

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/03/2018.

**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.

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*

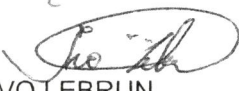
AUTORA: NATHALIA BAPTISTA DIAS

ORIENTADOR: MARIO SERGIO PALMA

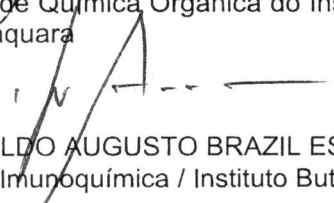
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


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 financeiro 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 sequência 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. bahiensis* 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 médica 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*.

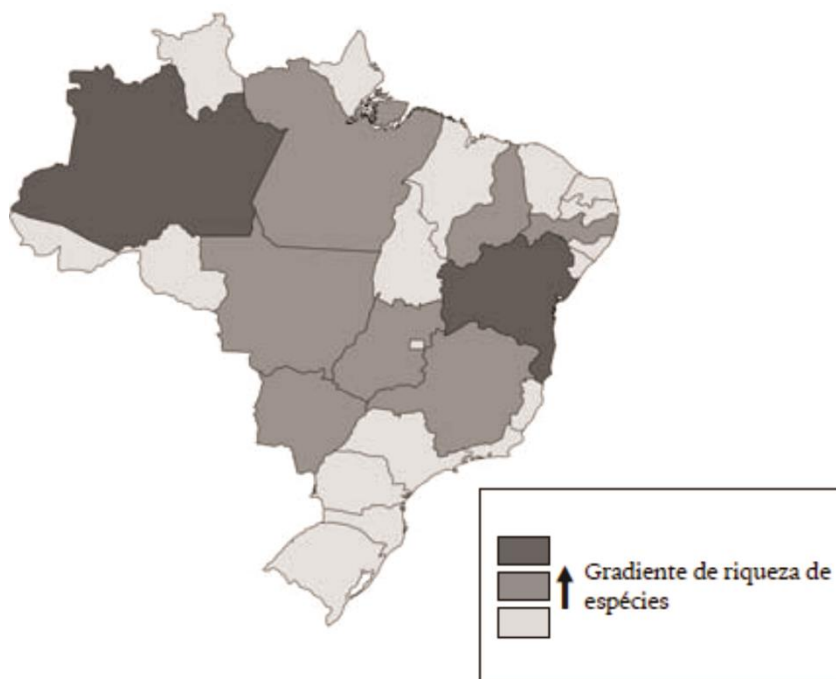
Fonte: adaptado de BRAZIL; PORTO (2010).

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.

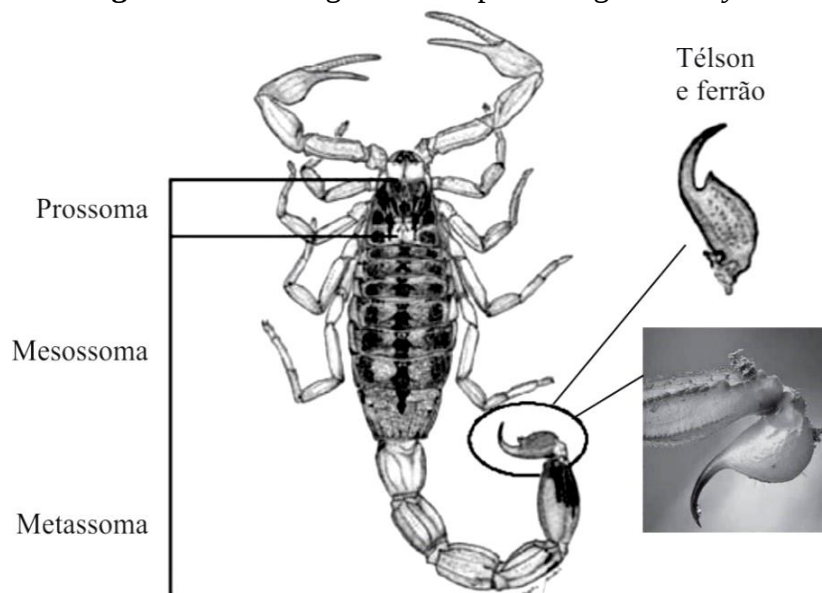
A espécie *T. serrulatus* é composta principalmente por fêmeas que se reproduzem assexuadamente (reprodução partenogenética) (SOUZA et al., 2009). Tal estratégia reprodutiva (reprodução assexuada) foi reportada para onze espécies em várias regiões do mundo, sendo cinco delas de ocorrência no Brasil: *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”.

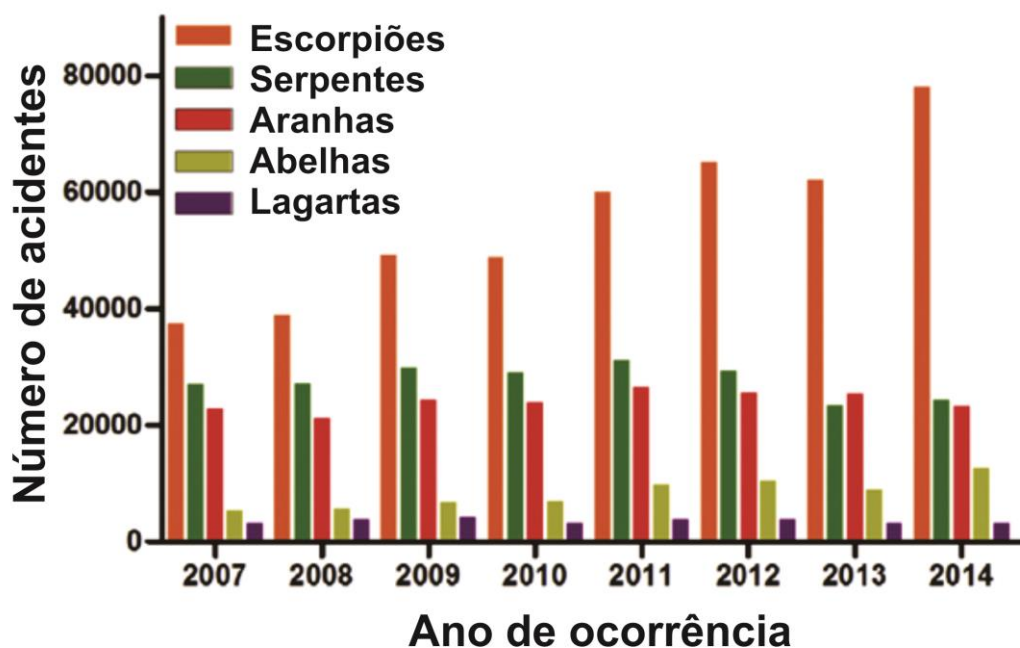
Os escorpiões inoculam o veneno pelo ferrão, para captura de suas presas e também como mecanismo de defesa (PLESSIS et al., 2008), sendo considerados animais peçonhentos. A gravidade depende de fatores como a espécie e o tamanho do escorpião, a quantidade de

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 diarreia); 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 (MARCUSSE et al., 2001).

A toxicidade dos venenos de escorpião parece ser específica 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 peptídeos básicos com ações neurotóxicas, 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 demonstrado 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 excluía das análises.

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 alguns 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 (MARCUSSE 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 circunstâncias, 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 excitação 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 espásticas (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 molar de 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 sequências, 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 primária 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 peptídeo da família das clorotoxinas (Bs-TX7) foi isolado a

partir do veneno do escorpião *Buthus indicus* (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 imperitoxinas (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 demonstraram 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 cisteínas 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 subfamílias 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 vóo), (BAUER et al., 2000). Esse tipo de fragmentação (por CID) permite fragmentação de peptídeos preferencialmente nas ligações amida ao longo da cadeia polipeptídica, gerando sequências 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 ionização 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 (MSⁿ).

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 performance, uma vez que o sistema IT é capaz de análises MSⁿ. 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 MSⁿ 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 diferentes amostras de veneno da vespa social *Polybia palista*, demonstrando a grande riqueza desses compostos através de análises de LCMS e MSⁿ.

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 metabólitos 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 abordagens

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*) metabólica": 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 metabólitos individualmente, mas comparar padrões ou "impressões digitais" de metabólitos 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 específicas 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 metabólitos 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 "Ômicas", 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 partículas 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).

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 biológicas. 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 células, 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 frequência 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 metabólica, 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 venomomics: 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 IKK β 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 sympathetic nerves of rat vas deferens by the toxin TsTX-I from Brazilian 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.; NAOIKI, 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.; NAOIKI, 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 MSⁿ 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 orthogonal injection 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: theoretical 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 link between 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.; BHADARIA, 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.; TWYXCROSS, 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 Ca^{2+} and guanine 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.; RAUBITSCHKE, 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 exultans*) 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.

LOURENÇO, 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.; RAUBITSCHKE, A.; NABORS, L. B.; FIVEASH, J. B.; SHEN, S.; KHAZAEI, 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 Ca²⁺-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 plus-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 edema induced 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.; KNYSACK, 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.; GASPAS, 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, self-association 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. Immunopharmacol.**, 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, characterization 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.; BUSS, 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 peroxynitrite 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-aminonicotinamide. **J. Nutr.**, v. 65, n. 2, p. 199-209, 1958.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry 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-Verlag, 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.