



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

PEDRO PEREIRA DE OLIVEIRA PARDAL

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO ESCORPIONISMO E DO
ESCORPIÃO *Tityus obscurus* GERVAIS, 1843 (SCORPIONES: BUTHIDAE) DE
DUAS REGIÕES DISTINTAS NO ESTADO DO PARÁ NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA.**

BELÉM
2014

PEDRO PEREIRA DE OLIVEIRA PARDAL

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO ESCORPIONISMO E DO
ESCORPIÃO *Tityus obscurus* GERVAIS, 1843 (SCORPIONES: BUTHIDAE), DE
DUAS REGIÕES DISTINTAS NO ESTADO DO PARÁ NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA.**

Tese de Doutorado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Doutor em Clínica de Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa
Co-orientador: Prof. Dr. José Luiz Fernandez Vieira

BELÉM
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA

Pardal, Pedro Pereira de Oliveira.

Contribuição ao conhecimento do escorpionismo e do escorpião *Tityus obscurus* Gervais, 1843 (Scorpiones: Buthidae), de duas regiões distintas no Estado do Pará na Amazônia brasileira / Pedro Pereira de Oliveira Pardal; orientador, Edna Aoba Yassui Ishikawa, co-orientador, José Luiz Fernandez Vieira. – 2014

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2014.

1. Animais venenosos. 2. Envenenamento. 3. Espectrometria de massa. 4. Pará. I. Ishikawa, Edna Aoba Yassui, orient. II. Vieira, José Luiz Fernandez, co-orient. III. Título.

CDD: 22. ed. 615.9098115

Ficha catalográfica elaborada por Marta G. Gonçalves
NMT/UFPA – CRB2 1164

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

PEDRO PEREIRA DE OLIVEIRA PARDAL

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO ESCORPIONISMO E DO
ESCORPIÃO *Tityus obscurus* GERVAIS, 1843 (SCORPIONES: BUTHIDAE), DE
DUAS REGIÕES DISTINTAS NO ESTADO DO PARÁ NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA.**

Tese de Doutorado apresentada à banca examinadora para obtenção do título de Doutor em Clínica de Doenças Tropicais. Área de concentração: Clínica de Doenças Tropicais.

Aprovado em 21 de março de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa
Orientador – NMT / UFPA

Prof. Dr. José Luiz Fernandez Vieira
Co-Orientador – NMT / UFPA

Profa. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio
Membro – IECOS/UFPA

Prof. Dr. Flávio Vasconcelos
Membro – ICS/UFPA

Prof. Dr. Fabrício Lemos de Siqueira Mendes
Membro – UNAMA

Prof. Dr. Francisco Oscar de Siqueira França
Membro – FMUSP

Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista
Membro (Suplente) – NMT/UFPA

Aos meus pais José e Josefa (in memória) pelo que hoje sou e por me ensinarem a nunca desistir;

Aos meus irmãos Maria Vicência, Francisco e Vitória pelo apoio durante minha vida acadêmica;

À Graça Pardal, minha esposa que tanto admiro, respeito, amo e que sabe me compreender e entender;

À minha filha Joseana e ao Marcelo pelos incentivos e ao próximo neto;

Ao meu filho Ricardo e à Marilena que me deram três alegrias na vida: Yago, Seles e Celena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a sua Mãe por terem me iluminado para a conclusão desta Tese.

Aos meus orientadores:

Edna Aoba Yassui Ishikawa pela confiança ao me aceitar como Doutorando, me permitindo usar seu Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Medicina Tropical de Universidade Federal do Pará, assim como, pela orientação, amizade e aprendizado da Biologia Molecular.

José Luiz Fernandez Vieira pela orientação, incentivo, apoio, amizade e pelo aprendizado da Toxicologia.

Ao programa de Pós-Graduação em Clínica de Medicina Tropical do NMT da UFPA por me permitir realizar o Doutorado.

Aos companheiros do Laboratório de Entomologia Médica e Animais Peçonhentos:

Habib Fraiha Neto, meu “Chefe” e amigo pelos incentivos.

Johne Coelho pela identificação preliminar dos espécimes, na extração do veneno, apoio, companheirismo, contribuição à Tese e pelas sextas-feiras na “Toca do Coelho”.

Ana de Nazaré pelos incentivos e amizade.

À Josyane e ao Bruno pelas capturas e manutenção dos escorpiões no laboratório e amizade.

Aos colaboradores que contribuíram direta ou indiretamente com a tese:

Maria Apolonia Gadelha pela amizade, colaboração e incentivos.

D. Zuleide e Cláudia Ericeira, do CIT, pela colaboração e incentivos.

Hipócrates Chalkidis das Faculdades Integradas do Tapajós, Laboratório de Pesquisas Zoológicas – LPZ, pela amizade, doação dos escorpiões e da peçonha dos espécimes, que nos permitiu realizar o estudo químico.

Aos Médicos Mariana Quiroga e Paulo Abati, do Hospital Municipal de Santarém, e às Enfermeiras Édna e Fernanda Cardoso, do Hospital Municipal de Rurópolis, pelo casos, pois sem eles seria impossível realizar a parte clínica.

Denise Maria Cândido, do Instituto Butantan, pela identificação confirmatória dos espécimes.

Dr. Carlos Bloch pela confiança e por ter permitido a realização das análises químicas do veneno em seu Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF.

Daniel Sifunte, do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) de Brasília-DF, pela amizade e na colaboração das análises químicas da peçonha, o que foi fundamental para esta Tese.

Roberta Fusco pelos ensinamentos no manuseio do Programa MEGA e no *GenBank*.

Paulo Henrique, do Instituto Evandro Chagas, pela amizade e o “*Scorpion Delivery*”.

Marta Gonçalves, Bibliotecária do NMT/UFPA, pelo preparo da Ficha Catalográfica.

Em especial, quero agradecer ao Biólogo Joaquim Martins, da FUNASA de Santarém, que não é só um amigo, mas um verdadeiro irmão, pois sempre se colocou à disposição para me acompanhar nas capturas dos escorpiões e na extração do veneno, me ensinando esta arte.

A todos muito obrigado!!!!

"Um homem que ousa desperdiçar uma hora
ainda não descobriu o valor da vida."

Charles Darwin

**ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO
E
REALIZADO NOS LABORATÓRIOS**

Laboratório de Entomologia Médica e Animais Peçonhentos
Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará

Laboratório de Biologia Molecular
Núcleo de Medicina Tropical de Universidade Federal do Pará

Laboratório de Polimorfismos de DNA
Universidade Federal do Pará

Laboratório de Artrópodes
Instituto Butantan, São Paulo

Laboratório de Pesquisas Zoológicas
Faculdades Integradas do Tapajós, Santarém, Pará

Laboratório de Espectrometria de Massa
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF

RESUMO

Introdução: O *Tityus obscurus* Gervais, 1843 (Scorpiones: Buthidae), sinônimo sênior de *T. paraensis* Kraepelin, 1896 e *T. cambridgei* Pocock, 1897 têm ampla distribuição na Amazônia brasileira, sendo o de maior importância médica na região e apresenta manifestação clínica diversificada, dependendo da região. **Objetivos:** Contribuir para o conhecimento da diversidade do escorpionismo e do escorpião *T. obscurus* na Amazônia brasileira, **Metodologia:** Descrever, analisar e comparar os aspectos clínico-epidemiológicos do envenenamento, o molecular ao nível do ácido desoxirribonucleico (DNA) de espécimes que ocasionaram acidentes, assim como, analisar a morfometria e a peçonha destes espécimes capturados nas regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil, distantes cerca de 850 km. **Resultados:** No estudo clínico epidemiológico, foram analisados 48 envenenamentos comprovados por estes espécimes, no período de janeiro de 2008 a julho de 2011, sendo 70,8% da região Leste e 29,2% da Oeste, com maior ocorrência na faixa etária acima de 15 anos, nos membros superiores e no período diurno; contudo, o tempo para o atendimento médico foi abaixo de 3 horas, com maior mediana e intervalo interquartil no Oeste. Na Leste, predominou gravidade leve, enquanto na Oeste, o moderado foi significativo. A frequência dos sintomas no sítio da picada foi similar em ambas as áreas, enquanto as manifestações sistêmicas foram significantes na Oeste, predominando os sintomas gerais, oftalmológicos, gastrointestinais e neurológicos. Dentre os neurológicos, destacam-se as mioclonias, sensação de “choque elétrico”, disartria, parestesia, ataxia, dismetria e fasciculação, encontrados somente nesta região. No estudo do DNA, foi utilizado o gene mitocondrial 16S rRNA, cuja análise comparativa das sequências das duas regiões mostrou 9.06% de polimorfismo, com divergência de 9.7 a 11%, com as árvores filogenéticas formando dois clados distintos no *Neighbor-Joining* e na Máxima Parcimônia. Para a análise morfológica, foram aplicados critérios taxonômicos morfométricos em 18 espécies coletadas na região Leste e 20 da Oeste, com tamanho variando de 62,15 mm a 85,24 mm, cujas medidas dos 29 caracteres dos machos e fêmeas das duas populações apresentaram maiores proporções das médias nos espécimes da Oeste, enquanto a análise multivariada dos dois sexos mostrou nos estudos de conglomerados e na análise discriminante, distinção entre os indivíduos das duas populações. Já a análise química da peçonha por meio do *RP-HPLC* e pela espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF encontrou divergência qualitativa e quantitativa no perfil cromatográfico das duas populações e nenhuma similaridade na composição química entre os seus componentes, com uma maior concentração de neurotransmissores para canais de K^+ e para Na^+ na região Oeste. **Conclusões:** Concluímos que os escorpiões analisados das

populações das regiões do Leste e Oeste do Estado do Pará da Amazônia brasileira e que hoje conhecemos como *T. obscurus* Gervais, 1843, colocam em evidência uma diversidade regional deste escorpião que pode estar relacionada à especiação dos espécimes, decorrente da distância e de barreiras geográficas, chegando a formar duas linhagens distintas, o que justifica a diversidade genética na composição química da peçonha e nas manifestações clínicas nos envenenamentos encontrados neste estudo e sugerimos uma revisão taxonômica destes “espécimes”.

Palavras chave: *Tityus obscurus*; Envenenamento; Peçonha; Espectrometria de Massa; Morfometria; 16S rRNA; Diversidade; Amazônia.

ABSTRACT

Introduction: *Tityus obscurus* Gervais, 1843 (Scorpiones: Buthidae) is a senior synonymous of *T. paraensis* Kraepelin, 1896 and *T. cambridgei* Pocock, 1897. It is widely distributed in the Brazilian Amazon basin and is considered the most important species responsible for scorpion stings. There were several differences in the clinical manifestations of envenomation by this species. **Objective:** To contribute for the knowledge of scorpionism by *T. obscurus* in Brazilian Amazon. **Methods:** We describe and compare the clinical and epidemiological findings of envenomation by *T. obscurus* in eastern and west areas of the state of Para. The composition of the venom, morphometric measures and DNA analysis of specimens captured were also compared between study areas. **Results:** From Jan 2008 to Jul 2010 were included 48 patients with confirmed envenomation by *T. obscurus*. Most of them came from the eastern region (70.8%). Median age groups were similar in both areas. Most scorpion stings took place during the day and occurred significantly on the upper limbs. The time between the sting and admission to the health center was less than three hours in both areas. Most eastern patients had local manifestations while in the west, systemic manifestations predominated. Local symptoms were similar in both areas, but systemic signs and symptoms were more common in the west. Symptoms frequently observed at the sting site were local and radiating pain, paresthesia, edema, erythema, sweating, piloerection and burning. The systemic manifestations were higher in patients from the west. Furthermore, neurological symptoms, such as general paresthesia, ataxia, dysarthria, myoclonus, dysmetria, and electric shock-like sensations throughout the body were reported only by patients from the west. Mitochondrial gene 16S rRNA showed a polymorphism of 9.06% with divergence from 9.7 to 11% forming two distinct at *Neighbor-Joining* and *Máxima Parcimônia*. There were 18 and 20 specimens captured in west and in eastern regions, measuring between 62.15 to 85.24mm. The largest specimens were captured in the west. Multivariate analysis showed a significant difference between specimens from both sites. The analysis of venom by mass spectrometry and high performance liquid chromatography showed significant differences in both the composition and concentrations of venom components. The venom of specimens captured in west showed a high concentration of compounds with affinity for K^+ and Na^+ channels. **Conclusion:** There are a regional diversity in several aspects of envenomation by *T. obscurus* Gervais, 1843, in the state of Para. The geographical separation promotes, probably, a speciation of specimens, forming two distinct lineages, with 16S rRNA divergences and different length, chemical

composition of venom and clinical manifestations of envenomations. The authors suggest a taxonomic review of this species.

Key-Words: *Tityus obscurus*; Envenomation; Venom; Mass spectrometry; Morphometric analysis; 16S rRNA; Diversity; Amazon.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1. | Aspecto morfológico do escorpião..... | 21 |
| Figura 2. | Aspecto morfológico dorsal e ventral do <i>T. obscurus</i> macho..... | 24 |
| Figura 3. | Mapa do genoma mitocondrial da <i>Drosophila yakuba</i> , mostrando a localização do gene 16S rRNA..... | 27 |
| Figura 4. | Mapa do Estado do Pará, na Amazônia brasileira..... | 35 |
| Figura 5. | Eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras de dez <i>T. obscurus</i> , de duas regiões do Estado do Pará, Brasil..... | 47 |
| Figura 6. | Fenograma agrupando as sequências do 16S rRNA obtidas de dez espécimes de <i>T. obscurus</i> das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, sendo a árvore obtida pelo método <i>Neighbor-Joining</i> baseado no modelo <i>Kimura-2-Parameter</i> | 49 |
| Figura 7. | Fenograma agrupando as sequências obtidas do 16S rRNA de <i>T. obscurus</i> das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, sendo a árvore condensada obtida pelo método Máxima Parcimônia..... | 49 |
| Figura 8. | Dendograma de conglomerados de 19 fêmeas de <i>T. obscurus</i> com caracteres de significância $p \leq 0,01$, das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará Brasil, obtido pelo método de ligação completa e distância de <i>Manhattan</i> com padronização das variáveis..... | 52 |
| Figura 9. | Dendograma de conglomerados de 19 machos de <i>T. obscurus</i> , com caracteres de significância $p \leq 0,01$, das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará Brasil, obtido pelo método de ligação completa e distância <i>Manhattan</i> com padronização das variáveis..... | 52 |
| Figura 10. | Funções discriminantes de duas populações de fêmeas de <i>T. obscurus</i> das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil..... | 53 |
| Figura 11. | Funções discriminantes de duas populações de machos de <i>T. obscurus</i> das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil..... | 53 |
| Figura 12. | Cromatograma obtido do pool da peçonha bruta do <i>T. obscurus</i> da região Leste por <i>RP-HPLC</i> em coluna semi-preparativa C ₁₈ (Phenomenex, 5 µm, 10x250 mm)..... | 54 |
| Figura 13. | Cromatograma obtido do pool da peçonha bruta do <i>T. obscurus</i> da região Oeste por <i>RP-HPLC</i> em coluna semi-preparativa C ₁₈ (Phenomenex, 5 µm, 10x250 mm)..... | 55 |
| Figura 14. | Sobreposição dos cromatográficos obtidos do pool da peçonha bruta do <i>T. obscurus</i> das regiões Leste em vermelho e Oeste em negro..... | 55 |
| Figura 15. | Sobreposição dos cromatográficos obtidos na faixa de toxinas moduladoras para canais de K ⁺ , do pool da peçonha bruta do <i>T. obscurus</i> das regiões Leste em vermelho e Oeste em negro..... | 56 |
| Figura 16. | Sobreposição dos cromatográficos obtidos na faixa de toxinas moduladoras para canais de Na ⁺ , do pool da peçonha bruta do <i>T. obscurus</i> das regiões Leste em vermelho e Oeste em negro..... | 56 |
| Figura 17. | Frequência das frações da peçonha do <i>T. obscurus</i> em 60 minutos de eluição em coluna semi-preparativa no RP-HPLC..... | 57 |
| Figura 18. | Componentes das massas moleculares das toxinas do <i>T. obscurus</i> das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil, em intervalo de 500 Da..... | 58 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------|---|----|
| Quadro 1. | Componentes das famílias da Fauna Mundial de escorpiões..... | 22 |
| Quadro 2. | Fauna escorpiônica do Brasil..... | 23 |
| Quadro 3. | Classificação da gravidade dos acidentes escorpiônicos no Brasil..... | 37 |
| Quadro 4. | Recomendações para extração e purificação do DNA..... | 38 |
| Quadro 5. | Ciclos térmicos para a reação do PCR..... | 39 |
| Quadro 6. | Componentes e volumes dos reagentes da reação de PCR para amplificar o DNA..... | 39 |
| Quadro 7. | Amostras dos <i>T. obscurus</i> , Gervais, 1843, utilizados na extração do DNA, com sua correspondente região, município, localidade, coordenadas dos acidentes no Estado do Pará, Brasil e números de acesso no <i>GenBank</i> | 46 |
| Quadro 8. | Frequência e médias das bases nucleotídicas nas sequências do 16S rRNA das dez amostras do <i>T. obscurus</i> Gervais, 1843, das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil, calculadas no BioEdit | 47 |
| Quadro 9. | Matriz de similaridade genéticas do 16S rRNA, gerada a partir de dez sequências de <i>T. obscurus</i> Gervais, 1843, das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará-Brasil..... | 48 |
| Quadro 10 | Matriz da distância genética com base no alinhamento das sequências do 16S rRNA dos <i>T. obscurus</i> Gervais, 1843, da região Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil..... | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Frequência das informações epidemiológicas do envenenamento por <i>T. obscurus</i> , nas regiões Leste e Oeste do Pará, Brasil..... | 43 |
| Tabela 2. | Frequência das manifestações clínicas do envenenamento por <i>T. obscurus</i> , nas regiões Leste e Oeste do Pará, Brasil..... | 44 |
| Tabela 3. | Frequência dos sintomas e sinais do envenenamento no sítio anatômico da picada por <i>T. obscurus</i> , nas regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil..... | 44 |
| Tabela 4. | Frequência das manifestações clínicas sistêmicas do envenenamento por <i>T. obscurus</i> , nas regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil..... | 45 |
| Tabela 5. | Coefficientes das funções discriminantes obtidas para machos e fêmeas das duas populações analisadas. Em destaque, os valores dos coeficientes que descrevem a maior parte da variação entre os grupos..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| 16S | Genes grande do rRNA e o S representa a Unidade <i>Svedburg</i> |
| A | Adenina |
| ABAE | Abaetetuba |
| ANAN | Ananindeua |
| AVE | Aveiro |
| BEL | Belém |
| BENE | Benevides |
| C | Citosina |
| CA_LA | Largura anterior da carapaça |
| CA_LP | Largura posterior da carapaça |
| Ca ²⁺ | Cálcio |
| CHE_A | Altura da chela do pedipalpo direito |
| CHE_C | Comprimento da chela do pedipalpo direito |
| CHE_L | Largura da chela do pedipalpo direito |
| Cl ⁺ | Cloro |
| Co_total | Comprimento corporal total |
| COI | Citocromo Oxidase I |
| COL | Colares |
| Da | Daltons |
| DM_C | Comprimento do dedo móvel do pedipalpo direito |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FEM_C | Comprimento do fêmur do pedipalpo direito |
| FEM_L | Largura do fêmur do pedipalpo direito |
| G | Guanina |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| HUJBB | Hospital Universitário João de Barros Barreto |
| IGMI | Igarapé-Miri |
| K ⁺ | Potássio |
| LEMAP/NMI | Laboratório de Entomologia Médica e Animais Peçonhentos do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do P |
| MET1_A | Altura do I segmento metassomal |
| MET1_C | Comprimento do I segmento metassomal |
| MET1_L | Largura do I segmento metassomal |
| MET2_A | Altura do II segmento metassomal |
| MET2_C | Comprimento do II segmento metassomal |
| MET2_L | Largura do II segmento metassomal |
| MET3_A | Altura do III segmento metassomal |
| MET3_C | Comprimento do III segmento metassomal |
| MET3_L | Largura do III segmento metassomal |
| MET4_A | Altura do IV segmento metassomal |
| MET4_C | Comprimento do IV segmento metassomal |
| MET4_L | Largura do IV segmento metassomal |
| MET5_A | Altura do V segmento metassomal |
| MET5_C | Comprimento do V segmento metassomal |
| MET5_L | Largura do V segmento metassomal |
| MP | Máxima Parcimônia |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> |
| mtDNA | DNA mitocondrial |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

| | |
|-----------------|---|
| Na ⁺ | Sódio |
| NJ | <i>Neighbor-Joining</i> |
| NPRO | Novo Progresso |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| rRNA | ácido ribonucléico ribossômico |
| RUR | Rurópolis |
| SAN | Santarém |
| <i>T</i> | <i>Tityus</i> |
| T | Timina |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| Tc1,Tc54 | <i>T. cambridgei</i> (1, 30, ... 54) |
| TEL_A | Altura do télson |
| TEL_C | Comprimento do télson |
| TEL_L | Largura do télson |
| TIB_C | Comprimento da tíbia do pedipalpo direito |
| TIB_L | Largura da tíbia do pedipalpo direito |
| To4.....15 | <i>T. obscurus</i> (4.....15) |
| ToL | <i>T. obscurus</i> Leste |
| ToO | <i>T. obscurus</i> Oeste |
| TRAI | Trairão |
| TRAQ | Traquateua |

SUMÁRIO

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. | REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 2.1. | Os escorpiões | 21 |
| 2.2. | <i>Tityus obscurus</i> Gervais, 1843 | 23 |
| 2.3. | Escorpionismo | 24 |
| 2.4. | Marcadores moleculares | 26 |
| 2.5. | A peçonha dos escorpiões | 27 |
| 2.6. | Estudo morfométrico | 30 |
| 3. | JUSTIFICATIVA | 32 |
| 4. | OBJETIVOS | 33 |
| 4.1. | Objetivo geral | 33 |
| 4.2. | Objetivos específicos | 33 |
| 5. | MATERIAL E MÉTODO | 34 |
| 5.1. | Tipo de estudo | 34 |
| 5.2. | Área do estudo | 34 |
| 5.3. | Identificação dos espécimes | 34 |
| 5.4. | Amostras do estudo | 34 |
| 5.4.1. | Estudo do escorpionismo..... | 34 |
| 5.4.2. | Estudo molecular..... | 35 |
| 5.4.3. | Estudo morfológico..... | 36 |
| 5.4.4. | Estudo da peçonha..... | 36 |
| 5.5. | Análise da casuística | 36 |
| 5.6. | Análise molecular | 36 |
| 5.6.1. | Extração do DNA..... | 36 |
| 5.6.2. | Marcadores moleculares..... | 37 |
| 5.6.3. | Reação em Cadeia da Polimerase..... | 37 |
| 5.6.4. | Eletroforese do produto de PCR..... | 37 |
| 5.6.5. | Sequenciamento do DNA..... | 38 |
| 5.6.6. | Análise das sequências do DNA..... | 39 |
| 5.6.7. | Análise de agrupamento e filogenética..... | 39 |
| 5.7. | Análise morfológica | 40 |
| 5.7.1. | Medidas morfométricas..... | 40 |

| | | |
|---------|--|----|
| 5.8. | Análise da peçonha | 40 |
| 4.8.1. | Fracionamento cromatográfico da peçonha por <i>RP-HPLC</i> | 40 |
| 5.8.2. | Análises por espectrometria de massa..... | 40 |
| 5.9. | Aspectos éticos | 42 |
| 5.9.1. | Obtenção das licenças..... | 42 |
| 5.9.2. | Critérios de inclusão das vítimas na pesquisa..... | 42 |
| 5.10. | Análises | 42 |
| 5.10.1. | Análise estatística..... | 42 |
| 6. | RESULTADOS | 43 |
| 6.1. | Da casuística | 43 |
| 6.2. | Do molecular | 45 |
| 6.2.1. | Sequências de DNA das amostras..... | 45 |
| 6.2.2. | Composição nucleotídica..... | 46 |
| 6.2.3. | Análise de similaridade e diversidade..... | 47 |
| 6.2.4. | Análise dos fenogramas..... | 48 |
| 6.3. | Da morfologia | 50 |
| 6.3.1. | Análise morfológica..... | 50 |
| 6.3.2. | Análise de conglomerados..... | 50 |
| 6.3.3. | Análise Discriminante..... | 50 |
| 6.4. | Da análise química | 54 |
| 6.4.1. | Fracionamento cromatográfico da peçonha bruta por <i>RP-HPLC</i> | 54 |
| 6.4.2. | Análise por espectrometria de massa..... | 57 |
| 7. | DISCUSSÕES | 59 |
| 7.1. | Da casuística | 59 |
| 7.2. | Do molecular | 62 |
| 7.3. | Da morfologia | 63 |
| 7.4. | Da peçonha | 64 |
| 7.5. | Relação das manifestações clínicas com as toxinas | 65 |
| 7.6. | Variabilidade geográfica do <i>T. obscurus</i> | 66 |
| 8. | CONCLUSÕES | 68 |
| | REFERÊNCIAS | 70 |
| | ANEXOS | 81 |
| | APÊNDICES | 84 |

1. INTRODUÇÃO

O envenenamento por escorpião ocorre tanto do Novo como no Velho Mundo (HORTA; CALDEIRA; SARES, 2007; GÓMEZ et al., 2010; JALALI et al., 2010), onde cerca de trinta espécies são consideradas potencialmente perigosas para os seres humanos (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008).

A fauna brasileira de escorpiões é constituída por mais de uma centena de escorpiões, porém, quatro espécies são mais incriminadas nos envenenamentos, destes se destaca o *T. obscurus* na região amazônica (BRASIL, 2001, 2009), que mostra clínica diferenciada nos envenenamentos no Estado do Pará. Entretanto, poucos são os estudos clínicos do envenenamento, da morfologia e do molecular dos espécimes e a caracterização química da peçonha na literatura mundial, contudo, nenhum relato compara estas variáveis. Por isso, nos propomos a realizar esta tese que objetiva analisar e comparar estas variáveis, visando encontrar uma resposta às manifestações clínicas diferenciadas encontradas em regiões distintas do Estado do Pará.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Os escorpiões

São animais antigos cujos primeiros fósseis encontrados datam de 425-450 milhões de anos. O nome escorpião deriva do latim *scorpio/scorpionis*. No passado, apresentavam hábitos aquáticos ou anfíbios, possuíam brânquias, pernas adaptadas à locomoção nos ambientes bentônicos e se pareciam com os atuais espécimes. Na era carbonífera (325-350 milhões de anos), passaram a colonizar o ambiente terrestre (CRUZ, 1994).

São encontrados em quase todos os ecossistemas terrestres, podendo viver em condições físicas extremas e adversas. Habitam regiões quentes e temperadas, como desertos, savanas, cerrados, florestas temperadas e tropicais. Algumas espécies se adaptaram a elevadas altitudes, como nos Andes peruanos (LOURENÇO, 1997), ou nas profundezas, como em grutas de até 800 metros (LOURENÇO; FRANCKE, 1985); outros suportam baixas temperaturas (CRUZ, 1994); porém, são os ambientes áridos que apresentam a maior diversidade de espécies (LUCAS; DA SILVA JÚNIOR, 1992).

Segundo Lucas e Da Silva Júnior (1992), Lourenço e Von Eickstedt (2009) e Candido (2010), o corpo dos escorpiões é formado pela carapaça (cefalotórax, ou prossoma), tronco (abdome, ou mesossoma) e a cauda (metassoma) (Fig. 1). Esta última é formada por cinco segmentos e pelo telson na extremidade final da cauda, onde se encontram duas glândulas produtoras da peçonha e o ferrão, ou aguilhão, para inocular a peçonha que é utilizada para imobilização das presas (BRASIL, 2009; CANDIDO, 2010).

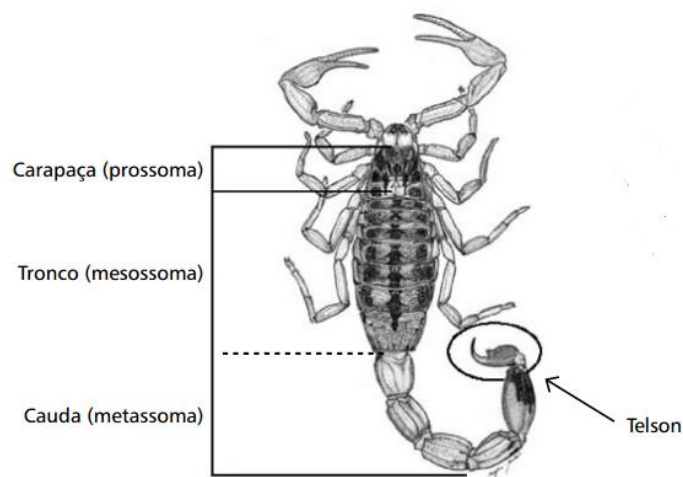


Figura 1. Aspecto morfológico do escorpião
Fonte: Brasil (2009).

Os escorpiões pertencem ao Reino Animalia; Filo Arthropoda; Subfilo Chelicerata; Classe Arachnida e Ordem Scorpiones, estando representados em todos os continentes, com exceção da Antártida. A fauna mundial é constituída por 18 famílias (Quadro 1), 151 gêneros e 1.947 espécies; destes, cerca de trinta espécies são consideradas potencialmente perigosas para os seres humanos, exceto uma espécie da família Scorpionidae. As demais pertencem à família Buthidae, que inclui 56 gêneros e 938 espécies distribuídos no Novo e no Velho Continente (PRENDINI, 2011; CHIPPAUX; GOYFFON, 2008), com destaque para aquelas pertencentes aos gêneros *Androctonus* e *Leiurus* (África do Norte e Oriente Médio), *Centruroides* (México e Estados Unidos) e *Tityus* (América do Sul e Trinidad) (LOURENÇO; VON EICKSTEDT, 2009).

Das 18 famílias de escorpiões descritas no mundo, quatro são encontradas no Brasil (Quadro 2), com mais de 160 espécies (BRASIL, 2009; LOURENÇO, 2002; LOURENÇO; VON EICKSTEDT, 2009), entre estas, o *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* e *T. obscurus* são as que mais causam envenenamentos (BUCARETCHI et al., 1995; BRASIL, 2009; PARDAL et al., 2003; SANTOS et al., 2010); entretanto, na região Norte são encontradas três famílias (Buthidae Kock, 1837; Chactidae Pocock, 1893; Hemiscorpiidae Pocock, 1893), 12 gêneros e 44 espécies (LOURENÇO, 2002), sendo o *T. obscurus* incriminado na maioria dos acidentes (PARDAL et al., 2003; BRASIL, 2009).

Quadro 1. Componentes das famílias da Fauna Mundial de escorpiões

| | |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Bothriuridae Simon, 1880 | Iuridae Thorell, 1876 |
| Buthidae C.L. Koch, 1837 | Pseudochactidae Gromov, 1998 |
| Chactidae Pocock, 1893 | Scorpionidae Latreille, 1802 |
| Chaerilidae Pocock, 1893 | Scorpiopidae Kraepelin, 1905 |
| Diplocentridae Karsch, 1880 | Superstitioniidae Stahnke, 1940 |
| Euscorpiidae Laurie, 1896 | Troglotayosicidae Lourenço, 1998 |
| Hemiscorpiidae Pocock, 1893 | Typhlochactidae Mitchell, 1971 |
| Heteroscorpionidae Kraepelin, 1905 | Urodacidae Pocock, 1893 |
| Hormuridae Laurie, 1896 | Vaejovidae Thorell, 1876 |

Fonte: Prendini (2011)

Quadro 2. Fauna escorpiônica do Brasil.

Família Bothriuridae Simon, 1880:

Gêneros:

- *Bothriurus* Peters, 1861.
- *Brachistosternus* Pocock, 1894.
- *Brazilobothriurus* Lourenço & Monod, 2000.
- *Thestylus* Simon, 1880.
- *Urophonius* Pocock, 1893.

***Família Buthidae Simon, 1879:**

Gêneros:

- *Ananteris* Thorell, 1891.
- *Isometrus* Hemprich & Ehrenberg, 1828.
- *Microtityus* Kjellesvig-Waerung, 1966.
- *Rhopalurus* Thorell, 1876.
- *Tityus* Koch, 1836.

***Família Chactidae Laurie, 1896:**

Gêneros:

- *Broteochactas* Pocock, 1893.
- *Brotheas* Koch, 1837.
- *Chactopsis* Kraepelin, 1912.
- *Guyanochactas* Lourenço, 1998.
- *Teuthraustes* Simon, 1878.
- *Vachoniochactas* Gonzalez-Sponga, 1978.

***Família Hemiscorpiidae Pocock, 1893:**

Gênero:

- *Opisthacanthus* Peters, 1861.

As famílias sinalizadas com Asterix são encontradas na região Norte

Fonte: Lourenço (2002); Lourenço e Von Eickstedt (2009).

2.2. *Tityus obscurus* Gervais, 1843.

A espécie *T. obscurus* (Fig. 2) está incluída no grupo dos *Tityus asthenes* (LOURENÇO, 2002), sendo conhecida como o escorpião preto da Amazônia (BRASIL, 2009). Em revisão crítica das espécies de *Tityus* do Pará, Lourenço (1984) refere que *T. cambridgei* Pocock, 1897 é sinônimo de *T. paraensis* Kraepelin, 1896, de *T. amazonicus* Giltay, 1928 e de *T. sampaiocrulsi* Mello-Leitão, 1931. Porém, atualmente, Lourenço e Leguin (2008) ao estudarem dois espécimes fêmeas de *Tityus (Atreus) obscurus*, oriundos da Guiana Francesa e depositados no *Muséum National d'Histoire Naturelle* de Paris, referiram ser *Tityus obscurus* Gervais, 1843 sinônimo sênior de *T. paraensis* Kraepelin, 1896 e de *T. cambridgei*, Pocock, 1897. Desse modo, a denominação de *T. obscurus* passou a prevalecer sobre as demais.

Esta espécie apresenta ampla distribuição, sendo comum na Guiana Francesa e em todo o Estado do Pará, Amapá e Mato Grosso (LOURENÇO, 1984, 2002; BRASIL, 2009).



Figura 2. Aspecto morfológico dorsal e ventral do *T. obscurus*, macho.

Legendas: Pe=pedipalpos; Ma=mão ou chela; De=dedos ou pinças; Ti=tíbia; Fe=fêmur; Qe=quelífera; Pr=prossoma; Ms=mesossoma; Mt=metassoma; Te=telson; Sa=subaculear; Ac=acúleo ou ferrão; Ps=pernas; Tg=tergitos; Et=esternitos; Pn=pente; Es=esterno.

Fonte: autor.

2.3. Escorpionismo

Segundo Chippaux e Goyffon (2008), cerca de 2 bilhões e 300 milhões de pessoas vivem nas áreas de risco, com 1 milhão e 200 mil acidentes anuais. Esses autores identificaram sete áreas: norte do Saara Africano, região Sahel da África (fronteira entre o deserto do Saara e as terras mais férteis), sul da África, Oriente Médio, sul da Índia, México, América do Sul a Leste dos Andes.

No Brasil, as espécies responsáveis pelos envenenamentos graves e até mesmo fatais pertencem ao gênero *Tityus* (BRASIL, 2009), com destaque para *T. serrulatus* (encontrado no Centro Oeste, Sudeste, Sul e Nordeste), estando associado aos acidentes de maior gravidade principalmente em crianças (BUCARETCHI et al., 1995; BRASIL, 2001; SOARES; AZEVEDO; DE MARIA, 2002; GUERRA et al., 2008; SANTOS et al., 2010). O *T. bahiensis*

(Sudeste, Sul, Nordeste e Centro Oeste), *T. stigmurus* (Nordeste) e *T. obscurus* (Pará, Amapá e Mato Grosso) são as outras espécies de grande importância do escorpionismo no País.

Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (BRASIL, 2014)¹ registram 172.618 acidentes por escorpião no Brasil, no período de 2010 a 2012, com média de 57.539 casos anuais; destes, 52,74% procedentes de Minas Gerais, Bahia e S. Paulo. Enquanto a região Norte registrou 8.503 acidentes, correspondendo a 4,9% dos casos do Brasil, tendo o Estado do Pará contribuído com 5.056 (59,4%) de todos os casos da região.

No Estado do Pará, os agentes do escorpionismo são denominados escorpiões ou lacraus (PARDAL et al., 2003). Os primeiros casos foram relatados por Asano et al. (1996), em estudo clínico e epidemiológico de 12 pacientes internados no Hospital Universitário João de Barros Barreto, em Belém do Pará (HUIBB), no período de 1992-1995. Em 2002, Martins e colaboradores descreveram 61 casos ocorridos no ano de 1996, todos atendidos no HUIBB.

Fora da capital do Estado, existem relatos de acidentes no município de Itaituba, localizado na região Oeste do Estado, onde os escorpiões foram responsáveis por 15,8% dos envenenamentos por animais peçonhentos atendidos em hospital local (PARDAL; CARDOSO; FAN, 1999); enquanto que no município de Oriximiná, entre os moradores ribeirinhos do rio Trombetas, a ocorrência foi de 16,8% (PARDAL et al., 2001); em Altamira e Brasil Novo, Sperotto et al. (2001) descreveu 27 casos; contudo no Hospital Municipal de Santarém, Pardal et al. (2003) atendeu 72 vítimas; entretanto, Pinheiro e Oliveira (2003) em Santarém, registraram acidentes escorpiônicos por *Rhopalurus amazonicus*.

No Brasil, os escorpiões de importância médica são o *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* e *T. obscurus*, destacando-se a espécie *T. serrulatus*, (BRASIL, 2001, 2009). Na Amazônia, ocorrem envenenamentos pelas espécies *T. obscurus*, *T. metuendus* e *T. silvestres*, sendo a primeira a de maior importância (ASANO et al., 1996; FRAIHA NETO; PARDAL, 1996; SPEROTTO et al., 2001; MARTINS et al., 2002; PARDAL et al., 2003).

A sintomatologia e gravidade dos envenenamentos são dependentes da quantidade de peçonha inoculada e dos mediadores químicos liberados, sendo classificados no Brasil em leves, moderados e graves (BRASIL, 2001) (Quadro 3).

No Pará, dependendo da região do Estado, o envenenamento pelo *T. obscurus* causa sinais e sintomas diferenciados. Nos municípios de Santarém, Belterra, Prainha, Itaituba, Altamira e Brasil-Novo, são descritas manifestações neurológicas de mioclonia em que as vítimas referem como sensação de “choque elétrico” pelo corpo, disartria, dismetria e ataxia,

¹ <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

entre outras (PARDAL; CARDOSO; FAN, 1999; SPEROTTO et al., 2001; PARDAL et al., 2003), ao contrário daqueles envenenamentos pelo mesmo artrópode, ocorridos na região metropolitana de Belém, onde entre as neurológicas foram observadas somente tontura e sonolência (MARTINS et al., 2002).

Dentre os estudos regionais sobre a gravidade dos acidentes, destacam-se o de Martins et al. (2002), Pardal, Ribeiro e Miranda (2002) e Yamano et al. (1999) em Belém, na região Leste do Estado do Pará, que mostram os casos leves em maior número, seguidos pelo moderado e grave; porém, Sperotto et al. (2001) e Pardal et al. (2003) observaram, no Sul (Altamira e Brasil Novo) e Oeste do Estado (Santarém, Belterra e Prainha), que os moderados prevaleceram sobre os demais, sem ocorrência de casos graves.

2.4. Marcadores moleculares

Vários marcadores moleculares, tanto nucleares como mitocondriais, têm sido usados para o estudo da filogenia dos artrópodes (GIRIBET; EDGECOMBE; WHEELER, 2001). A primeira informação sobre a aplicabilidade da análise do DNA mitocondrial (mtDNA) para taxonomia a nível de espécies de escorpiões foi descrita por Fet e Pondexter (1992) com *Centruroides exilicauda*.

Dentre os marcadores mitocondriais utilizados para estudar a ampla gama de táxons, destacam-se os genes RNA ribossômico (rRNA) 12S e 16S (S representa a unidade *Svedburg*, uma medida da taxa de sedimentação) e o COI (Citocromo Oxidase I) (PALUMBI, 1996). Atualmente os genes 16S e COI são os mais utilizados no estudo do mtDNA dos escorpiões, como mostram os registros do *GenBank* (NCBI, 2014)², sendo o segmento 16S utilizado em 428 estudos relacionados à família Buthidae. Dos escorpiões de importância médica que ocorrem no Brasil nos quais este gene foi estudado, existem dois registros para o *T. serrulatus*, um para *T. bahiensis* e dez para o *T. obscurus*, que fazem parte do presente estudo. O outro segmento estudado para esta mesma família é o COI, com 429 registros.

Os genes rRNA são segmentos altamente conservados entre os vertebrados e insetos (WOLSTENHOLME, 1992). São denominados de genes pequeno (*small*) 12S (SrRNA) e grande (*large*) 16S (LrRNA), contendo 789 e 1326 nucleotídeos, respectivamente. São os menores genes de metazoários descritos, com somente uma cópia por genoma, não contendo espaços nas suas regiões (CLARY; WOLSTENHOLME, 1985; SIMON et al., 1994).

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

O primeiro estudo com escorpiões empregando o marcador 16S rRNA foi realizado por Gantenbein et al. (1999), sendo aplicado para caracterizar a filogenia a nível de espécie dos escorpiões do gênero *Euscorpis* (GANTENBEIN; LARGIADÈR, 2003; FET et al., 2005), do gênero *Centruroides* (TOWLER et al., 2001) e de outros da família Buthidae (TERUEL; FET; GRAHAM, 2006; COSTA, 2008).

Vários estudos utilizaram o *primer* 16S rRNA específico para escorpião, do trabalho pioneiro de Gantenbein et al. (1999), também denominado de 16Sbr ou 16Sb (SIMON et al., 1994) que corresponde à posição 12.867-12.887 do genoma da *Drosophila yakuba* (CLARY; WOLSTENHOLME, 1985) (Fig. 3). O *primer* antisense utilizado nesse mesmo estudo também tem uma sequência específica para escorpião e foi projetado por Vitor Fet (GANTENBEIN et al., 1999) e corresponde à posição 13.218-13.310 no genoma da *Drosophila yakuba* (CLARY; WOLSTENHOLME, 1985).

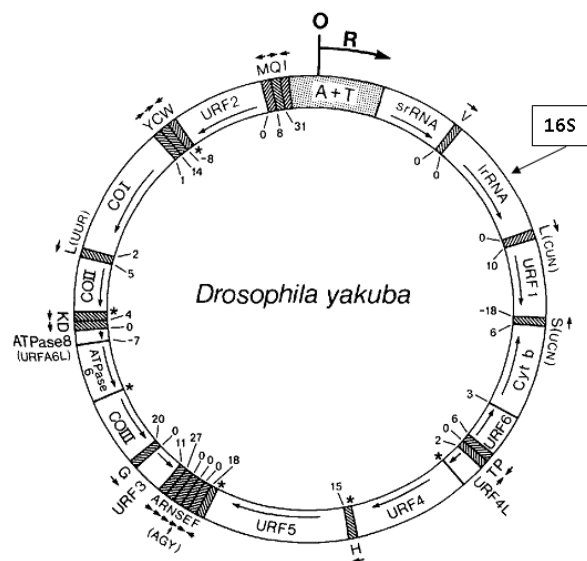


Figura 3. Mapa do genoma mitocondrial da *Drosophila yakuba*, mostrando a localização do gene 16S rRNA.

Fonte: Clary; Wolstenholme (1985).

2.5. A peçonha dos escorpiões

A peçonha dos escorpiões é constituída de proteínas altamente complexas que, quando inoculadas, produzem alterações no organismo em função da maior ou menor toxicidade e da quantidade produzida pelas diferentes espécies, sendo secretada por um par de glândulas de origem tegumentar situadas no telson (LOURENÇO, 2002; BRASIL, 2009).

A peçonha pode ser coletada por maceração da glândula ou estimulação elétrica do telson (LUCAS, 2003). É uma substância mucosa, opalescente, com aspecto leitoso, solúvel na água. A parte solúvel é uma mistura complexa, contendo muco, sais inorgânicos,

moléculas orgânicas de baixo peso molecular e pequenas proteínas denominadas de peptídeos neurotóxicos; serotonina e inibidores enzimáticos também estão presentes na peçonha (RODRIGUEZ DE LA VEJA; POSSANI, 2005, 2007).

Considerando-se as diferentes espécies de escorpiões conhecidas no mundo, estima-se que a peçonha contenha pelo menos 100 mil biomoléculas, com potenciais de aplicações farmacológicas. Porém, cerca de 400 peptídeos tóxicos distintos foram isolados (TAN et al., 2006), e caracterizados estruturalmente mais de 30 espécies diferentes de escorpiões (POSSANI et al., 1999), entre estas, as africanas *Androctonus australis* e *Leiurus quinquestriatus*, a mexicana *Centruroides suffusus*, a norte-americana *Centruroides sculpturatus*, a colombiana *Tityus pachyurus* (GUERRERO-VARGAS et al., 2012), as brasileiras *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* (BECERRIL et al., 1996) e *Tityus obscurus* (BATISTA et al., 2000, 2002a, 2002b, 2004; MURGIA et al., 2004, GUERRERO-VARGAS et al., 2012).

Magalhães (1928) acreditava ser a toxina escorpiônica neurotrópica e neurotóxica, e realizou diversas experiências animais, demonstrando a ação da peçonha de *T. serrulatus* sobre os núcleos vagais, postulando que o processo de intoxicação deveria se caracterizar por lesões bulbares. No Brasil, Gomez e Diniz (1966) foram pioneiros ao isolar, a partir da peçonha bruta de *T. serrulatus*, uma fração purificada (tityustoxina) que demonstrou ação no sistema nervoso periférico.

Devido a sua especificidade e alta afinidade, as toxinas dos escorpiões têm sido utilizadas como ferramentas farmacológicas para caracterizar diferentes receptores de proteínas presentes nos canais iônicos (LECOMTE et al., 1998). De acordo com sua ação sobre estes canais de mamíferos, insetos ou artrópodes, as neurotoxinas dos escorpiões são responsáveis pelas manifestações nos organismos por reconhecerem os canais iônicos (MENEZ et al., 1992; POSSANI et al., 2000). Essas neurotoxinas são divididas em quatro famílias diferentes conforme a sua especificidade de ligação nos canais iônicos: as que agem nos canais para Na^+ contêm 60-76 resíduos de aminoácidos (POSSANI et al., 1999; RODRIGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005, 2007), nos canais para K^+ , contêm 23 a 43 resíduos (RODRIGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2004), nos canais para Cl^- geralmente com 29 a 41 aminoácidos (POSSANI et al., 2000), e nos canais para Ca^{2+} , com peptídeos de 33 a 35 resíduos de aminoácidos (VALDIVIA; POSSANI, 1998).

As neurotoxinas da peçonha do escorpião contêm peptídeos de baixo peso molecular que especificamente modulam a permeabilidade de vários canais iônicos das células (POSSANI et al., 2000). Por isso, têm sido intensivamente estudadas, representando excelente

modelo experimental para o estudo dos canais iônicos (BECERRIL; MARANGONI; POSSANI, 1997). Também interagem com outros alvos moleculares, como membranas e receptores, acarretando diversas ações fisiológicas, como desestabilização da membrana, bloqueio dos sistemas nervoso central e periférico, alteração da musculatura lisa e esquelética, dentre outras (MENEZ et al., 1992).

As peçonhas do *T. obscurus* estudadas até o momento são de espécimes capturados em Balbina, no Estado do Amazonas; Samuel, em Roraima; Santana, no Amapá (BATISTA et al., 2000); no Amapá sem localização precisa (GUERRERO-VARGAS et al., 2012); Anajás e Afuá na Ilha de Marajó, no Estado do Pará (BATISTA et al., 2002b, 2004), dentre outros sem especificar as áreas (BATISTA et al., 2002a; MURGIA et al., 2004).

Análise da peçonha do *T. obscurus* tem demonstrado a existência de pelo menos 102 componentes peptídicos; destes, somente dezoito estruturas primárias completas de peptídeos são conhecidos. Três deles são toxinas específicas para canais de K^+ e quinze atuam em canais para Na^+ . Entre as toxinas para K^+ temos: Tc1 (*T. cambridgei* 1) (BATISTA et al, 2000), Tc30 e Tc32 (BATISTA et al. 2002a). Enquanto as para canais de Na^+ encontramos: Tc48a, Tc48b, Tc49a, Tc54 e Tc49b (BATISTA et al, 2002a, 2004; MURGIA et al., 2004). Recentemente, 12 toxinas moduladoras de canais para Na^+ foram obtidas e sequenciadas de glândulas da peçonha do *T. obscurus* por Guerrero-Vargas et al. (2012), identificadas e denominadas To4 a To15 (*T. obscurus* 4 a 15). Estas neurotoxinas de escorpiões, segundo Borja-Oliveira et al. (2009), em estudos *in vitro*, demonstraram que possuem efeitos inotrópicos positivos e que também atuam diretamente sobre musculatura esquelética de ratos.

Peçonhas de escorpiões são importantes fontes de moléculas bioativas complexas, sendo inicialmente seu estudo baseado na abordagem com base na sua letalidade ou na sua capacidade para induzir alguns efeitos farmacológicos (NISHIKAWA et al., 1994). Estes métodos conduziram à identificação e purificação de um grande número de toxinas altamente letais da peçonha de escorpião. Atualmente, dentre os métodos mais utilizados para estudo químico de venenos e peçonhas de origem animal, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência ou *High performance liquid chromatography (HPLC)* como etapa inicial e, em seguida, a análise por espectrometria de massa ou *Mass Spectrometry (MS)* (ARAÚJO; ASSIS JR.; SOBREIRA, 2007; FENG et al., 2008).

O *HPLC* é um método físico-químico de separação fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases que estão em contato íntimo, que são a fase móvel e a estacionária. É método

analítico utilizado em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses e em análises para separar, detectar, quantificar e isolar compostos (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A MS é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, pela determinação de suas massas moleculares na forma iônica, baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético e sendo, considerada uma importante ferramenta para investigar os componentes das peçonhas, inclusive em busca de novas drogas (ESCOUBAS, QUINTON, NICHOLSON, 2008).

Ultimamente, estas técnicas vêm sendo utilizadas, intensivamente, para identificação e quantificação das peçonhas de vários animais, entre eles a do caracol *Conus consors* (DUTERTRE et al., 2010); abelhas *Osmia rufa* (STÖCKLIN, et al.; 2010), e dos escorpiões *Rhopalurus junceus* de Cuba (RODRÍGUEZ-RAVELO et al., 2013), *Scorpion maurus palmatus* do Egito (ABDEL-RAHMAN et al., 2009), *Androctonus crassicauda* da Turquia (CALISKAN et al., 2006), assim como de escorpiões brasileiros, destacando o *Opisthacanthus cayaporum* (SCHWARTZ et al., 2008), o *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. stigmurus* (BECERRIL; MARANGONI; POSSANI, 1997) e *T. obscurus* (BATISTA et al., 2000, 2002a, 2002b, 2004; MURGIA et al., 2004; GUERRERO-VARGAS et al., 2012).

2.6. Estudo morfométrico

A distinção de espécies de escorpiões é bastante complexa devido à grande conservação da morfologia externa; assim, métodos taxonômicos alternativos, como a morfometria, podem ser mais eficientes para executar essa tarefa (LOURENÇO, 2002). O que fez Mello-Leitão (1939) aumentar o número de caracteres morfológicos para o diagnóstico, elevando o número de espécies de *Tityus*; enquanto Lourenço (1998), acrescentando a estes caracteres o padrão de cor, estabeleceu uma classificação para o gênero *Tityus*. Entretanto, neste gênero, a morfometria pouco tem sido utilizada e, quando ocorre, constitui-se apenas na estatística descritiva das medidas de poucos indivíduos relatados em trabalhos de descrição ou revisão de espécies, sendo escassas análises comparativas que envolvam testes estatísticos para comprovar a diferença entre elas (PINTO-DA-ROCHA; LOURENÇO, 2000). Atualmente, informações morfométricas estão sendo frequentemente aplicadas para justificar as posições taxonômicas dos escorpiões (PONCE-SAAVEDRA et al., 2009; HUGHES, 2011).

O *T. obscurus* é reconhecido como uma única espécie e foi descrito de apenas um indivíduo proveniente da Guiana Francesa. Quando adulto é um escorpião grande, medindo

de 8,5 a 10 cm de comprimento (Fig. 2). O corpo e os segmentos do metassoma são uniformemente negros, porém os esternitos são menos escuros. Quando jovens, a coloração é matizada de preto com amarelo. Os cinco segmentos do metassoma possuem quilhas em números de 10-10-8-8-5 e as granulações dos dedos móveis e fixos da chela (mão) com 17 fileiras oblíquas. Possui um acúleo (ferrão) e um espinho subaculear pontiagudo. Apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos bem distintos, apresentando os pedipalpos bastante finos e alongados em relação às fêmeas. O pente possui de 18 a 22 dentes e a lamela média basal encontra-se dilatada no sexo feminino (LOURENÇO; LEGUIN, 2008).

O *T. obscurus* tem seu habitat na Floresta Amazônica, mas, também pode ser encontrado em áreas antropizadas que apresentam características que podem possibilitar o surgimento de um padrão polimórfico (LOURENÇO; VON EICKSTEDT, 1988), semelhante ao registrado para outros Buthidae, bem como em integrantes de outras famílias que possuem uma extensa distribuição geográfica, nos quais se observa a existência de variações na coloração e em medidas de estruturas do pedipalpo e metassoma (PONCE-SAAVEDRA, et al. 2009; HUGHES, 2011).

Sabe-se que a heterogeneidade ambiental (especialmente com relação ao tipo de vegetação e relevo, que podem ser barreiras geográficas) e eventos geológicos ocorridos durante a evolução dos ecossistemas atuais isolam e selecionam, simultaneamente, caracteres adaptativos a determinados ambientes, em populações alopátricas de uma mesma espécie que, posteriormente, podem levar à especiação ou à origem de polimorfismos intraespecíficos (HARRINGTON, 1984; SIMAIAKIS; GIOKAS; KORSÓS, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

No Brasil, a fauna escorpiônica pertence às famílias Bothriuridae, Buthidae, Chactidae e Hemiscorpiidae (LOURENÇO, 2002; LOURENÇO; VON EICKSTEDT, 2009). Destas, é na família Buthidae que encontramos os escorpiões de importância em saúde pública, todos pertencentes ao gênero *Tityus*, sendo o *T. serrulatus* o responsável por maior gravidade (BUCARETCHI et al., 1995; BRASIL, 2001; SOARES; AZEVEDO; DE MARIA, 2002; SANTOS et al., 2010), porém, na Amazônia, é o *T. obscurus* o mais incriminado no envenenamento humano (MARTINS et al., 2002; PARDAL et al., 2003; MAESTRI NETO et al., 2008).

O *T. obscurus* vem recentemente ganhando atenção dos pesquisadores em decorrência a sintomatologia da região Oeste do Estado do Pará ser predominantemente neurológica (PARDAL et al., 2003), sendo estes sintomas distintos daqueles de outras regiões da Amazônia Legal (MARTINS et al., 2002) e por outras espécies causadoras de acidentes no Brasil (HORTA; CALDEIRA; SARES, 2007; GUERRA et al., 2008). Por isso, estudos têm sido desenvolvidos com esta espécie amazônica, principalmente na composição de sua peçonha (BATISTA et al., 2000, 2002a, 2002b, 2004; MURGIA et al., 2004; GUERRERO-VARGAS et al., 2012); da toxicidade (NISHIKAWA et al. 1994); do morfológico, porém nenhum estudo morfométrico foi desenvolvido com esta espécie (LOURENÇO, 2002), molecular e filogenético (COSTA, 2008; GUERRERO-VARGAS et al., 2012). Entretanto, nenhum estudo comparativo tem sido realizado destas variáveis. Desta forma, nos propomos a analisar e comparar os aspectos moleculares e morfométricos do escorpião, do envenenamento e químico da peçonha, visando contribuir com o conhecimento da diversidade do escorpionismo e do *T. obscurus* Gervais, 1843, em duas regiões distintas da Amazônia brasileira.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Descrever, analisar e comparar os aspectos clínico-epidemiológicos dos envenenamentos, o molecular ao nível do ácido desoxirribonucléico (DNA) de espécimes que ocasionaram acidentes, assim como a morfometria e a peçonha destes espécimes capturados nas regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil, visando contribuir para o conhecimento da diversidade do escorpionismo e do escorpião *T. obscurus* Gervais, 1843, nas áreas de estudo.

4.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar e comparar os aspectos epidemiológico e clínico do envenenamento por *T. obscurus* nas áreas do estudo;
2. Sequenciar e comparar o gene 16S do ácido ribonucléico ribossômico (16S rRNA) mitocondrial de escorpiões *T. obscurus* que ocasionaram envenenamentos nas áreas de estudo;
3. Gerar matrizes genéticas para verificar o grau de similaridade e divergência intraespecífica e interespecífica nas populações de *T. obscurus* das duas regiões;
4. Construir cladogramas do gene 16S rRNA mitocondrial que reflitam as relações de parentesco entre as espécies;
5. Fracionar, identificar e comparar as frações da peçonha do *T. obscurus* das duas regiões distintas, mediante *Reversed-Phase High-performance liquid chromatography (RP-HPLC)*;
6. Proceder análise e comparação dos componentes da peçonha das duas regiões, obtidas por espectrometria de massa tipo *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight/Time-of-Flight (MALDI-TOF/TOF)*;
7. Realizar e comparar as medidas morfométricas do *T. obscurus* das duas regiões;
8. Construir dendogramas das medidas morfométricas dos espécimes provenientes das duas regiões;
9. Determinar o grau de diversidade das variáveis.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1. Tipo de estudo

Trata-se de um modelo descritivo, analítico e comparativo dos aspectos epidemiológico e clínico do escorpionismo, molecular e morfológico do escorpião e químico da peçonha do *T. obscurus* de duas regiões distintas do Estado do Pará.

5.2. Área do estudo

A pesquisa foi desenvolvida em municípios das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, distantes cerca de 850 km, com clima quente e úmido, temperatura média de 22 a 34⁰C e separadas pelos rios Xingu e Tocantins (Fig. 4).

O estudo epidemiológico e clínico foi realizado nas vítimas de envenenamentos durante o atendimento médico nos hospitais públicos de Belém e Ananindeua (região Leste) e Santarém e Rurópolis (Oeste); o molecular nos escorpiões causadores dos acidentes e doados pelas vítimas; a análise química realizada na peçonha obtida dos *T. obscurus* capturados vivos em Benevides (Leste) e Santarém (Oeste), enquanto a morfometria nas espécies da fauna escorpiônica dos municípios da região Leste (Belém, Ananindeua, Benevides, Traquateua, Colares, Abaetetuba e Igarapé-Miri) e do Oeste (Santarém, Rurópolis, Novo Progresso, Trairão e Aveiro), pertencentes à coleção do Laboratório de Entomologia Médica e Animais Peçonhentos do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (LEMAP/NMT/UFPA).

5.3. Identificação dos espécimes

Os escorpiões foram examinados em estéreo microscópio e identificados preliminarmente como *T. obscurus* Gervais 1843, no LEMAP/NMT/UFPA e depois confirmados no Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan–SP, usando-se a chave taxonômica de Lourenço (2002). Todos os espécimes estão conservados em etanol a 70% e fazem parte da coleção do LEMAP/NMT/UFPA.

5.4. Amostras do estudo

5.4.1. Estudo do escorpionismo

No período de janeiro de 2008 a junho de 2011, em estudo prospectivo, 48 vítimas comprovadamente envenenadas pelo *T. obscurus*, que doaram os espécimes e deram consentimento livre e esclarecido (Apêndice 4), fazem parte desta Tese. Sendo 34 tratados e

submetidos a uma avaliação clínica e epidemiológica por médicos dos hospitais municipais da região Leste (Belém e Ananindeua) e 14 na Oeste (Santarém e Rurópolis) do Estado do Pará.

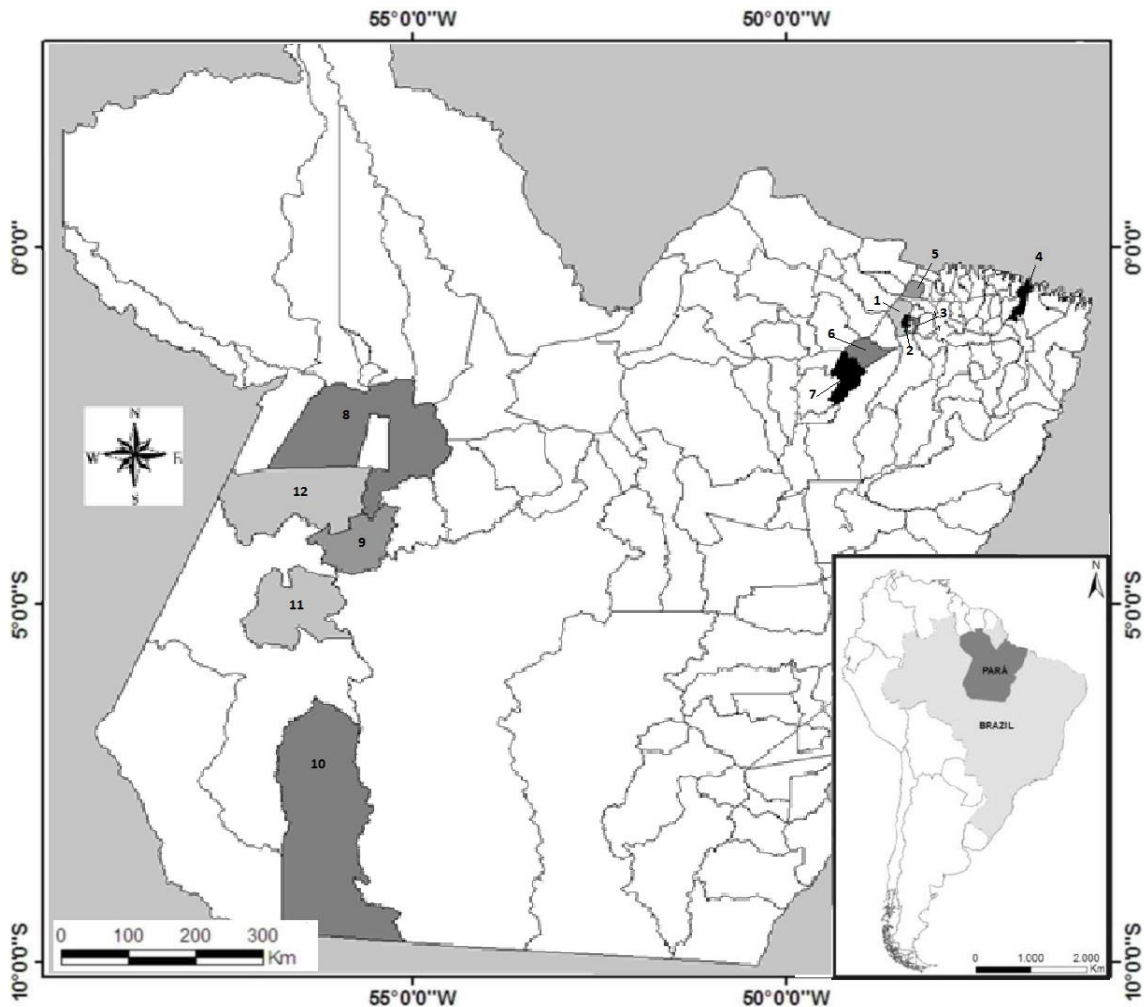


Figura 4. Mapa do Estado do Pará, na Amazônia brasileira.

Sinalizando as áreas do estudo, na Leste: 1-Belém (BEL), 2-Ananindeua (ANAN), 3-Benevides (BENE), 4-Trauateua (TRAQ), 5-Colares (COL), 6-Abaetetuba (ABAE) e 7-Igarapé-Miri (IGMI), e da região Oeste: 8-Santarém (SAN), 9-Rurópolis (RUR), 10-Novo Progresso (NPRO), 11-Trairão (TRAI) e 12-Aveiro (AVE).

Fonte: autor

5.4.2. Estudo molecular

O DNA foi extraído no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, de amostras de *T. obscurus* escolhidas por randomização e responsáveis por envenenamentos, sendo cinco de cada região do estudo (Belém e Santarém), enquanto o sequenciamento foi realizado no Laboratório de Polimorfismos de DNA da UFPA.

5.4.3. Estudo morfológico

A análise morfológica foi realizada em amostras de espécimes de *T. obscurus* depositadas na coleção do LEMAP, sendo 18 procedentes da região Leste: Belém, Ananindeua, Benevides, Trauateua, Colares, Abaetetuba, Igarapé-Miri e 20 da Oeste: Santarém, Rurópolis, Novo Progresso, Trairão e Aveiro, sendo as mensurações morfométricas efetuadas com paquímetro digital em escala milimétrica (SISSOM, 1990).

5.4.4. Estudo da peçonha

A peçonha bruta foi obtida por estimulação elétrica do telson, conforme Candido e Lucas (2004), de 60 espécimes de *Tityus obscurus* coletados por busca ativa na área Leste, em Benevides, e Oeste, em Santarém (30 de cada região). Em seguida, o pool de peçonhas foi liofilizado e armazenado a -20°C . Em Belém, a extração foi realizada no LEMAP/NMT/UFPA e em Santarém, no Laboratório de Pesquisas Zoológicas (LPZ) das Faculdades Integradas do Tapajós. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF.

5.5. Análise da casuística

Foram registrados dados clínicos e demográficos de cada vítima, incluindo idade, sexo, local da picada, o tempo decorrido do acidente para atendimento médico, bem como a gravidade do envenenamento, manifestações clínicas e tratamento (Apêndice 2). Avaliações bioquímicas e hematológicas não foram realizadas. As manifestações clínicas e os critérios de gravidade foram baseados nas normas do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2001), que classifica o envenenamento por escorpiões em leve, moderado e grave (Quadro 3). Todos os pacientes com manifestações locais foram tratados com medicação sintomática, enquanto os com sistêmicas, tratados com antiveneno específico para escorpião. O soro antiescorpiônico utilizado foi produzido pela Fundação Ezequiel Dias de Minas Gerais-Brasil, que contem na sua composição fração F(ab')₂ de imunoglobulinas que neutralizam no mínimo 5 mg da peçonha de referência do escorpião *T. serrulatus* em camundongos.

5.6. Análise molecular

5.6.1. Extração do DNA

Para extração e purificação do DNA foi utilizado o GENTRA® - *Generation® Capture Column™ Kit* (QIAGEN - *Gentra systems* – Cat. No. GC-0050, USA), (QIAGEN,

2010), do tecido muscular de um dos pedipalpos de dez *T. obscurus* conservados em álcool a 70%, seguindo as recomendações do fabricante (Quadro 4).

Quadro 3. Classificação da gravidade dos acidentes escorpiônicos no Brasil.

| Classificação | Manifestações clínicas |
|----------------------|--|
| Leve | Dor e parestesia local |
| Moderado | Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações como náuseas, vômitos, sudorese e sialorreia discreta, agitação, taquicardia e taquipneia. |
| Grave | Além das citadas na forma moderada, presença de uma ou mais das seguintes manifestações: vômitos profusos e incoercíveis, sudorese profusa, sialorreia intensa, prostração, convulsão, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque. |

Fonte: Brasil (2001).

5.6.2. Marcadores moleculares

Foram utilizados oligonucleotídeos específicos de escorpiões que amplificaram o gene mitocondrial 16S rRNA, sendo o *primer* senso o universal LR-J-12887 (5'- CGA TTT GAA CTC AGA TCA- 3') (SIMON et al., 1994), com 18 mer de comprimento e o *primer* antisenso 5'- GTG CAA AGG TAG CAT AAT CA - 3' (GANTENBEIN et al., 1999), com 20 mer de comprimento, sintetizados pela *Operon Technologies Inc* (OPERON, 2010).

5.6.3. Reação em Cadeia da Polimerase

As amostras de DNA extraídas foram amplificadas mediante *Polymerase chain reaction - PCR* (Reação em Cadeia da Polimerase), em termociclador *Mastercycler® Personal Eppendorf*, seguindo os ciclos do protocolo de amplificação mostrados nos Quadros 5 e 6.

5.6.4. Eletroforese do produto de PCR

O produto de *PCR* foi fracionado em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (Tris-borato-EDTA). O DNA foi corado com brometo de etídio (concentração final de 0,5 µg/ml) e as bandas visualizadas em transiluminador de ultravioleta

(UV) de 110 volts UVP *inc*® conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), sendo o resultado visualizado e gravado em cartão de memória.

5.6.5. Sequenciamento do DNA

Para o sequenciamento do DNA, foi utilizando o *kit* para sequenciamento automático “*Big Dye Terminator*” (*Applied Biosystems*), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram analisadas em sequenciadores automáticos modelo Mega Bace® (*GE Healthcare*).

Os reagentes utilizados na reação foram: água, tampão (5X) para sequenciamento, *primer* (3,2pmoles), *bigDye* e DNA. Os *primers* foram os iniciadores 16S rRNA específicos para escorpiões usados por Gantenbein et al. (1999): sensor 5’ CGA TTT GAA CTC AGA TCA 3’ e reverso 5’ GTG CAA AGG TAG CAT AAT CA 3’, no seguinte protocolo de ciclagem que foi utilizado para a reação de sequência: 95° 30"; 48° 15"; 60° 4'. O *kit* utilizado foi *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.

Quadro 4. Recomendações para extração e purificação do DNA

| Etapas | Recomendações |
|---------------|--|
| 1. | Pré-aquecer o banho-seco a 99°C, antes do procedimento; |
| 2. | Seccionar, longitudinalmente, o fêmur e a tíbia de um dos pedipalpos, expondo a massa muscular, retirando-a com auxílio de lâmina de bisturi e depositando-a em <i>eppendorf</i> ; |
| 3. | Adicionar 250µl PBS + 1 µl EDTA (Concentração final = 1mM EDTA/PBS), triturar o material com auxílio de ponteira, até ficar homogêneo; |
| 4. | Adicionar no <i>Capture Column (blue Waste Collection Tube)</i> e deixar à temperatura ambiente por 1 minuto a uma hora; |
| 5. | Adicionar 400 µl de DNA <i>Purification solution</i> n° 1; |
| 6. | Incubar por 1 minuto em temperatura ambiente (TA) e, em seguida, centrifugar por 10 segundos em 5000 rpm; |
| 7. | Transferir o <i>Capture Column</i> para outro <i>Waste Collection tube</i> ; |
| 8. | Adicionar 400 µl de DNA <i>purification solution</i> n° 1; |
| 9. | Incubar por 1 minuto à TA e centrifugar por 10 segundos em 5000 rpm; |
| 10. | Adicionar 200 µl de DNA <i>Elution Solution</i> n° 2 e centrifugar por 10 segundos em 5000 rpm; |
| 11. | Transferir o <i>Capture Column</i> para o <i>Clear DNA Collection Tube</i> ; |
| 12. | Adicionar 100 µl de DNA <i>Elution Solution</i> n° 2; |
| 13. | Aquecer a 99°C em banho-seco por 10 minutos (pré-aquecido); |
| 14. | Centrifugar, imediatamente, em 14.000 rpm por 1 minuto, para liberar o DNA purificado; |
| 15. | Armazenar o DNA purificado a -20°C em freezer. |

Fonte: Qiagen (2010).

Quadro 5. Ciclos térmicos para a reação do *PCR*.

| 16S | Tempo | Temperatura | Ciclos |
|--------------|--------------|--------------------|---------------|
| Pré-ciclo | 5´ | 94° | 1 |
| Desnaturação | 45” | 94° | 30 |
| Anelamento | 45” | 48° | 30 |
| Extensão | 45” | 72° | 30 |
| Pós-ciclo | 10´ | 72° | 1 |

Fonte: Autor

Quadro 6. Componentes e volumes dos reagentes da reação de *PCR* para amplificar o DNA.

| Componentes | Volume |
|--------------------------------------|---------------|
| H ₂ O | 15,05 µl |
| 10 x B | 2,5 µl |
| MgCl ₂ | 0,75 µl |
| dNTPs (desoxinucleotideo trifosfato) | 4 µl |
| 16S senso | 1 µl |
| 16S antisenso | 1 µl |
| Tag | 0,2 µl |
| DNA | 1,5 µl |

Fonte: Autor

5.6.6. Análise das sequências do DNA

As análises das dez sequências de mtDNA representando os *T. obscurus* das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará foram alinhadas, ajustadas manualmente e editadas no programa BioEdit (HAAL, 1999). Uma sequência de DNA do *Rhopalurus laticauda* (AY586785) foi incluída como grupo externo “*outgroups*”, extraído do *GenBank* de Borges et al. (2010)³, para comparar a relação genética intraespecífica e entre espécimes das populações do estudo.

5.6.7. Análise de agrupamento e filogenética

Para análise de grupamentos foram usados os critérios de similaridade e dissimilaridade (BUSSAB; MIAZAKI; ANDRADE, 1990). A similaridade das sequências de nucleotídeos foi calculada pelo modelo de “*Sequence Identity Matrix*” no BioEdit (HAAL, 1999). Com as percentagens obtidas, foram calculadas as distâncias genéticas, utilizando o parâmetro $D=1-S$ (S é o grau de similaridade obtido). Com estes valores foram gerados fenogramas com o auxílio do programa MEGA 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*), sendo as análises feitas no agrupamento de vizinhos ou *Neighbor-Joining (NJ)* e *Maximum Parsimony* -

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY586785>

Máxima Parcimônia (MP), cuja confiabilidade foi obtida pelo método *bootstrap* com 1000 replicações (TAMURA et al., 2011).

5.7. Análise morfológica

5.7.1. Medidas morfométricas

A análise morfométrica foi realizada em 38 amostras de espécimes de *T. obscurus*, sendo 19 machos e 19 fêmeas. Os espécimes foram agrupados de acordo com a região de coleta, obtendo-se duas populações, a do Leste paraense com seis machos e 12 fêmeas e do Oeste com 13 machos e sete fêmeas (Apêndice 1). Foram medidas 29 dimensões, entre elas os comprimentos corporais totais e outras onze medidas dos segmentos dos escorpiões (Apêndice 3), seguindo as recomendações de Sissom et al. (1990). Em seguida, para análises de conglomerados, foram selecionadas 14 variáveis de machos e 16 fêmeas altamente significativas (Tabela 5), destas, identificaram-se 11 caracteres comuns nos dois gêneros (Apêndice 3).

5.8. Análise da peçonha

5.8.1. Fracionamento cromatográfico da peçonha por *RP-HPLC*

Para a obtenção das frações cromatográficas, foram pesadas separadamente alíquotas de 2,5 mg do pool da peçonha bruta de *Tityus obscurus* dissolvidas em 500 µL de água Milli-Q filtrada (Millex 0,22 µm). Depois de centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi injetado em um sistema *RP-HPLC* (Shimadzu Co., Kyoto, Japan, Série LC-10AT VP), usando coluna semi-preparativa C₁₈ (*Phenomenex*, 5 µm, 10x250 mm). O gradiente linear utilizado foi de 5% até 95% de acetonitrila em água Milli-Q com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA); o fluxo foi de 2,5 mL/min e o tempo de eluição de 60 minutos. Os experimentos foram monitorados em dois comprimentos de onda de 216 e 280 nm e analisados visualmente. Todas as frações foram coletadas manual e individualmente na medida em que eram eluídas. Após cada corrida cromatográfica, as frações foram liofilizadas, utilizando concentrador a vácuo (Centrivap, Labconco, Kansas City, MO), e estocadas à temperatura de -20°C, para minimizar degradação.

5.8.2. Análises por espectrometria de massa

Cada fração obtida pelo sistema *HPLC* foi diluída em água Milli-Q, para então ser adicionado 1 µL na proporção de 1:3 à solução saturada das matrizes α -ciano-4-

hidroxicinâmico (α -cyano) ou 1,5-diaminonaftaleno (DAN) em acetonitrila 50% e TFA 0,3% e aplicadas separadamente em placa de aço inoxidável de *MALDI-TOF/TOF* (*Autoflex Speed* e *Ultraflex III*, *Bruker Daltonics, Germany*). Depois de cristalizadas à temperatura ambiente, foram analisadas em modo *MS* (α -cyano) e para fragmentação nos métodos *LIFT* (*Laser Induced Fragmentation Technique*) com α -cyano ou *ISD* (*In Source Decay*) e com diaminonaftaleno (DAN).

Os dados obtidos por espectrometria de massa (*MS* e *MS/MS*) foram gerados no equipamento *MALDI-TOF/TOF* (*Autoflex Speed* e *Ultraflex III*, *Bruker Daltonics, Germany*) com laser *SmartBeam*TM, controlado pelo *software FlexControl 3.0*. Os espectros foram adquiridos nos modos *MS* linear ou refletido, *MS/MS* (*LIFT*) ou *ISD*, utilizando como calibrantes uma mistura de proteínas (*Bruker Daltonics, USA*) contendo: insulina, ubiquitina, citocromo C, mioglobina, citocromo C $[M+2H]^+$ e mioglobina $[M+2H]^+$ no modo linear. Já a calibração no modo refletido e *LIFT* foi realizada com calibrante *Bruker*, contendo bradicinina, angiotensinas I e II, substância P, bombesina, substrato renina, ACTH (1-17) e insulina. Para o modo *ISD*, o calibrante utilizado foi *BSA* (*bovine serum albumin*) e seus fragmentos.

Os espectros de massa foram adquiridos em séries de 200 disparos de laser até que fosse obtido um espectro passível de ser analisado a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa nas faixas de 100 a 20.000 Da (*Autoflex Speed*, *Bruker Daltonics, Germany*) e de 20.000 a 80.000 Da (*Ultraflex III*, *Bruker Daltonics, Germany*) para os modos refletido e linear.

Para fragmentação de peptídeos, foi utilizado o modo *MS/MS*, utilizando o método de *LIFT* com aceleração de 19 kV. Neste método, o íon parental foi selecionado por *PCIS* (*Precursor Ion Selector*), para posteriormente atravessar a unidade de *LIFT* onde foi fragmentado e em seguida tendo a massa parental suprimida por *PLMS* (*Post Lift Metastable Suppressor*). Desta maneira, foram gerados espectros, nos quais a massa precursora é isolada e adicionada ao espectro graficamente, e os fragmentos são gerados somente a partir da molécula precursora. Os espectros da massa molecular foram processados utilizando o *software FlexAnalysis 3.3* (*Bruker Daltonics, Germany*), e a lista de massas obtidas exportadas para planilhas Excel 2007, para organização e análise dos dados.

5.9. Aspectos éticos

5.9.1. Obtenção das licenças

As licenças para o trabalho foram aprovadas e obedecem às normas do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, protocolo 038/2007 - CEP/NMT (Anexo 1) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), licença número 11727-2 (Anexo 2).

5.9.2. Critérios de inclusão das vítimas na pesquisa

Fazem parte do estudo pacientes envenenados por *T. obscurus* que preencheram os critérios de inclusão e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (Apêndice 4). Foram observados os seguintes critérios de inclusão:

- 1- Acidentados por escorpiões *T. obscurus* que, durante o atendimento médico, trouxeram o animal causador do envenenamento e o doaram;
- 2- Pacientes de ambos os sexos e de qualquer faixa etária;
- 3- Acidente ocorrido nas últimas 24 horas, caracterizando um processo agudo.

5.10. Análises

Para as análises foram usados critérios conforme o estudo realizado:

5.10.1. Análise estatística

1- Os dados epidemiológicos e clínicos dos pacientes foram tabulados e analisados pelos programas *Epi-Info*TM 6.04 (CDC, 2009) e *Bioestat*® 5.0 (AYRES et al., 2007), e analisados a mediana (Md) e percentis 25 e 75 (IQR, intervalo interquartil), qui-quadrado de várias proporções e o Teste Exato de *Fisher*, quando aplicável. As diferenças foram consideradas significantes, quando o valor de $p \leq 0,05$.

2- No morfométrico, testes estatísticos descritivos e o Teste U de *Mann-Whitney*, para verificar os níveis das relações morfológicas das duas populações, aceitando-se como significantes as variáveis com $p \leq 0,01$, enquanto para análises de conglomerados, foram aplicadas análises multivariadas de conglomerados pelos métodos de ligação completa (*Complete-linkage*) com distância padronizada e análise discriminante, para verificar os níveis de dissimilaridade entre os espécimes das localidades amostradas, por meio do programa *BioEstat* 5.0 (AYRES et al., 2007).

6. RESULTADOS

6.1. Da casuística

Na Tabela 1, são mostradas as frequências da procedência das vítimas da região Leste, sendo 20 (41,7%) do município de Ananindeua e 14 (29,2 %) de Belém e da Oeste, nove (18,7%) de Santarém e cinco (10,4%) de Rurópolis. Quanto ao gênero, não houve significância entre as áreas de estudo. Referente à faixa etária, os maiores de 15 anos foram os mais acometidos nas duas regiões. As idades variaram entre 3 a 62 anos (média $32,8 \pm 16,1$) na região Leste, e na Oeste, entre 1 a 66 anos, com média de $34,0 \pm 19,7$ (dados não mostrados). Os membros superiores foram os mais acometidos, principalmente no período diurno, e sendo o atendimento médico realizado com mais frequência na primeira hora do acidente nas duas áreas. O menor tempo entre a picada e o atendimento médico foi de cinco minutos, e o maior de 22 horas (dados não mostrados).

Tabela 1. Frequência das informações epidemiológicas do envenenamento por *T. obscurus*, nas regiões Leste e Oeste do Pará, Brasil.

| PARÂMETROS | LESTE | | OESTE | | p valor |
|------------------------------|--------------|-------|--------------|-------|---------|
| | n | % | n | % | |
| Vítimas | 34 | 70,8 | 14 | 29,2 | |
| Gênero: | | | | | 0,52 |
| Masculino | 17 | 50,0 | 9 | 64,3 | |
| Feminino | 17 | 50,0 | 5 | 35,7 | |
| Faixa etária: | | | | | 0,73 |
| < - 14 | 5 | 14,7 | 2 | 14,28 | |
| 15 - > | 29 | 85,3 | 12 | 85,71 | |
| Md(IQR)* | 31.5(23-41) | | 31.5(20-50) | | |
| Sítio da picada: | | | | | 0,65 |
| Membro superior | 24 | 70,6 | 8 | 57,1 | |
| Membro Inferior | 8 | 23,5 | 5 | 35,7 | |
| Outros locais | 2 | 5,9 | 1 | 7,1 | |
| Hora do acidente: | | | | | 0,02 |
| 7-18 | 25 | 73,5 | 10 | 71,4 | |
| 19-6 | 9 | 26,5 | 4 | 28,6 | |
| Tempo para o socorro: | | | | | 0,83 |
| < 1 | 22 | 64,70 | 8 | 57,14 | |
| 2- 3 | 5 | 14,70 | 2 | 14,28 | |
| 3 ≥ | 7 | 20,58 | 4 | 28,57 | |
| Md (IQR)* | 1.0(0.3-2.0) | | 1.3(1.0-3.0) | | |

*Mediana e intervalo do interquartil

Fonte: autor

A Tabela 2 mostra a frequência das manifestações clínicas, onde duas vítimas da região Leste não foram envenenadas (*Dry sting*). Entretanto, nenhum paciente apresentou nível de gravidade considerado grave e nem óbito. Contudo, as manifestações sistêmicas e o antiveneno foram mais frequentes na Oeste. Enquanto na Tabela 3, entre os pacientes das duas

áreas, 95,8% referiram manifestações clínicas no sítio anatômico da picada, sendo a dor a mais referida.

Tabela 2. Frequência das manifestações clínicas, gravidade e tratamento do envenenamento por *T. obscurus*, nas regiões Leste e Oeste do Pará, Brasil.

| Parâmetros | Leste (n=34) | Oeste (n=14) | p valor |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| <u>Manifestações clínicas</u> | | | |
| Assintomático (<i>Dry sting</i>) | 2 | 0 | |
| Manifestação no local | 32 | 14 | |
| Manifestação sistêmica | 6 | 9 | |
| <u>Gravidade dos sintomas</u> | | | |
| Leve | 26 | 5 | 0.005 |
| Moderado | 6 | 9 | |
| <u>Tratamento:</u> | | | |
| Sintomático + observação | 26 | 5 | 0.005 |
| Soroaterapia | 6 | 9 | |

Fonte: autor

Tabela 3. Frequência dos sintomas e sinais do envenenamento no sítio anatômico da picada por *T. obscurus*, nas regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil.

| Parâmetros* | Leste (n=32) | Oeste (n=14) |
|----------------------------------|-------------------------|------------------------|
| <u>Manifestação local</u> | | |
| Dor | 30 | 14 |
| Dor irradiada | 2 | 9 |
| Parestesia | 16 | 12 |
| Edema | 12 | 7 |
| Eritema | 14 | 5 |
| Sudorese | 1 | 3 |
| Pelo ericado | 0 | 4 |
| Calor | 0 | 1 |
| Sensação choque elétrico | 0 | 1 |

*alguns pacientes tiveram mais de uma manifestação clínica.

Fonte: autor

Na Tabela 4, são apresentados os sintomas e sinais sistêmicos das 15 (31,2%) vítimas de todos os pacientes acidentados no estudo; destes, 18,7% ocorreram na região Oeste e 12,5 na Leste, com significância das manifestações gerais, digestivos, oculares e neurológicos na área Oeste. Dentre os neurológicos, destacam-se as mioclônias e a sensação de “choque elétrico” por todo o corpo.

Tabela 4. Frequência das manifestações clínicas sistêmicas do envenenamento por *T. obscurus*, nas regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil.

| Parâmetros* | Leste (n=32) | Oeste (n=14) | p valor |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| <u>Gerais:</u> | <u>2</u> | <u>9</u> | <u>0,0001</u> |
| Sudorese | 2 | 5 | |
| Cefaleia | 1 | 0 | |
| Agitação | 0 | 4 | |
| Tremores | 0 | 5 | |
| Prostração | 0 | 1 | |
| Astenia | 0 | 2 | |
| Calafrios | 0 | 1 | |
| <u>Digestivo:</u> | <u>3</u> | <u>5</u> | <u>0,0365</u> |
| Náuseas | 3 | 4 | |
| Dor abdominal | 0 | 3 | |
| Vômitos | 0 | 2 | |
| Sialorreia | 0 | 1 | |
| <u>Cardio-respiratório:</u> | <u>1</u> | <u>1</u> | |
| Hipertensão arterial | 0 | 1 | <u>0,5027</u> |
| Taquipneia | 1 | 0 | |
| <u>Ocular:</u> | <u>1</u> | <u>7</u> | <u>0,0003</u> |
| Visão escura | 1 | 5 | |
| Hiperemia conjuntival | 0 | 4 | |
| Fotofobia | 0 | 1 | |
| <u>Neurológico:</u> | <u>4</u> | <u>9</u> | <u>0,0005</u> |
| Sonolência | 1 | 4 | |
| Tontura | 3 | 0 | |
| Confusão mental | 1 | 0 | |
| Sensação “choque elétrico” | 0 | 7 | |
| Mioclonias | 0 | 9 | |
| Ataxia de marcha | 0 | 4 | |
| Parestesia todo corpo | 0 | 5 | |
| Disartria | 0 | 6 | |
| Dismetria | 0 | 3 | |
| Fasciculação | 0 | 3 | |
| Incoordenação motora | 1 | 1 | |

*alguns pacientes tiveram mais de uma manifestação clínica.

Fonte: autor

6. 2. Do molecular

6.2.1. Sequências de DNA das amostras

Fragmento de aproximadamente 400 pares de bases (pb) do gene 16S rRNA foi amplificado pela PCR (Fig. 5), no entanto para o alinhamento foram utilizados apenas 362~364 pb. Todas as sequencias, dos dez espécimes de *T. obscurus* foram depositadas no *GenBank* (*GenBank Nucleotide Sequence Database*) (NCBI, 2014)⁴, que estão identificadas

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=tityus%20obscurus>

no quadro 7 como: ToL (*T. obscurus* do Leste), ToO (*T. obscurus* do Oeste) e numeradas de 1 a 10.

Quadro 7. Amostras dos *T. obscurus*, Gervais, 1843, utilizados na extração do DNA, com sua correspondente região, município, localidade, coordenadas dos acidentes no Estado do Pará, Brasil e números de acesso no *GenBank*.

| Amostras* | Tombo** | Região | Município | Localidade | Coordenadas*** | Acesso <i>GenBank</i> |
|-----------|---------|--------|-----------|--------------|----------------------------------|-----------------------|
| ToL1 | 381 | Leste | Belém | Outeiro | S 01° 16' 382" W 48° 26' 270" | JX196960 |
| ToL2 | 359 | Leste | Belém | Icoaraci | S 01° 19' 002" W 48° 27' 244" | JX196969 |
| ToL3 | 360 | Leste | Belém | Maracangalha | S 01° 25' 132" W 48° 28' 812" | JX196961 |
| ToL4 | 362 | Leste | Belém | Val-de-Cans | S 01° 23' 556" W 48° 29' 030" | JX196962 |
| ToL5 | 391 | Leste | Belém | Terra Firme | S 01° 27' 150" W 48° 26' 587" | JX196963 |
| ToO6 | 393 | Oeste | Santarém | Curuá-Una | S 02° 62' 992" W 54° 59' 861" | JX196964 |
| ToO7 | 364 | Oeste | Santarém | Santarém | S 02° 42' 585" W 54° 71' 774" | JX196965 |
| ToO8 | 377 | Oeste | Santarém | Planalto | S 02° 35' 692" W 54° 43' 182" | JX196966 |
| ToO9 | 378 | Oeste | Santarém | Terra Preta | S 02° 41' 545" W 54° 38' 451" | JX196967 |
| ToO10 | 379 | Oeste | Santarém | Tabocal | S 02° 34' 485" W 54° 43' 564" | JX196968 |

**T. obscurus* (To), Leste (L), Oeste (O) + número da amostra (1a10).

**UFPA/NMT/LEMAP

****Global Positioning System*: S: latitude, W: longitude

Fonte: autor

6.2.2. Composição nucleotídica

Analisando as sequências alinhadas do gene 16S do rRNA do *T. obscurus* das duas regiões do estudo, quando comparadas com as amostras da sequência ToL1, todas da região Oeste apresentaram 35 sítios de substituições, mostrando um polimorfismo de 9,06% (Apêndice 5). Enquanto o quadro 8 mostra as frequências e as médias das composições das bases nucleotídicas.

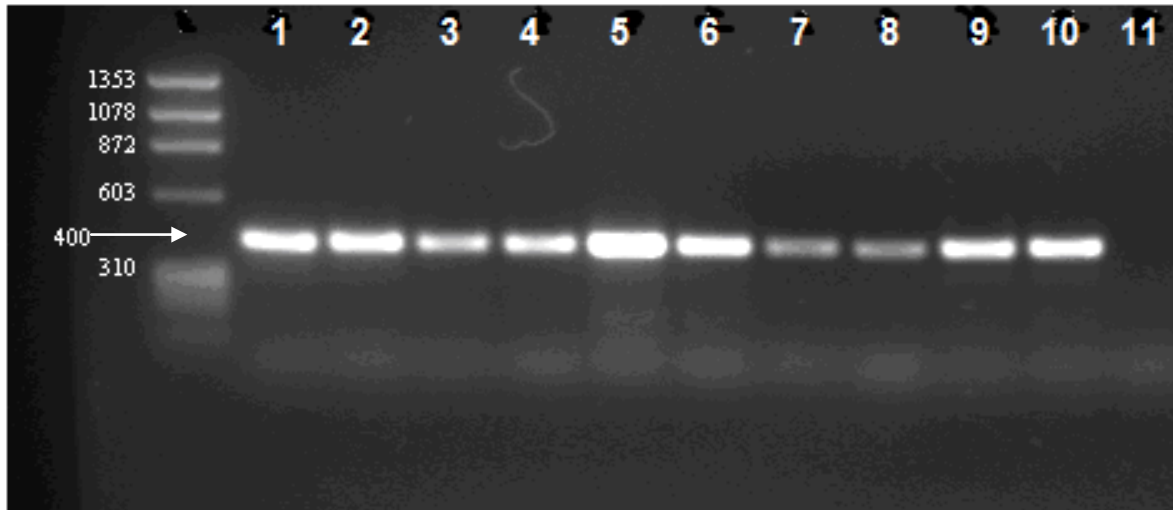


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras de dez *T. obscurus*, de duas regiões do Estado do Pará, Brasil. O produto da PCR amplificou a região 16S rRNA mitocondrial com aproximados 400pb, tendo como marcador de peso molecular ϕ X174/HaeIII. Legenda: 1-ToL1; 2- ToL2; 3-ToL3; 4- ToL4; 5- ToL5 (Amostras do Leste); 6- ToO6; 7-ToO7; 8-ToO8; 9- ToO9; 10- ToO10 (Amostras do Oeste); 11-Controle negativo. Fonte: autor

Quadro 8. Frequência e médias das bases nucleotídicas nas sequências do 16S rRNA das dez amostras do *T. obscurus* Gervais, 1843, das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil, calculadas no BioEdit (HALL, 1999).

| Nucleotídeos/ Amostras | A (%) | C (%) | G (%) | T (%) | G+C (%) | A+T (%) |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ToL1 | 32,97 | 14,29 | 14,01 | 38,74 | 28,30 | 71,70 |
| ToL2 | 32,97 | 14,01 | 14,01 | 39,01 | 28,02 | 71,98 |
| ToL3 | 32,42 | 14,01 | 14,01 | 39,56 | 28,02 | 71,98 |
| ToL4 | 32,97 | 14,01 | 14,01 | 39,01 | 28,02 | 71,98 |
| ToL5 | 32,14 | 14,01 | 14,29 | 39,56 | 28,30 | 71,70 |
| Média Total Leste | 32,69 | 14,06 | 14,06 | 39,17 | 28,13 | 71,86 |
| ToO6 | 29,83 | 14,09 | 16,02 | 40,06 | 30,11 | 69,89 |
| ToO7 | 30,03 | 14,05 | 15,98 | 39,94 | 30,03 | 69,97 |
| ToO8 | 29,83 | 14,09 | 16,02 | 40,06 | 30,11 | 69,89 |
| ToO9 | 29,56 | 14,09 | 16,30 | 40,06 | 30,39 | 69,61 |
| ToO10 | 30,11 | 14,09 | 16,02 | 39,78 | 30,11 | 69,89 |
| Média Total Oeste | 29,87 | 14,08 | 16,06 | 39,98 | 30,15 | 69,85 |

Legenda: A -Adenina, T-Timina, C - Citosina, G - Guanina

Fonte: autor

6.2.3. Análise de similaridade e diversidade

As matrizes de similaridade (Quadro 9) geradas das dez sequências de *T. obscurus* mostram grande similaridade intraespecífica entre os escorpiões das região Leste e Oeste, e uma alta divergência entre as duas populações (Quadro 10).

Quadro 9. Matriz de similaridades genéticas do 16S rRNA geradas a partir de dez sequências de *T. obscurus* Gervais, 1843, das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará-Brasil.

| Amostras | ToL1 | ToL2 | ToL3 | ToL4 | ToL5 | ToO6 | ToO7 | ToO8 | ToO9 | ToO10 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ToL1 | - | | | | | | | | | |
| ToL2 | 0,997 | - | | | | | | | | |
| ToL3 | 0,991 | 0,989 | - | | | | | | | |
| ToL4 | 0,997 | 0,994 | 0,994 | - | | | | | | |
| ToL5 | 0,989 | 0,986 | 0,997 | 0,991 | - | | | | | |
| ToO6 | 0,892 | 0,895 | 0,898 | 0,895 | 0,895 | - | | | | |
| ToO7 | 0,895 | 0,898 | 0,901 | 0,898 | 0,898 | 0,997 | - | | | |
| ToO8 | 0,892 | 0,895 | 0,898 | 0,895 | 0,895 | 1,000 | 0,997 | - | | |
| ToO9 | 0,890 | 0,892 | 0,895 | 0,892 | 0,892 | 0,997 | 0,994 | 0,997 | - | |
| ToO10 | 0,898 | 0,901 | 0,903 | 0,901 | 0,901 | 0,994 | 0,991 | 0,994 | 0,991 | - |

Fonte: autor

Quadro 10. Matriz da distância genética com base no alinhamento das sequências do 16S rRNA dos *T. obscurus* Gervais, 1843, da região Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil.

| Amostras | ToL1 | ToL2 | ToL3 | ToL4 | ToL5 | ToO6 | ToO7 | ToO8 | ToO9 | ToO10 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ToL1 | - | | | | | | | | | |
| ToL2 | 0,003 | - | | | | | | | | |
| ToL3 | 0,009 | 0,011 | - | | | | | | | |
| ToL4 | 0,003 | 0,006 | 0,006 | - | | | | | | |
| ToL5 | 0,011 | 0,014 | 0,003 | 0,009 | - | | | | | |
| ToO6 | 0,108 | 0,105 | 0,102 | 0,105 | 0,105 | - | | | | |
| ToO7 | 0,103 | 0,102 | 0,099 | 0,102 | 0,102 | 0,003 | - | | | |
| ToO8 | 0,108 | 0,105 | 0,102 | 0,105 | 0,105 | 0,000 | 0,003 | - | | |
| ToO9 | 0,110 | 0,108 | 0,105 | 0,108 | 0,108 | 0,003 | 0,006 | 0,003 | - | |
| ToO10 | 0,102 | 0,099 | 0,097 | 0,099 | 0,099 | 0,006 | 0,009 | 0,006 | 0,009 | - |

Fonte: autor

6.2.4. Análise dos fenogramas

Os fenogramas gerados pelos métodos *NJ* e *MP* mostram topografias muito equivalentes, formando dois ramos bem distintos e apoiados por 100% de *bootstrap*, com as amostras da população de *T. obscurus* da região Leste agrupadas em um ramo, e da Oeste em outro (Fig. 6 e Fig. 7), evidenciando a grande divergência entre as duas populações.

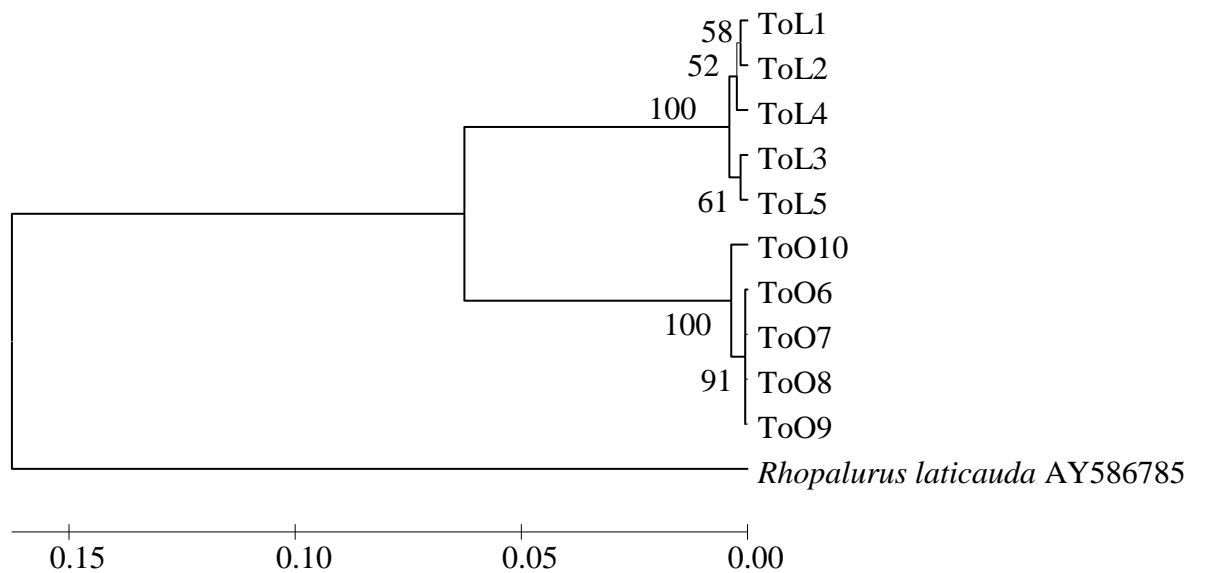


Figura 6. Fenograma agrupando as sequências do 16S rRNA obtidas de dez espécimes de *T. obscurus* das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, sendo a árvore obtida pelo método *Neighbor-Joining* baseado no modelo *Kimura-2-Parameter*, com *bootstrap* de 1000 replicações.

Fonte: autor

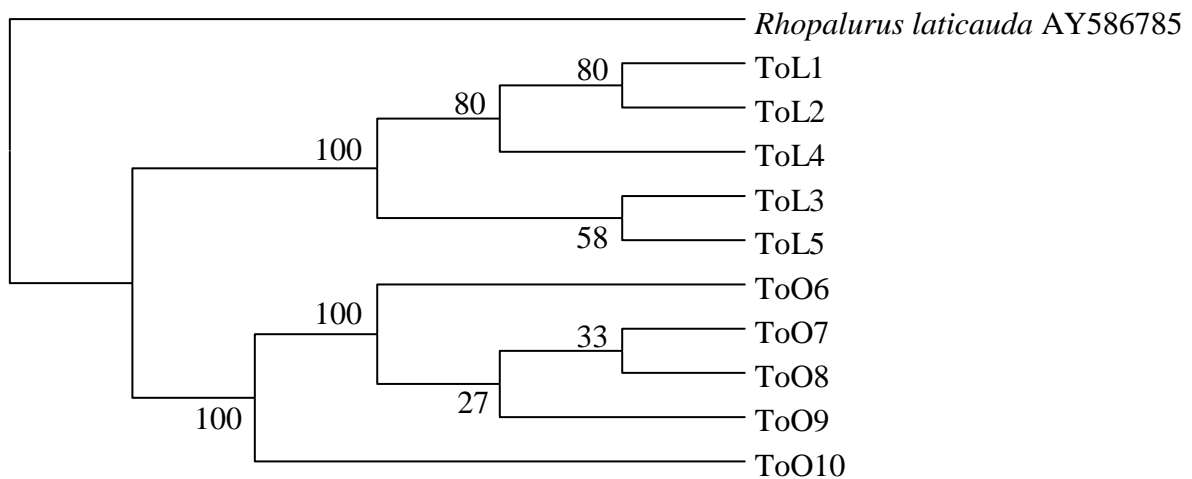


Figura 7. Fenograma agrupando as sequências obtidas do 16S rRNA de *T. obscurus* das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, sendo a árvore condensada obtida pelo método *Máxima Parcimônia* com *bootstrap* de 1000 replicações.

Fonte: autor

6.3. Da morfologia

6.3.1. Análise morfológica

Os espécimes de *T. obscurus* das populações da área Leste e Oeste encontram-se no Apêndice 1, cujo comprimento total (Co_total) variou de 62,15 mm a 85,24 mm.

Ao comparar as médias das mensurações morfológicas das fêmeas das populações de escorpião das duas regiões (Apêndice 3), quase todas são maiores nos da área Oeste, com exceção do Co_total e comprimento do telson (TEL_C); porém, a análise pelo Teste U de *Mann-Whitney* não mostrou significância nas medidas do Co_total, CA_LA, CHE_L, CHE_A, MET1_C, MET2_C, MET3_C, MET4_C, MET5_C, TEL_C e TEL_A.

Entre as medidas dos machos, a população da área Oeste apresenta maior proporção das médias de todos os caracteres; porém, ao comparar as análises das medidas pelo *Mann-Whitney*, essas análises mostram que a maioria das amostras se apresenta com diferenças significantes, com exceção dos caracteres Co_total, CA_LP, FEM_L, TIB_L, CHE_L, CHE_A, DM_C, MET1_C, MET2_C, MET3_C, MET4_C e MET5_C. Verifica-se, também, que os machos da população do Oeste são os que se mostram com as maiores médias, porém sem existir significância entre as duas populações.

6.3.2. Análise de conglomerados

Para as análises de conglomerados foram selecionadas variáveis estatisticamente significantes dos dois gêneros (14 caracteres dos machos e 16 das fêmeas) (Tabela 5), realizadas pelo método de *Complete Linkage* e distância de *Manhattan* com padronização. Para as fêmeas, resultaram em um dendograma que separa a 100% as populações da região Leste e da Oeste em dois grupos (Fig. 8). Enquanto que, entre os machos, dois indivíduos que foram classificados no grupo Oeste (um pertencente ao município de Rurópolis (RUR) e outro ao município de Trairão (TRAI)) foram agrupados juntamente com os indivíduos do Leste (Fig. 9).

6.3.3. Análise Discriminante

A análise discriminante demonstra que há distinção entre os indivíduos das populações Leste e Oeste do Estado do Pará, considerando apenas as 11 variáveis com significância de $p < 0,01$ e comuns nos dois gêneros (Apêndice 3). Na análise realizada com as fêmeas, ambas as populações ocuparam posições diferentes no espaço multivariado, sem haver sobreposição de elementos (Fig. 10); duas funções discriminantes foram geradas a partir deste teste, no qual se nota que as diferenças encontradas entre as fêmeas destes grupos são explicadas

principalmente pela largura dos segmentos metassomais (MET1_L e MET2_L), na função 1, e pelo comprimento da chela (CHE_C) e altura do 2º segmento metassomal (MET2_A), na função 2 (Tabela 5).

Para os machos, existe sobreposição das populações; mesmo assim é possível notar que a maior parte dos indivíduos da população Leste e Oeste permanecem plotados em regiões extremas (Fig. 11). Neste caso, a primeira função discriminante está mais correlacionada com a largura do 5º segmento do metassoma (MET5_L) e com a altura do 1º segmento do metassoma (MET1_A), enquanto que a maior parte da variação da função 2 está relacionada com a altura do 1º e 3º segmentos dos metassomas (MET1_A e MET3_A).

Tabela 5. Coeficientes das funções discriminantes obtidas para machos e fêmeas das duas populações analisadas. Em destaque, os valores dos coeficientes que descrevem a maior parte da variação entre os grupos.

| Variável | Machos | | Variável | Fêmeas | |
|----------|--------------|--------------|----------|-------------|-------------|
| | Função 1 | Função 2 | | Função 1 | Função 2 |
| CA_LA | -1.06 | 3.18 | FEM_C | 0.80 | -1.91 |
| TIB_C | -0.84 | 0.58 | FEM_L | 1.09 | 1.06 |
| MET1_L | -2.50 | 5.57 | TIB_C | 0.26 | -0.64 |
| MET1_A | 6.66 | 12.28 | TIB_L | 1.26 | 1.46 |
| MET2_L | -2.05 | -5.20 | CHE_C | -0.73 | 4.96 |
| MET2_A | -9.57 | -8.63 | DM_C | -1.02 | -0.18 |
| MET3_L | 0.53 | 2.77 | MET1_L | 3.12 | 0.15 |
| MET3_A | 0.25 | 5.42 | MET1_A | 1.75 | 1.27 |
| MET4_L | 3.17 | 1.82 | MET2_L | 2.34 | -3.10 |
| MET4_A | 2.67 | -3.87 | MET2_A | 0.77 | 3.57 |
| MET5_L | 10.87 | -9.03 | MET3_L | 1.03 | -0.27 |
| MET5_A | -6.66 | -3.47 | MET3_A | 0.97 | -1.12 |
| TEL_L | 1.20 | -1.22 | MET4_L | 1.39 | -0.91 |
| TEL_A | 1.36 | 1.28 | MET4_A | -0.31 | -2.94 |
| | | | MET5_L | 0.70 | 1.20 |
| | | | MET5_A | 0.60 | -0.99 |

Fonte: autor

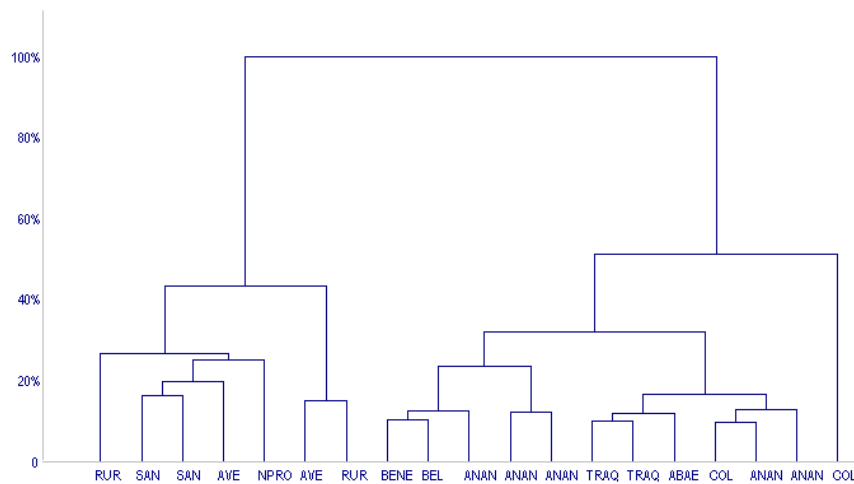


Figura 8. Dendrograma de conglomerados de 19 fêmeas de *T. obscurus* com caracteres de significância $p \leq 0,01$, das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil, obtido pelo método de ligação completa e distância de *Manhattan* com padronização das variáveis FEM_C, FEM_L, TIB_C, TIB_L, CHE_C, D.M_C, MET1_L, MET1_A, MET2_L, MET2_A, MET3_L, MET3_A, MET4_L, MET4_A, MET5_L e MET5_A.

Fonte: autor

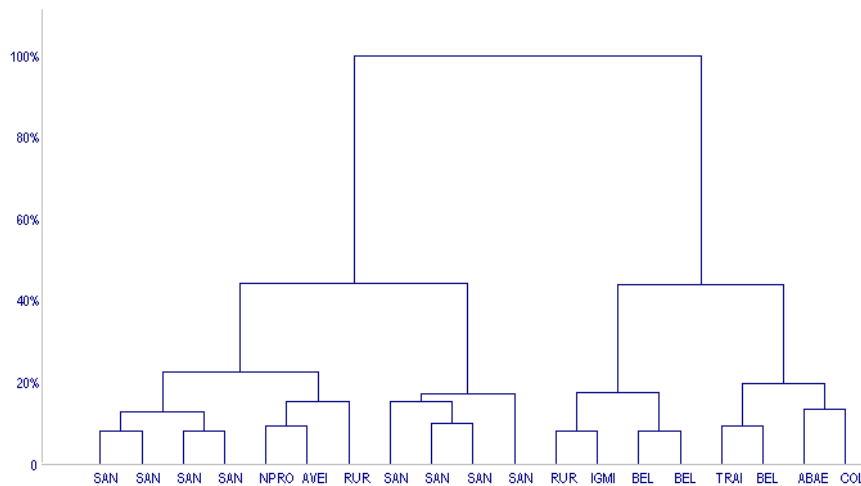


Figura 9. Dendrograma de conglomerados de 19 machos de *T. obscurus* com caracteres de significância $p \leq 0,01$, das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil, obtido pelo método de ligação completa e distância *Manhattan* com padronização das variáveis CA_LA, TIB_C, MET1_L, MET1_A, MET2_L, MET2_A, MET3_L, MET3_A, MET4_L, MET4_A, MET5_L e MET5_A, TEL_C e TEL_L.

Fonte: autor

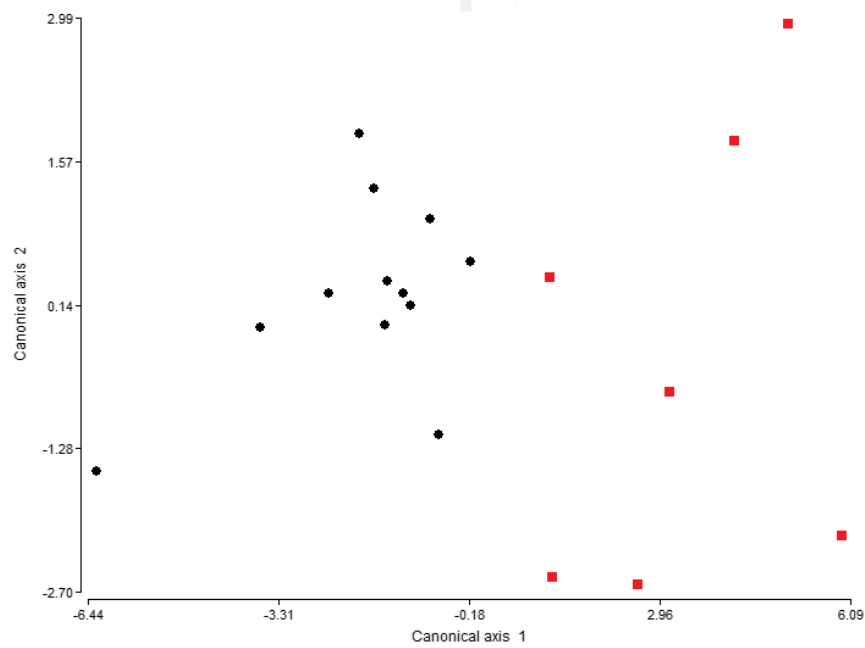


Figura 10. Funções discriminantes de duas populações de fêmeas de *T. obscurus* das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil. Os círculos representam a população Leste e os quadrados a Oeste.

Fonte: autor

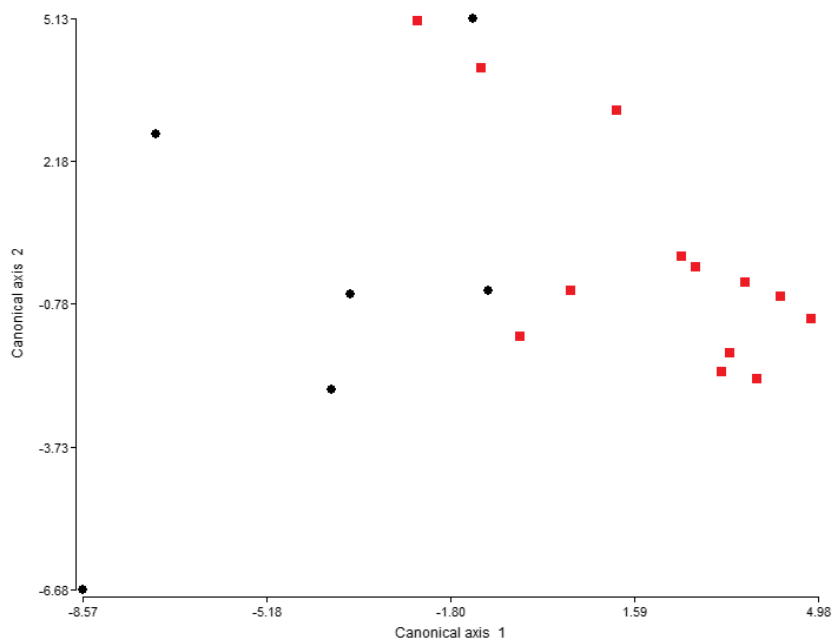


Figura 11. Funções discriminantes de duas populações de machos de *T. obscurus* das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil. Os círculos representam a população Leste e os quadrados a Oeste.

Fonte: autor

6.4. Da análise química

6.4.1. Fracionamento cromatográfico da peçonha bruta por *RP-HPLC*

O fracionamento da peçonha bruta do *T. obscurus* obtidas por *RP-HPLC*, utilizando os mesmos solventes para as purificações e as mesmas quantidades de peçonha, mostrou uma boa reprodutibilidade dos perfis cromatográficos, com 40 picos na eluição para a toxina da região Leste e 54 para a da Oeste (Fig. 12, 13); para destacar as diferenças e semelhanças das expressões dos componentes presentes em cada região, a sobreposição de ambos os cromatogramas é mostrada na figura 14. Para melhor visualizar e comparar seus componentes, os cromatogramas foram divididos em duas regiões relacionadas com a eluição e seu tempo de retenção (TR), os quais representam diferentes tipos de componentes químicos de toxinas, entre 20 a 32 minutos, onde se encontram preferencialmente os peptídeos moduladoras para canais de potássio (Fig. 15) e de 32 a 50 minutos, para canais de sódio (Fig. 16) (BATISTA et al., 2004), sendo os peptídeos para canais de K^+ e Na^+ com maior frequência na região Oeste (Fig. 17).

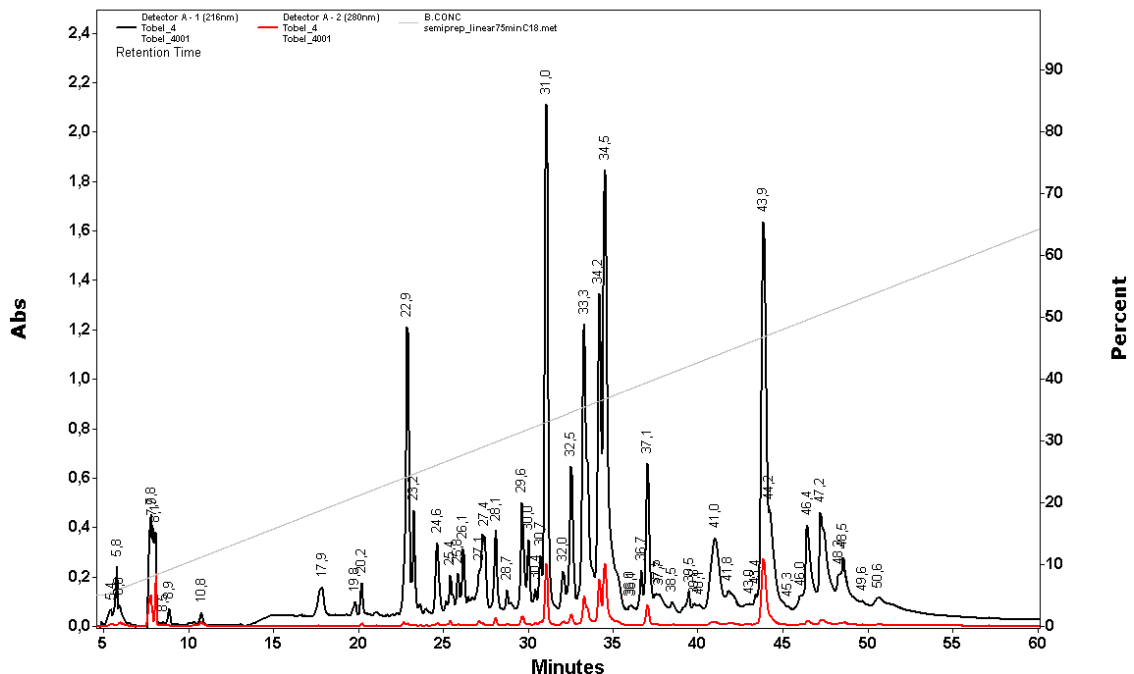


Figura 12. Cromatograma obtido do pool da peçonha bruta do *T. obscurus* da região Leste por *RP-HPLC* em coluna semi-preparativa C_{18} (*Phenomenex*, 5 μ m, 10x250 mm). O gradiente linear utilizado foi de 5% até 95% de acetonitrila, com fluxo de 2,5 mL/min e eluição de 60 minutos. Os experimentos foram monitorados nos comprimentos de ondas de 216 e 280 nm.

Fonte: autor

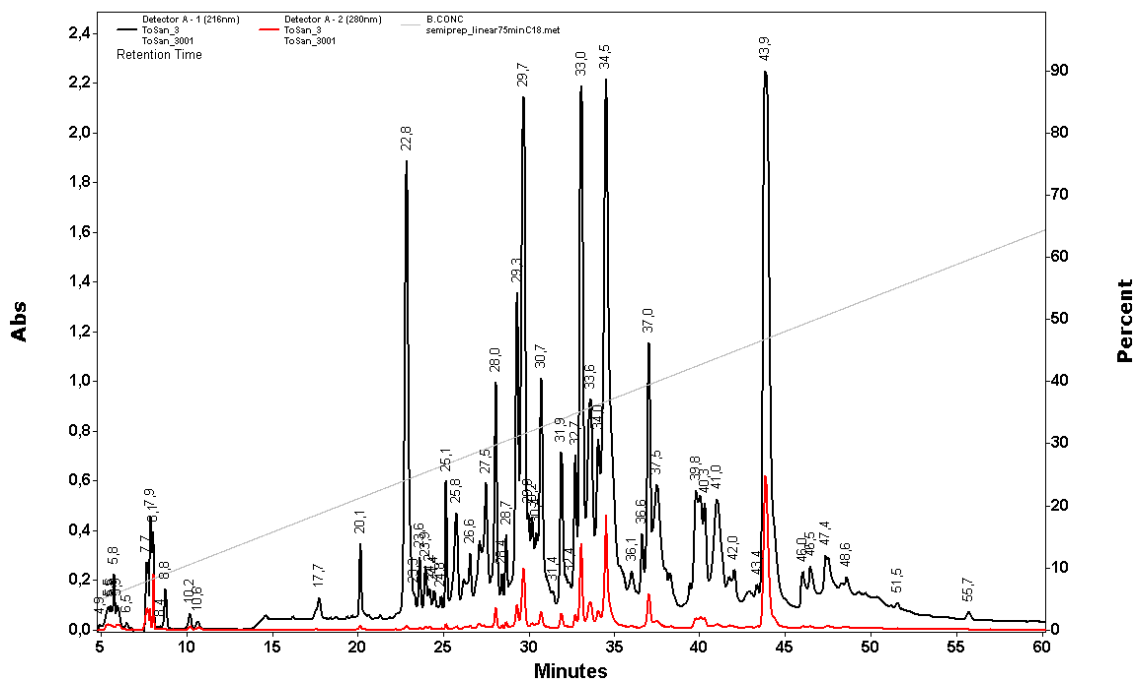


Figura 13. Cromatograma obtido do pool da peçonha bruta do *T. obscurus* da região Oeste por *RP-HPLC* em coluna semi-preparativa C_{18} (*Phenomenex*, 5 μ m, 10x250 mm). O gradiente linear utilizado foi de 5% até 95% de acetonitrila, com fluxo de 2,5 mL/min e eluição de 60 minutos. Os experimentos foram monitorados nos comprimentos de ondas de 216 e 280 nm.

Fonte: autor

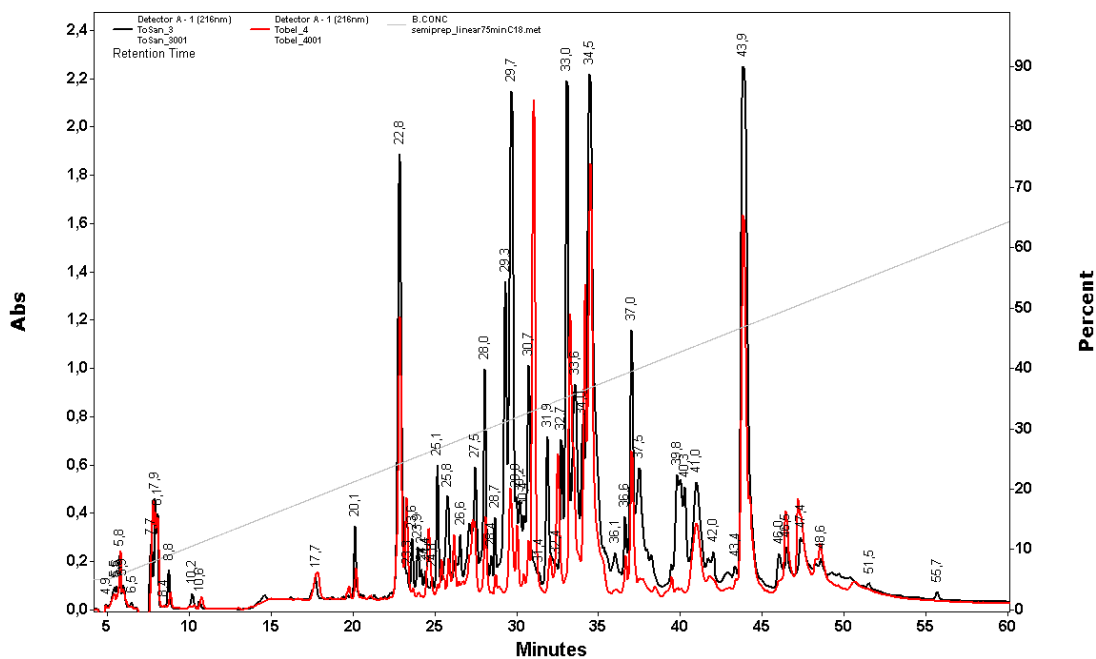


Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas obtidos do pool da peçonha bruta do *T. obscurus* das regiões Leste em vermelho e Oeste em preto. Monitorados pelo comprimento de onda de 216nm.

Fonte: autor

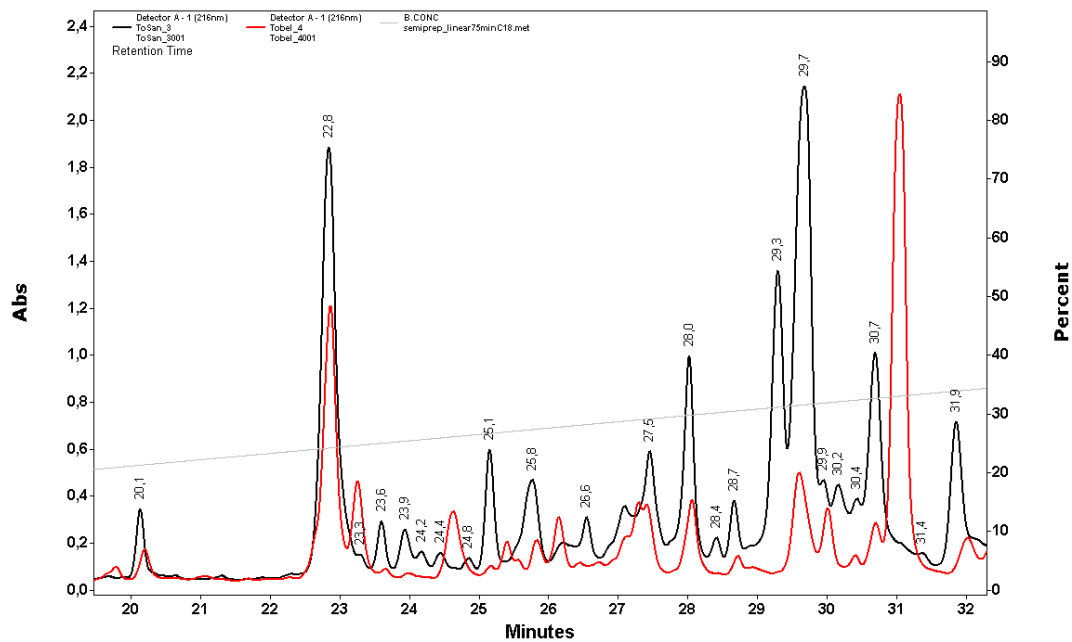


Figura 15. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na faixa de toxinas moduladoras de canais para K^+ , do pool da peçonha bruta do *T. obscurus* das regiões Leste em vermelho e Oeste em negro. Monitorados pelo comprimento de onda de 216nm.

Fonte: autor

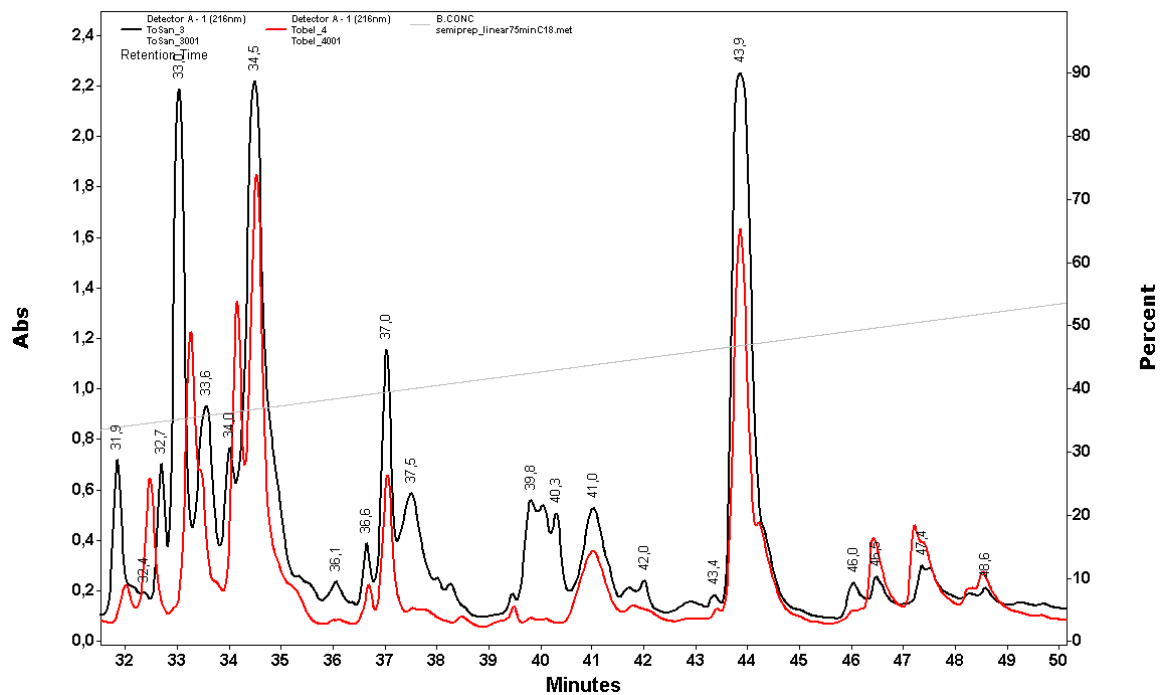


Figura 16. Sobreposição dos cromatogramas obtidos na faixa de toxinas moduladoras de canais para Na^+ , do pool da peçonha bruta do *T. obscurus* das regiões Leste em vermelho e Oeste em negro. Monitorados pelo comprimento de onda de 216nm.

Fonte: autor

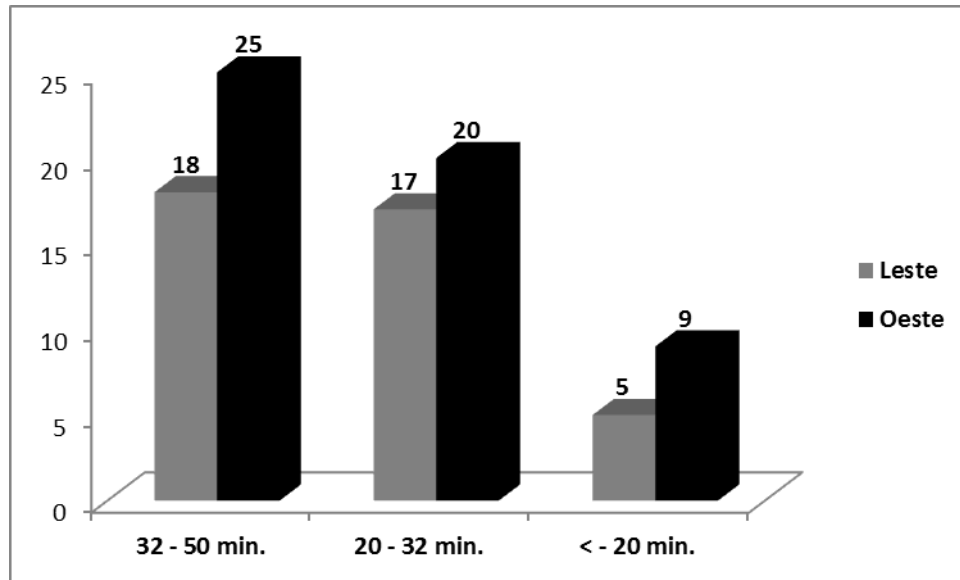


Figura 17. Frequência das frações da peçonha do *T. obscurus* em 60 minutos de eluição em coluna semi-preparativa no *RP-HPLC*. Em cinza componentes da região Leste e em preto da Oeste.

Fonte: autor

6.4.2. Análise por espectrometria de massa

Todas as frações cromatográficas obtidas do fracionamento da peçonha do *T. obscurus* das duas regiões foram analisadas por espectrômetro de massa do tipo *MALDI-TOF/TOF*, em um intervalo de massa molecular de 200 a 80.000 *Daltons (Da)*, gerando 79 componentes distintos nas amostras da região Leste, com um espectro de massa molecular entre 4028.9 a 30575.5 *Da*, e de 113 componentes nas do Oeste, com as massas variando entre 4017.9 a 30618.1 *Da*. Na comparação, não foi identificada nenhuma massa com peso molecular similar entre as duas peçonhas do estudo, porém, na região Oeste, a massa molecular 4510.4 *Da* foi encontrada com o mesmo peso nos tempos de retenção de 25,5 e 27,5 minutos, assim como, a massa de 4223.8 *Da*, nos tempos de 26,6 e 27,1 minutos (Apêndice 6). Para melhor entendimento e comparação, os dados experimentais foram organizados em intervalos de massas moleculares de 500 *Da* (Fig. 18), e as toxinas classificadas em dois grupos com base em sua atividade e tamanho molecular. No primeiro grupo, encontramos as toxinas que modulam canais para potássio com peso molecular entre 2500-5000 *Da* (PIMENTA et al., 2001). Nesta faixa, são quantificadas em 17,7% na peçonha da região Leste, entre os tempos de retenção de 24,7 a 28,7 minutos e em 20,3% na Oeste, entre 22,9 a 39,5 minutos. No segundo grupo, os peptídeos que atuam nos canais para sódio, com 6500-8500 *Da* (RODRÍGUEZ DE LA VEGA; POSSANI, 2005). Estas são identificadas em 43,0%, na área

Leste, entre as eluições de 24,7 a 46,5 minutos e na Oeste, em 45,1%, entre 25,2 a 43,9 minutos.

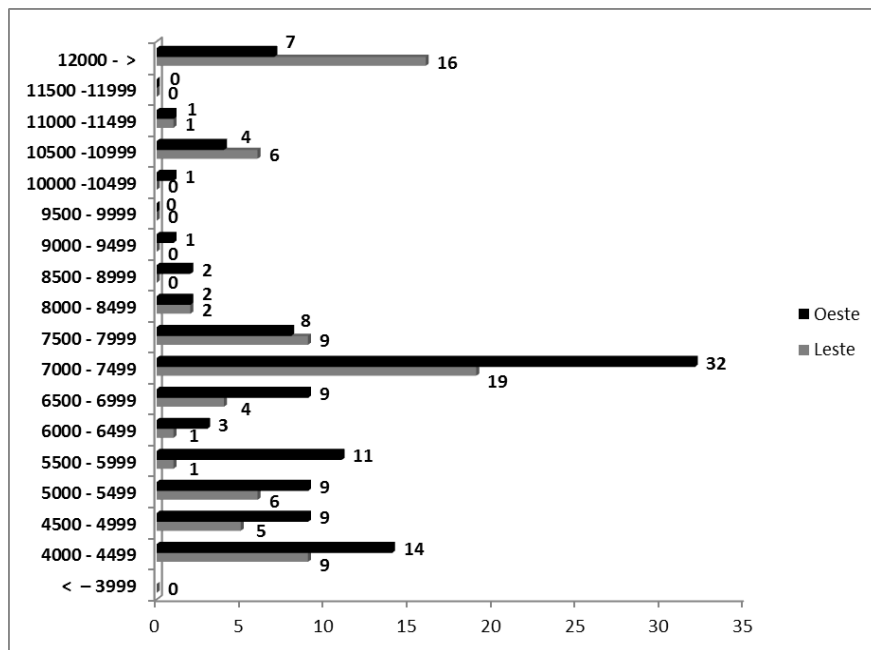


Figura 18. Componentes das massas moleculares das toxinas do *T. obscurus* das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil, em intervalo de 500 Da.

Fonte: autor

7. DISCUSSÕES

7.1. Da casuística

A maioria das vítimas envenenadas pelo *T. obscurus* é proveniente da região Leste. Nesta, estão situadas as duas cidades mais urbanizadas e com maior população residente do Estado. Este escorpião é o de maior importância em saúde pública na Amazônia brasileira (BRASIL, 2001, 2009) e tem causado acidentes nas duas regiões (PARDAL et al., 2003; MARTINS et al., 2002); porém, várias espécies do gênero *Tityus* têm sido descritas na região Norte do Brasil (LOURENÇO, 2002), as quais, no período do estudo, ocasionaram no Estado do Pará uma incidência anual de 82,4 acidentes por 100.000 habitantes. No entanto, a incidência foi menor em Belém e Ananindeua, com 6,4/100.000 habitantes, do que em Santarém e Rurópolis de 264,4/100.000 habitantes (BRASIL, 2014)⁵.

Na distribuição entre os gêneros, o masculino predominou na Oeste. Esta possui uma zona mais rural, o que, provavelmente, faz o acidente estar associado com o tipo de trabalho realizado neste meio. Resultados semelhantes foram encontrados por Pardal et al. (2003) nesta mesma área do estudo. Nas outras regiões brasileiras, este gênero também é o mais acometido (SOARES; AZEVEDO; DE MARIA, 2002; HORTA; CALDEIRA; SARES, 2007), porém na Turquia, o feminino tem maior incidência (OZKAN; KAT, 2005).

Nas duas regiões, a faixa etária mais acidentada está entre adolescentes e adultos, com mediana e intervalo interquartil [MD (IQR)] de 31.5(23-41) e 31.5(20-50) na Leste e Oeste respectivamente. Estes achados são semelhantes a outros estudos no Pará (MARTINS et al., 2002; PARDAL et al., 2003; MAESTRI NETO et al., 2008) e em outras regiões do Brasil (SOARES; AZEVEDO; DE MARIA, 2002), assim como, no México (CHOWELL et al., 2006), no Marrocos (SOULAYMANI et al., 2007) e na Colômbia (GÓMEZ et al., 2002; OTERO et al., 2004); entretanto, Bouaziz et al. (2008) na Tunísia, encontrou 72% dos pacientes abaixo de 15 anos.

O membro superior foi o mais acometido, provavelmente em decorrência do manuseio de materiais de construção ou entulhos em residências ou em outros ambientes, aliado à limpeza doméstica. Estudos similares corroboram esses resultados (PARDAL et al., 2003; CHOWELL et al., 2006; HORTA; CALDEIRA; SARES, 2007; GÓMEZ et al., 2010), no entanto, Roodt et al. (2003) e Pipelzadeh et al. (2007) mostraram ser os membros inferiores os mais atingidos.

⁵ <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

Os envenenamentos ocorreram no período diurno nas duas regiões, apesar de os escorpiões terem hábitos noturnos, passando o dia escondidos em locais escuros, sugerindo que os animais foram perturbados no seu habitat natural. Segundo a literatura brasileira, os acidentes tanto podem acontecer nesse período (RIBEIRO; RODRIGUES; JORGE, 2001; PARDAL et al, 2003), como no noturno (HORTA; CALDEIRA; SARES, 2007), porém, em outros países como na Colômbia (GÓMEZ et al, 2002), na África do Sul (MÜLLER, 1993) e no Iran (PIPELZADEH et al., 2007), sua incidência é maior no período noturno.

O tempo entre o acidente e o atendimento médico das vítimas, nas duas regiões, foi abaixo de três horas, porém a região Oeste mostra um maior Md (IQR) 1.3(1.0-3.0); isto provavelmente seja decorrente da região ser predominantemente rural e das dificuldades de meios de transportes para se chegar ao atendimento hospitalar, diferentemente da Leste, que é mais urbanizada e com melhores meios de mobilidade; o que corrobora os resultados encontrados por Pardal et al. (2003) nesta mesma área.

A frequência das manifestações clínicas no sítio da picada foi frequente e semelhante nos pacientes das duas regiões, sendo os sinais e sintomas de dor seguidos por parestesias, edema e eritema os mais frequentemente observados. Achados anteriores causados por esta espécie na Amazônia brasileira (MARTINS et al., 2002; PARDAL et al., 2003) e na Guiana Francesa (MOHAMED et al., 2013) vêm apoiar os nossos achados. Estes sintomas também são observados nos acidentes por *T. stigmurus* no Nordeste do Brasil (LIRA-DA-SILVA; AMORIM; BRAZIL, 2000), *T. serrulatus* e *T. bahiensis* no Sudeste do Brasil (BUCARETCHI et al., 1995; SOARES; AZEVEDO; DE MARIA, 2002) e em outros países (CHOWELL et al., 2006; GÓMEZ et al., 2010). Na Tunísia, envenenamentos por *Hemiscorpius lepturus* não foram acompanhados de processo inflamatório local (BOUAZIZ et al., 2008), mas no Irã, a necrose local foi relatada (PIPELZADEH et al., 2007; JALALI et al., 2010).

As manifestações clínicas sistêmicas foram diferentes nas duas regiões, com maior frequência e gravidade nos pacientes da região Oeste, com ênfase nos sinais e sintomas neurológicos, enquanto na Leste, as manifestações consideradas leves predominaram. Estes achados corroboram os relatos de Pardal et al. (2003) e Martins et al. (2002) nestas mesmas áreas do estudo. Contudo, duas vítimas não apresentaram nenhuma manifestação clínica que, segundo o Consenso Internacional dos envenenamentos por escorpiões (KHATTABI et al., 2011), o classifique no chamado nível 0 (zero), onde não ocorre envenenamento ou “*dry sting*”; enquanto as outras vítimas estão incluídas no nível 1, e apresentam manifestações somente no local da picada e no nível 2, nas chamadas manifestações sistêmicas menores e

que não levam ao risco de vida. Entretanto, no nível 3, onde ocorrem alterações cardíocirculatórias e levam a risco de vida, nenhum paciente está incluído. Esta divergência da gravidade e das manifestações clínicas entre as regiões do estudo pode estar relacionada a vários fatores, entre eles, a composição química da peçonha do *T. obscurus*. Relatos de Horta, Caldeira e Sares (2007) e Chippaux e Goyffon (2008) referem que a gravidade do envenenamento está relacionada, entre outros fatores, à espécie do escorpião e à composição da peçonha; entretanto, Nishikawa et al. (1994), em estudo experimental, mostra que a peçonha do *T. obscurus* tem menor toxicidade, quando comparado com outras peçonhas de escorpiões brasileiros, como *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus*.

Manifestações clínicas decorrentes da estimulação do sistema simpático, parassimpático, bem como para o lado do sistema nervoso central (SNC) têm sido descritos no escorpionismo humano por *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. stigmurus*, que incluem sonolência, tonturas, contratura, tremores e convulsões. No entanto, alguns achados neurológicos do estudo como mioclonias, sensação de “choque elétrico” no corpo, disartria, parestesia em todo corpo, ataxia de marcha, dismetria e fasciculação são observados somente nos acidentes por *T. obscurus* da região Oeste e não relatados em outras regiões do Estado do Pará (MARTINS et al., 2002) e nem do Brasil (BUCARETCHI et al., 1995; LIRA-DA-SILVA; AMORIM; BRAZIL, 2000; HORTA, CALDEIRA, SARES, 2007). Porém, Pardal et al. (2003), na região Oeste do estudo, e Mohamed et al. (2013), na Guiana Francesa relataram esta ocorrência por esta mesma espécie. Outros escorpiões como *Centruroides infamatus* e *C. limpidus tecomanus* no México (CHOWELL et al., 2006) e *Parabuthus granulatus* e *P. transvaalicus* na África do Sul e Zimbábue (MÜLLER, 1993; BERGMAN, 1997) ocasionam sintomas similares.

O tratamento específico para escorpionismo no Brasil se baseia na administração do antiveneno escorpiônico específico, obtido a partir de plasma de cavalos imunizados com as peçonhas de *T. Serrulatus*, e tem sido utilizado de forma eficaz para o tratamento de escorpionismo humano por *T. serrulatus* e de outras espécies, tais como *T. stigmurus* e *T. bahiensis* (BUCARETCHI et al., 1995; LIRA-DA-SILVA, AMORIM, BRAZIL, 2000; BRASIL, 2001; HORTA, CALDEIRA, SARES, 2007). Além disso, estudos em vivo e em vitro mostraram que o antiveneno de *T. serrulatus* pode ser utilizado com sucesso contra *T. obscurus* (NISHIKAWA et al., 1994).

Todos os pacientes evoluíram para cura após o tratamento no presente estudo. Os que apresentaram manifestações locais foram tratados com analgésicos e receberam alta hospitalar entre 6 a 12 horas após a admissão. Enquanto, os que apresentavam manifestações sistêmicas

receberam medicação sintomática como analgésicos para combater a dor, benzodiazepínico para o controle das mioclônias e soroterapia específica antiescorpiônica na dosagem de 15 ml administrados por via intravenosa durante um período de 20 minutos. Os pacientes da região Leste foram liberados do hospital nas primeiras 24 horas, enquanto os da região Oeste, sete deles foram liberados dentro de 48 horas, e dois até 72 horas (dados não mostrados).

7.2. Do molecular

O gene mitocondrial do estudo, quando amplificado, revelou um fragmento semelhante ao encontrado em outras espécies de escorpiões (GANTENBEIN; FET; BARKER, 2001; TERUEL; FET; GRAHAM, 2006). Sendo esta ferramenta uma poderosa aliada para avaliar a posição taxonômica de populações de animais, subespécies e espécies de escorpiões (GANTENBEIN et al., 2000; TOWLER et al., 2001), por meio de análises da similaridade, diversidade genética e filogenia dos espécimes (GANTENBEIN; LARGIADÈR, 2003; OZKAN; AHMET; ZAFER, 2010; BORGES et al., 2010).

O sequenciamento do gene mostra que a combinação adenina + timina (A+T) está mais presente nas médias das amostras do *T. obscurus* das duas regiões: Leste (71,86%) e Oeste (69,85%), enquanto que a guanina + citosina (G+C) está em menor número no Leste (28,13%) e Oeste (30,15%). Resultados equivalentes foram encontrados por Borges et al. (2010) em 21 espécies de *Tityus* da Venezuela, Trinidad, Brasil e Panamá, onde o A+T foi de 72.5% e o G+C de 27.4%.

As matrizes mostram que as intraespécies de cada região estão muito próximas geneticamente, cuja similaridade e divergência encontram-se entre 98,6 a 99,7 e de 0,3% a 1,4% na Leste, de 99,1 a 100% e de 0,0% a 0,9% na Oeste, respectivamente; entretanto, quando comparamos as duas populações de *T. obscurus*, fica evidente a separação entre elas com divergência de 9,7 a 11%. Segundo Ozkan, Ahmet e Zafer (2010), ao comparar oito espécies de *Androctonus crassicauda* mostraram 99,7% de similaridade intraespécies e 98,7% a 98,9% entre as interespcies na província Sanliurfa na Turquia; enquanto Costa (2008), para os *T. obscurus* coletados de outros municípios do Oeste do Pará, mostrou que a diferença intraespecífica variou de 0 a 8,2%. Outras espécies como o *Centruroides exilicauda* no México apresentaram divergências intraespécies de 1-10%, enquanto as interespcies do México e USA ficaram em 13-16%, sendo estas consideradas altas por Gantenbein, Fet e Barker (2001). No entanto, Fet et al. (2005), ao analisar os *Euscorpilus italicus* da Suíça, Itália, Eslovénia, Grécia e Turquia, encontrou distância genética entre 0 a 1,2%, considerada extremamente baixa.

Os fenogramas mostram que a população de *T. obscurus* do Leste está nitidamente separada das do Oeste; enquanto os espécimes de cada área estão intimamente relacionados e apoiados por 100% do *bootstrap*. Estes resultados demonstram o elevado grau de polimorfismo genético (9,06%) entre as sequências do DNA dos *T. obscurus* dos dois grupos. Isso pode estar relacionado com a grande distância e as barreiras geográficas entre as duas áreas de estudo, o que parece ser suficiente para separar as duas populações. Segundo Haffer (2008), as barreiras geográficas na Amazônia podem separar populações e causar diferenciações de espécies. No Marrocos e Tunísia, o *Buthus occitanus* separado pelo Estreito de Gibraltar formou três grupos neste complexo de espécies, o que fez Gantenbein e Largiadèr (2003) afirmarem que as distâncias geográficas podem funcionar como barreira de fluxo gênico. Isto também parece estar ocorrendo com o *C. exilicauda* do México e USA e o *C. limpidus* da região Central e Sul do México que mostram mais de uma linhagem dentre estas espécies (GANTENBEIN; FET; BARKER, 2001; TOWLER et al., 2001).

7.3. Da morfologia

Os resultados mostram variação morfométrica entre as populações de machos e fêmeas de *T. obscurus* das duas regiões, sendo confirmados pelas análises cladísticas e das discriminâncias. Estudos morfométricos em escorpiões têm adquirido cada vez mais espaço na distinção de diversas espécies e gêneros de escorpiões. Fet e Soleglad (2002) mostraram existir mais de uma espécie do *Euscorpilus carpathicus* na Europa; Hughes (2011) descreveu uma nova espécie do gênero *Vaejovis* no Arizona, EUA, enquanto Karatas (2007) evidenciou variação morfológica entre os *Mesobuthus nigrocinctus* da Turquia.

Entre as principais variáveis morfométricas que permitem diferenciação entre as duas populações de *T. obscurus*, encontramos largura e altura dos segmentos metassomais, por apresentarem um alto nível de significância no teste de *Mann-Whitney* e elevados valores das funções discriminantes. Esses caracteres têm sido bastante eficientes para diferenciar variações morfológicas ou mesmo espécies. No norte da China, dois gêneros de *Mesobuthus* foram diferenciados, principalmente através das proporções entre o comprimento e a largura de cada segmento metassomal (ZHANG; ZHU, 2009); Hughes (2011), em recente revisão de algumas espécies do gênero *Vaejovis*, mostrou que a taxa comprimento/largura do III segmento metassomal pode distinguir fêmeas de duas espécies, através de análise de funções discriminantes.

As análises dos dendogramas e as das discriminâncias mostram perfeitamente que existe uma grande distância morfológica entre as duas populações de fêmeas das duas áreas,

porém, com os machos, nota-se que alguns indivíduos da população Oeste (um indivíduo de Rurópolis e outro de Trairão) são mais relacionados às populações da região Leste. Ponce-Saavedra et al. (2009), ao realizarem análise de conglomerados com subespécies de *Centruroides limpidus*, observaram que nos dendogramas ocorria mesclagem de indivíduos de *C. limpidus limpidus* e *C. l. tecomanus*, e justificam o resultado afirmando que o grau de semelhança nas medidas entre ambas foi responsável por promover mistura dos grupos nestas análises. É possível que o mesmo tenha ocorrido no presente estudo, e que o baixo número amostral de ambas as populações possa também ter influenciado neste resultado.

Neste estudo, todos os resultados das análises multivariadas dos dados morfométricos indicam uma diferenciação do *T. obscurus* em duas linhagens, evidenciando um padrão morfológico Leste-Oeste no Estado do Pará, sendo que as populações do Oeste são em média maiores do que as do Leste. Fato semelhante já foi registrado em populações de *Bothriurus bonariensis*, na América dos Sul (OLIVERO; MATTONI; PERETI, 2012) e de outro artrópode, *Scolopendra cingulata*, na região do Mediterrâneo (SIMAIAKIS; GIOKAS; KORSÓS, 2011).

7.4. Da peçonha

Ao comparar os cromatogramas obtidos pelo sistema *RP-HPLC*, ficou evidente que a peçonha da região Oeste tem um maior número de frações e não apresenta perfil cromatográfico similar. Estudos anteriores com a mesma técnica e com o mesmo tempo de eluição, em peçonha de escorpiões, têm mostrado números de componentes diversos. Caliskan et al. (2006) encontrou 44 no *Androctonus crassicauda* da Turquia; Schwartz et al., (2008) separou 80 frações no *Opisthacanthus cayaporum* do Brasil; enquanto nas toxinas da mesma espécie deste estudo, Murgia et al. (2004) encontrou 50 e Batista et al. (2004) 60 frações. Entretanto, para melhor observar as diferenças e semelhanças das frações nas peçonhas de cada região, a sobreposição dos perfis cromatográficos é apresentada e nota-se que os localizados nas faixas de tempo de retenção que correspondem às toxinas para sódio e para potássio, são mais frequentes na peçonha do *T. obscurus* da região Oeste, porém, identifica-se que as frações com TR de 22.9, 25.2, 28.0, 28.7, 30.7, 32.5, 34.5, 36.7, 39.5 e 46.5 minutos estão presentes nas duas toxinas. Estudos anteriores, pelo *HPLC* nas toxinas destes espécimes, identificaram e sequenciaram o peptídeo Tc1, que é o menor peptídeo específico conhecido para canal de K^+ (Batista et al., 2000); Tc30 (TR 30 min.) e Tc32 (TR 32 min.) que bloqueiam os canais Kv1.3 e Shaker B K^+ (Batista et al. 2002a); Tc48a, Tc48b, Tc49a, Tc54 e Tc49b atuam nos canais para Na^+ . Tc49b é uma não α -toxina, que aboliu quase

completamente a corrente de Na^+ nas células granulares do cerebelo (Batista et al, 2002b); Tc48a afeta a permeabilidade do Na^+ nas células F-11 em cultura, provocando um efeito notável sobre a resposta fisiológica dos neurônios, levando a um aumento na excitabilidade e na amplitude do potencial de ação (Batista, 2004) e Tc48b atuam no canal de Na^+ das células de cultura da pituitária GH3 (Murgia et al., 2004). Atualmente, Guerrero-Vargas et al. (2012), por clonagem molecular, identificaram novas toxinas para canais de Na^+ , nomeando de To4 a To15.

Ao comparar as amostras de toxinas do *T. obscurus* das duas regiões, analisadas pelo MALDI-TOF/TOF, não se observa nenhuma similaridade na composição química entre os seus componentes, mesmo naquelas massas moleculares que se expressam no mesmo tempo de retenção de 25.2, 28.0, 28.7, 30.7, 32.5, 34.5, 36.7, 39.5 minutos. Segundo Miyashita et al. (2007), a família Buthidae possui uma peçonha muito diferente em comparação com outros não-Buthidae. Além disso, mesmo dentro da família Buthidae, grandes diferenças podem ser observadas na composição da peçonha entre espécies diferentes (DYASON et al., 2002, GUERRERO-VARGAS et al., 2012) e dentro de uma espécie (ABDEL-RAHMAN et al., 2009; OZKAN; CIFTCI, 2010; RUIMING et al., 2010; RODRÍGUEZ-RAVELO et al., 2013). Por isso, estima-se que existam aproximadamente 150.000 polipéptidos distintos em todas as espécies conhecidas de escorpiões no mundo (TAN et al., 2006).

Na análise dos espectros de massas das peçonhas das duas áreas, fica evidente que os neurotransmissores moduladores para K^+ e para Na^+ encontram-se em maior quantidade na região Oeste, o que sugere que os envenenamentos pelo *T. obscurus*, em Santarém e Rurópolis-Pará, tenham potencial de maior gravidade. Segundo Becerril, Marangoni e Possani (1997), a peçonha de escorpião *Tityus* é rica em péptidos neurotóxicos, especialmente aqueles que modulam os canais de Na^+ ou bloqueiam os canais de K^+ , sendo estes ions os mais estudados e conhecidos (RODRÍGUEZ DE LA VEGAS; POSSANI, 2005) por exercerem ação em vários organismos, atuando especificamente na função dos canais iônicos das células excitáveis e não excitáveis (POSSANI et al., 1999), sendo no homem, o responsável pelo surgimento das manifestações clínicas do envenenamento.

7.5. Relação das manifestações clínicas com as toxinas

A relação das manifestações clínicas do envenenamento com a peçonha do *T. obscurus* mostra as vítimas da região Oeste com uma riqueza na sua sintomatologia e na composição química da peçonha. Diversidade de componentes da peçonha tem sido descrita para várias espécies de escorpião, porém, nunca comparando a sua relação com as

manifestações clínicas. Entretanto, vários fatores geográficos, ambientais e genéticos podem contribuir para variação intraespecífica dos componentes da peçonha dos escorpiões (RUIMING et al., 2010; OZKAN; CIFTCI, 2010; ABDEL- RAHMAN et al., 2009); sendo as neurotoxinas que interferem nos canais para sódio as que têm grande importância médica e farmacológica (WAGNER et al. (2003). Segundo Catteral (1980) e Gwee et al., (2002) estas estão relacionadas às manifestações clínicas do envenenamento, levando principalmente, à hiperatividade do sistema nervoso autônomo.

Relatos anteriores mostram que a peçonha de *T. obscurus* contém pelo menos cerca de uma centena de componentes de péptidos diferentes (BATISTA et al., 2000), baixa toxicidade (NISHIKAWA et al. 1994) e manifestações clínicas diferenciadas entre regiões do Estado do Pará (MARTINS et al., 2002; PARDAL et al., 2003). Entretanto, nossos resultados mostram que a população de *T. obscurus* da área Oeste, distante e separada por várias barreiras geográficas da Leste, apresenta componentes neurotóxicos de canais para K^+ e para Na^+ mais frequentes o que provavelmente pode explicar a gravidade e a sintomatologia diferenciada dos envenenamentos nas áreas do estudo.

7.6. Variabilidade geográfica do *T. obscurus*

Existem diversas hipóteses sobre a origem biológica na Amazônia que podem explicar a alta diversidade e distribuição geográfica de espécies de muitos grupos taxonômicos na região, entre elas a de que os rios servem como barreiras para a dispersão (HAFFER, 2008), entretanto, Lourenço (2002) afirma que a maioria dos escorpiões desta região são espécies monomórfica, entre eles o *T. obscurus*. No entanto, nossos resultados mostram que esta espécie, que está distante cerca de 850 km e separada por dois grandes rios, Xingu e Tocantins, apresenta uma variação morfológica significante na largura e altura dos segmentos dos metassomas e com elevado grau de polimorfismo genético sugerindo que ela tenha sofrido uma especiação alopátrica, o que provavelmente levou à diversidade na composição química da peçonha, o que é de extrema importância para compreender a diversidade das manifestações clínicas entre as vítimas do envenenamento nas áreas do estudo. Segundo Ruiming et al. (2010) e Ozkan e Ciftci (2010), separações geográficas podem levar à diversidade dos componentes das peçonhas dos escorpiões. Outros autores, como Badhe et al. (2006), encontraram variação intraespecífica entre as peçonhas dos *Mesobuthus tamulus* de diferentes regiões da Índia; Abdel-Rahman et al. (2009) observaram que um conjunto de fatores, seja ambiental, genético e geográfico, contribuem para variações intraespecíficas da toxina de populações do *Scorpio maurus palmatus*, de regiões diferentes do Egito.

Recentemente, Guerrero-Vargas et al. (2012) mostraram, por análise filogenética e clonagem molecular das glândulas de toxinas dos escorpiões *T. pachyurus* e *T. obscurus*, uma clara separação geográfica entre escorpiões do gênero *Tityus* que habitam a Amazônia, os das regiões montanhosas dos Andes e dos espécimes encontrado ao sul da Floresta Amazônica brasileira.

8. CONCLUSÕES

Este estudo possibilita ampliar o conhecimento sobre *Tityus obscurus* Gervais, 1843 de duas regiões distintas do Estado do Pará, Amazônia brasileira, ao realizar uma análise comparativa dos aspectos epidemiológico-clínico do envenenamento, o molecular e o morfológico do escorpião e o químico da peçonha deste espécime, fornecendo os seguintes dados bastante informativos:

1. O envenenamento pelo *T. obscurus* causa manifestações clínicas e gravidade diferenciadas entre as vítimas das regiões Leste e Oeste;
2. As manifestações clínicas do envenenamento no sítio anatômico da picada são comuns nas duas regiões;
3. São mais frequentes na região Oeste do Estado as manifestações clínicas gerais, autonômicas e neurológicas;
4. Os sintomas/sinais de mioclonias, sensação de choque elétrico pelo corpo, disartria, ataxia, dismetria e fasciculação são encontrados somente entre as vítimas da região Oeste;
5. O alinhamento das sequências parciais do gene 16S mitocondrial dos espécimes de *T. obscurus* mostra um elevado grau de polimorfismo genético entre as amostras das duas regiões;
6. As matrizes de similaridade e de distância revelam que as intraespécies são similares, enquanto, entre as populações das regiões Leste e Oeste mostram uma alta divergência genética;
7. Os fenogramas gerados revelam topografias muito congruentes, formando dois ramos bem distintos, evidenciando uma divergência entre as duas populações e uma semelhança intraespecífica;
8. Os indivíduos das populações de *T. obscurus* das duas regiões se diferenciam, principalmente, pela largura e altura dos segmentos dos metassomas, visto o alto nível de significância e dos valores dessas variáveis nas funções discriminantes;
9. Os dendogramas e as discriminâncias mostram a existência de uma grande distância morfológica entre as duas populações de fêmeas das duas áreas, porém, alguns indivíduos machos da população Oeste estão mais relacionados com as populações da região Leste.
10. Os dados morfológicos analisados pelas multivariadas indicam um padrão Leste-Oeste do *T. obscurus* no Estado do Pará;
11. A divergência morfológica desta espécie pode estar relacionada à especiação dos espécimes, decorrente da distância e barreiras geográficas;

12. O perfil cromatográfico da toxina mostra uma divergência qualitativa e quantitativa nos espécimes das duas regiões do Estado do Pará-Brasil;
13. Os espectros de massas das peçonhas das duas áreas não mostram nenhuma similaridade na composição química entre os seus componentes;
14. A presença de neurotransmissores moduladores para K^+ e para Na^+ em maior frequência na região Oeste torna-se de extrema importância para compreender a diversidade das manifestações clínicas entre as vítimas do envenenamento por *T. obscurus* nas áreas do estudo.

Considerando todas estas informações, concluímos que os escorpiões analisados das populações das regiões do Leste e Oeste do Estado do Pará, Amazônia brasileira, e que hoje conhecemos como *T. obscurus* Gervais, 1843, mostram a existência de uma diversidade na composição química da peçonha, um polimorfismo morfológico e genético do espécime, colocando em evidência uma diversidade regional deste escorpião, que pode estar relacionada à especiação dos espécimes, decorrente da distância e barreiras geográficas, chegando a formar duas linhagens distintas, o que justifica a diferença das manifestações clínicas do envenenamento encontradas neste estudo e sugerimos uma revisão taxonômica destes “espécimes”.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMANA, M.A.; OMRAN, M.A.A.; ABDEL-NABI, I.M.; UEDA, H.; MCVEAN, A. Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. **Toxicon**, v. 53, p. 349–359, 2009.
- ARAÚJO, W.A.G.; ASSIS Jr., F.I.; SOBREIRA, G.F. Fundamentos e métodos para análise de aminoácidos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v 4 n, 2, p. 395-404, 2007.
- ASANO, M.E.; ARNUND, R.M.; LOPES, F.O.B.; PARDAL, J.S.O.; PARDAL, P.P.O. Estudo clínico e epidemiológico de 12 acidentes por escorpiões atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém-Pará, no período de 1992-1995. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29 (Supl. 1), p. 243, 1996.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, IDMS / MCT / CNPq, 2007, 364p.
- BADHE, R.V.; THOMAS, A.B.; HARER, S.L.; DESHPANDE, A.D.; SALVI, N.; WAGHMARE, A. Intraspecific variation in protein pattern of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, Coconsis, Pocock) venoms from western and southern India. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 612-619, 2006.
- BATISTA, C.V.F.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; LUCAS, S.; POSSANI, L.D. Tc1, from *Tityus cambridgei*, is the first member of a new subfamily of scorpion toxin that blocks K⁺ channels. **FEBS Letters**, v. 486, p. 117-120, 2000.
- BATISTA, C.V.F.; GÓMEZ-LAGUNAS, F.; RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R.C.; HAJDU, P.; PANYI, G.; GASPARGAS, R.; POSSANI, L.D. Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and *Shaker B* K⁺ channels with distinctly different affinities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1601, p. 123-131, 2002a.
- BATISTA, C.V.F.; ZAMUDIO, F.Z.; LUCAS, S.; FOX, J.W.; FRAU, A.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L.D. Scorpion toxins from *Tityus cambridgei* that affect Na⁺ channels. **Toxicon**, v. 40, p. 557-562, 2002b.
- 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. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 55–66, 2004.
- BECERRIL, B.; CORONA, M.; CORONAS, F.I.; ZAMUDIO, F.; CALDERON-ARANDA, E.S.; FLETCHER, P.L.; MARTIN, B.M.; POSSANI, L.D. Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochemical Journal**, v. 313, n. 3, p. 753-60, 1996.
- BECERRIL, B.; MARANGONI, S.; POSSANI, L.D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. **Toxicon**, v. 35, p. 821-835, 1997.

BERGMAN, N.J. Clinical description of *Parabuthus transvaalicus* scorpionism in Zimbabwe. **Toxicon**, v. 35, p. 759-771, 1997.

BORGES, A.; BERMINGHAM, E.; HERRERA, N.; ALFONZO, M.J.; SANJUR, O.I. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. **Toxicon**, v. 55, p. 436-454, 2010.

BORJA-OLIVEIRA, C.R.; PERTINHEZ, T.A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; SPISNI, A. Positive inotropic effects of *Tityus cambridgei* and *T. serrulatus* scorpion venoms on skeletal muscle. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, n. 3, p. 404-8, 2009.

BOUAZIZ, M.; BAHLOUL, M.; KALLEL, H.; SAMET, M.; KSIBI, H.; DAMMAK, H.; BEN AHMED, M.N.; CHTARA, K.; CHELLY, H.; BEN HAMIDA, C.; REKIK, N. Epidemiological, clinical characteristics and outcome of severe scorpion envenomation in South Tunisia: Multivariate analysis of 951 cases. **Toxicon**, v. 52, p. 918-926, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde (Org). **Acidente por animais peçonhentos**: Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 18/01/2014.

_____. Ministério da Saúde (Org.). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, Fundação Nacional de Saúde, 2001. 120 p.

_____. Ministério da Saúde (Org.). **Manual de controle de escorpiões**. Serie B. Textos básicos de saúde. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009. 70 p.

BUCARETCHI, F.; BARACAT, E.C.E.; NOGUEIRA, R.J.N.; CHAVES, A.; ZAMBRONE, F.A.D.; FONSECA, M.R.C.C.; TOURINHO, F.S. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 331-336, 1995.

BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: IME/USP, 1990, 105p.

CALISKAN, F.; GARCÍA, B.I.; CORONAS, F.I.; BATISTA, C.V.; ZAMUDIO, Z.; POSSANI, L.D. Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey: peptides and genes. **Toxicon**, v. 48, p. 12-22, 2006.

CANDIDO, D. M. **Escorpiões**. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/pdf/v5cap03.pdf>>. Acesso em: 01 maio 2010.

CANDIDO, D.M.; LUCAS, S. Maintenance of scorpions of the genus *Tityus* Koch (Scorpiones, Buthidae) for venom obtention at Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 86-97, 2004.

CATTERALL, W.A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 15-43, 1980.

CDC (Org.). **EpiInfo™ 6.04**. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/EI6dnjp.htm>>. Acesso em: 28 fev. 2009.

CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. **Acta Tropica**, v. 107, p. 71–79, 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, p. 753–758, 2006.

CLARY, D.O.; WOLSTENHOLME, D.R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, p. 252-271, 1985.

COSTA, L.S.O. **Identificação molecular e análise filogenética de escorpiões da região Oeste do Pará**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Federal do Pará, Santarém, 2008.

CRUZ, E.F.S. **Biologia dos escorpiões**. In: BARRAVIERA, B. Venenos animais: Uma visão integrada. Rio de Janeiro: Editora de Publicação Científica, 1994. p. 135-150.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia. Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DUTERTRE, S.; BIASS, D.; STÖCKLIN, R.; FAVREAU, P. Dramatic intraspecimen variations within the injected venom of *Conus consors*: An unsuspected contribution to venom diversity. **Toxicon**, v. 55, p. 1453–1462, 2010.

DYASON, K.; BRANDT, W.; PRENDINI, L.; VERDONCK, F.; TYTGAT, J.; PLESSIS, J.; MÜLLER, G.; VAN DER WALT, J. Determination of species-specific components in the venom of *Parabuthus* scorpions from southern Africa using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.16, p. 768-773, 2002.

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G.M.. Venomics: unraveling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, p. 279–295, 2008.

FENG, X.; LIU, X.; LUO, Q.; LIU, B. F. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 27, n. 6, p. 635-60, 2008.

FET, V.; PONDEXTER, B.J. Genetic variation of mitochondrial DNA in *Centruroides exilicauda* (Scorpiones: Buthidae) as revealed by the polymerase chain reaction. **American Zoologist**, v. 32, n. 5, p. 136A, 1992.

FET, V.; GANTENBEIN, B.; KARATAS, A.; KARATAS, A. An extremely low genetic divergence across the range of *Euscorpium italicus* (Scorpiones, euscorpidae). **The Journal of Arachnology**, v. 34, p. 248–253, 2005.

FET, V.; SOLEGLAD, M.E. Morphology analysis supports presence of more than one species in the “*Euscorpium carpathicus*” complex (Scorpiones: Euscorpidae). **Euscorpium**, v. 3, p. 1-51, 2002.

FRAIHA NETO, H.; PARDAL, P.P.O. Escorpiões e escorpionismo na área metropolitana de Belém e arredores, Estado do Pará, Brasil (Chelicerata, Scorpiones). **Anais da Academia de Medicina do Pará**, v. 7, p. 31-35, 1996.

GANTENBEIN, B.; FET, V.; BARKER, M.D. Mitochondrial DNA reveals a deep, divergent phylogeny in *Centruroides exilicauda* (Wood, 1863) (Scorpiones: Buthidae). **Scorpions**, In Memoriam Gary A. Polis, p. 235-244, 2001.

GANTENBEIN, B.; FET, V.; BARKER, M.; SCHOLL, A. Nuclear and mitochondrial markers reveal the existence of two parapatric scorpion species in the Alps: *Euscorpium germanus* (C.L. Koch, 1837) and *E. alpha* Caporiacco, 1950, stat. nov. (Euscorpidae). **Revue Suisse de Zoologie**, v. 107, n. 4, p. 843-869, 2000.

GANTENBEIN, B.; LARGIADÈR, C.R. The phylogeographic importance of the Strait of Gibraltar as a gene flow barrier in terrestrial arthropods: a case study with the scorpion *Buthus occitanus* as model organism. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 28, p. 119-130, 2003.

GANTENBEIN, B.; FET, V.; LARGIADER, C.R.; SCHOLL, A. First DNA phylogeny of *Euscorpium* Thorell, 1876 (Scorpiones, Euscorpidae) and its bearing on taxonomy and biogeography of this genus. **Biogeographica**, v. 75, n. 2, p. 49-65, 1999.

GIRIBET, G.; EDGECOMBE, G.D.; WHEELER, W.C. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. **Nature**, v. 413, p. 157-161, 2001.

GÓMEZ, J.P.; QUINTANA, J.C.; ARBELÁEZ, P.; FERNÁNDEZ, J.; SILVA, J.F.; BARONA, J.; GUTIÉRREZ, J.C.; DÍAZ, A.; OTERO, R. Picaduras por escorpión *Tityus asthenes* en Mutatá, Colombia: aspectos epidemiológicos, clínicos y toxicológicos. **Biomédica**, v. 30, p. 126-139, 2010.

GÓMEZ, J.P.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A.; VELÁSQUEZ, M. Aspectos toxicológicos, clínicos y epidemiológicos del envenenamiento producido por el escorpión *Tityus fuhrmanni* Kraepelin. **Medunab**, v. 5, p. 159-165, 2002.

GOMEZ, M.V.; DINIZ, C.R. Separation of toxic components from Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 33, p. 899-902, 1966.

GUERRA, C.M.N.; CARVALHO, L.F.A.; COLOSIMO, E.A.; FREIRE, H.B.M. Análise de variáveis relacionadas à evolução letal do escorpionismo em crianças e adolescentes no Estado de Minas Gerais no período de 2001 a 2005. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 6, p. 509-515, 2008.

- GUERRERO-VARGAS, J.A.; MOURÃO, C.B.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; POSSANI, L.D.; SCHWARTZ, E.F. Identification and phylogenetic analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* novel putative Na⁺-channel scorpion toxins. **PLoS One**, v. 7, n. e30478, p. 1-13, 2012.
- GWEE, M.C.E.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H.E.; GOPALAKRIHNAKONE, P.; KINI, R.M.; CHEAH, L.S., Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, p. 795–801, 2002.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAFFER, J. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68 (4, Suppl.), p. 917-947, 2008.
- HARINGTON, A. Character variation in the scorpion *Parabuthus villosus* (Peters) (Scorpiones: Buthidae): A case of intermedial zone. **The Journal of Arachnology**, v. 11, p. 393-406, 1984.
- HORTA, F.M.B.; CALDEIRA, A.P.; SARES, J.A.S. Escorpionismo em crianças e adolescentes: aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes hospitalizados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 351-353, 2007.
- HUGHES, G.B. Morphological analysis of montane scorpions of the genus *Vaejovis* (Scorpiones: Vaejovidae) in Arizona with revised diagnoses and description of a new species. **The Journal of Arachnology**, v. 39, n. 3, p. 420-238, 2011.
- JALALI, A.; PIPELZADEH, M.H.; SAYEDIAN, R.; ROWAN, E.G. A review of epidemiologic al, clinical and in vitro physiologic al studies of envenomation by the scorpion *Hemiscorpius lepturus* (Hemiscorpiidae) in Iran. **Toxicon**, v. 55, p. 173-179, 2010.
- KARATAS, A. *Mesobuthus nigrocinctus* (Ehrenberg, 1828) (Scorpiones: Buthidae) in Turkey: Distribution and morphological variation. **Euscorpius**, v. 56, p. 1–10, 2007.
- KHATTABI, A.; SOULAYMANI-BENCHEIKH, R.; ACHOUR, S.; SALMI, L.R. Scorpion consensus expert group: Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 7, p. 364-369, 2011.
- LECOMTE, C.; SABATIER, J.M.; VAN RIETSCHOTEN, J.; ROCHAT, H. Synthetic peptides as tools to investigate the structure and pharmacology of potassium channel-acting short-chain scorpion toxins. **Biochimie**, v. 80, n. 2, p. 151-154, 1998.
- LIRA-DA-SILVA, R.M.; AMORIM, A.M.; BRAZIL, T.K. Envenomation by *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) in Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 239-245, 2000.
- LOURENÇO, W.R. Revisão crítica das espécies *Tityus* do Estado do Pará (Scorpiones, Buthidae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Zoologia**, v. 1, n. 1, p. 5-8, 1984.

_____. Un nouveau genre de scorpion amazonien appartenant a la famille des Chactidae (Chelicerata, Scorpiones). **Revue Arachnologique**, v. 12, n. 12, p. 129-134, 1998.

_____. Additions a la faune de scorpions néotropicaux (Arachnida). **Revue Suisse de Zoologie**, v. 104, n. 3, p. 587-604, 1997.

_____. **Scorpions of Brazil**. Paris: Les Éditions de l'If, 2002. 307p.

LOURENÇO, W.R.; FRANCKE, O.F. Révision des connaissances sur les Scorpions cavernicoles (Troglobies) (Arachnida, Scorpiones). **Memoires de Biospeologie**, v. 12, p. 3-7, 1985.

LOURENÇO, W.R.; LEGUIN, E. The true identity of *Scorpio (Atreus) obscurus* Gervais. 1843 (Scorpiones, Buthidae). **Euscorpius**, v. 75, p. 1-11, 2008.

LOURENÇO, W.R.; VON EICKSTEDT, R.D. Considerações sobre a sistemática de *Tityus costatus* (Karsch, 1879), provável espécie polimórfica de escorpião da floresta atlântica do Brasil (Scorpiones, Buthidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 68, p. 3-11, 1988.

_____. Escorpiões de importância médica. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.A.; Haddad Jr., V. (eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p.198-213.

LUCAS, S. O laboratório de artrópodes do Instituto Butantan e os aracnídeos peçonhentos. **História, Ciências, Saúde**. Manguinhos, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 1025-1035, 2003.

LUCAS, S.M.; DA SILVA JÚNIOR, P.I. Escorpiões de Interesse Médico no Brasil. In: Schvartsman, S. (ed.). **Plantas venenosas e Animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. p.211-215.

MAESTRI NETO, A.; GUEDES, A.B.; CARMO, S.F.; CHALKIDIS, H.M.; COELHO, J.S.; PARDAL, P.P.O. Aspectos do escorpionismo no Estado do Pará – Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 49-55, 2008.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento da intoxicação pelo veneno dos escorpiões. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.Tomo XX1, n.fasc. I, 1928.

MARTINS, M.A.; BARRADA, L.; SILVA, R.H.V.; PARDAL, P.P.O. Estudo clínico e epidemiológico dos acidentes por escorpiões atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto, período de janeiro a dezembro de 1996. **Revista Paraense de Medicina**, v. 16, n. 1, p. 34-38, 2002.

MELLO-LEITÃO, C. Revisão do gênero *Tityus*. **Physis, Buenos Aires**, v. 17, p. 57-76, 1939.

MENEZ, A.; BONTEMS, F.; ROUMESTAND, C.; GILQUIN, B.; TOMA, F. Structural basis for functional diversity of animal toxins. **Proceeding of the Royal Society of Edinburgh**, v. 99B, n. 1/2, p. 83–103, 1992.

MIYASHITA, M.; OTSUKI, J.; HANAI, Y.; NAKAGAWA, Y.; MIYAGAWA, H. Characterization of peptide components in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (Hemiscorpiidae). **Toxicon**, v. 50, p. 428–437, 2007.

MOHAMED, B.; GUEGUENIAT, P.; MAYENCE, C.; EGMANN, G.; NARCISSE, E.; GONON, S.; HOMMEL, D.; KALLEL, H. Epidemiological and clinical study on scorpionism in French Guiana. **Toxicon**, v. 73, p. 56-62, 2013.

MÜLLER, G.J. Scorpionism in South Africa: A report of 42 serious scorpion envenomations. **South African Medical Journal**, v. 83, p. 405-411, 1993.

MURGIA, A.R.; BATISTA, C.V.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L.D. Amino acid sequence and function of a new alpha-toxin from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei*. **Toxicon**, v. 43, p. 737-740, 2004.

NCBI: National Center for Biotechnology Information. **Entrez nucleotide**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 19 de janeiro de 2014.

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

OLIVERO, P.A.; MATTONI, C.I.; PERETI, A.V. Morphometry and geographical variation of *Bothriurus bonariensis* (Scorpiones: Bothriuridae). **The Journal of Arachnology**, v. 40, n. 1, p. 113-122, 2012.

OPERON Technologies Inc. Oligonucleotide data sheet. **Operon a Quiage Company**. Disponível em: <<http://www.bioresearchonline.com/storefronts/operon.html>>. Acesso em: 12 jan. 2010.

OTERO, R.; NAVIO, E.; CÉSPEDES, F.A.; NÚÑEZ, M.J.; LOZANO, L.; MOSCOSO, E.R.; MATAALLANA, C.; ARSUZA, N.B.; GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, D.; RODAS, J.H.; RODRÍGUEZ, O.J.; ZULETA, J.E.; GÓMEZ, J.P.; SALDARRIAGA, M.; QUINTANA, J.C.; NÚÑEZ, V.; CÁRDENAS, S.; BARONA, J.; VALDERRAMA, R. PAZ, N.; DÍAZ, A.; RODRÍGUEZ, O.L.; MARTÍNEZ, M.D.; MATURANA, R.; BELTRÁN, L.E.; MESA, M.B.; PANIAGUA, J.; FLÓREZ, E.; LOURENÇO, W.R. Scorpion envenoming in two regions of Colombia: clinical, epidemiological and therapeutic aspects. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 742-750, 2004.

OZKAN, O.; AHMET, C.; ZAFER, K. A study on genetic diversity of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807); Scorpiones: Buthidae) from Turkey. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 599-606, 2010.

- OZKAN, O.; CIFTCI, G. Individual variation in the protein profile of the venom of *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832, Scorpiones: Buthidae) from Turkey. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 505-508, 2010.
- OZKAN, O.; KAT, I. *Mesobuthus eupeus* scorpionism in Sanliurfa region of Turkey. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 11, p. 479-491, 2005.
- PALUMBI, S.R. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: Hills, David M; Moritz, C.; Mable, B. K. **Molecular Systematics**. 2. ed. USA: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1996. Cap. 7, p. 205-247.
- PARDAL, J.S.O.; PARDAL, P.P.O.; CARDOSO, B.S.; WEN, F.H.; SANTOS, S.T. Animais causadores de acidentes entre moradores ribeirinhos do rio Trombetas, município de Oriximiná-Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34(Supl. 1), p. 377-378, 2001.
- PARDAL, P.P.O.; CARDOSO, B.S.; FAN, H.W. Escorpionismo na região do rio Tapajós, Itaituba (Pará). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32(Supl. 1), p. 394-395, 1999.
- PARDAL, P.P.O.; CASTRO, L.C.; JENNINGS, E.; PARDAL, J.S.O.; MONTEIRO, M.R.C.C. Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 349-353, 2003.
- PARDAL, P.P.O.; RIBEIRO, M.B.; MIRANDA, A.S.P. Aspectos clínicos dos acidentes por animais. **Revista Paraense de Medicina**, v. 16, n. 4, p. 26-32, 2002.
- PIMENTA, A.M.C.; STÖCKLIN, 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 Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 17, p. 1562–1572, 2001.
- PINHEIRO, M.T.L.; OLIVEIRA, S.M.S. Ocorrência de escorpiões e acidentes escorpiônicos no bairro Elcione Barbalho Santarém-Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36(Supl. 1), p. 85-86, 2003.
- PINTO-DA-ROCHA, R.; LOURENÇO, W.R. Two new species of *Tityus* from Brazilian Amazonia (Scorpiones: Buthidae). **Revue Arachnologique**, v. 13, n. 13, p. 187-195, 2000.
- PIPELZADEH, M.H.; JALALI, A.; TARAZ, M.; POURABBAS, R.; ZAREMIRAKABADI, A. An epidemiological and a clinical study on scorpionism by the Iranian scorpion *Hemiscorpius lepturus*. **Toxicon**, v. 50, p. 984-992, 2007.
- PONCE-SAAVEDRA, J.; FRANCKE, O.F.; CANO-CAMACHO, H.; HERNANDEZ-CALDERON, E.. Evidencias morfológicas y moleculares que validan como especie a *Centruroides tecomanus* (Scorpiones: Buthidae). **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 80, p. 71-84, 2009.

POSSANI, L.D.; BECERRIL, B.; DELEPEERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 287-300, 1999.

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.

PRENDINI, L. Order Scorpiones C.L. Koch, 1850. *In*: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. **Zootaxa**, v. 3148, p. 115–117, 2011.

QIAGEN. **GenerationTM Capture Collumn – Handbook**, 2007, 27p. Disponível em <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1001070> Acesso em 07 jan. 2010.

RIBEIRO, A.L.; RODRIGUES, L.; JORGE, M.T. Epidemiological and clinical features of the scorpion envenoming in São Paulo and nearby cities. **Revista de Patologia Tropical**, v. 30, p. 83-92, 2001.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R.C.; POSSANI, L.D. Current views on scorpion toxins specific for K⁺ channels. **Toxicon**, v. 43, p. 865–875, 2004.

_____. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure–function relationships and evolution. **Toxicon**, v. 46, p. 831–844, 2005.

_____. Novel paradigms on scorpion toxins that affect the activating mechanism of sodium channels. **Toxicon**, v. 49, p. 171-180, 2007

RODRÍGUEZ-RAVELO, R.; CORONAS, F.I.V.; ZAMUDIO, F.Z.; , GONZÁLEZ-MORALES, L.; LÓPEZ, G.E.; URQUIOLA, A.R.; POSSANI, L.D. The Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* (Scorpiones, Buthidae): component variations in venom samples collected in different geographical areas. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.19, p. 1-10, 2013.

ROODT, A.R.; GARCIA, S.I.; SALOMON, O.D.; SEGRE, L.; DOLAB, J.A.; FUNES, R.F.; TITTO, E.H. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. **Toxicon**, v. 41, p. 971-7, 2003.

RUIMING, Z.; YIBAO, M.; YAWEN, H.; ZHIYONG, D.; YINGLIANG, W.; ZHIJIAN, C.; WENXIN, L. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components. **BMC Genomics**, v. 11, n. 452, p. 1-15, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, v. 3, 2: ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989. 215p.

SANTOS, P.L.C.; MARTINS, F.J.; VIEIRA, R.C.P.A.; RIBEIRO, L.C.; BARRETO, B.B.; BARBOSA, N.R. Características dos acidentes escorpiónicos em Juiz de Fora - MG. **Revista de Atenção Primária à Saúde**, v. 13, n. 2, p. 164-169, 2010.

SCHWARTZ, E.F.; CAMARGOS, T.S.; ZAMUDIO, F.Z.; SILVA, L.P.; BLOCH, C.; 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. 1499-508, 2008.

SIMAIAKIS, S.M.; GIOKAS, S.; KORSÓS, Z. Morphometric and meristic diversity of the species *Scolopendra cingulate* Latreille, 1829 (Chilopoda: Scolopendridae) in the Mediterranean region. **Zoologischer Anzeiger**, v. 250, p. 67-69, 2011.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, n. 6, p. 651-701, 1994.

SISSOM, W.D. **Systematics, biogeography, paleontology**. In: Polis, G.A. (ed). The biology of scorpions. Stanford University Press, p. 64-160, 1990.

SOARES, M.R.M.; AZEVEDO, C.S.; DE MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 359-363, 2002.

SOULAYMANI, B.R.; IDRISSE, M.; TAMIM, O.; SEMLALI, I.; MOKHTARI, A.; TAYEBI, M.; SOULAYMANI, A. Scorpion stings in one province of Morocco: epidemiological, clinical and prognosis aspects. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 13, p. 462-471, 2007.

SPEROTTO, L.S.; YAMANO, E.Y.S.; KNOWLES, B.M.; CAMILO, F.S.; SILVA M.A.; SOUSA, R.D.; ZANELATO, E.; PARDAL, P.P.O. Estudo clínico e epidemiológico de 27 casos de escorpionismo em Brasil Novo/Altamira-PA. Período de fevereiro a setembro de 2000. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34(Supl. 1), p. 381, 2001.

STÖCKLIN, R.; FAVREAU, P.; THAI, R.; PFLUGFELDER, J.; BULET, P.; MEBS, D. Structural identification by mass spectrometry of a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary bee *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae). **Toxicon**, v. 55, p. 20-27, 2010.

TAMURA, K; PETERSON, D; PETERSON, N; STECHER, G; NEI, M; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, P.T.J.; VEERAMANI, A.; SRINIVASAN, K.N.; RANGANATHAN, S.; BRUSIC, V. SCORPION2: a database for structure–function analysis of scorpion toxins. **Toxicon**, v. 47, p. 356–363, 2006.

TERUEL, R.; FET, V.; GRAHAM, M.R. The first mitochondrial DNA phylogeny of Cuban Buthidae (Scorpiones: Buthoidea). **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa**, v. 39, p. 219-226, 2006.

TOWLER, W.I.; SAAVEDRA, J.P.; GANTENBEIN, B.; FET, V. Mitochondrial DNA reveals a divergent phylogeny in tropical *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) from Mexico. **Biogeographica**, Paris, v. 77, n. 4, p. 157-172, 2001.

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

WAGNER, S.; CASTRO, M.S.; BARBOSA, J.A.R.G.; FONTES, W.; SCHWARTZ, E.N.F.; SEBEN, A.; PIRES JR.O.R., SOUSA, M.V.; SCHWARTZ, C.A. Purification and primary structure determination of Tf4, the first bioactive peptide isolated from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus fasciolatus*. **Toxicon**, v. 41, p. 737-745, 2003.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. **International Review of Cytology**, v. 141, p. 173-216, 1992.

YAMANO, E.Y.S.; HIDAKA, A.S.V.; NEGRÃO, S.G.; SOUZA, N.; LIMA, S.G.; SOUZA, Z.N.; MAGALHÃES, A.F.A.; MIRANDA, J.B.M.; ESTEVES, F.A.L.; VIEIRA, J.L.; PARDAL, P.P.O. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos acidentes por escorpiões orientados pelo Centro de Informações Toxicológicas de Belém, no período de maio de 1997 a novembro de 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, (Supl. 1), p. 394, 1999.

ZHANG, L.; ZHU, M.S. Morphological variation of *Mesobuthus martensii* (Karsch, 1879) (Scorpiones: Buthidae) in Northern of China. **Euscorpius**, v. 81, p. 1-18, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1**Parecer 038/2007 - CEP/NMT**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº038 /2007-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** ESTUDO MOLECULAR DO TITYUS PARAENSIS KRAEPELIN, 1986 E SUA RELAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICA EM DUAS REGIÕES DO ESTADO DO PARÁ-BRASIL.
3. **Pesquisador Responsável:** Pedro Pereira de Oliveira Pardal.
4. **Instituição / Unidade:** UNM/UFPA..
5. **Data de Entrada:** 22/10/2007.
6. **Data do Parecer:** 30/10/2007.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**


Profº Teiji Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.

ANEXO 2

Licença do IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade didática no âmbito do ensino superior

| | | |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Número: 11727-1 | Data da Emissão: 26/10/2007 10:56 | Data de Validade: 25/10/2008 |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|

Dados do titular

| | | |
|--|--|--------------------------|
| Registro no Ibama: 596153 | Nome: Pedro pereira de Oliveira Pardal | CPF: 024.473.202-72 |
| Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ | | CNPJ: 34.621.748/0001-23 |

Observações, ressalvas e condicionantes

| | |
|---|--|
| 1 | A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT). |
| 2 | Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade. |
| 3 | Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico. |
| 4 | A autorização para envio de material biológico não consignado ao exterior deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação. |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local | Tipo |
|---|------------|----|---|------------|
| 1 | | PA | ESTADO DO PARÁ | Fora de UC |
| 1 | Atividades | | Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ, Coleta/transporte de amostras biológicas in situ, Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro, Captura de animais silvestres in situ, Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ | |

Atividades X Táxons

| # | Atividade | Táxons |
|---|---|--|
| 1 | Captura de animais silvestres in situ | Diplopoda, Insecta, Chilopoda, Arachnida |
| 2 | Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ | Diplopoda, Insecta, Arachnida, Chilopoda |
| 3 | Coleta/transporte de amostras biológicas in situ | Arachnida, Insecta, Chilopoda, Diplopoda |
| 4 | Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ | Insecta (*Qtde: 5), Chilopoda (*Qtde: 50), Diplopoda (*Qtde: 30), Arachnida (*Qtde: 900) |
| 5 | Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro | Arachnida, Insecta |

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

| | | |
|---|---|--|
| 1 | Amostras biológicas (Invertebrados Terrestres) | Ectoparasita |
| 2 | Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres) | Puçã, Armadilha luminosa, Captura manual |

Destino do material biológico coletado

| # | Nome local destino | Tipo Destino |
|---|------------------------------|--------------|
| 1 | UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ | colecção |

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Lista de *T. obscurus* das regiões Leste e Oeste do Pará da coleção do LEMAP, agrupadas de acordo sexo, município e tamanho total dos espécimes.

| REGISTRO UFPA/NMT/LEMAP | SEXO | REGIÃO | MUNICÍPIO | COMPRIMENTO TOTAL (mm) |
|----------------------------|-------|--------|----------------|---------------------------|
| 286 | Macho | Oeste | Santarém | 74,83 |
| 287 | Macho | Oeste | Santarém | 78,77 |
| 311 | Fêmea | Oeste | Santarém | 62,53 |
| 312 | Macho | Oeste | Santarém | 85,22 |
| 33 | Macho | Oeste | Santarém | 75,81 |
| 54 | Fêmea | Oeste | Santarém | 73,20 |
| 64 | Macho | Oeste | Santarém | 74,83 |
| 406 | Macho | Oeste | Santarém | 80,81 |
| 409 | Macho | Oeste | Santarém | 85,24 |
| 364 | Macho | Oeste | Santarém | 77,97 |
| 141 | Fêmea | Leste | Traquateua | 75,80 |
| 144 | Fêmea | Leste | Traquateua | 74,90 |
| 17 | Macho | Leste | Belém | 77,69 |
| 177 | Fêmea | Leste | Colares | 67,85 |
| 178 | Fêmea | Leste | Colares | 64,88 |
| 181 | Macho | Leste | Colares | 62,17 |
| 183 | Fêmea | Leste | Ananindeua | 74,56 |
| 189 | Fêmea | Leste | Ananindeua | 70,81 |
| 253 | Macho | Leste | Igarapé-Miri | 75,31 |
| 276 | Fêmea | Leste | Benevides | 70,23 |
| 324 | Fêmea | Leste | Belém | 74,67 |
| 38 | Macho | Leste | Belém | 76,38 |
| 78 | Fêmea | Leste | Abaetetuba | 78,00 |
| 80 | Macho | Leste | Abaetetuba | 68,57 |
| 81 | Macho | Leste | Belém | 77,60 |
| 87 | Fêmea | Leste | Ananindeua | 67,34 |
| 89 | Fêmea | Leste | Ananindeua | 74,00 |
| 90 | Fêmea | Leste | Ananindeua | 77,44 |
| 335 | Fêmea | Oeste | Rurópolis | 76,95 |
| 336 | Macho | Oeste | Rurópolis | 62,15 |
| 235 | Macho | Oeste | Novo Progresso | 78,83 |
| 237 | Fêmea | Oeste | Novo Progresso | 73,22 |
| 337 | Fêmea | Oeste | Rurópolis | 69,81 |
| 338 | Macho | Oeste | Rurópolis | 70,20 |
| 75 | Macho | Oeste | Trairão | 65,60 |
| 82 | Macho | Oeste | Aveiro | 78,28 |
| 83 | Fêmea | Oeste | Aveiro | 69,29 |
| 85 | Fêmea | Oeste | Aveiro | 68,87 |

APÊNDICE 2
PROTOCOLO DE PESQUISA CLÍNICA

1- IDENTIFICAÇÃO:

Nome vítima:.....

Idade:..... sexo:..... Município do acidente:.....

2- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS:

Trouxe o animal ?..... Nome popular do escorpião:.....

Data do acidente:...../...../..... Hora do acidente:.....

Tempo do acidente para o atendimento médico:.....

Parte do corpo acidentado:.....

3- SINTOMAS/SINAIS LOCAIS (ASSINALAR):

| | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Assintomático | <input type="checkbox"/> Parestesia em todo o membro Acidentado |
| <input type="checkbox"/> Dor local | <input type="checkbox"/> Ereção de pelos no local da picada |
| <input type="checkbox"/> Dor irradiada para a região axilar ou inguinal | <input type="checkbox"/> Edema local |
| <input type="checkbox"/> Parestesia local | <input type="checkbox"/> Eritema local |
| <input type="checkbox"/> Calor local | <input type="checkbox"/> Outros (anotar): |

5- SINTOMAS/SINAIS SISTÊMICOS (ASSINALAR):

| | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Assintomático | <input type="checkbox"/> Agitado |
| <input type="checkbox"/> Náuseas | <input type="checkbox"/> Calmo |
| <input type="checkbox"/> Vômitos ocasionais | <input type="checkbox"/> Sonolência |
| <input type="checkbox"/> Vômitos frequentes | <input type="checkbox"/> Prostração |
| <input type="checkbox"/> Sudorese discreta | <input type="checkbox"/> Confusão mental |
| <input type="checkbox"/> Sudorese profusa | <input type="checkbox"/> Tremores |
| <input type="checkbox"/> Sialorreia | <input type="checkbox"/> Convulsão |
| <input type="checkbox"/> Diarreia | <input type="checkbox"/> Priapismo |
| <input type="checkbox"/> Dor abdominal | <input type="checkbox"/> Visão escura |
| <input type="checkbox"/> Hipotermia | <input type="checkbox"/> Fotofobia |
| <input type="checkbox"/> Hipertermia | <input type="checkbox"/> Hiperemia conjuntival |
| <input type="checkbox"/> Midríase | <input type="checkbox"/> Taquipneia |
| <input type="checkbox"/> Miose | <input type="checkbox"/> Bradipneia |
| <input type="checkbox"/> Ptose palpebral | <input type="checkbox"/> Sensação parestésica por todo o Corpo |
| <input type="checkbox"/> Sensação de choque elétrico pelo corpo | <input type="checkbox"/> Disartria (fala como bêbado) |
| <input type="checkbox"/> Insuficiência cardíaca | <input type="checkbox"/> Edema agudo do pulmão |
| <input type="checkbox"/> Mioclonias (abalos musculares) | <input type="checkbox"/> Arritmia cardíaca |
| Pressão arterial: / | Frequência cardíaca: |

GRAVIDADE DO ACIDENTE: Leve Moderado Grave.Tratamento realizado: Sintomático Soroterápico Número de ampolas:....

Data da alta:/...../.....

Tipo de alta: Cura Óbito

Pesquisador

APÊNDICE 3

Abreviaturas e médias das mensurações das variáveis morfológicas dos espécimes de *T. obscurus*, das populações das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil.

| Variáveis Morfológicas | Fêmea/Leste n=12 | Fêmea/Oeste n=7 | Teste U | Macho/Leste n=6 | Macho/Oeste n=13 | Teste U |
|------------------------|---------------------|--------------------|---------|--------------------|---------------------|---------|
| Co_total | 72.540±4.230 | 70.553±4.553 | 0.3499 | 72.953±6.274 | 76.042±6.799 | 0.3598 |
| CA_LA | 5.273±0.352 | 5.354±0.926 | 0.3747 | 4.780±0.307 | 5.533±0.873 | 0.0141* |
| CA_LP | 8.161±0.508 | 8.625±0.447 | 0.0575 | 7.618±1.183 | 8.305±0.852 | 0.1144 |
| FEM_C | 7.795±0.504 | 8.697±0.533 | 0.0035* | 9.517±0.978 | 11.220±1.848 | 0.0537 |
| FEM_L | 2.185±0.097 | 2.402±0.140 | 0.0035* | 2.030±0.171 | 2.239±0.301 | 0.0655 |
| TIB_C | 8.380±0.408 | 9.208±0.453 | 0.0041* | 9.862±0.831 | 11.743±1.733 | 0.0179* |
| TIB_L | 2.989±0.124 | 3.554±0.882 | 0.0060* | 2.402±0.163 | 2.689±0.369 | 0.0956 |
| CHE_C | 5.119±0.413 | 5.620±0.393 | 0.0160* | 6.338±0.508 | 7.718±1.482 | 0.0537 |
| CHE_L | 2.522±0.134 | 2.762±0.314 | 0.0993 | 2.227±0.197 | 2.419±0.266 | 0.1144 |
| CHE_A | 2.567±0.191 | 2.595±0.189 | 0.7998 | 2.192±0.131 | 2.357±0.214 | 0.0794 |
| DM_C | 10.158±0.589 | 10.810±0.317 | 0.0112* | 10.950±0.751 | 11.750±1.085 | 0.0794 |
| MET1_C | 5.5008±0.5073 | 5.5557±0.801 | 1.0000 | 5.880±0.726 | 6.030±0.694 | 0.4560 |
| MET1_L | 3.764±0.124 | 4.110±0.158 | 0.0004* | 3.318±0.274 | 4.002±0.328 | 0.0038* |
| MET1_A | 3.507±0.158 | 3.794±0.176 | 0.0035* | 3.070±0.382 | 3.722±0.239 | 0.0016* |
| MET2_C | 6.772±0.473 | 6.803±0.616 | 0.9663 | 7.028±0.626 | 7.663±0.896 | 0.1605 |
| MET2_L | 3.634±0.132 | 3.999±0.181 | 0.0020* | 3.240±0.353 | 4.084±0.365 | 0.0021* |
| MET2_A | 3.479±0.113 | 3.804±0.123 | 0.0004* | 3.153±0.214 | 3.715±0.337 | 0.0044* |
| MET3_C | 7.231±0.454 | 7.413±0.665 | 0.4220 | 7.950±0.543 | 8.562±0.938 | 0.1144 |
| MET3_L | 3.709±0.141 | 4.126±0.114 | 0.0004* | 3.407±0.326 | 4.213±0.436 | 0.0038* |
| MET3_A | 3.644±0.129 | 3.996±0.121 | 0.0004* | 3.173±0.230 | 3.891±0.358 | 0.0033* |
| MET4_C | 7.783±0.561 | 8.024±0.893 | 0.7353 | 8.503±0.605 | 9.153±1.119 | 0.2195 |
| MET4_L | 3.850±0.148 | 4.307±0.170 | 0.0004* | 3.545±0.411 | 4.532±0.479 | 0.0029* |
| MET4_A | 3.677±0.124 | 4.040±0.153 | 0.0006* | 3.362±0.263 | 3.975±0.391 | 0.0050* |
| MET5_C | 8.587±0.492 | 9.011±0.555 | 0.1083 | 9.228±0.577 | 9.904±0.839 | 0.1360 |
| MET5_L | 3.790±0.173 | 4.160±0.138 | 0.0007* | 3.617±0.366 | 4.548±0.553 | 0.0050* |
| MET5_A | 3.700±0.130 | 3.990±0.124 | 0.0013* | 3.497±0.299 | 4.100±0.409 | 0.0110* |
| TEL_C | 7.786±0.659 | 7.710±0.869 | 0.8327 | 6.770±0.167 | 7.683±0.177 | 0.0029* |
| TEL_L | 2.818±0.171 | 2.980±0.112 | 0.0312 | 2.692±0.223 | 3.100±0.330 | 0.0159* |
| TEL_A | 2.884±0.141 | 2.954±0.153 | 0.4469 | 2.740±0.179 | 3.002±0.324 | 0.0485 |

* indicadas com asterisco as estatisticamente significantes e destacada em cinza os caracteres comuns nos dois gêneros.

Fonte: autor

APÊNDICE 4

“TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”

Eu,.....com.... anos de idade, autorizo a Universidade Federal do Pará, por intermédio do pesquisador:....., a desenvolver a pesquisa abaixo descrita.

Eu,....., de anos de idade, responsável pelo menor de anos de idade, autorizo a Universidade Federal do Pará, por intermédio do pesquisador:....., a desenvolver a pesquisa abaixo descrita.

Pesquisa: Estudo molecular do *Tityus paraensis* Kraepelin, 1896 e sua relação clínico-epidemiológica, em duas regiões do Estado do Pará-Brasil.

Objetivos: Estudar o lacrau (escorpião) e os sintomas das vítimas destes animais.

Descrição de Procedimentos:

1- Só fará parte do estudo paciente acidentado pelo lacrau preto (escorpião que tem o nome de *Tityus paraensis* Kraepelin, 1896) e que traga espontaneamente o animal quando do atendimento médico, que se disponha a doar o mesmo, assim como a responder o questionário.

2-A pesquisa será realizada através da aplicação de um questionário referente aos sintomas do voluntário e da doação do escorpião que ocasionou o envenenamento.

3- Será informado sobre os sintomas do acidente. Os sintomas do leve: dores e/ou parestesia e/ou edema local; sintomas do acidente moderado: são os mesmos apresentados no leve, acrescidos de sudorese, palidez, vômitos ocasionais e tonteiras; e os sintomas do grave são os mesmos do moderado acrescidos de vômitos intensos, hipo ou hipertensão arterial, hipo ou hipertemia, convulsões e edema agudo do pulmão. Nos pacientes do Oeste do Pará, os sintomas são acrescidos de mioclonias, disartrias, sensação de choque elétrico pelo corpo e dismetria.

Desconfortos e riscos esperados: a participação na pesquisa não trará nenhum risco ou danos ao voluntário, pois eles vão apenas responder a um questionário e fazer a doação do escorpião que ocasionou o acidente, quando do atendimento médico. A vítima receberá todos os cuidados médicos referentes ao seu agravo pela equipe médica do hospital.

Benefícios esperados: este estudo mostrará os sintomas produzidos por este tipo de escorpião e o grau de gravidade que ele poderá produzir nas vítimas, o que trará um melhor conhecimento sobre este agravo.

Confiabilidade: O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento da pesquisa a qualquer momento e deixar de participar da mesma, assim como as suas informações serão sigilosas e sua identidade preservada.

Os participantes receberão todas as informações e esclarecimentos de qualquer dúvida referente à pesquisa e sobre o pesquisador.

Aspecto legal: elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos e atende à Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde – Brasília – DF.

Atenção: A participação na pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará. Av. Generalíssimo Deodoro, 92. Umarizal. CEP: 66.055-240. Belém-Pará. Fone: (091) 3241.9864.

Assinatura do voluntário:.....

Assinatura do responsável (se for a vítima menor de idade):.....

Local:.....

Data:/...../.....

| | |
|-------|-------------------|
| | 360 |
| | |
| ToL1 | ACTAATGATTATGC |
| ToL2 | |
| ToL3 | |
| ToL4 | |
| ToL5 | |
| ToO6 | |
| ToO7 | |
| ToO8 | |
| ToO9 | |
| ToO10 | |

Fonte: autor

APÊNDICE 6

Espectro das massas moleculares em *Daltons* e seus tempos de retenção da peçonha do *T. obscurus* das regiões Leste e Oeste do Estado do Pará, Brasil.

| TR (min) | m/z (Leste) | TR (min) | m/z (Oeste) |
|----------|---|----------|--|
| 24.7 | 4143.9 8287.0 | 22.9 | 4223.3 |
| 25.2* | 4141.4 | 23.6 | 6116.6 |
| 25.4 | 4056.7 4028.9 5628.2 4119.9 4514.3 4140.8 | 24.5 | 5695.5 |
| 25.8 | 4053.2 | 25.2* | 4085.8 5253.4 4105.2 4042.7 4147.8 5106.0 8171.8 |
| 26.1 | 4507.6 4566.9 5247.4 7341.2 | 25.5 | 4929.3 4949.6 4886.2 4458.8 4984.9 4510.4 4579.0 |
| 26.9 | 7749.2 4294.8 4923.2 7884.7 | 26.3 | 5929.2 |
| 27.3 | 4295.0 7341.6 7750.1 | 26.6 | 4530.0 4484.1 4223.8 |
| 28.0* | 7343.7 7495.3 | 27.1 | 4296.5 7748.3 4223.8 |
| 28.7 | 7314.4 4882.7 | 27.5 | 5219.0 4510.4 7748.1 |
| 29.6 | 8046.7 16091.5 24140.3 | 28.0* | 9044.1 5928.5 4049.6 |
| 30.0 | 7780.0 | 28.5 | 5930.1 |
| 30.7* | 7759.0 7937.7 7262.3 | 28.7* | 4017.9 7485.2 6365.2 7739.1 |
| 31.0 | 14193.9 | 29.3* | 7727.1 |
| 32.0 | 7181.4 14121.0 14235.7 21280.3 | 29.7 | 7744.6 8048.6 15465.2 |
| 32.5* | 5334.6 7200.5 | 30.3 | 7346.9 7086.4 7145.4 |
| 33.3 | 7367.0 | 30.7* | 6922.2 6190.6 |
| 33.5 | 7144.1 7363.6 | 31.8 | 7066.2 |
| 34.1 | 7373.3 7057.2 10730.9 14714.7 | 32.5* | 7185.4 6955.0 |
| 34.5* | 7065.0 10725.1 | 32.7 | 7182.5 6937.0 14355.7 |
| 36.7* | 7240.7 10944.0 5469.6 | 33.6 | 7319.7 7345.8 7143.1 7205.5 7074.3 7220.6 6933.6 |
| 37.0 | 7240.5 14473.0 | 34.0 | 7209.3 7373.2 5167.0 |
| 37.6 | 10660.5 7296.6 5327.6 21290.2 | 34.5* | 7459.1 7057.7 7116.3 7160.6 7103.3 7089.1 7146.4 10745.3 |
| 39.5* | 6292.4 10833.4 10577.5 5412.7 | 36.0 | 7946.6 10488.9 10573.5 |
| 41.0 | 7629.1 15263.3 6594.6 7172.8 22899.8 30575.5 | 36.7* | 7258.1 |
| 41.9 | 11026.7 6926.7 7628.7 5175.5 | 37.1 | 7270.7 |
| 43.5 | 6930.9 7075.8 | 37.5 | 7324.8 |
| 43.8 | 13858.1 20773.6 27747.1 | 38.3 | 10775.3 4344.4 7402.3 10649.2 7323.8 5004.0 8838.0 4520.7 |
| 44.3 | 6935.1 | 39.5* | 5530.7 5330.3 4478.8 |
| 46.5 | 7622.4 12737.3 | 39.8 | 5340.6 5501.5 |
| - | - | 40.2 | 7032.7 6905.2 5330.5 |
| - | - | 40.4 | 7641.0 7024.3 5524.4 6893.0 |
| - | - | 41.1 | 15285.3 22941.5 30618.1 |
| - | - | 41.8 | 5172.4 8630.8 5844.1 |
| - | - | 42.1 | 6924.7 7643.9 7167.6 5845.3 5526.5 |
| - | - | 43.3 | 6928.7 11174.5 7090.1 |
| - | - | 43.9 | 6941.8 7083.5 20762.7 |
| - | - | 43.9 | 13867.0 |
| - | - | 46.1 | 5955.9 |

Legenda: Assinalados em cinza, os menores e maiores pesos de massas moleculares, sublinhadas as massas com pesos moleculares iguais e, em asterix, as frações com os mesmos tempos de retenção.

Fonte : autor