



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO  
LICENCIATURA INTEGRADA EM BIOLOGIA E QUÍMICA – PERCUSO QUÍMICA**

**FABRÍCIA AMARAL ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE EM MAMÍFERO E DO RECONHECIMENTO  
IMUNOQUÍMICO DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus obscurus***

Santarém

2021

**FABRÍCIA AMARAL ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE EM MAMÍFERO E DO RECONHECIMENTO  
IMUNOQUÍMICO DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus obscurus***

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Coordenação do curso de Licenciatura em Química para obtenção do grau de Licenciada em Biologia e Química com habilitação em Química pela Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da educação, sob Orientação da Professora Doutora Deyanira Fuentes Silva e Coorientação do Professor Doutor Joacir Stolarz de Oliveira.

**Santarém**

**2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas (SIBI) da UFOPA  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFOPA -  
Biblioteca Unidade Rondon

Rocha, Fabricia Amaral.

Caracterização da toxicidade em mamífero e do reconhecimento imunoquímico da peçonha do escorpião *Tityus obscurus* / Fabricia Amaral Rocha. - Santarém, 2021.

37fl.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA. Instituto de Ciências da Educação-ICED. Licenciatura Integrada em Biologia e Química - Percurso Química.

Orientador: Deyanira Fuentes Silva.

Coorientador: Joacir Stolarz de Oliveira.

1. Escorpionismo. 2. DL50. 3. Soro antiescorpiônico. I. Silva, Deyanira Fuentes. II. Oliveira, Joacir Stolarz de. III. Título.

UFOPACampus Rondon

CDD 23.ed. 615.94

**FABRÍCIA AMARAL ROCHA**

**CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE EM MAMÍFERO E DO RECONHECIMENTO  
IMUNOQUÍMICO DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus obscurus*.**

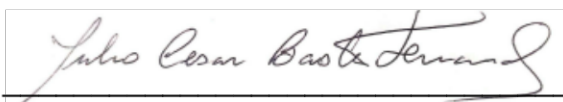
Trabalho de conclusão de curso apresentado a Coordenação do curso de licenciatura em Química para obtenção do grau de Licenciado em Biologia e Química com habilitação em Química pela Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências da educação, sob Orientação da Professora Doutora Deyanira Fuentes Silva e Coorientação do Professor Doutor Joacir Stolarz de Oliveira.

Conceito: 8,1 (oito vírgula um)

Data da aprovação: 03/09/2021



Professora Doutora Deyanira Fuentes Silva – Orientadora  
Universidade Federal do Oeste do Pará



Professor Doutor Julio Cesar Bastos Fernandes – 1º Avaliador  
Universidade Federal do Oeste do Pará



Professor Doutor Juarez de Souza – 2º Avaliador  
Instituto Esperança de Ensino Superior – IESPES

Aos meus pais, Miriam e Dinaildo, por todo amor e incentivo. Às minhas irmãs e aos meus sobrinhos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Química e Estrutura de Macromoléculas Biológicas e ao Laboratório de Fisiologia e Toxinas Animais, que foi a minha segunda casa durante esses cinco anos de estágio, onde compartilhei inúmeros momentos, agradeço por toda estrutura que possibilitou a realização desse trabalho.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Deyanira Fuentes Silva, pela orientação durante todos esses anos, por fazer parte da minha formação acadêmica compartilhando sua sabedoria e conhecimentos, por sempre acreditar no meu potencial, até mesmo quando eu duvidava, por todos os conselhos e conversas que me ajudaram a evoluir, por ser essa profissional extremamente comprometida que se preocupa com o aprendizado dos seus alunos e que tem grande amor por sua pesquisa. Eu realmente aprendi muito com a Senhora. Obrigada!

Ao meu coorientador Prof. Joacir Stolarz de Oliveira, por todo apoio na realização das atividades do laboratório, por todos os conselhos, por sempre compartilhar seus conhecimentos e explicar de maneira tão clara sobre qualquer conteúdo ou procedimento do laboratório quando eu tinha dúvida. Obrigada!

À minha mãe, Miriam, por toda dedicação, por sempre me incentivar a seguir o caminho do conhecimento, que apesar das dificuldades sempre me apoiou, principalmente nos meus momentos difíceis, de desânimo e cansaço. Agradeço por todo amor, todas orações, toda compreensão e todos os princípios que me ensinou. A senhora é meu maior exemplo, minha inspiração!

Às minhas irmãs, Mayara, Larissa e Sabrina, pelo apoio, amizade e companheirismo em todas as fases da minha vida, sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

Aos meus amigos Samuel e Victor, com quem pude dividir minhas dúvidas, minhas angústias e felicidades durante todo o percurso acadêmico, obrigada pela amizade, companheirismo e parceria nos estudos, vocês me ajudaram a superar cada obstáculo que a graduação impôs e foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Às minhas amigas Alyne e Emanuela, que mesmo distante, sempre me apoiaram, acreditaram em mim e me deram força para não desistir.

Às minhas amigas Brenna e Elimary, minhas parceiras de laboratório, que sempre estiveram dispostas a me ajudar, que me aconselhavam e me encorajavam diariamente, com vocês, dividi as melhores conversas e os melhores cafés.

Às minhas colegas de curso Ellen, Wayla e Simone, por todas as conversas, todos os almoços, estudos, risadas e companhia durante esses anos de graduação.

Ao técnico em laboratório Railson Moraes Franco, do Instituto Esperança de Ensino Superior (IESPES), pelos camundongos cedidos para realização dos experimentos.

A todos os meus colegas que estagiaram no laboratório ao longo desses anos que estive por lá.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

A vocês, minha gratidão!

“Seja comum, seja simples, seja você quem for. Não há necessidade de ser importante, a única necessidade é de ser real. Ser real é existencial. Ser importante é viagem do ego.”

– Osho.

## RESUMO EM LÍNGUA PORTUGUESA

O acidente causado pela picada de escorpião, denominado escorpionismo, compreende um sério problema de saúde pública. No Brasil, os escorpiões de importância médica, pertencem ao gênero *Tityus*, sendo *T. obscurus* o responsável pelos principais envenenamentos graves na região Norte. A incidência desses envenenamentos vem aumentando no estado do Pará, onde acidentes graves já foram descritos. O tratamento para esses envenenamentos baseia-se na soroterapia, na qual é utilizado um soro antiescorpiônico específico para a peçonha do escorpião *T. serrularus*. Neste trabalho, determinamos a toxicidade (Dose Letal 50%) da peçonha de *T. obscurus*, onde três experimentos foram realizados com grupos de 5 camundongos fêmeas e machos, segundo o protocolo da organização mundial da saúde. Um soro anti-*T. obscurus* foi produzido em camundongos, esses animais foram injetados via intraperitoneal, com a peçonha de *T. obscurus* e, posteriormente, receberam mais sete reforços a cada 15 dias. A partir disso, foram realizados testes imunológicos, ELISA e Western Blott, para o reconhecimento do soro produzido em camundongos e do soro antiescorpiônico comercial, pelas peçonhas de *T. obscurus* e *T. serrulatus*. Também foi realizada a soro-neutralização, onde diluições dos soros, anti-*T. obscurus* ou soro comercial, foram misturadas com três doses letais da peçonha de *T. obscurus* ou *T. serrulatus* e inoculadas em camundongos. Os resultados obtidos no experimento de toxicidade foram analisados pelo teste estatístico Probit e apresentou uma dose letal de 3,54 mg/kg de camundongo. Os ensaios de ELISA e Western blott mostraram reconhecimento do soro de camundongo pela peçonha de *T. obscurus* e *T. serrulatus*. No entanto, nesses ensaios o soro comercial não reconheceu a peçonha de *T. obscurus* e apenas apresentou reconhecimento pela peçonha de *T. serrulatus*. Os testes *in vivo* evidenciaram que o soro de camundongo e o soro comercial não neutralizam as toxinas da peçonha de *T. obscurus*. Esses resultados demonstram que a peçonha de *T. obscurus* possui alta toxicidade e o soro antiescorpiônico comercial é ineficaz para tratar o envenenamento deste escorpião.

**Palavras Chaves:** escorpionismo; DL50; soro antiescorpiônico; *Tityus obscurus*.

## ABSTRACT

The envenomation caused by the scorpion sting, called scorpionism, comprises a serious public health problem. In Brazil, medically important scorpions belong to the genus *Tityus*, with *T. obscurus* responsible for the envenomation in the North region. The incidence of these envenomation has been increasing in the state of Pará, where serious cases have already been recorded. The treatment for scorpionism is based on serum therapy, which uses a specific antivenom against *T. serrularus*. In this work, we determined the toxicity (Lethal Dose 50%) of *T. obscurus* venom, performing three experiments with groups of 5 female and male mice, according to the World Health Organization protocol. An anti-*T. obscurus* serum was produced in mice, the animals were injected intraperitoneally, with the *T. obscurus* venom followed by seven boosters every 15 days. From this, immunochemical tests, ELISA and Western Blott, were performed to recognize the serum produced in mice and the commercial serum by the *T. obscurus* and *T. serrulatus* venom. In addition, seroneutralization was performed, with dilutions of anti-*T. obscurus* or commercial serum mixed with three lethal doses of the *T. obscurus* or *T. serrulatus* venom, followed by injection into mice. The results obtained in the toxicity experiment were analyzed by the Probit statistical test and a 3.54 mg/kg LD<sub>50</sub> determined. The ELISA and Western blott assay showed mouse serum recognition by the *T. obscurus* and *T. serrulatus* venom. However, in these assays the commercial serum did not recognize *T. obscurus* and only showed recognition by the *T. serrulatus* venom. *In vivo* tests evidenced that mouse and commercial sera do not neutralize *T. obscurus* venom toxins. These results demonstrate that *T. obscurus* venom has high toxicity and the commercial antiscorpion serum is ineffective to treat envenomation caused by this scorpion species.

Keywords: scorpionism; LD<sub>50</sub>; antivenom; *Tityus obscurus*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> SDS-PAGE 15% da peçonha bruta de <i>T. obscurus</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> Soro de camundongos imunizados com peçonha de <i>T. obscurus</i> .....	24
<b>Figura 3.</b> Reconhecimento de <i>T. obscurus</i> pelos soros pré-imune, 1ª sangria, hiperimune e soro comercial.....	25
<b>Figura 4.</b> Reconhecimento <i>T. serrulatus</i> pelos soros anti- <i>T. obscurus</i> , soro comercial na diluição de 1:1000. ....	26
<b>Figura 5.</b> Ensaios de Western Blott com soro de camundongo Anti- <i>T. obscurus</i> .....	27
<b>Figura 6.</b> Ensaios de Western Blott com soro comercial.....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Taxa de mortalidade por cada experimento de toxicidade realizado.....	23
<b>Tabela 2.</b> Resultado da soroneutralização em camundongos.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA – Método do Ácido bicinconínico

ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)

DL<sub>50</sub> – Dose Letal 50%

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio eletroforese

IC – Intervalo de confiança

IgG – Imunoglobulina G

g – Grama

h – Hora

i.p. – Intraperitoneal

µg – Micrograma

µL – Microlitro

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

OPD – o-fenilenodiamina

kDa – Quilodalton

kg – Quilograma

rpm – Rotações por minuto

PBS - Tampão fosfato-salino

Tris-HCl – Tris(hidroximetil)aminometano-Ácido clorídrico

UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará

V – Volt

(v/v) – Relação volume/volume

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
2.1. EXTRAÇÃO DAS PEÇONHAS .....	18
2.2. DOSAGEM PROTEICA.....	18
2.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS PAGE 15%.....	19
2.4. DOSE LETAL 50% (DL <sub>50</sub> ) .....	19
2.5. IMUNIZAÇÃO.....	20
2.6. ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA - ELISA.....	20
2.7. ENSAIOS DE WESTERN BLOTT .....	21
2.8. ENSAIO DE SORONEUTRALIZAÇÃO.....	21
<b>3. RESULTADOS</b> .....	22
3.1. DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES DAS PROTEÍNAS DA PEÇONHA DE <i>T. obscurus</i> .....	22
3.2. ENSAIO DE TOXICIDADE DA PEÇONHA DE <i>T. obscurus</i> .....	23
3.3. OBTENÇÃO DE SORO ANTIESCORPIÔNICO E AVALIAÇÃO DO RECONHECIMENTO DA PEÇONHA DE <i>T. obscurus</i> .....	24
3.4. SORONEUTRALIZAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA PEÇONHA .....	28
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34

**<sup>1</sup>ARTIGO**

**CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE EM MAMÍFERO E DO RECONHECIMENTO IMUNOQUÍMICO DA PEÇONHA DO ESCORPIÃO *Tityus obscurus***

Fabília Amaral Rocha<sup>1</sup>, Joacir Stolarz de Oliveira<sup>2</sup>, Deyanira Fuentes Silva<sup>1\*</sup>. <sup>1</sup> Laboratório de Química e Estrutura de Macromoléculas Biológicas; <sup>2</sup> Laboratório de Fisiologia e Toxinas Animais, Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Instituto de Ciências da Educação – ICED S/N Marechal Rondon, Avenida Caranazal, CEP 68040-070, Santarém, PA, Brasil.

\*Correspondência: [deyanira.ufopa@gmail.com](mailto:deyanira.ufopa@gmail.com).

---

<sup>1</sup> O artigo apresentado foi redigido conforme as diretrizes de submissão da revista Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. As normas indicadas para a redação de artigos pela revista se encontram no link <http://www.jvat.com.br/guide-for-authors>.

## Resumo

**Antecedentes:** O acidente causado pela picada de escorpião, denominado escorpionismo, compreende um sério problema de saúde pública. No Brasil, os escorpiões de importância médica, pertencem ao gênero *Tityus*, sendo *Tityus obscurus* o principal responsável pelos envenenamentos na região Norte. A incidência desses envenenamentos vem aumentando no estado do Pará, onde acidentes graves já foram descritos. O tratamento para esses envenenamentos baseia-se na soroterapia, na qual é utilizado um soro antiescorpiônico específico para peçonha do escorpião *T. serrularus*. **Métodos:** Determinamos a toxicidade da peçonha de *T. obscurus* mediante a realização de três experimentos com grupos de 5 camundongos fêmeas e machos, segundo o protocolo da Organização Mundial da Saúde. Um soro anti-*T. obscurus* foi produzido em camundongos, esses animais foram injetados uma primeira vez, via intraperitoneal, com a peçonha de *T. obscurus*, seguida de mais sete reforços a cada 15 dias. A partir disso, foram realizados testes imunológicos, ELISA e Western Blott para o reconhecimento do soro produzido em camundongos e do soro comercial pela peçonha de *T. obscurus* e *T. serrulatus*. Além disso, foi realizada a soroneutralização, onde diluições dos soros anti-*T. obscurus* ou soro comercial foram misturadas com três doses letais da peçonha de *T. obscurus* ou *T. serrulatus* e inoculadas em camundongos. **Resultados:** Os resultados obtidos no experimento de toxicidade foram analisados pelo teste estatístico Probit e apresentou uma dose letal de 3,54 mg/kg. Os ensaios de ELISA e Western blott mostraram o reconhecimento do soro produzido em camundongo pela peçonha de *T. obscurus* e *T. serrulatus*. No entanto, nesses ensaios o soro comercial não reconheceu a peçonha de *T. obscurus* e apenas apresentou reconhecimento pela peçonha de *T. serrulatus*. Os testes *in vivo* evidenciaram que o soro de camundongo e o soro comercial não neutralizam as toxinas da peçonha de *T. obscurus*. **Conclusão:** Os resultados demonstram que a peçonha de *T. obscurus* possui alta toxicidade e que o soro comercial é ineficaz para tratar o envenenamento causado por este escorpião.

Palavras Chaves: Escorpionismo. DL<sub>50</sub>. Soro antiescorpiônico. Elisa.

## 1. INTRODUÇÃO

O escorpionismo é o acidente causado pela picada de escorpião, o que representa um problema de saúde pública em países tropicais, no qual está incluído o Brasil. Mundialmente, são conhecidas aproximadamente 1.500 espécies de escorpiões, distribuídas em 18 famílias. Dentre elas, a Família Buthidae é a mais importante do ponto de vista epidemiológico, uma vez que nela se encontram as espécies consideradas perigosas para o homem [1]. No Brasil, os escorpiões de importância médica pertencem a família Buthidae, gênero *Tityus*, com quatro espécies responsáveis por envenenamento graves. Os escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, ambos distribuídos na região Sul e Sudeste, são responsáveis pelo maior número e pela gravidade dos casos de envenenamento no país, muitos deles progredindo para o óbito. As espécies *T. obscurus* e *T. stigmurus* se encontram predominantemente nas regiões Norte e Nordeste, respectivamente [2].

O escorpião *T. obscurus* (Gervais, 1843) é sinônimo sênior de *Tityus cambrigdei* (Pocock, 1897) e de *Tityus paraensis* (Kraepelin, 1896). Popularmente, esta espécie também é chamada de “escorpião preto”. Sua ocorrência na região amazônica se registra nos estados do Pará, Mato grosso, Amapá, sendo encontrado também na Guiana francesa, Equador e Suriname [3].

No Pará, a incidência de envenenamentos por picadas de escorpião tem aumentado consideravelmente. Os estudos de Neto *et al.* destacaram os municípios de Santarém, Itaituba, Rurópolis, Belterra, Prainha e a região oeste com alta frequência de acidentes escorpiônicos, em alguns deles chegando a alcançar níveis de epidemia, com registros de 61 mortes no estado do Pará durante o período de 2000 a 2019 [4]. Um dos primeiros relatos epidemiológicos do escorpionismo no estado do Pará (Belém), foi divulgado por Martins *et al.*, identificando *T. obscurus* como o agente

causador de 61 casos de envenenamentos por picada de escorpião [5]. Por outro lado, Pardal *et al.* relataram 72 casos por escorpionismo entre 2000 e 2001 e Torrez, *et al.* divulgaram que no período de 2008 a 2014 houveram 58 vítimas [3,6]. Em todos esses relatos a espécie causadora do envenenamento foi *T. obscurus*, razão pela qual é considerada de importância médica na região. Em países como Guiana e Equador também foram descritos vários casos de envenenamentos por *T. obscurus*, incluindo casos letais [7,8].

Em geral, os sintomas clínicos da picada de *T. obscurus* são semelhantes aos demais escorpiões, que são caracterizadas por dor imediata e parestesia no local da picada, em casos leves. Nos casos moderados, os pacientes, podem experimentar sintomas como náuseas, agitação e taquicardia, vômitos, diarreia, febre, sudorese, sialorreia e manifestações sistêmicas intensas em casos graves, como hipotermia, hipertensão ou hipotensão arterial, bradicardia, edema pulmonar e agitação. Esta espécie também apresenta como sintoma a sensação contínua de “choque elétrico”, sintoma este também descrito no envenenamento das espécies *T. strandi* e *T. apiacas*, de igual ocorrência na Região Amazônica [2,3,9]. A gravidade das manifestações sistêmicas causadas por esses escorpiões depende da espécie, da quantidade de peçonha injetada, sua composição, da faixa etária e condição clínica do paciente. Envenenamentos por escorpiões, especialmente em crianças e idosos com comorbidades, acarretam um quadro clínico grave e na maioria das vezes fatal [1,2,10].

De modo geral, a peçonha de escorpião é uma mistura complexa constituída principalmente de proteínas e peptídeos neurotóxicos. Esses componentes são considerados os principais responsáveis por desencadear os sinais e sintomas característicos dos envenenamentos escorpiônicos [11,12]. No país, o tratamento

clínico do envenenamento pela picada de escorpião se faz com analgésicos para o alívio da dor, sendo eficiente para os casos leves. Nos casos mais graves o recomendado é a soroterapia, que consiste na administração de um soro de equino específico contra a peçonha de *Tityus serrulatus* [13]. No entanto, publicações recentes têm assinalado a ineficácia do tratamento soroterápico em eliminar os sintomas do envenenamento por *T. obscurus*, quando aplicadas as doses recomendadas de três ampolas em casos moderados e de quatro a seis ampolas nos casos graves. A ineficácia do antiveneno pode estar relacionada com a variação que ocorre nas toxinas de diferentes espécies [6,14].

A toxicidade dos escorpiões de importância médica no Brasil tem sido reportada por alguns autores. Nishikawa *et al.* aponta *T. serrulatus* e *T. stigmurus* como as espécies mais tóxicas com uma Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>) de 1,160 mg/kg e 0,773 mg/kg respectivamente, comparado com *T. obscurus*, considerado moderadamente tóxico, o qual apresentou uma dose letal de 12,13 mg/kg. Por outro lado, Santos-da-Silva *et al.* encontraram uma dose letal de 3,13 mg/kg e 0,99mg/kg para os escorpiões *T. obscurus* e *T. serrulatus*, respectivamente. Nos estudos de Nishikawa *et al.*, também foi avaliado o reconhecimento imunológico do soro anti-*T.serrulatus*, onde os testes de Western Blott mostraram o reconhecimento da peçonha de *T. obscurus* pelo soro; no entanto, os ensaios de ELISA apresentaram títulos de anticorpos mais baixos contra esta peçonha [15,16]. O reconhecimento imunológico do soro anti-*T. serrulatus* também foi testado por De Oliveira *et al.*, a análise de Western Blott da peçonha de *T. obscurus*, mostrou que o soro não reconhece todas as toxinas deste escorpião, demonstrando assim que os componentes da peçonha de *T. obscurus* e *T. serrulatus* não são antigenicamente semelhantes [17].

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a toxicidade *in vivo* da peçonha de *T. obscurus* em mamífero e avaliar o reconhecimento *in vitro* de dois soros pela peçonha desta espécie. Um deles foi um soro comercial e o outro foi um soro anti-*Tityus obscurus*, desenvolvido neste trabalho empregando camundongos. Os soros anti-*T. obscurus* e comercial também foram avaliados na sua capacidade para neutralizar os efeitos tóxicos da peçonha, utilizando-se 3 vezes a DL<sub>50</sub>.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. EXTRAÇÃO DAS PEÇONHAS

A peçonha de *T. obscurus* foi obtida por meio de eletroestimulação na base do télson do escorpião, utilizando uma fonte de 12V com intervalo de tempo de 1 segundo, entre cada estímulo. As extrações foram realizadas a cada 15 dias, e a peçonha coletada em microtubos plásticos do tipo *ependorff* de 1,5 mL, centrifugada e armazenada a uma temperatura de -20°C até sua utilização.

### 2.2. DOSAGEM PROTEICA

Determinamos a concentração da peçonha pelo método de espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm de acordo com Harris & Angal [18]. Abreviadamente, um microlitro de peçonha foi diluído até um volume de 1000 µL e centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado e sua absorvância medida num espectrofotômetro Nova 3300UV (Nova Instruments, Brasil). A absorvância lida a 280 nm foi multiplicada pelo valor de 0,82 para obter a quantidade de proteína total. O fator 0,82 foi calculado pelo método padronizado para quantificação de proteína empregando o reagente BCA (ácido bicinconínico; Thermo Scientific, USA), estabelecido previamente no laboratório através de 5 experimentos independentes.

### 2.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS PAGE 15%

O perfil eletroforético de distribuição das massas moleculares dos componentes proteicos foi avaliado empregando um gel de 15% de poliacrilamida-bisacrilamida conforme descrito por Laemmli [19]. Um volume de 2  $\mu$ L de peçonha fresca, com aproximadamente 220  $\mu$ g de proteína total foi misturado com o tampão de amostra (20 mM Tris-HCl, 20% SDS, 10% glicerol, 2 mM de mercaptoetanol e 0,2% azul de bromofenol) e aquecidas a 100°C durante 10 minutos. Após o aquecimento, a mistura foi centrifugada durante 2 minutos a 3000 rpm, carregadas no gel e submetidas à separação em condições redutoras. Para a separação utilizou-se o sistema de eletroforese miniVE (Hoefer Inc., Alemanha). O gel foi corado com solução de Azul de Comassie e as bandas de proteína foram reveladas com uma solução aquosa contendo 30% (v/v) de etanol e 10%(v/v) de ácido acético. O experimento foi realizado em triplicata.

### 2.4. DOSE LETAL 50% (DL<sub>50</sub>)

A dose letal 50% da peçonha de *T. obscurus* foi determinada por injeção intraperitoneal (i.p.) de doses crescentes de peçonha bruta fresca diluídas em solução salina (NaCl 0,9%), seguindo-se o protocolo da Organização Mundial da Saúde [20]. Foram realizados 3 experimentos independentes, cada dose foi testada em réplicas de cinco camundongos machos e fêmeas da linhagem *Swiss*. Os camundongos tiveram massas entre 18g e 22g e as doses utilizadas variaram de 1,25 a 13,0 mg de peçonha por kg de camundongo (mg/kg). O volume de injeção foi de 200  $\mu$ L e como controle negativo foi injetado solução salina. A taxa de sobrevivência dos animais foi observada até 48 h após a inoculação da peçonha e a DL<sub>50</sub> foi calculada utilizando o método estatístico de Probit. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais-UFOPA N° 09010-2016.

## 2.5. IMUNIZAÇÃO

Cinco camundongos balb/c de 18 g foram inoculados por primeira vez, via i.p., com 5 µg de peçonha na presença de adjuvante completo de Freund. Após 15 dias da primeira imunização foi realizado o primeiro reforço, via i.p., utilizando a metade da quantidade de peçonha inoculada na primeira imunização, junto com adjuvante incompleto de Freund. Posteriormente, mais sete reforços foram administrados, via i.p., a cada 15 dias e com a mesma dose de antígeno utilizada no primeiro reforço; o último reforço do antígeno foi em solução salina. Antes da primeira imunização e após a terceira imunização foram extraídas pequenas amostras do sangue para avaliar o desenvolvimento da resposta imune. Finalmente, após sete reforços os animais foram submetidos à exsanguinação por punção cardíaca [21].

## 2.6. ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA - ELISA

Para o teste de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) foram utilizadas microplacas de 96 poços, nas quais foram aplicados, em triplicatas, 100 µL de solução de peçonha (10 µg/mL) por poço e a placa incubada a 37°C durante 1h. Após este período, a placa foi lavada com solução de Tween 0,1% e, em seguida, bloqueada com Albumina sérica bovina (BSA) à 0,5% e incubada por 2 h a 37°C. Transcorrido este período, a placa foi novamente lavada com Tween 0,1% e o soro de camundongo foi adicionado em várias diluições para avaliar o seu reconhecimento pelos antígenos da peçonha. Na reação de revelação utilizou-se o reagente O-phenyldiamine (OPD) e sua absorbância foi medida a 490 nm no leitor de placas Synergy/HTX. Foram realizadas a titulação do soro pré-imune, retirado dos camundongos antes da imunização, também do soro obtido na primeira sangria e do soro Hiperimune extraído ao final das imunizações, contra a peçonha de *T. obscurus* e similarmente foram realizados testes de ELISA da peçonha de *T. obscurus* contra o soro antiescorpiônico

comercial e da peçonha de *T. serrulatus* contra seu soro comercial e o soro produzido em camundongo Anti-*T. obscurus* [22]. Os gráficos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 9 e os títulos de anticorpos determinados por regressão linear.

## 2.7. ENSAIOS DE WESTERN BLOTT

Os componentes da peçonha de *T. obscurus* e *T. serrulatus* foram separados por SDS-PAGE como descrito pela técnica de Laemmli, e transferidos sob corrente elétrica constante para uma membrana de nitrocelulose. As proteínas presentes na membrana foram então submetidas à caracterização imunoenzimática utilizando o soro específico produzido contra a peçonha *T. obscurus* e um dos soros antiescorpiônicos comerciais. A membrana foi lavada com PBS e incubada com uma diluição de anticorpos 1:1000 durante 1h a 25°C. Posteriormente foi incubada com anticorpos anti-IgG acoplados à enzima peroxidase de rabanete e revelada com OPD [19].

## 2.8. ENSAIO DE SORONEUTRALIZAÇÃO

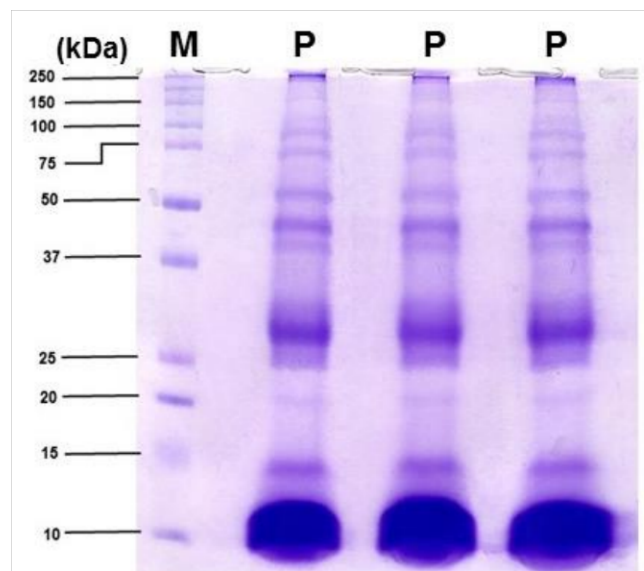
A neutralização da atividade letal da peçonha do escorpião *T. obscurus* com o soro produzido em camundongo e o soro comercial foi realizada seguindo a metodologia empregada por BOGARÍN *et al.* e a WHO [20,23]. Alíquotas de 100 µL de diluições seriadas dos soros anti-*T. obscurus* ou soro comercial foram misturadas com igual volume de solução de peçonha *T. obscurus* ou *T. serrulatus* na concentração de três vezes a DL<sub>50</sub>. Como controle negativo da neutralização foi utilizada a solução de peçonha contendo três DL<sub>50</sub> e como controle positivo foi utilizada a mínima diluição do soro antiescorpiônico e do soro de camundongo anti-*T. obscurus*. As misturas de

peçonha/soro e controles foram incubadas a 37°C durante 30 minutos, seguida da inoculação, via i.p, em camundongos e as mortes registradas dentro das 48 horas.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES DAS PROTEÍNAS DA PEÇONHA DE *T. obscurus*

A peçonha bruta de *T. obscurus* foi separada em triplicata em um gel de poliacrilamida à 15%. No perfil eletroforético (figura 2) foram evidenciadas bandas com massas relativas variando de 100 kDa a 37 kDa, que correspondem aos componentes com altas massas moleculares. Destaca-se também três bandas intensas, uma abaixo de 50 kDa, outra acima dos 25 kDa e uma banda alargada e intensa ao redor de 10 kDa. Esta última corresponde aos peptídeos, componentes de maior abundância na peçonha destes animais.



**Figura 1.** SDS-PAGE 15% da peçonha bruta de *T. obscurus*. Colunas identificadas: P, 2 µL de peçonha bruta ou 220 µg de proteína total; M, Padrão de massas moleculares de proteína.

### 3.2. ENSAIO DE TOXICIDADE DA PEÇONHA DE *T. obscurus*

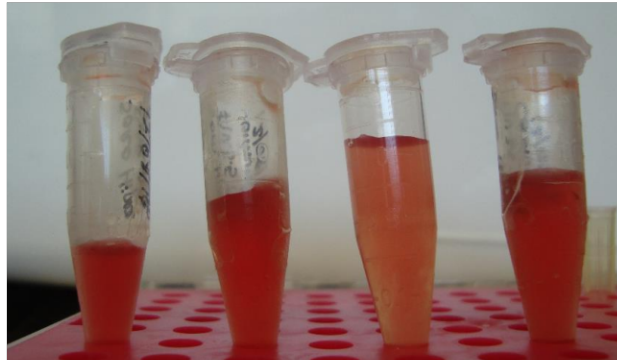
A peçonha de *T. obscurus* apresentou atividade letal em camundongo, as manifestações sistêmicas e comportamentais foram perceptíveis em todos os grupos de camundongos, tais como sinais de agitação, dificuldade de respiração, diminuição na locomoção, sialorreia, transpiração e espasmos foram observados em todas as doses injetadas. Os sinais apareceram, aproximadamente, 10 minutos após a injeção, persistindo por horas. A Tabela 1, apresenta os números de animais mortos por cada dose para os três experimentos independentes. Nos dois primeiros experimentos, todas as mortes ocorreram a partir de 12 h do início da injeção, no entanto, no último as mortes começaram em 2 h. A dose de 1,25 mg/kg não foi letal para nenhum dos grupos de camundongos, e apenas houve uma morte na dose de 2,5 mg/kg de massa corpórea de camundongo. Nas demais doses o número de mortes foi similar em todos os experimentos. A DL<sub>50</sub> determinada pela análise de Probit foi igual a 3,54 mg/kg de massa corpórea de camundongo.

**Tabela 1.** Taxa de mortalidade por cada experimento de toxicidade realizado.

Experimento	Doses (mg/kg)						
	1,25	2,5	5,0	7,0	9,0	11,0	13,0
01	0	0	01	03	03	04	05
02	0	0	03	03	04	05	03
03	0	01	04	05	05	05	05

### 3.3. OBTENÇÃO DE SORO ANTIESCORPIÔNICO E AVALIAÇÃO DO RECONHECIMENTO DA PEÇONHA DE *T. obscurus*

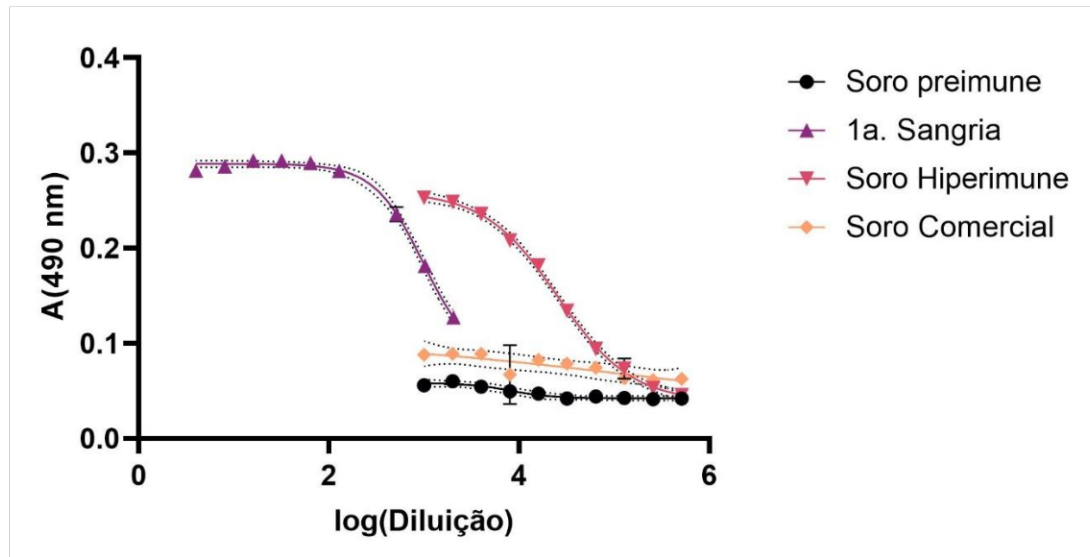
Um volume aproximado de 2,5 mL do soro hiperimune (figura 2) foi obtido a partir da imunização dos cinco camundongos.



**Figura 2.** Soro de camundongos imunizados com peçonha de *T. obscurus*.

A Fig. 3 apresenta os resultados do teste de ELISA, onde o soro pré-imune mostrou que não há reconhecimento pela peçonha de *T. obscurus*, apresentando uma linha horizontal e com valores praticamente constantes, sem presença de título e, portanto, comprovando a ausência de anticorpos contra *T. obscurus* no soro dos camundongos antes das imunizações. O soro de 1<sup>a</sup> sangria apresentou um baixo reconhecimento pela peçonha de *T. obscurus*, com um título de 984 (Figura 3). Esse resultado comprova que até o terceiro reforço de imunização, os camundongos já apresentavam uma boa resposta imunológica contra a peçonha de *T. obscurus*. O reconhecimento do soro Hiperimune anti- *T. obscurus*, extraído dos camundongos ao final de todos os reforços de imunização, apresentou um bom reconhecimento pela peçonha deste escorpião, com título de 25644. Vale ressaltar que o valor do título foi alcançado com uma diluição (1:1000) do soro hiperimune, pois quando adicionado na diluição (1:1) alcançou o seu máximo de reconhecimento, não permitindo a

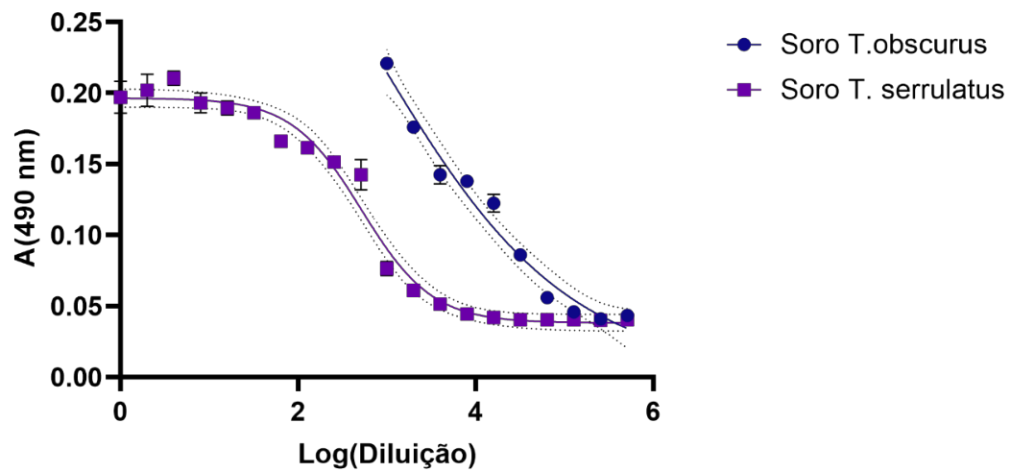
determinação do título. Quanto ao soro comercial, este não reconheceu a peçonha de *T. obscurus*, tendo em vista de que apresentou uma linha de tendência semelhante ao do soro pré-imune.



**Figura 3.** Reconhecimento de *T. obscurus* pelos soros pré-imune, 1ª sangria, hiperimune e soro comercial.

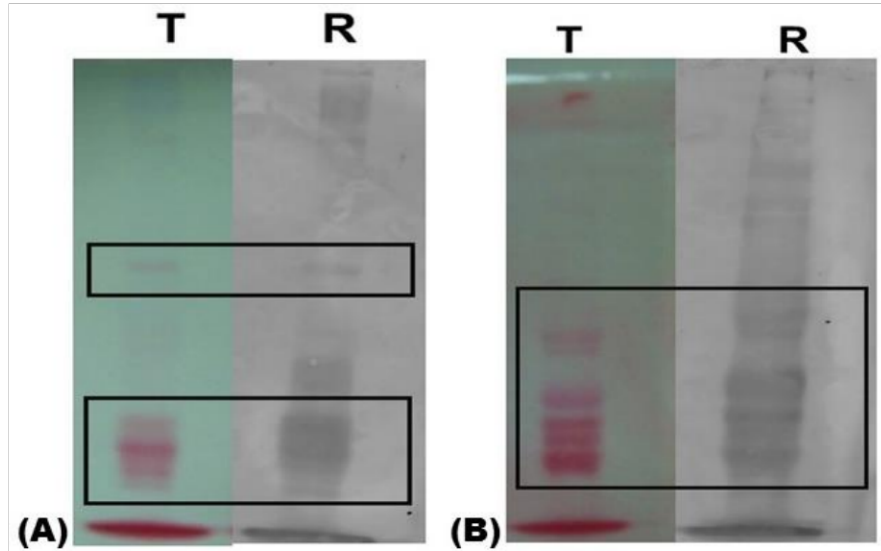
Nos ensaios do soro comercial puro com a peçonha de *T. serrulatus*, não foi possível a determinação do título e, então, outro ensaio com o soro comercial, na diluição 1:1000, foi realizado e obteve-se o título de 694,4 (Fig. 4).

O reconhecimento do soro hiperimune anti-*T. obscurus*, pela peçonha de *T. serrulatus*, na diluição 1:1000, demonstrou que os anticorpos produzidos em camundongos contra *T. obscurus* foram capazes de reconhecer a peçonha de *T. serrulatus*, apresentando um título igual a 525.

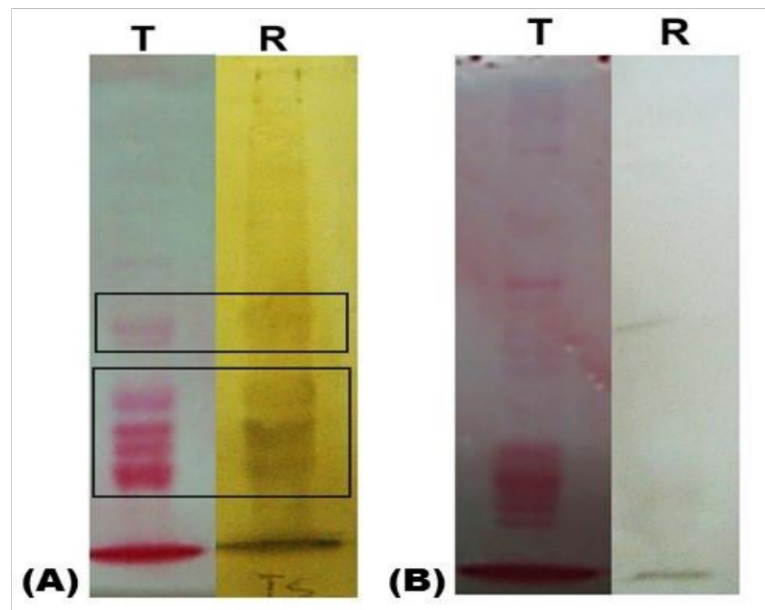


**Figura 4.** Reconhecimento da peçonha de *T. serrulatus* pelos soros anti-*T. obscurus* e soro comercial na diluição de 1:1000.

Na técnica de *Western blott*, o soro produzido em camundongo foi capaz de reconhecer várias bandas de proteínas da peçonha de *T. obscurus*, tanto bandas de baixo quanto alto peso molecular (Fig. 5A). Este soro também foi capaz de reconhecer os peptídeos da peçonha de *T. serrulatus* (Fig. 5B). Por outro lado, o soro comercial anti-*T. serrulatus* não foi capaz de reconhecer banda alguma, de proteínas ou peptídeos, de *T. obscurus* transferidos do gel para a membrana de nitrocelulose (Fig. 6B). Porém, o soro comercial específico anti-*T. serrulatus* reconhece claramente as proteínas e peptídeos da peçonha de *T. serrulatus* como mostrado na figura 6A.



**Figura 5. Western Blott do reconhecimento do soro produzido em camundongo.** (A) Membrana com a da peçonha de *T. obscurus*. (B) Membrana com a peçonha de *T. serrulatus*. Em T, revelado das proteínas transferidas na membrana utilizando o corante vermelho de Ponceau S. Em R, reconhecimento das proteínas pelo soro.



**Figura 6. Western Blott do reconhecimento de um soro comercial.** (A) Membrana com a peçonha de *T. serrulatus* e (B) Membrana com a da peçonha de *T. obscurus*. Em T, revelado das proteínas transferidas na membrana utilizando o corante vermelho de Ponceau S. Em R, reconhecimento das proteínas pelo soro.

#### 3.4. SORONEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO* DA PEÇONHA

A Tabela 2 mostra os resultados para a soroneutralização das peçonhas dos escorpiões *T. obscurus* e *T. serrulatus* utilizando o soro produzido em camundongo e o soro comercial, respectivamente. Todos os animais dos três grupos injetados manifestaram sinais de envenenamento e após 3h morreram. Não houve nenhum sobrevivente para esses grupos, demonstrando que tanto o soro comercial (anti-*T. serrulatus*) como o soro produzido em camundongo não neutralizaram os efeitos do envenenamento causado pelos escorpiões *T. obscurus* e *T. serrulatus*. A morte dos animais do grupo controle negativo (G4) também ocorreram após 3h da injeção. Os grupos controles positivos inoculados com os soros anti-*T. obscurus* (G5) e anti-*T. serrulatus* (G6) respectivamente, tiveram camundongos sobreviventes.

**Tabela 2.** Resultado da soroneutralização em camundongos.

<b>Grupo (N=5)</b>	<b>Peçonha (3DL50) X Soro (puro e dil.1:2)</b>	<b>Mortos/injetados</b>	<b>Taxa de mortalidade (%)</b>
01	<i>T. obscurus</i> x Soro anti- <i>T.obscurus</i>	5/5	100
02	<i>T. obscurus</i> x Soro comercial	5/5	100
03	<i>T. serrulatus</i> x Soro comercial	0/5	0
04	<i>T. obscurus</i> x PBS (Controle negativo)	5/5	100
05	Soro de camundongo Anti – <i>T.obscurus</i> (Controle positivo)	0/5	0
06	Soro comercial (Controle positivo)	0/5	0

#### 4. DISCUSSÃO

Até o momento o único soro disponível no país, para o tratamento específico contra picadas de escorpião, continua sendo o soro antiescorpiônico produzido em equino contra a peçonha de *T. serrulatus*, por este ser o escorpião de maior importância médica no Brasil, sendo negligenciado o desenvolvimento para outras espécies de escorpiões. No entanto, a capacidade de o soro de equino neutralizar os efeitos tóxicos da peçonha de outras espécies do gênero *Tityus* não tem sido demonstrada. Alguns pesquisadores, descrevem diversos casos de envenenamentos no oeste do Pará por *T. obscurus* [3,5,6]. Nesses casos, as vítimas evoluíram para uma sintomatologia grave havendo necessidade de serem tratadas com até 10 ampolas de soro antiescorpiônico. Esses dados demonstram a falta de especificidade do soro comercial para a peçonha de *Tityus obscurus*. Além disso, a grande quantidade de soro antiescorpiônico administrado, pode causar graves efeitos colaterais nos pacientes, como reações anafiláticas. Pesquisas têm mostrado que a sintomatologia e a composição da peçonha podem mudar em regiões para algumas espécies de *Tityus*, conseqüentemente afetando a eficácia do soro [14].

Neste trabalho, estudamos a possibilidade de desenvolvimento de um soro específico contra a peçonha de *T. obscurus* e fornecemos novos dados sobre a toxicidade desta peçonha em mamífero. A caracterização bioquímica da peçonha do escorpião *T. obscurus*, por análise eletroforética mostrou uma banda com uma massa relativa por volta de 45kDa, que provavelmente corresponde à hialuronidase, enzima comum na peçonha dos artrópodes e está associada a dispersão das toxinas pelos tecidos. Também revelou uma banda mais larga e intensa, ao redor de 10 kDa, correspondente aos peptídeos, que são as principais toxinas responsáveis pelos

sintomas de envenenamentos graves e representam a maior parte dos constituintes da peçonha [12,24].

Na atividade biológica, a peçonha de *T. obscurus* induziu atividade letal em camundongos, demonstrando uma alta toxicidade com o valor da DL<sub>50</sub> de 3,54 mg/kg. Os sintomas de envenenamento observados nesse estudo são semelhantes aos descritos para outros escorpiões. Foi possível observar agitação, dificuldade de respiração, sialorreia, transpiração, espasmos, diminuição na locomoção, sudorese, pálpebra “caí da” e espasmos. Alguns pesquisadores têm demonstrado que as neurotoxinas presentes na peçonha de *T. obscurus* exercem efeito em canais para sódio e potássio de células excitáveis como neurônios e músculos. Esses canais iônicos modulam as diversas atividades celulares e, portanto, qualquer ação pode afetar o funcionamento normal do organismo [11]. No envenenamento por *T. obscurus* alguns pacientes relatam uma sensação contínua de choque elétrico, este sintoma que era apenas descrito nesta espécie, recentemente foi reportado nas espécies *T. strandi* e *T. apiacas* ambas encontradas na Região Amazônica [9]. A dose letal de *T. obscurus* foi determinada por alguns autores. Nishikawa, *et al.*, considera a espécie moderadamente tóxica, com DL<sub>50</sub> de 12,13 mg/kg e Santos-da-Silva *et al.*, encontraram uma dose letal de 3,13 mg/kg. Comparando o valor encontrado em nosso trabalho para a dose letal (DL<sub>50</sub>) de *T. obscurus*, observa-se que esta foi quatro vezes menor do que o relatado por Nishikawa, *et al.* [15]. Vale ressaltar que as doses letais descritas por esses autores foram determinadas a partir de apenas um experimento e com a peçonha de *T. obscurus*, liofilizada e congelada. Os nossos experimentos foram realizados em triplicata e a peçonha utilizada não passou por nenhum método de secagem e congelamento. A peçonha foi coletada e preparada minutos antes dos ensaios, portanto este resultado nos mostra que a toxicidade da peçonha fresca é

maior do que quando liofilizada e congelada. Isto provavelmente ocorre porque uma secagem inadequada pode causar alterações na estrutura conformacional das proteínas ou uma possível oxidação de alguns de seus componentes [15,16,25].

Os resultados de ELISA mostraram que os anticorpos produzidos em camundongos reconheceram a peçonha de *T. obscurus*, alcançando título de 25644, este valor está acima da média de 320 para anticorpos produzidos com um reconhecimento adequado pelo seu antígeno e revelados no sistema OPD. O soro comercial apresentou reconhecimento pela peçonha de *T. serrulatus*, no entanto, nenhum reconhecimento pela peçonha de *T. obscurus*. Este resultado corrobora com os estudos de Nishikawa *et al.*, em que os testes de Elisa do soro comercial com a peçonha de *T. obscurus* tiveram títulos de anticorpos mais baixos contra essa peçonha [15].

Os resultados para o reconhecimento das proteínas da peçonha de *T. obscurus* pelo soro comercial corroboram com as análises de Western Blot descritas nos trabalhos de De Oliveira *et al.*, o qual mostrou que o soro anti-*T. serrulatus* não reconhece todas as toxinas de *T. obscurus*, confirmando que os componentes da peçonha de *T. obscurus* e *T. serrulatus* não são antigenicamente semelhantes [17].

A soro neutralização da peçonha de *T. obscurus* e *T. serrulatus*, com soro comercial, mostrou que este soro não neutraliza as toxinas de ambas peçonhas. Estes resultados são condizentes com relatos de envenenamento por *T. obscurus*, em que o soro comercial não reduziu as manifestações neuromusculares, mesmo após a administração de uma grande quantidade de soro. A variabilidade que ocorre na composição das peçonhas de *T. obscurus* e *T. serrulatus*, possivelmente devido ao isolamento geográfico, pode estar relacionada com a falta de especificidade do soro comercial anti-*T. serrulatus* para esta outra espécie [6,16]. Além disso, como não

ocorreu neutralização de ambas peçonhas com soro anti-*T. obscurus*, desenvolvido neste estudo, isto indica que possivelmente os peptídeos da peçonha de *T. obscurus* não são bons imunogênicos e, portanto, outros métodos de preparação desses antígenos precisam ser verificados, afim de obter uma imunização mais eficaz.

## 5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a peçonha de *T. obscurus* apresenta alta toxicidade em camundongo, com uma DL<sub>50</sub> de 3,54 mg/kg. O reconhecimento de anticorpos produzidos em camundongos contra esta peçonha mostra que o soro comercial não reconhece a peçonha de *T. obscurus*, enquanto que o soro anti-*T. obscurus* reconhece ambas peçonhas, de *T. obscurus* e *T. serrulatus*. Nos testes *in vivo* o soro comercial não foi capaz de neutralizar o envenenamento por *T. obscurus* em camundongos, também não houve neutralização desta peçonha pelo nosso soro produzido em camundongo. Esses resultados são consistentes com os relatos de ineficácia do soro comercial para o envenenamento de *T. obscurus* e, além disso, demonstram que a peçonha desses escorpiões não são antigenicamente semelhantes, além de que as toxinas de *T. obscurus* não são bons imunogênicos. Portanto, novos estudos devem ser direcionados a testes de imunogenicidade das toxinas de *T. obscurus*. Vale ressaltar que este trabalho é o primeiro estudo de desenvolvimento de soroterápico específico contra *T. obscurus*.

## REFERÊNCIAS

1. Chippaux JP, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Trop*. 2008;107(2):71–9.
2. Cupo P. Clinical update on scorpion envenoming. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):642–9.
3. Pardal PP de O, Gadelha MA da C, Menezes MMGO, Malheiros RS, Ishikawa EAY, Gabriel MDG. Envenenamento grave pelo escorpião *Tityus obscurus* Gervais, 1843. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2014;5(3):65–70.
4. Neto GW de A. Análise epidemiológica da evolução temporal do escorpionismo no Brasil com ênfase na Amazônia legal brasileira, 2000 a 2018. [dissertação]. Santarém (PA): Universidade Federal do Oeste do Pará; 2020.
5. Martins MA, Barradas L, Silva RHV, Pardal PPO. Clinical epidemiological study of accidents by scorpions attended *in* João de Barros Barreto Universitarian Hospital from January to December, 1996. *Rev Para Med*. 2002 Jan-Apr;16(1):34-8.
6. Torrez PPQ, Quiroga MMM, Abati PAM, Mascheretti M, Costa WS, Campos LP, et al. Acute cerebellar dysfunction with neuromuscular manifestations after scorpionism presumably caused by *Tityus obscurus* in Santarém, Pará / Brazil. *Toxicon*. 2015; 96:68–73.
7. Iseron KV, Ramcharran SDJ. Black Scorpion (*Tityus obscurus*) Fatalities in Guyana and a Literature Review. *J Emerg Med*. 2019;57(4):554–9.
8. Román JP, García F, Medina D, Vásquez M, García J, Graham MR, et al. Scorpion envenoming in Morona Santiago, Amazonian Ecuador: Molecular phylogenetics confirms involvement of the *Tityus obscurus* group. *Acta Trop*. 2018;178(October 2017):1–9.
9. Silva de Oliveira SM, Bertani R, Quispe Torrez PP, Lopes de Sousa PR, Martinez Quiroga MM, Bertolozzi MR, et al. Electric shock sensation in the first reports of envenomations by *Tityus strandi* in the Brazilian Amazon. *Toxicon*. 2020;178(January):8–12.
10. Reckziegel GC. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012;1–8.

11. Batista CVF, Del Pozo L, Zamudio FZ, Contreras S, Becerril B, Wanke E, et al. Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2004;803(1):55–66.
12. Mullen GR, Stockwell SA. (Scorpiones) [Internet]. *MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY*. Elsevier Inc.; 2002. 411–423 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-510451-7.50022-0>
13. Ministério da Saúde [Internet]. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília; 2001 [citado em 15 de agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.iciict.fiocruz.br/sites/www.iciict.fiocruz.br/files/Manual-de-Diagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf>
14. Amaral CFS, Rezende NA. Treatment of scorpion envenoming should include both a potent specific antivenom and support of vital functions. *Toxicon.* 2000;38(8):1005–7.
15. Nishikawa AK, Caricati CP, Lima MLSR, Dos Santos MC, Kipnis TL, Eickstedt VRD, et al. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon.* 1994;32(8):989–98.
16. Santos-da-Silva A de P, Candido DM, Nencioni ALA, Kimura LF, Prezotto-Neto JP, Barbaro KC, et al. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. *Toxicon.* 2017; 126:51–8.
17. De Oliveira UC, Nishiyama MY, Dos Santos MBV, De Paula Santos-Da-Silva A, De Menezes Chalkidis H, Souza-Imberg A, et al. Proteomic endorsed transcriptomic profiles of venom glands from *Tityus obscurus* and *T. serrulatus* scorpions. *PLoS One.* 2018;13(3):1–23.
18. HARRIS EL., ANGAL S. Protein purification applications: a practical approach. Oxford; 1989. 317 p.
19. LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227: 680–5.
20. World health organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. [Internet]. Geneva; 1981. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37282>.
21. Cowley JVG. Anticuerpos monoclonales. 1<sup>st</sup> ed. Cuba; 1995. 180pp.
22. Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, Fuentes-Silva D, Palomares LA, Muñoz-Cruz S, Yépez-Mulia L, et al. Structural analysis of the endogenous

- glycoallergen Hev b 2 (endo- $\beta$ -1,3-glucanase) from *Hevea brasiliensis* and its recognition by human basophils. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2014;70(2):329–41.
23. Bogarín G, Morais JF, Yamaguchi IK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, et al. Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon*. 2000;38(10):1429–41.
24. Venancio EJ, Portaro FCV, Kuniyoshi AK, Carvalho DC, Pidde-Queiroz G, Tambourgi D V. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus genus* and the neutralization potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon*. 2013;69 (December 2011):180–90.
25. Dorce VAC, da Rocha MMT, Candido DM, Nencioni ALA, Auada AVV, Barbaro KC, et al. Influence of different processing techniques on the toxicity and biochemical characteristics of *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. 2018;156(May):41–7.