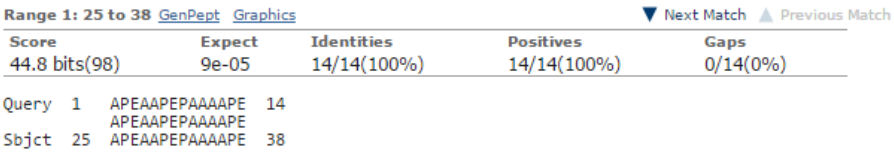
```
Query  1   KEALAPEPAPEPAPE  15
           KEALAPEPAPEPAPE
Sbjct  5   KEALAPEPAPEPAPE  19
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B13: Resultado da busca do peptídeo Typep-45 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Pape peptide

Código de Acesso: P86821



Range 1: 25 to 38 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
44.8 bits(98)	9e-05	14/14(100%)	14/14(100%)	0/14(0%)

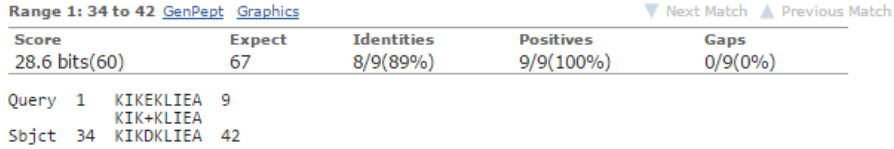
```
Query  1   APEAAPEPAAAAPE  14
           APEAAPEPAAAAPE
Sbjct  25  APEAAPEPAAAAPE  38
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B14: Resultado da busca do peptídeo Typep-6 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Potassium channel toxin TtrKIK; Flags: Precursor [Tityus trivittatus]

Código de Acesso: Q0GY45



Range 1: 34 to 42 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
28.6 bits(60)	67	8/9(89%)	9/9(100%)	0/9(0%)

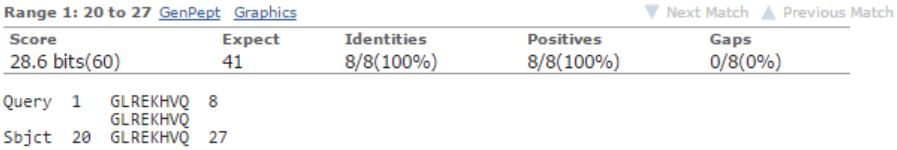
```
Query  1   KIKEKLIEA  9
           KIK+KLIEA
Sbjct  34  KIKDKLIEA  42
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B15: Resultado da busca do peptídeo Typep-16 pela ferramenta Blastp

beta-KTx-like peptide [Tityus trivittatus]

Código de Acesso: ABU94955



Range 1: 20 to 27 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
28.6 bits(60)	41	8/8(100%)	8/8(100%)	0/8(0%)

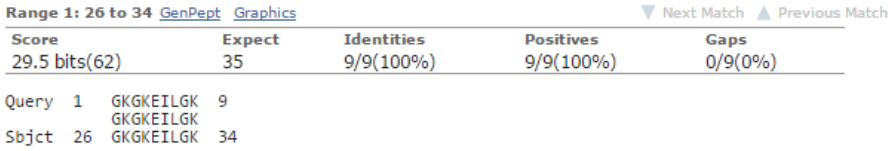
```
Query  1   GLREKHVQ  8
           GLREKHVQ
Sbjct  20  GLREKHVQ  27
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B16: Resultado da busca do peptídeo Typep-17 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2; AltName: Full=Ts19; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-1; AltName: Full=Ts19 fragment I; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-2; AltName: Full=Ts19 fragment II; Flags: Precursor

Código de Acesso: P86822



Range 1: 26 to 34 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
29.5 bits(62)	35	9/9(100%)	9/9(100%)	0/9(0%)

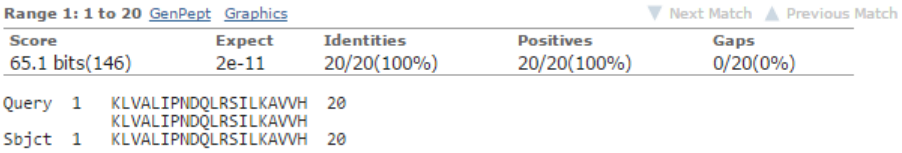
```
Query  1   GKGKEILGK  9
           GKGKEILGK
Sbjct  26  GKGKEILGK  34
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B17: Resultado da busca do peptídeo Typep-24 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Potassium channel toxin Tst-beta-KTx; Short=TstbetaKTx [Tityus stigmurus]

Código de Acesso: P0C2F3



Range 1: 1 to 20 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
65.1 bits(146)	2e-11	20/20(100%)	20/20(100%)	0/20(0%)

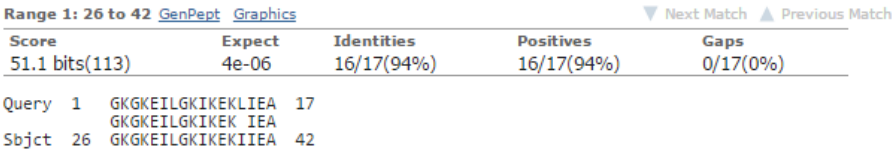
```
Query  1   KLVALIPNDQLRSILKAVVH  20
           KLVALIPNDQLRSILKAVVH
Sbjct  1   KLVALIPNDQLRSILKAVVH  20
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B18: Resultado da busca do peptídeo Typep-27 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2; AltName: Full=Ts19; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-1; AltName: Full=Ts19 fragment I; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-2; AltName: Full=Ts19 fragment II; Flags: Precursor

Código de Acesso: P86822



Range 1: 26 to 42 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
51.1 bits(113)	4e-06	16/17(94%)	16/17(94%)	0/17(0%)

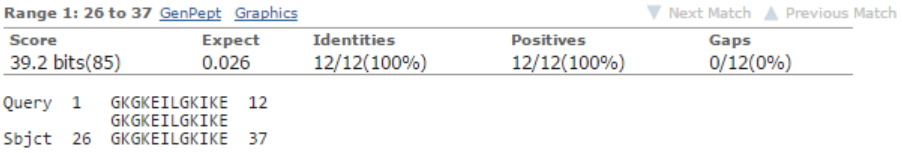
```
Query  1   GKGKEILGKIKEKLIEA  17
           GKGKEILGKIKEK IEA
Sbjct  26  GKGKEILGKIKEKIIEA  42
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B19: Resultado da busca do peptídeo Typep-44 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2; AltName: Full=Ts19; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-1; AltName: Full=Ts19 fragment I; Contains: RecName: Full=Potassium channel toxin beta-Ktx 2-2; AltName: Full=Ts19 fragment II; Flags: Precursor

Código de Acesso: P86822



Range 1: 26 to 37 GenPept Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
39.2 bits(85)	0.026	12/12(100%)	12/12(100%)	0/12(0%)

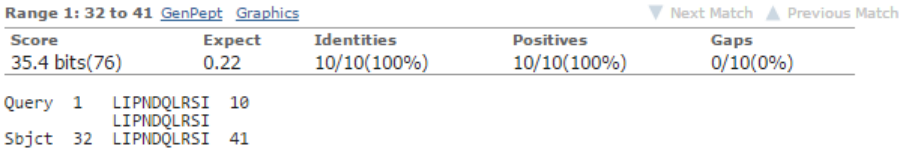
```
Query  1   GKGKEILGKIKE  12
           GKGKEILGKIKE
Sbjct  26  GKGKEILGKIKE  37
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B20: Resultado da busca do peptídeo Typep-3 pela ferramenta Blastp

beta-KTx-like peptide [Tityus trivittatus]

Código de Acesso: ABU94955



Range 1: 32 to 41 GenPept Graphics — Next Match — Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
35.4 bits(76)	0.22	10/10(100%)	10/10(100%)	0/10(0%)

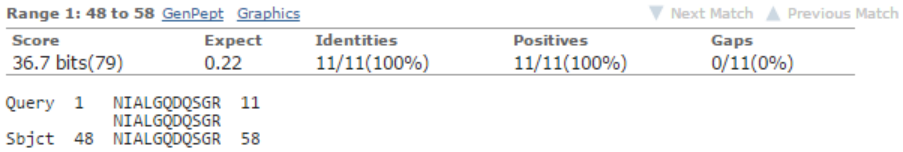
```
Query  1   LIPNDQLRSI  10
           LIPNDQLRSI
Sbjct  32  LIPNDQLRSI  41
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B21: Resultado da busca do peptídeo Typep-4 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Venom allergen 5; AltName: Full=Antigen 5; AltName: Full=Cysteine-rich venom protein; Short=CRVP

Código de Acesso: P85840



Range 1: 48 to 58 GenPept Graphics — Next Match — Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
36.7 bits(79)	0.22	11/11(100%)	11/11(100%)	0/11(0%)

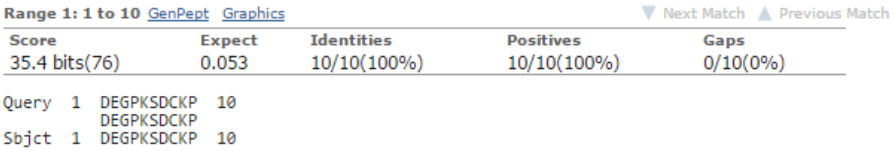
```
Query  1   NIALGQDQSGR  11
           NIALGQDQSGR
Sbjct  48  NIALGQDQSGR  58
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B22: Resultado da busca do peptídeo Typep-5 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Toxin To27; AltName: Full=Toxin Tc27, partial [Tityus cambridgei]

Código de Acesso: P84676



Range 1: 1 to 10 GenPept Graphics — Next Match — Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
35.4 bits(76)	0.053	10/10(100%)	10/10(100%)	0/10(0%)

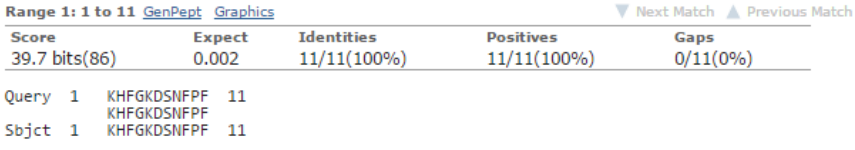
```
Query  1  DEGPKSDCKP  10
          DEGPKSDCKP
Sbjct  1  DEGPKSDCKP  10
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B23: Resultado da busca do peptídeo Typep-14 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Venom peptide 1; Contains: RecName: Full=Venom peptide 2 [Tityus serrulatus]

Código de Acesso: P86825



Range 1: 1 to 11 GenPept Graphics — Next Match — Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
39.7 bits(86)	0.002	11/11(100%)	11/11(100%)	0/11(0%)

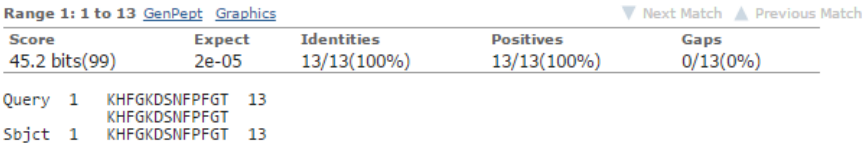
```
Query  1   KHFGKDSNFPF  11
           KHFGKDSNFPF
Sbjct  1   KHFGKDSNFPF  11
```

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B24: Resultado da busca do peptídeo Typep-36 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Venom peptide 1; Contains: RecName: Full=Venom peptide 2 [Tityus serrulatus]

Código de Acesso: P86825

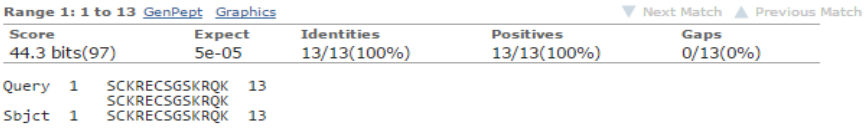


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura B25: Resultado da busca do peptídeo Typep-25 pela ferramenta Blastp

RecName: Full=Toxin OcyKTx3, partial [Opisthacanthus cayaporum]

Código de Acesso: P86117

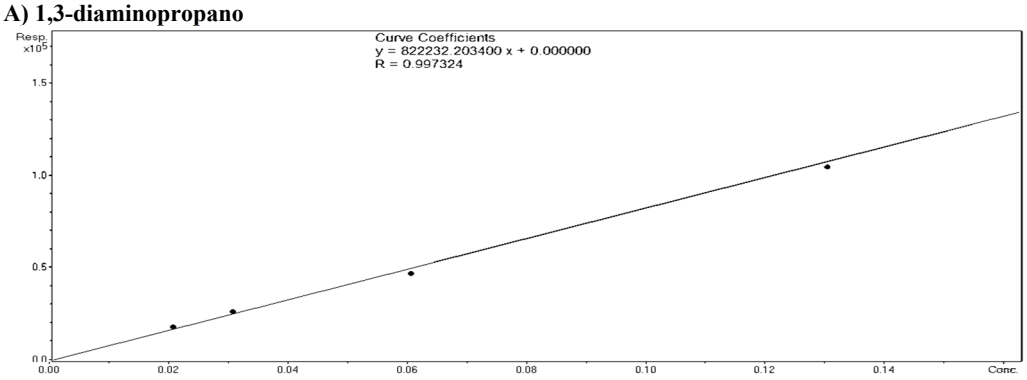


Fonte: Dados da pesquisa.

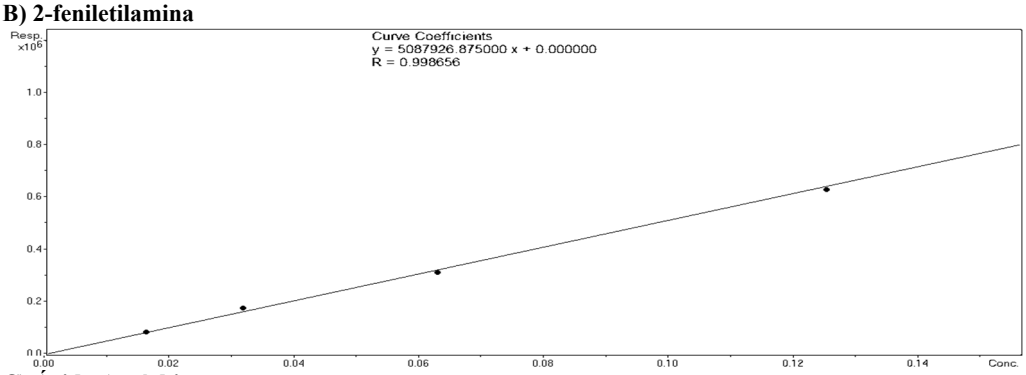
APÊNDICE C - Curvas de calibração dos padrões de metabólitos

Figura C1: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) 1,3-diaminopropano, B) 2-feniletilamina, C) ácido ascórbico e D) ácido aspártico

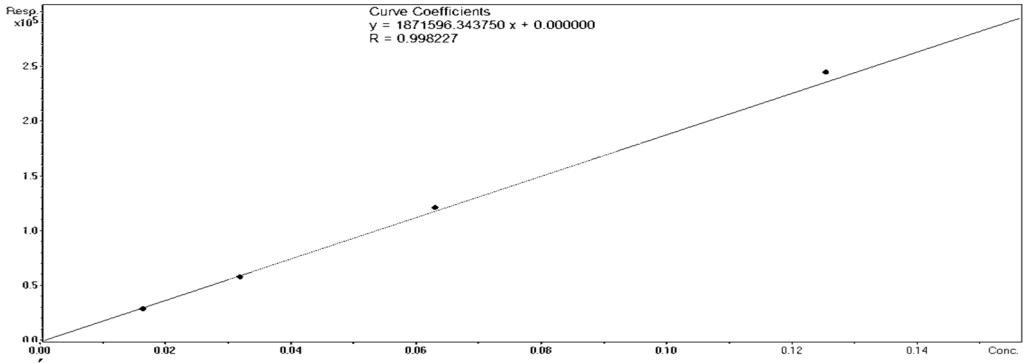
A) 1,3-diaminopropano



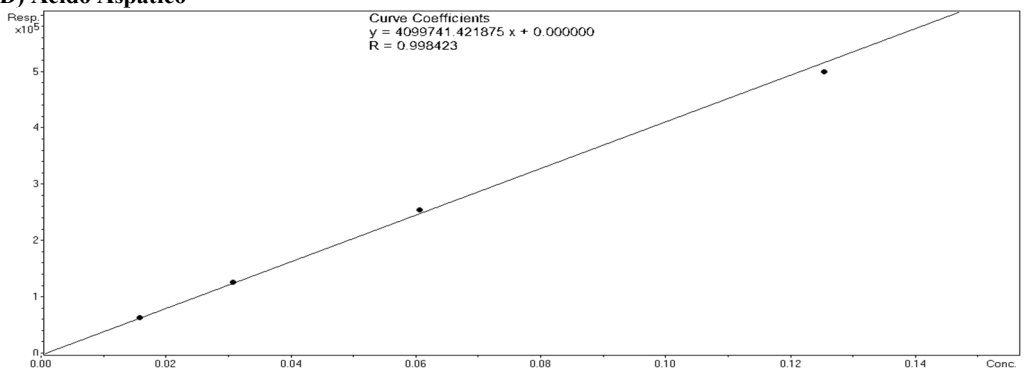
B) 2-feniletilamina



C) Ácido Ascórbico



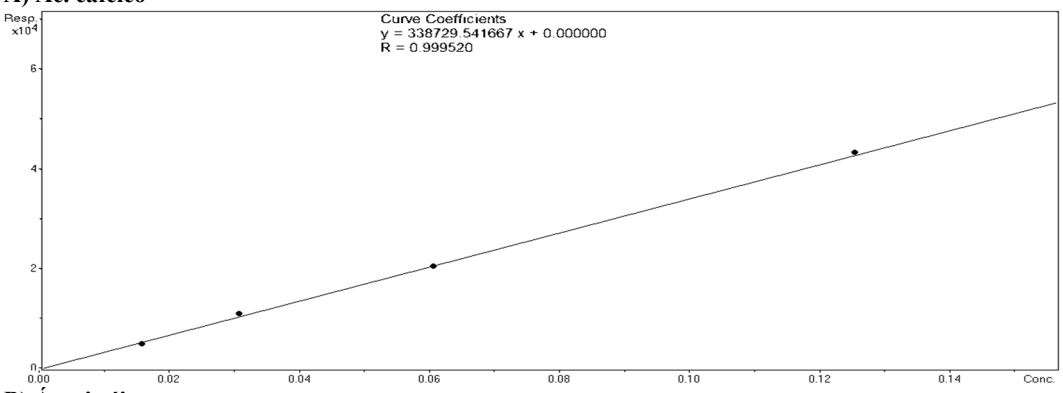
D) Ácido Aspático



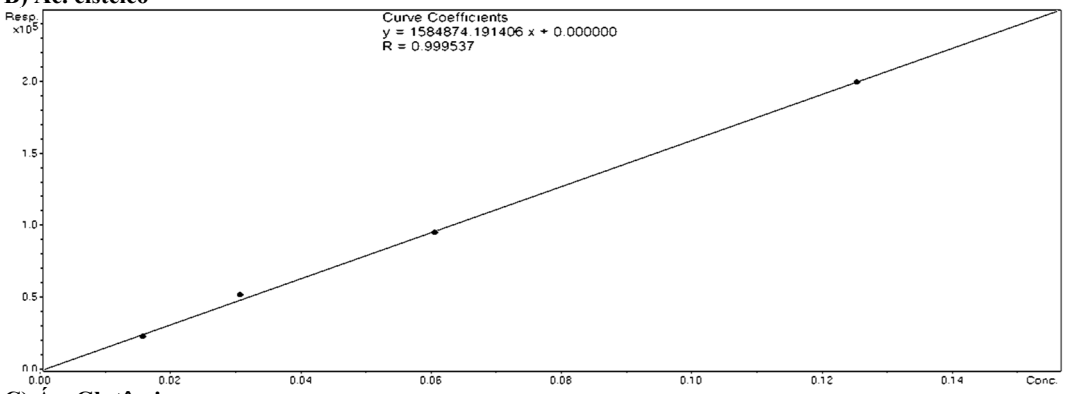
Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) 1,3-diaminopropano, B) 2-feniletilamina, C) ácido ascórbico e D) ácido aspártico, contendo suas equações e coeficientes da reta. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C2: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) ácido caféico, B) ácido cistéico, C) ácido glutâmico e D) ácido 3,4-di-hidroxifenilacético

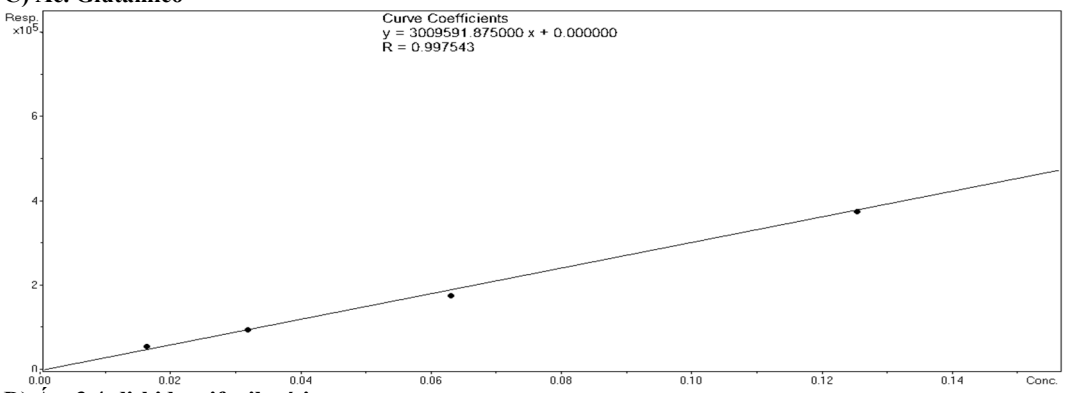
A) Ác. caféico



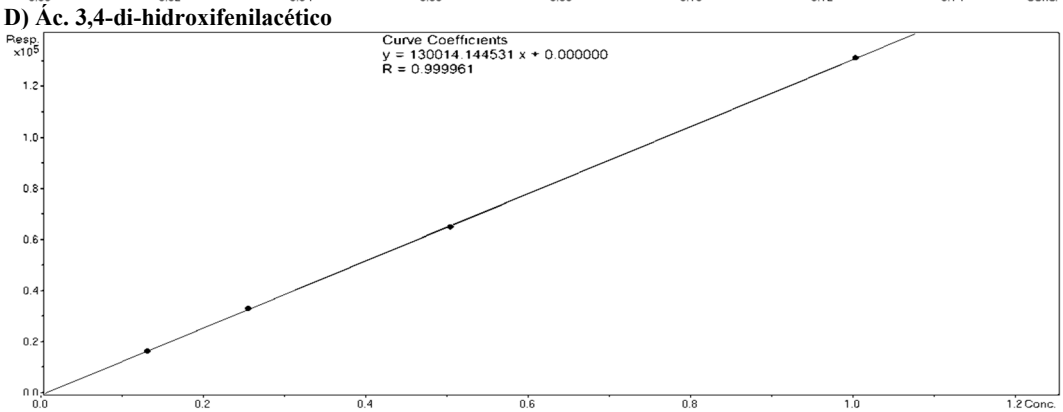
B) Ác. cistéico



C) Ác. Glutâmico



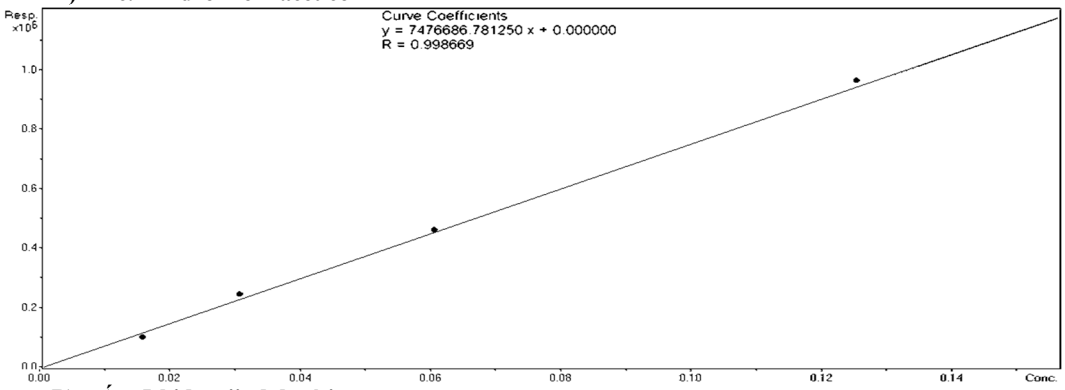
D) Ác. 3,4-di-hidroxifenilacético



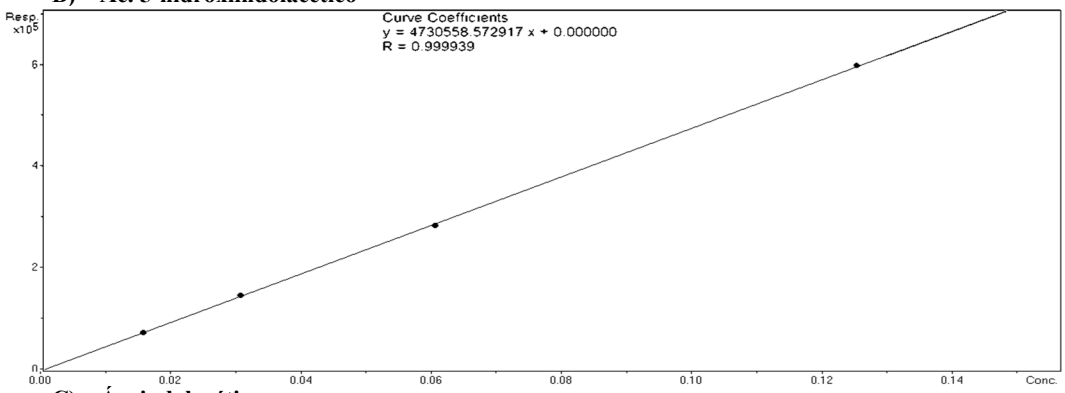
Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) ácido caféico, B) ácido cistéico, C) ácido glutâmico e D) ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, contendo suas equações e coeficientes da reta. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C3: Curvas de calibração obtidas para os compostos ácido A) 3,4-di-hidroxifenilacético, B) 5-hidroxiindolacético, C) ácido indolacético e D) ácido caínico

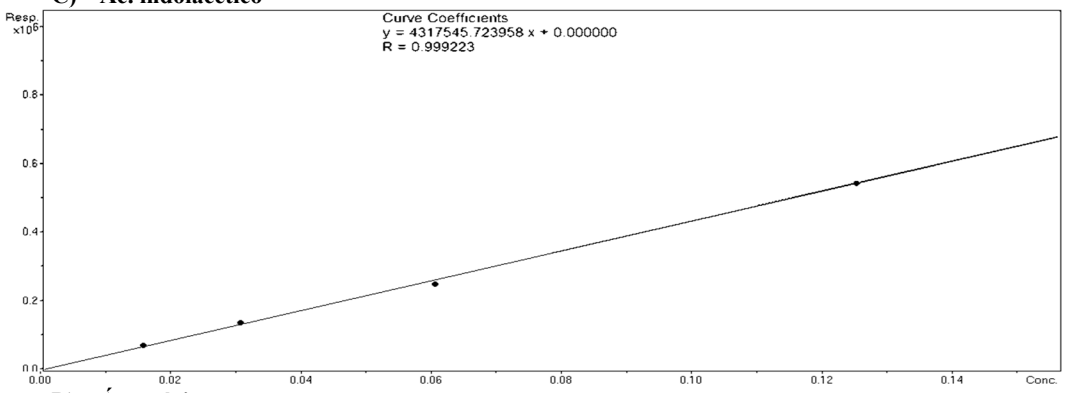
A) Ác. 4-hidroxifenilacético



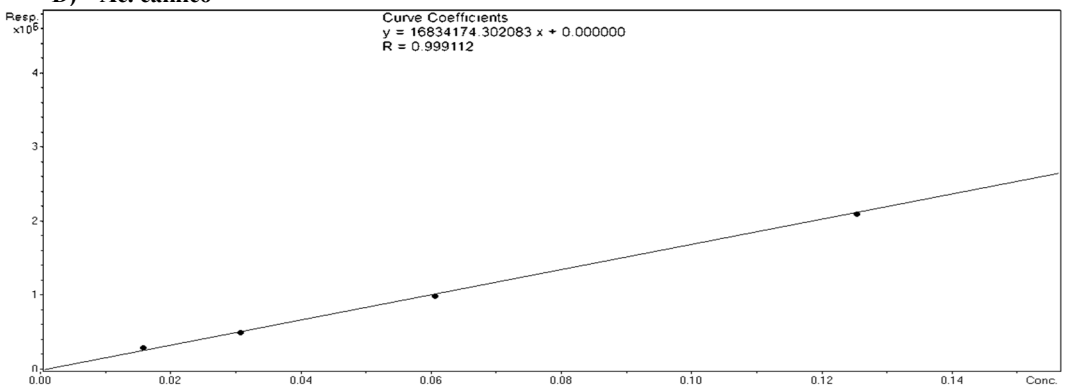
B) Ác. 5-hidroxiindolacético



C) Ác. indolacético



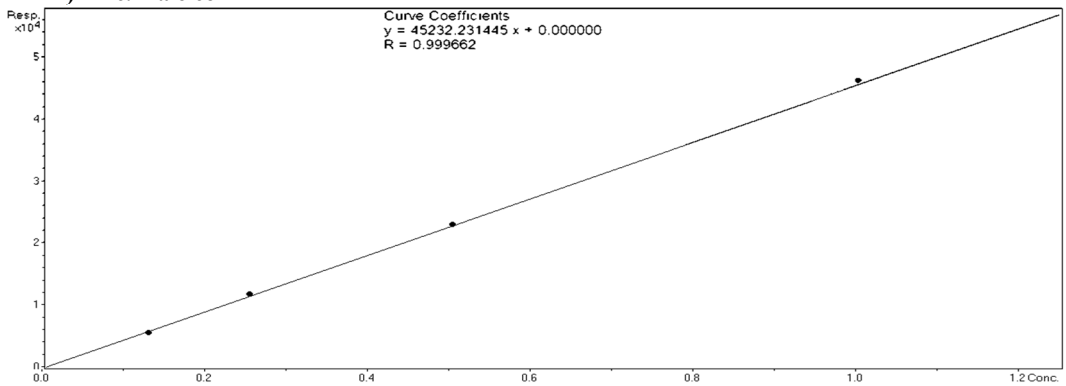
D) Ác. caínico



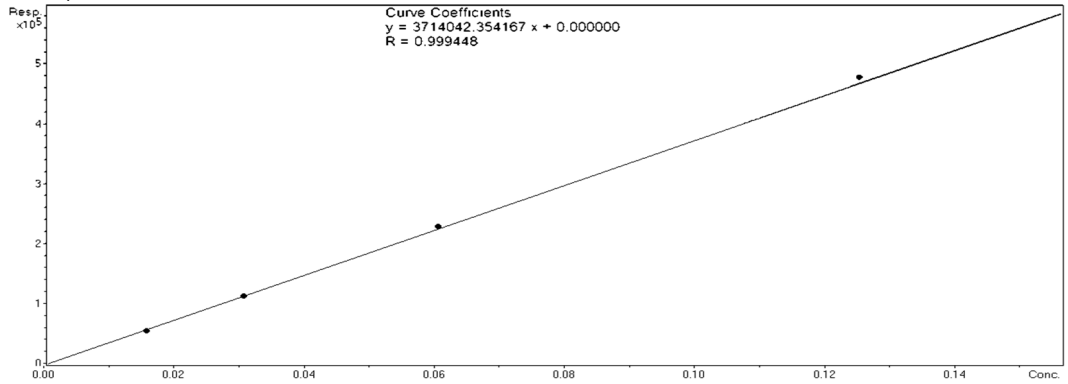
Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos ácido A) 3,4-di-hidroxifenilacético, B) 5-hidroxiindolacético, C) ácido indolacético e D) ácido caínico, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C4: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) ácido maléico, B) adenosina difosfato, C) adenina e D) adenosina monofosfato cíclica

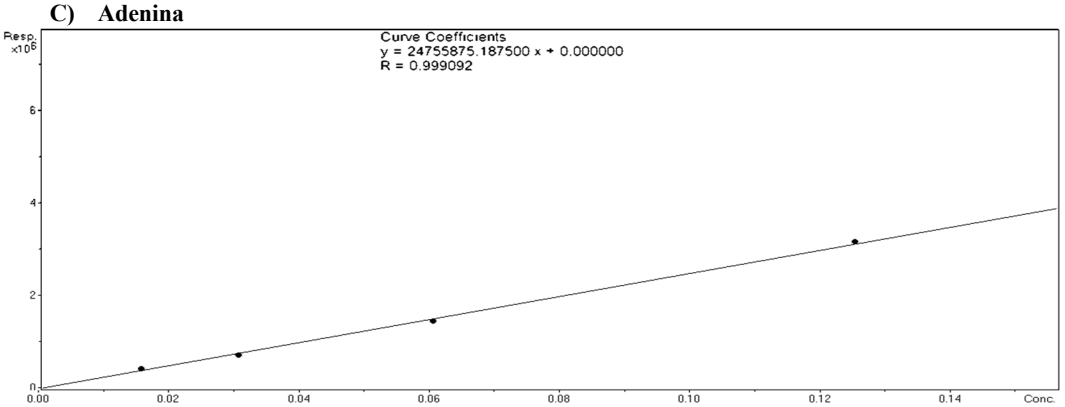
A) Ác. maléico



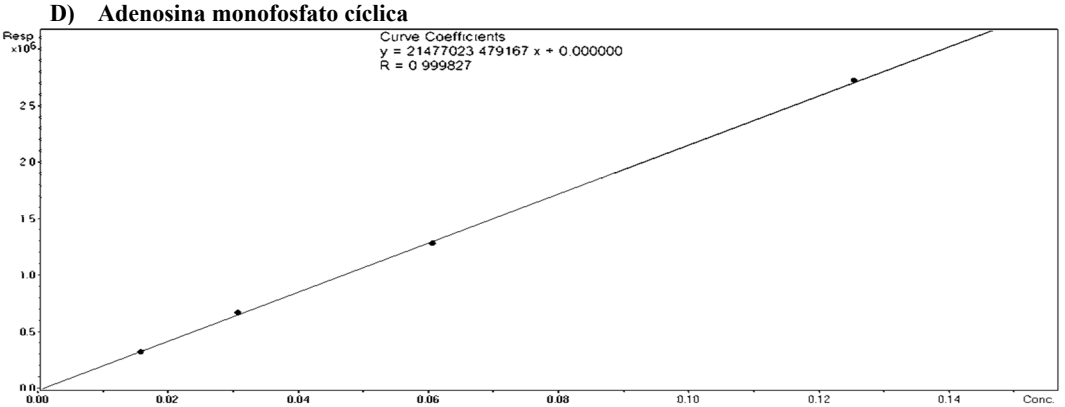
B) Adenosina difosfato



C) Adenina



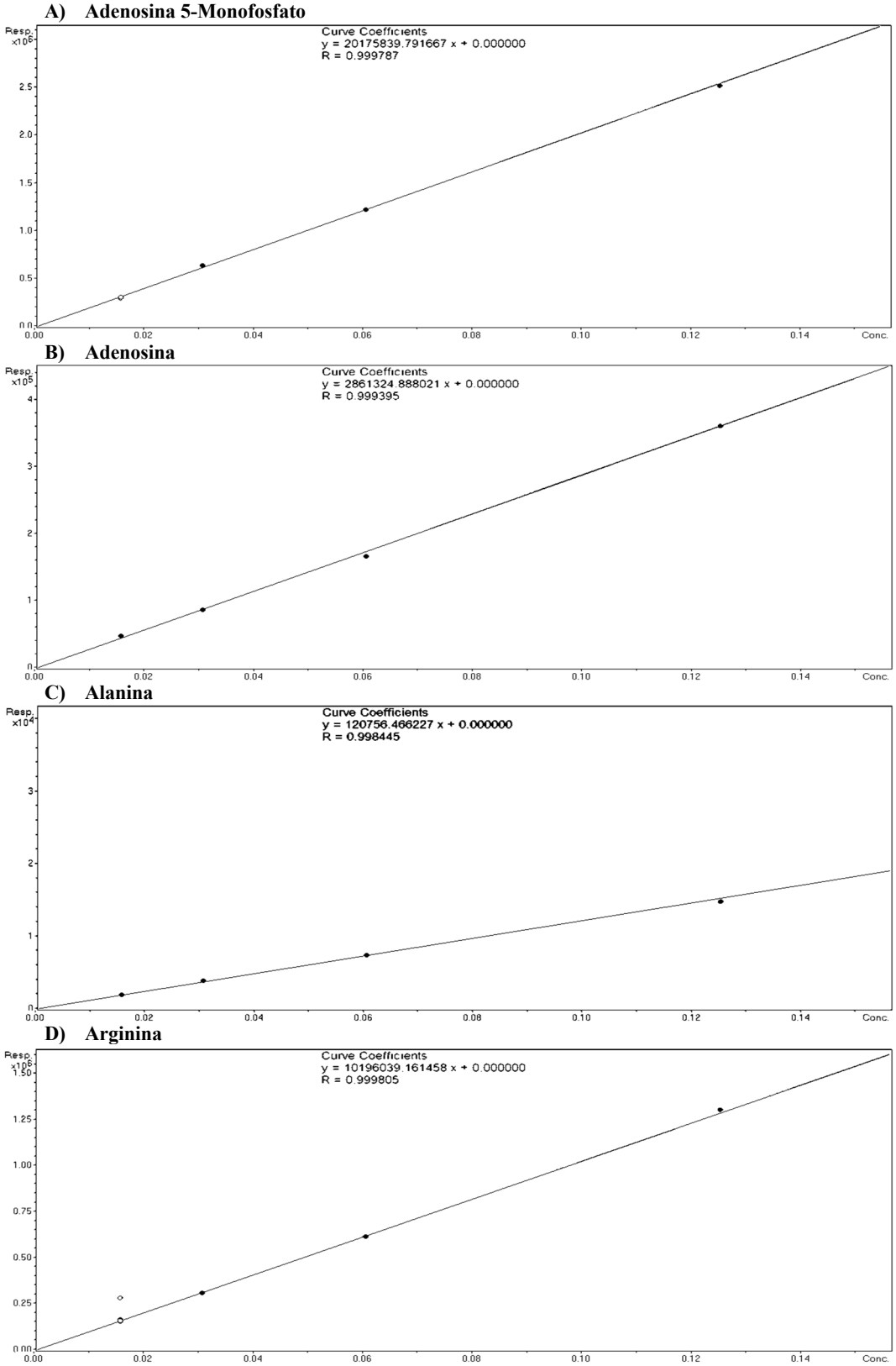
D) Adenosina monofosfato cíclica



Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) ácido maléico, B) adenosina difosfato, C) adenina e D) adenosina monofosfato cíclica, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

Fonte: dados da pesquisa.

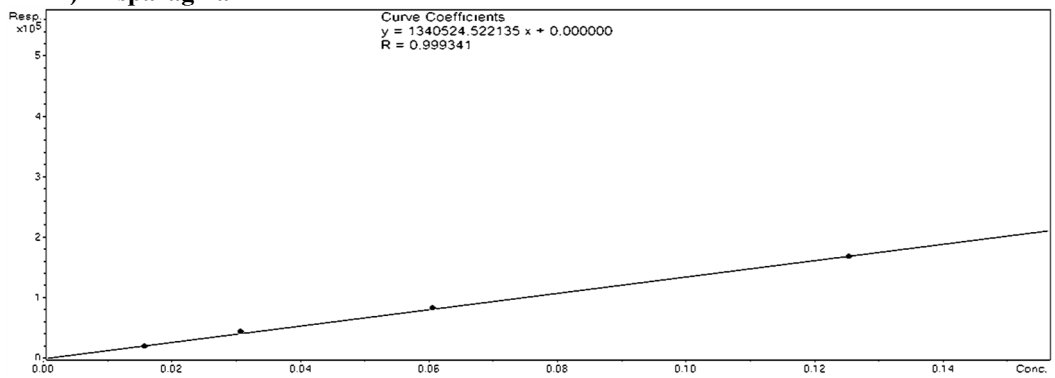
Figura C5: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) adenosina 5-monofosfato, B) adenosina, C) alanina e D) arginina



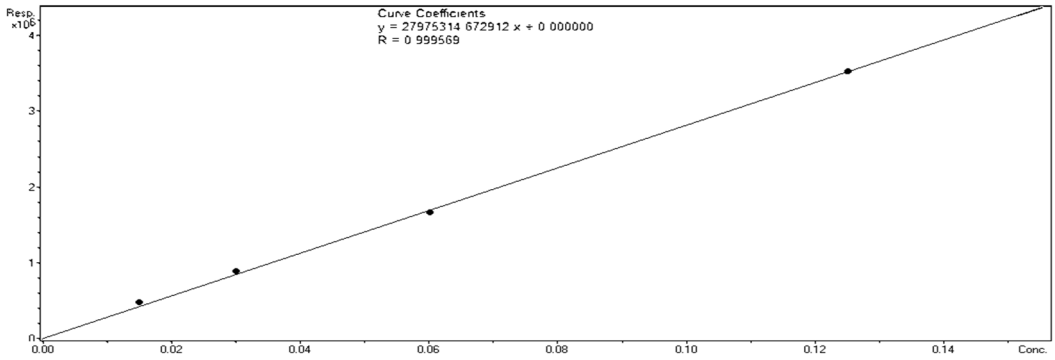
Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) adenosina 5-monofosfato, B) adenosina, C) alanina e D) arginina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C6: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) asparagina, B) betaína, C) cadaverina e D) Citosina

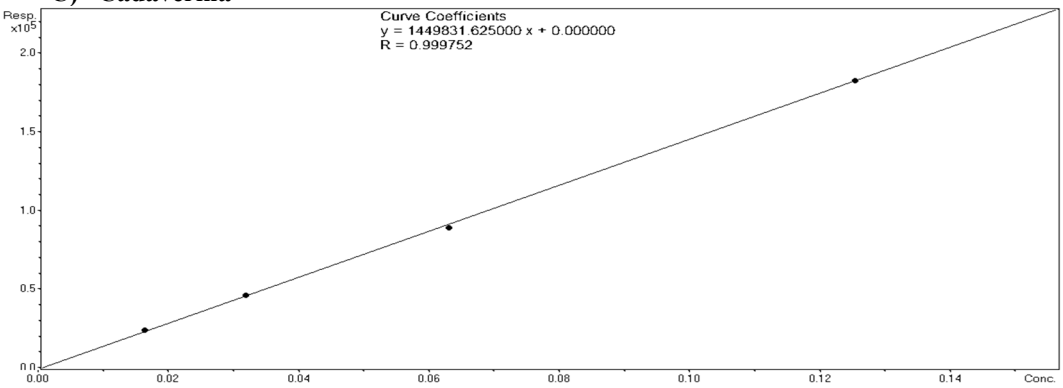
A) Asparagina



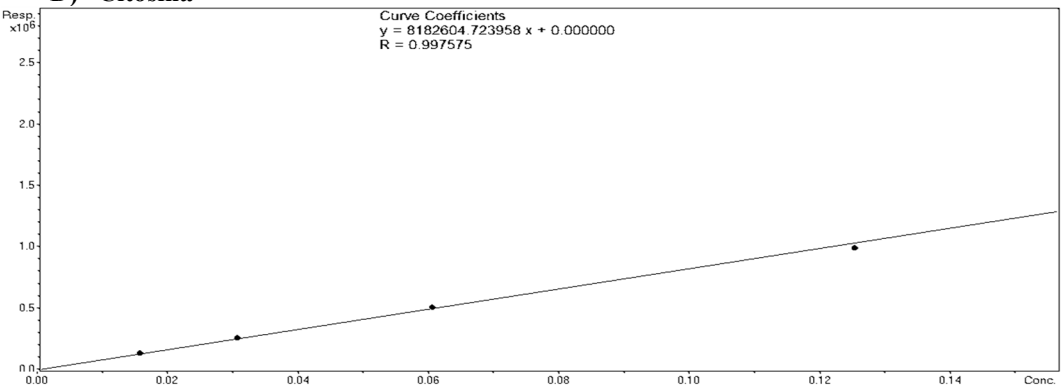
B) Betaína



C) Cadaverina



D) Citosina

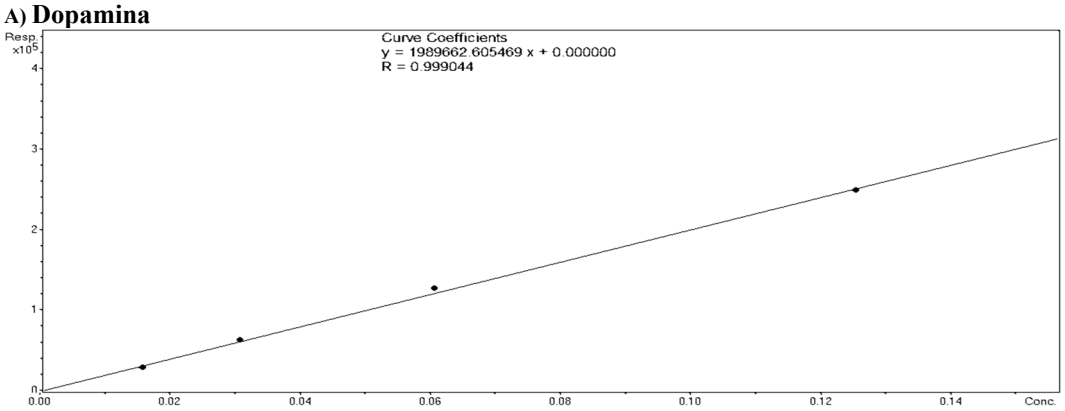


Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) asparagina, B) betaína, C) cadaverina e D) Citosina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

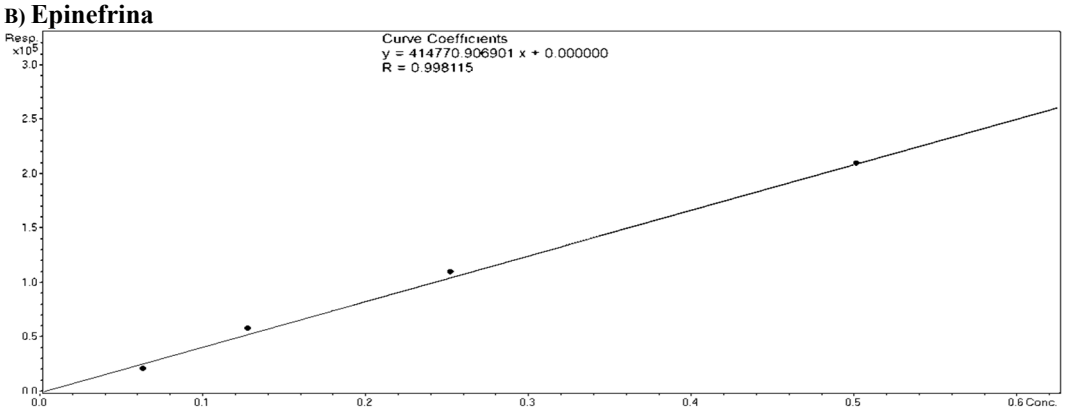
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C7: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) dopamina, B) epinefrina, C) espermidina e D) espermina

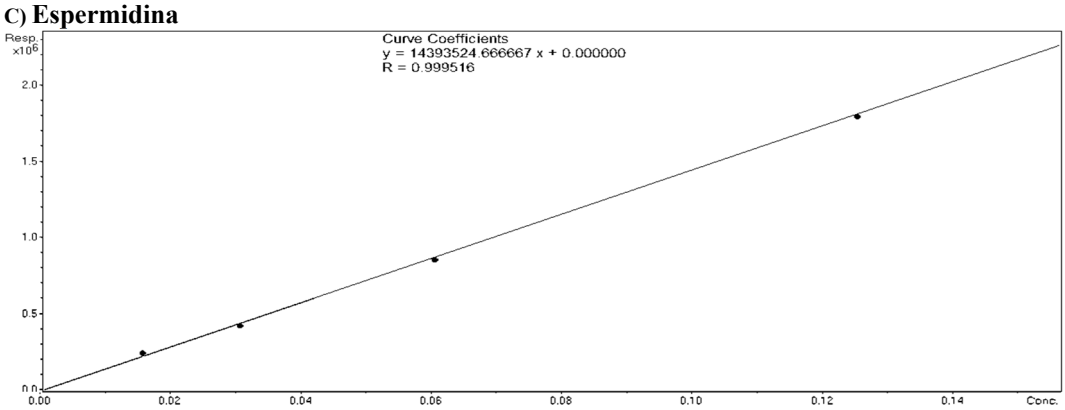
A) Dopamina



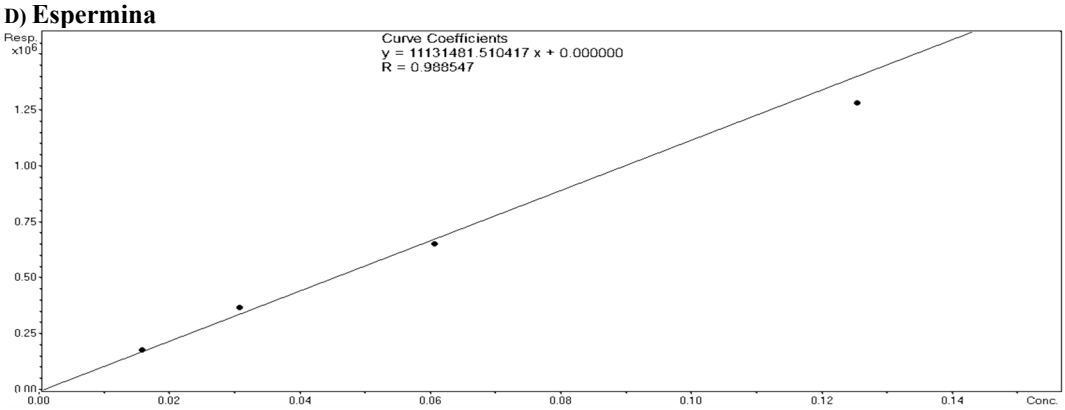
B) Epinefrina



C) Espermidina



D) Espermina

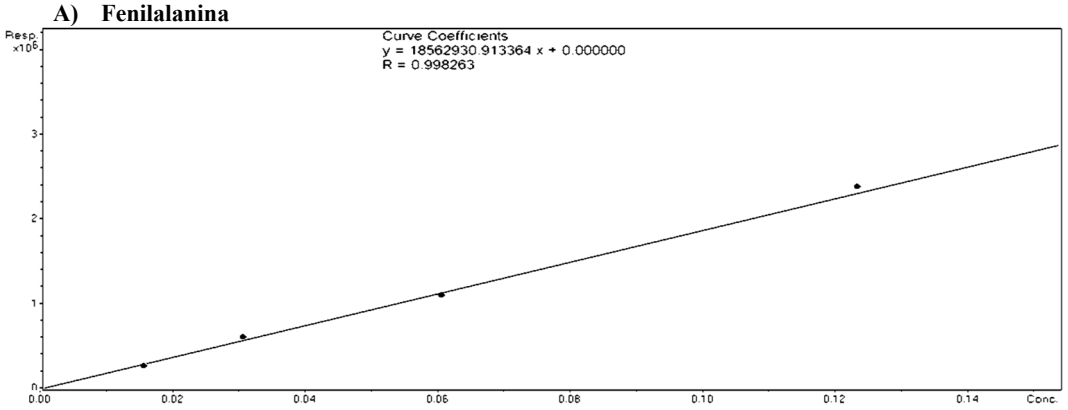


Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) dopamina, B) epinefrina, C) espermidina e D) espermina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

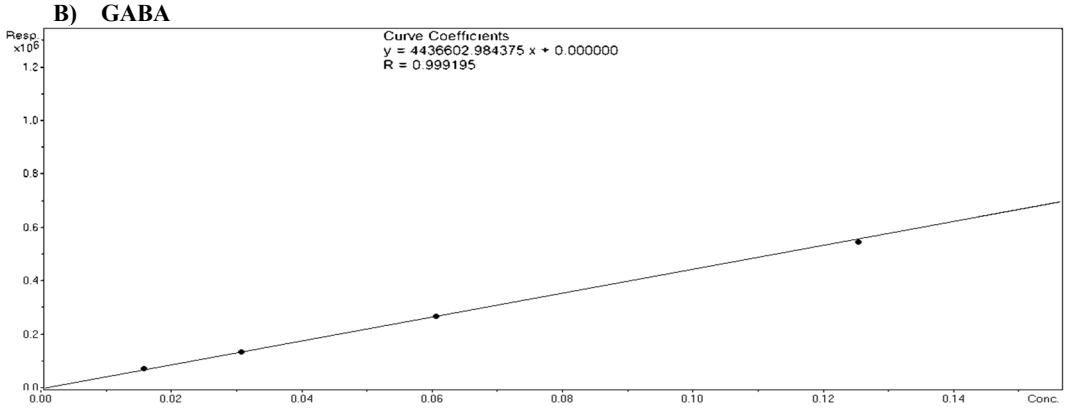
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C8: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) fenilalanina, B) GABA, C) glicina e D) glicose

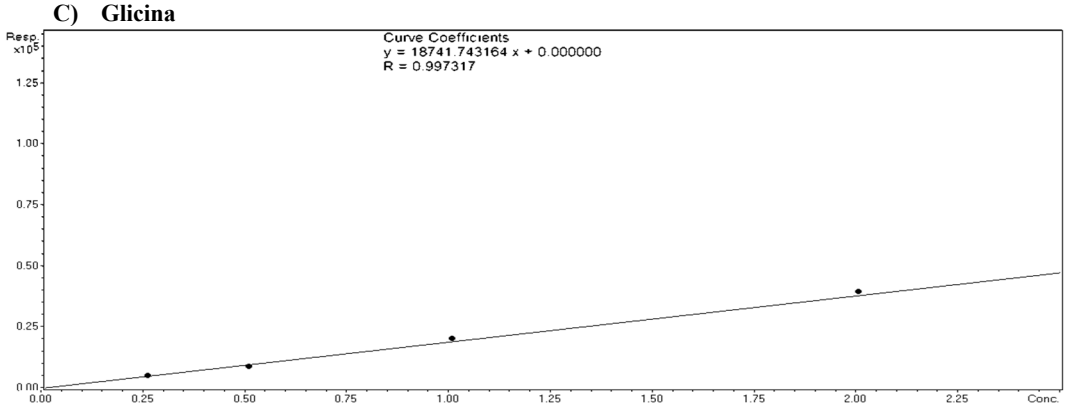
A) Fenilalanina



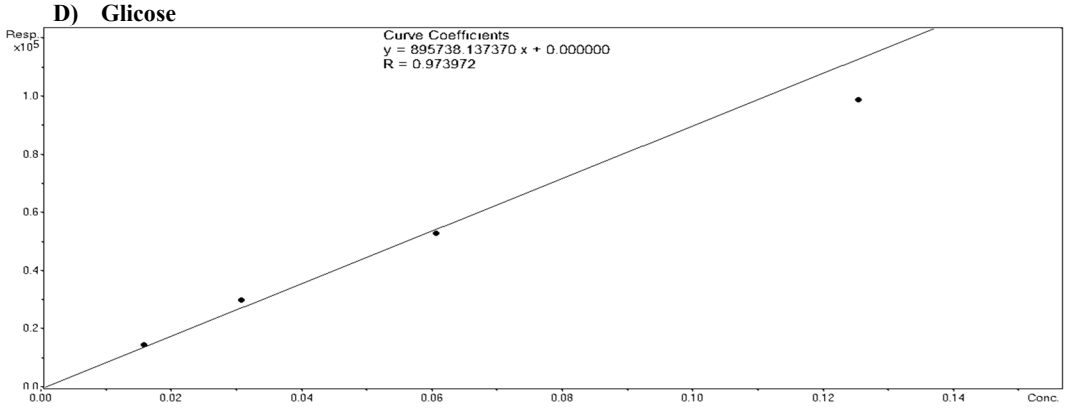
B) GABA



C) Glicina



D) Glicose



Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) fenilalanina, B) GABA, C) glicina e D) glicose, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

Fonte: dados da pesquisa.

Figura C9: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) glutamina, B) guanina, C) guanosina e D) guanosina difosfato

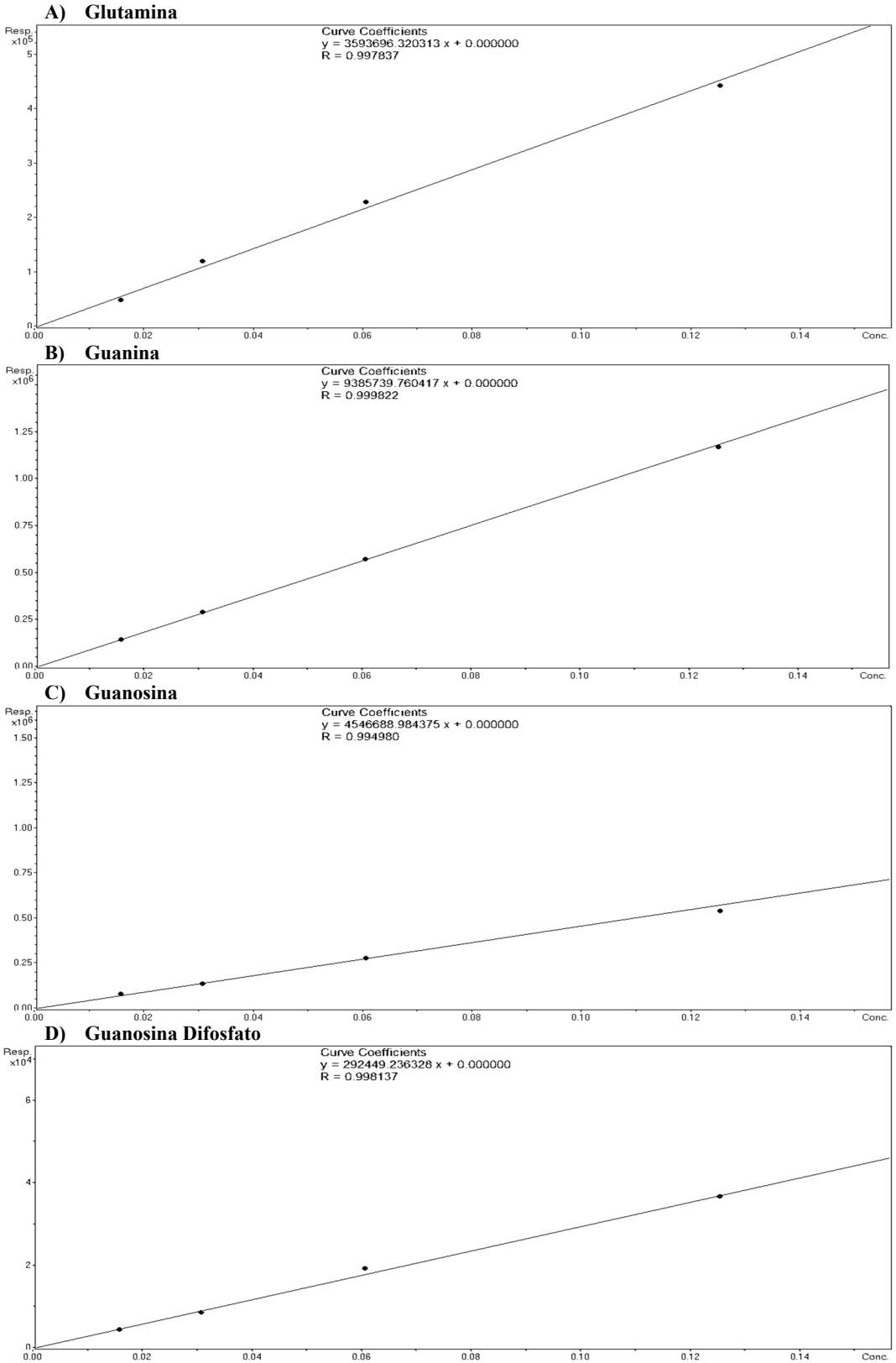
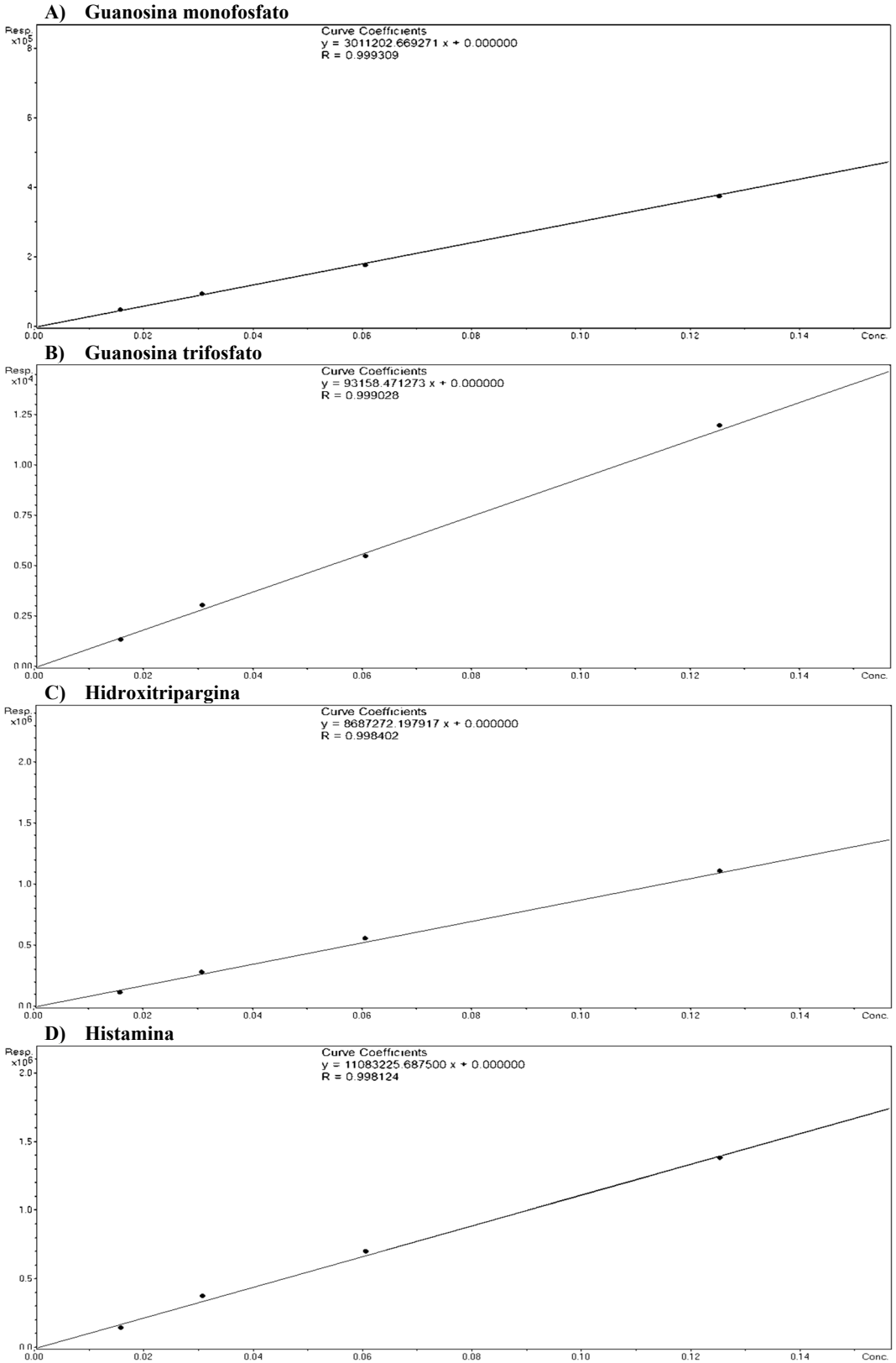


Figura C9: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) glutamina, B) guanina, C) guanosina e D) guanosina difosfato, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.
Fonte: dados da pesquisa.

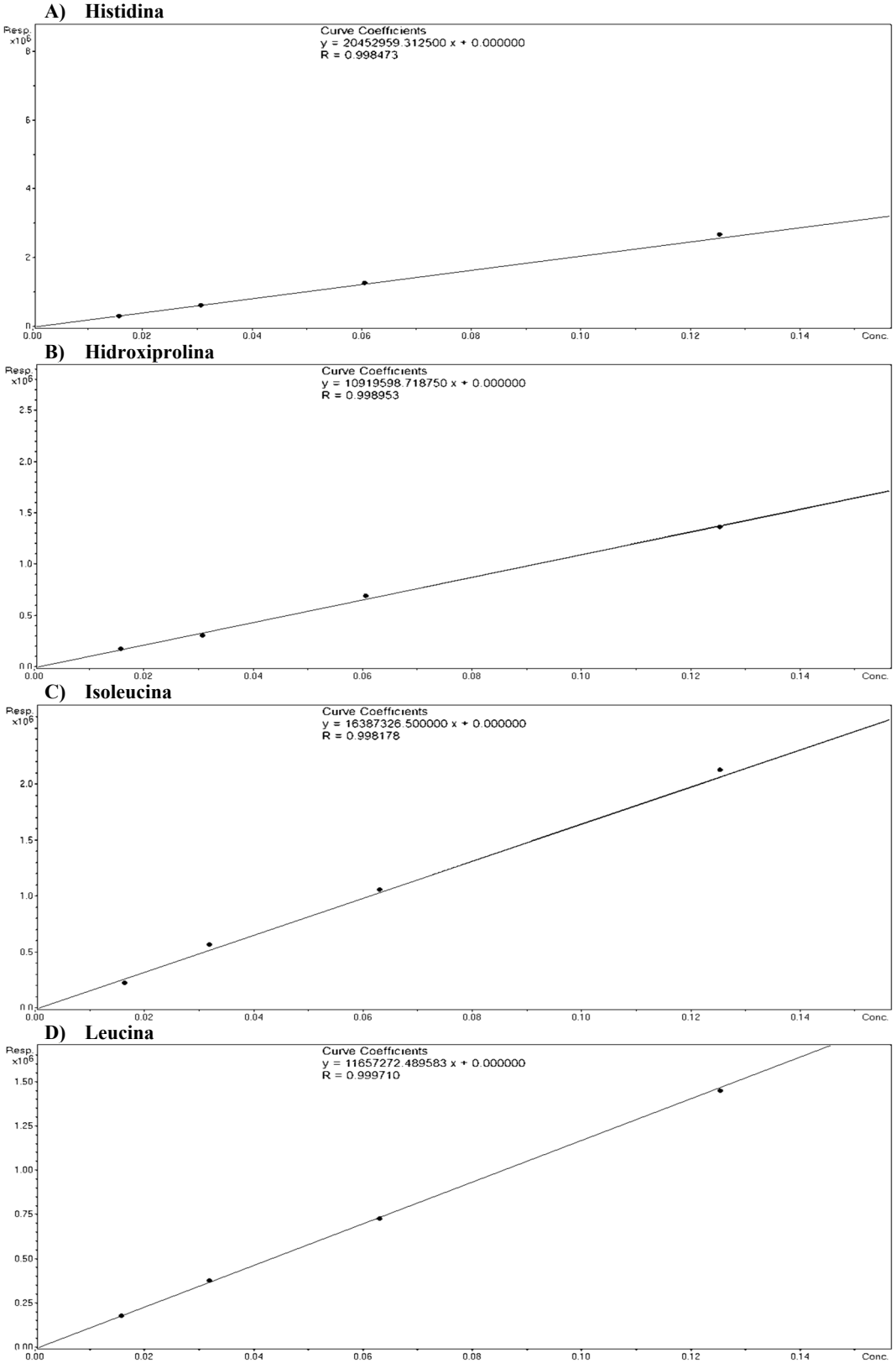
Figura C10: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) guanosina monofosfato, B) guanosina trifosfato,C) hidroxitripargina e D) histamina



Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) guanosina monofosfato, B) guanosina trifosfato, C) hidroxitripargina e D) histamina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

Fonte: dados da pesquisa.

Figura C11: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) histidina, B) hidroxiprolina, C) isoleucina e D) leucina

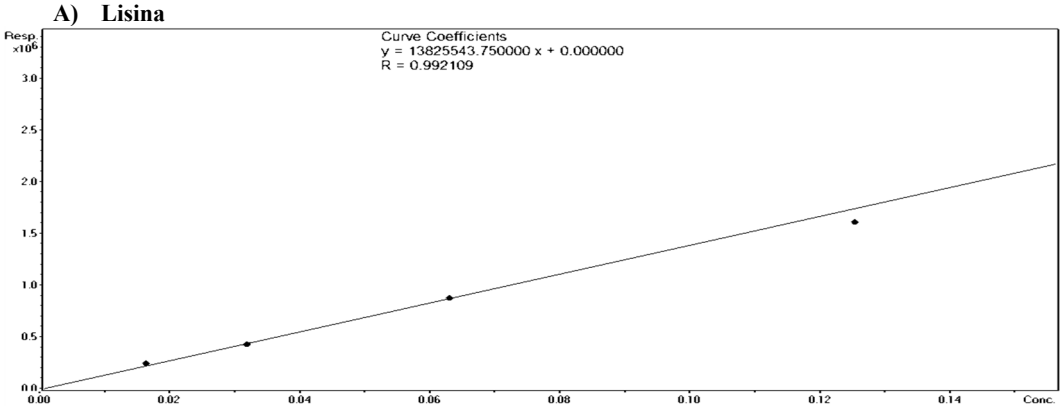


Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) histidina, B) hidroxiprolina, C) isoleucina e D) leucina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

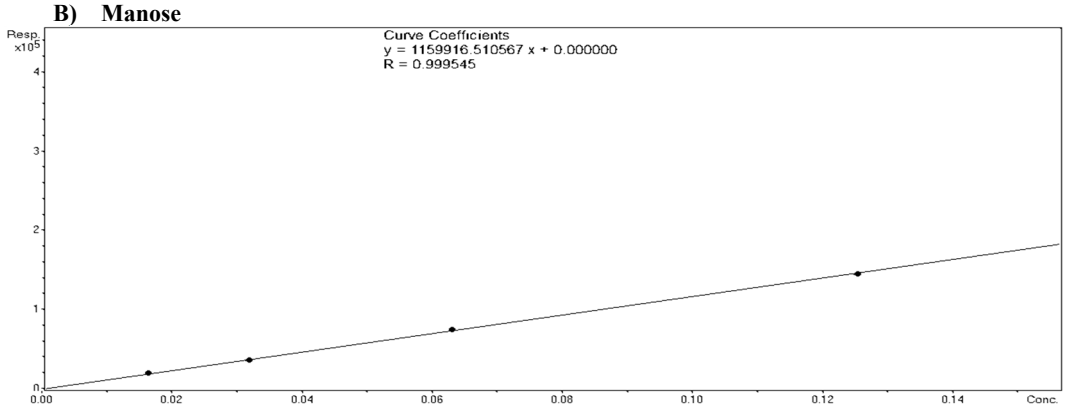
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C12: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) lisina, B) manose, C) metionina e D) nicotina

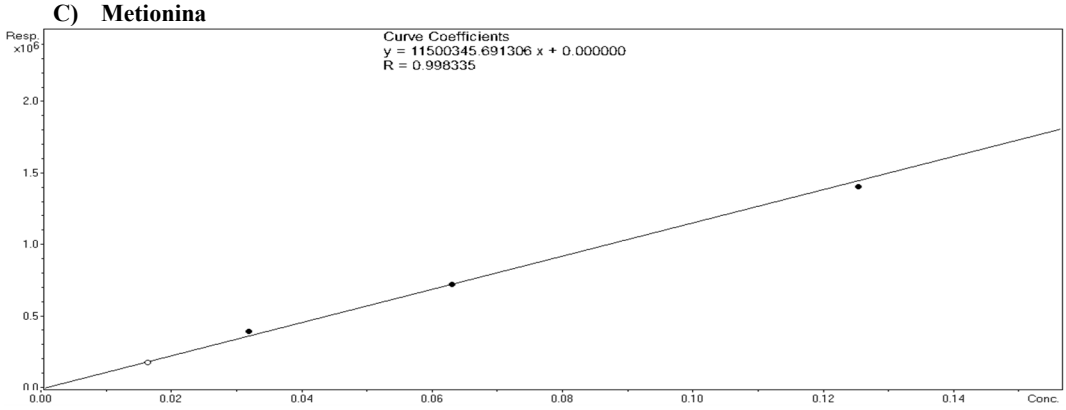
A) Lisina



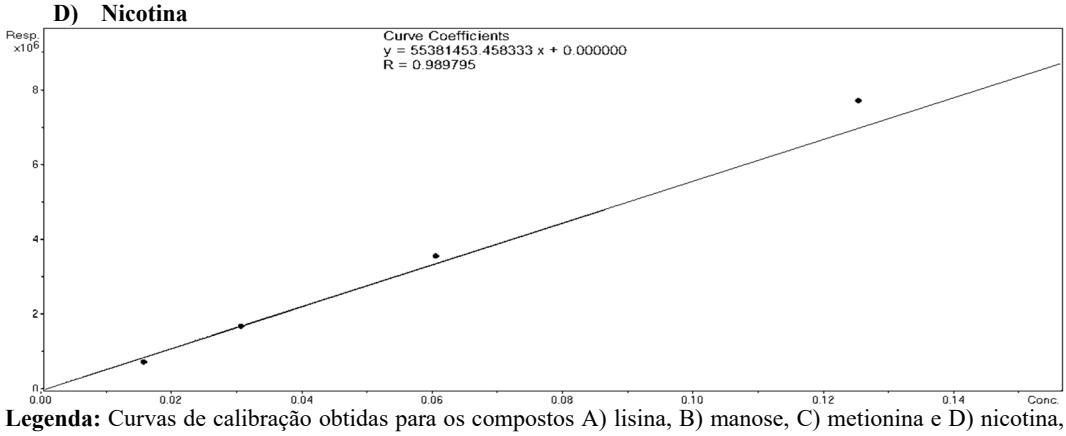
B) Manose



C) Metionina



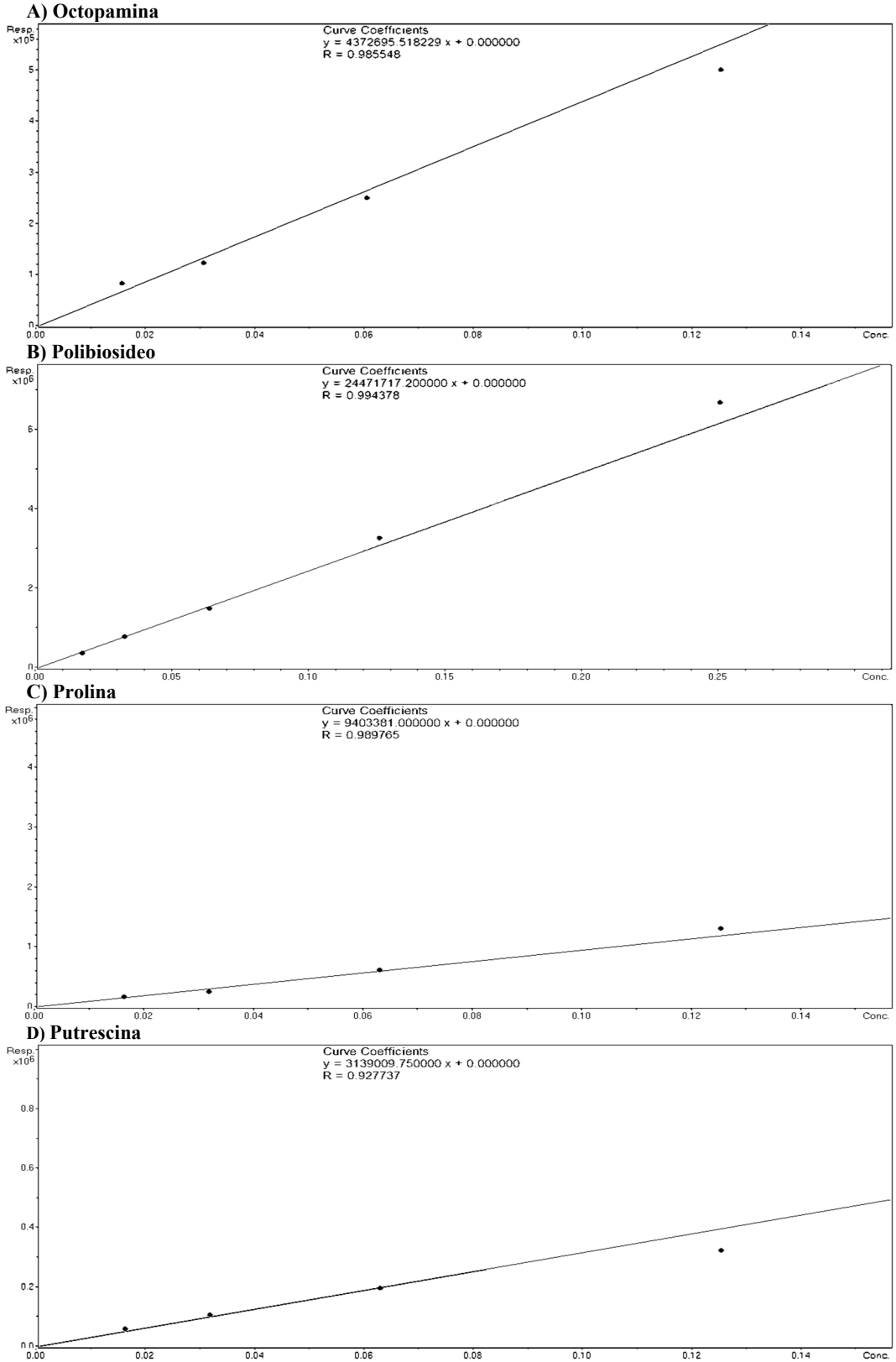
D) Nicotina



Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) lisina, B) manose, C) metionina e D) nicotina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

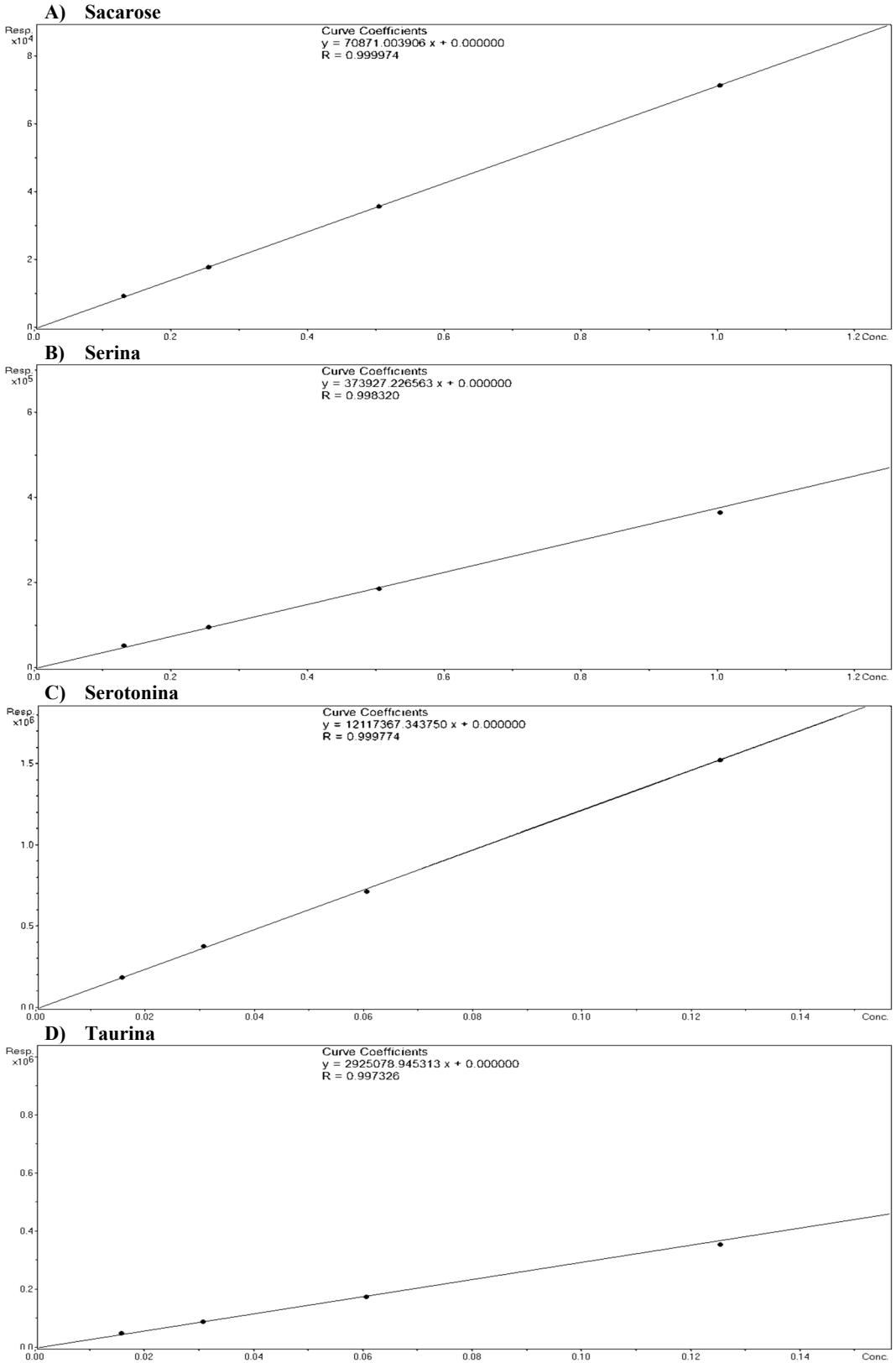
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C13: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) octopamina, B) polibiosideo, C) prolina e D) putrescina



Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) octopamina, B) polibiosideo, C) prolina e D) putrescina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.
Fonte: dados da pesquisa.

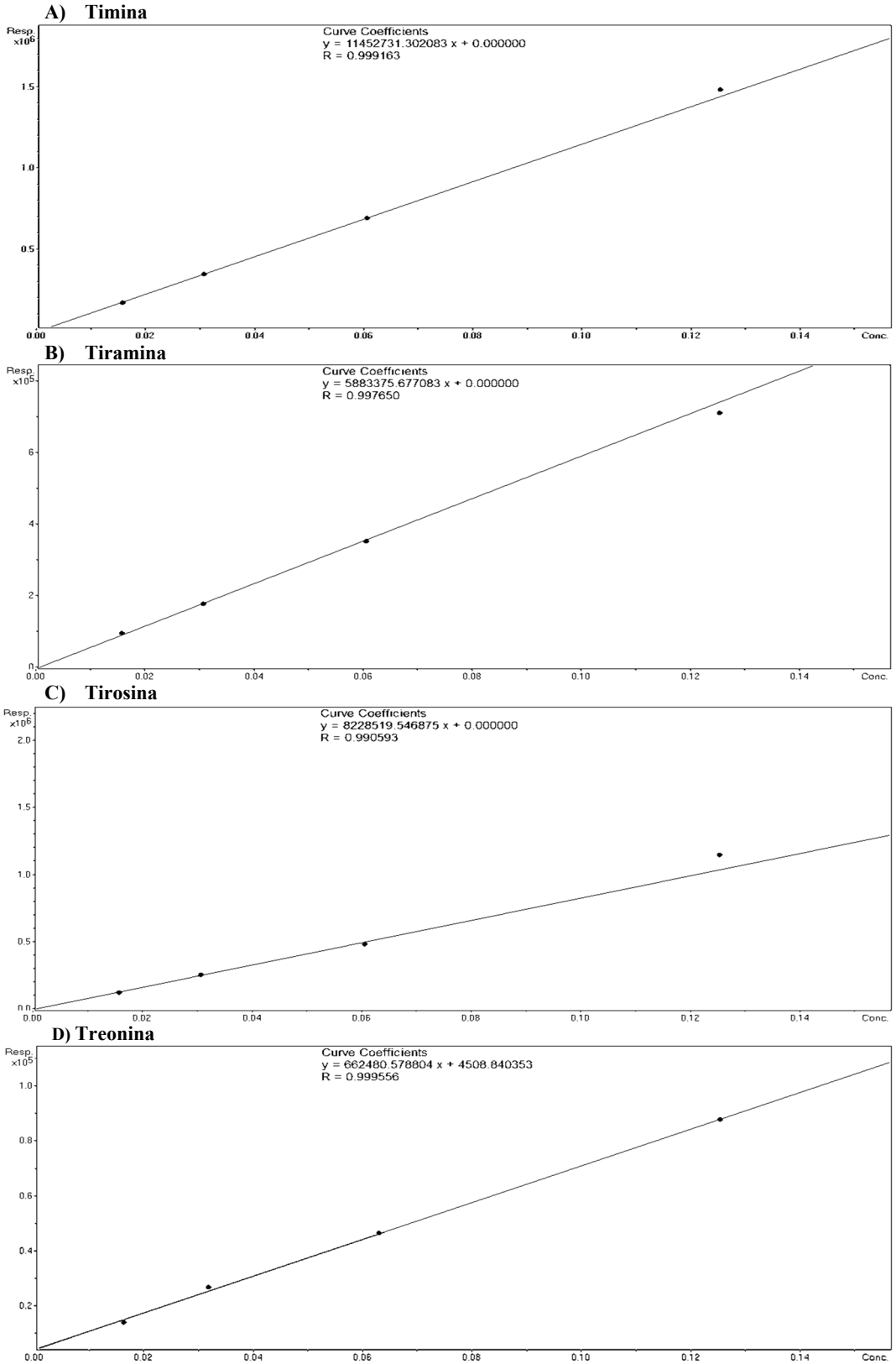
Figura C14: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) sacarose, B) serina, C) serotonina e D) taurina



Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) sacarose, B) serina, C) serotonina e D) taurina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

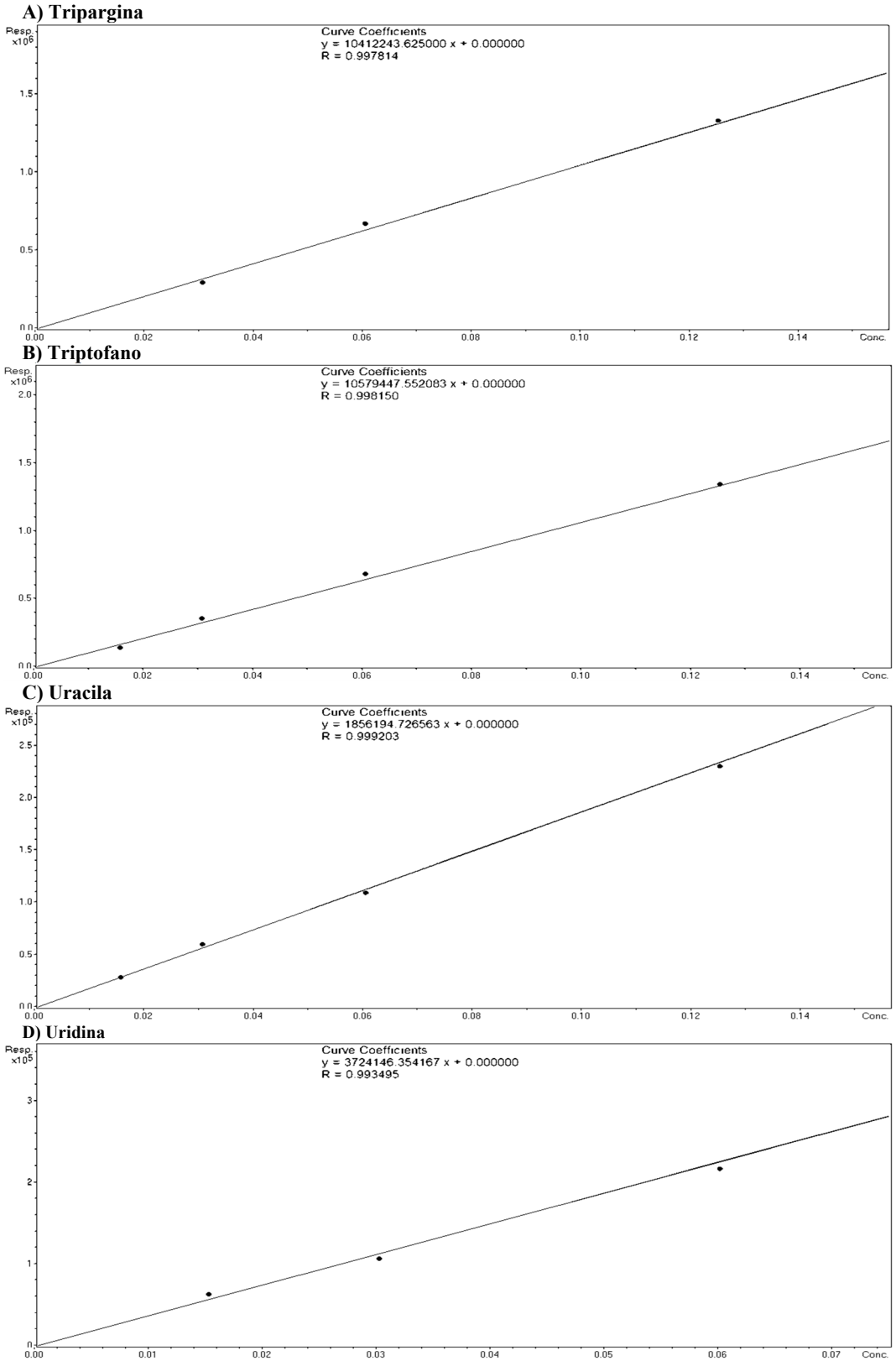
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C15: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) timina, B) tiramina, C) tirosina e D) treonina



Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) timina, B) tiramina, C) tirosina e D) treonina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura C16: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) tripargina, B) triptofano, C) uracila e D) uridina

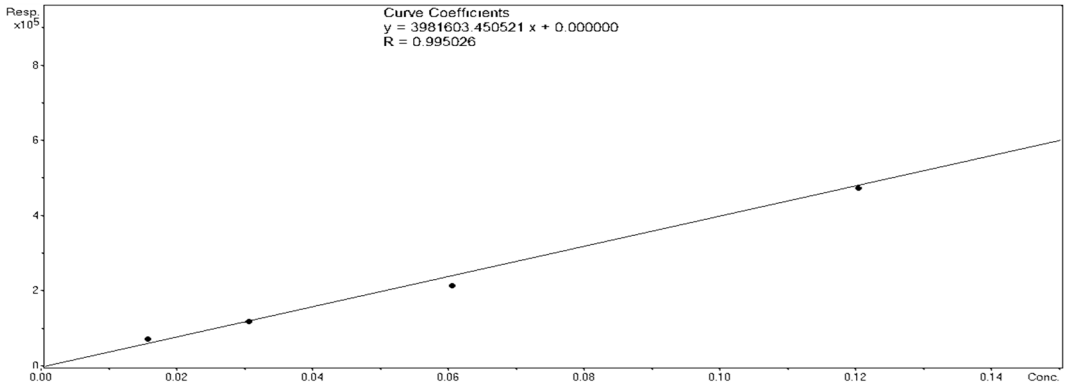


Legenda: Curvas de calibração obtidas para os compostos A) tripargina, B) triptofano, C) uracila e D) uridina, equações e coeficientes da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug.

Fonte: dados da pesquisa.

Figura C17: Curva de calibração obtida para o composto valina

Valina



Legenda: Curva de calibração obtida para o composto valina e sua equação e coeficiente da reta correspondentes. Os pontos equivalem às concentrações de 0.015ug; 0.03ug; 0.06ug e 0.125ug para este composto.

Fonte: dados da pesquisa.

APÊNDICE D: Tabela de aminoácidos

Nome (Símbolo)	Composição	Massa Média	Massa Monoisotópica	Íon Imonium
Alanina Ala ou A	C_3H_5NO	71,0788	71,03711	44
Arginina Arg ou R	$C_6H_{12}N_4O$	156,1876	156,10111	129 (112, 100, 87, 73, 70, 59)
Asparagina Asn ou N	$C_4H_6N_2O_2$	114,1039	114,04293	87 (70)
Ácido Aspártico Asp ou D	$C_4H_5NO_3$	115,0886	115,02694	88
Cisteina Cys ou C	C_3H_5NOS	103,1448	103,00919	76
Ácido Glutâmico Glu ou E	$C_5H_7NO_3$	129,1155	129,04259	102
Glutamina Gln ou Q	$C_5H_8N_2O_2$	128,1308	128,05858	101 (84, 129)
Glicina Gly ou G	C_2H_3NO	57,0520	57,02146	30
Histidina His ou H	$C_6H_7N_3O$	137,1412	137,05891	110 (166, 138, 123, 121, 82)
Isoleucina Ile ou I	$C_6H_{11}NO$	113,1595	113,08406	86 (72)
Leucina Leu ou L	$C_6H_{11}NO$	113,1595	113,08406	86 (72)
Lisina Lys ou K	$C_6H_{12}N_2O$	128,1742	128,09496	101 (129, 112, 84, 70)
Metionina Met ou M	C_5H_9NOS	131,1986	131,04049	104 (61)
Fenilalanina Phe ou F	C_9H_9NO	147,1766	147,06841	120 (91)
Prolina Pro ou P	C_5H_7NO	97,1167	97,05276	70
Serina Ser ou S	$C_3H_5NO_2$	87,0782	87,03203	60
Treonina Thr ou T	$C_4H_7NO_2$	101,1051	101,04768	74
Triptofano Trp ou W	$C_{11}H_{10}N_2O$	186,2133	186,07931	159
Tirosina Tyr ou Y	$C_9H_9NO_2$	163,1760	163,06333	136
Valina Val ou V	C_5H_9NO	99,1326	99,06841	72