**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

**Atividade escorpionicida de metabólitos secundários de
Paecilomyces formosus em bioensaios *in vivo* com *Tityus*
serrulatus Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones: Buthidae)**

José Brites Neto

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2017**

José Brites Neto
Médico Veterinário

**Atividade escorpionicida de metabólitos secundários de *Paecilomyces formosus* em bioensaios *in vivo* com *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922
(Scorpiones: Buthidae)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Brites Neto, José

Atividade escorpionicida de metabólitos secundários de *Paecilomyces formosus* em bioensaios *in vivo* com *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones: Buthidae) / José Brites Neto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

132 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Escorpiões 2. Cromatografia 3. Espectrometria de massas 4. Controle químico I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais (*In memoriam*), José Brites Filho e Zeni da Silva Brites, dedico este trabalho com minha eterna gratidão, pois sem vocês nada disso seria possível.

À minha irmã Joszeni Brites (*In memoriam*), com minha saudade de sua presença e incontida admiração.

Ao grande e ilustre professor Vernon Everett Thatcher (*In memoriam*), por seus ensinamentos em meus primeiros passos na ciência e por acreditar que este dia chegaria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em espírito e verdade, declaro que nunca haverá qualquer concepção humana, seja litúrgica ou científica, que conseguirá abalar todos os créditos em Seu favor no sentido da criação e evolução desta alma planetária.

A Jesus Cristo, obrigado pelo seu sacrifício vicário e ao Espírito Santo, pela consolação diuturna que me faz seguir este caminho com honestidade, justiça e esperança.

À minha esposa, Francisca Adriana Moraes da Silva Brites, pelo seu amor, carinho, dedicação, sensibilidade, força, companheirismo e fé nesta jornada, pois são muitos os adjetivos que precisaria listar nesta página, mas não haverá suficiência.

À minha irmã, Zélia Cristina Brites Belletti, pelo seu carinho, atenção e incentivo neste caminhar que ficou mais triste com a perda que tivemos. Agora, ficamos por continuar em memória e honra de todos eles.

A todos os meus familiares e amigos, filhos, genro e netos, sobrinhos e cunhado, tios e primos, mas em especial a você, Maria Célia Alves Ferreira, querida amiga, admiradora e incentivadora, sempre presente em todas as conquistas.

À Medicina Veterinária e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela oportunidade oferecida de uma bela carreira em minha vida, com 31 anos dedicados na preservação da saúde dos animais (clínica médica e cirúrgica) e do homem (vigilância em saúde pública).

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), pela oportunidade oferecida em minha titulação e pelo investimento autorizado para este estudo.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela credibilidade no projeto, pela infraestrutura dispensada ao trabalho e pelo enriquecimento de conhecimentos e valores agregados neste nível de minha formação profissional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Simone Possedente de Lira, pela oportunidade de mais um aprendizado, pelas críticas sempre construtivas, pela confiança e credibilidade neste trabalho, pelas cobranças sempre corretas e proativas, pela dedicação profissional ao estudo, pelo esmero, atenção e carinho pessoal e pelos bons exemplos agregados na construção destes anos de convivência acadêmica.

À Secretaria de Saúde de Americana, pela autorização administrativa dos trabalhos realizados no município e aos agentes de controle de vetores do programa de vigilância e controle de escorpiões, Jardel Brasil, Jesus Tendor, Luiz Valentin Marchi, Fabrício Fabiano dos Santos e Amarildo Azarias, pelo auxílio técnico e logístico nas capturas noturnas de espécimes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através dos projetos BIOprospeTA FAPESP (Projeto temático - 2013/50228-8) e FAPESP (Projeto regular - 2014/15760-3).

Ao Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes, uma reflexão especial! O que dizer de seu entusiasmo, quando tudo parece incógnito, perdido e difícil de provar? Seu olhar se lança à frente! À frente de propósitos incongruentes, vaidades insubstanciais, enigmas reticentes e ceticismos destrutivos. Olha com a virtude de quem sabe andar na direção de um alvo sem reticências, na visão de um universo de possibilidades, que não são exatas e nem sobejam deidade, pois para nós humanos, tudo é finito! Então, antes que tudo acabe, você sabe tornar a essência mais tênue, mais simples, mais feliz e mais produtora. Esta é a lógica da sabedoria que aprendi em nossa convivência. Obrigado pela sua amizade, sempre com boas ideias e bons conselhos dados em todas as fases deste projeto desde sua origem. Sou muito grato.

Ao Prof. Dr. Wilson R. Lourenço, do Departamento de Sistemática e Evolução - Seção de Artrópodes, Museu Nacional de História Natural da França, pela prestimosa e honrosa atenção que me dispensou na revisão dos textos sobre escorpiões e escorpionismo.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni (Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária/UFRRJ), pela amizade e pelos trabalhos em colaboração de identificação morfológica dos isolados de fungos selecionados para o estudo.

À Profa. Dra. Keila Maria Roncato Duarte (Laboratório de Produção de Anticorpos e Imunoensaios, do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP), pela amizade e boas orientações em projetos de estudo e pela cessão de área em seu laboratório para o desenvolvimento de bioensaios com escorpiões.

À Profa. Dra. Sônia Maria De Stefano Piedade (Departamento de Ciências Exatas (LCE) - ESALQ/USP), pelos valiosos e indispensáveis conhecimentos agregados em estatística experimental e pelas fundamentais análises estatísticas que nortearam resultados significativos em todos os bioensaios realizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote (Laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP) e ao colega Msc. Pedro Avelino Maia de Andrade, pela identificação molecular dos isolados de fungos estudados no bioensaio.

Ao Prof. Dr. Roberto de Souza Gomes Berlinck (IQSC-USP São Carlos), pelo suporte nas análises deste estudo, através de uso do equipamento de UPLC-MS, com agradecimentos aos técnicos e alunos do laboratório.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, responsável pelo Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado à Química de Produtos Naturais (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP), pelas análises realizadas no espectrofotômetro de massas adquirido dentro da chamada de projetos multiusuários da FAPESP (processo nº09/54094-0). Agradeço também ao Dr. Eduardo J. Crevelin pela aquisição dos espectros.

Ao Msc. Felipe Gabriel Andrino, pelo auxílio em muitas análises no laboratório, pela torcida no êxito do trabalho, pela paciência e colaboração nestes dias de convivência. Muito obrigado!

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da ESALQ e da Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela excelente recepção e convivência.

Aos colegas Flávio Rocha, Luciana Mecatti Elias, Sergio Birello Sartori, Diana Fortkamp, Jeane Maria Cunha Machado, Marcos Canto Machado e Richtier Gonçalves da Cruz, com especial atenção à amiga Gislaine Vicente dos Reis, por toda e qualquer ajuda no meu doutorado, pelo sorriso diário, pela solidariedade, pela torcida e pela troca de experiências na vida acadêmica. Desejo muito sucesso a todos vocês, em suas jornadas e carreira.

Aos meus cães, Luna (*In memoriam*) e Fred, companheiros inseparáveis de madrugadas de estudo e de momentos atenuantes do estresse cotidiano, agradeço o conforto da presença companheira e do olhar afetuoso.

“A maneira mais simples e eficaz pela qual o governo pode fortalecer a pesquisa empresarial é apoiar a pesquisa básica e desenvolver talentos científicos”.

Vannevar Bush

“A pesquisa básica é como atirar uma flecha para o ar e, onde ela cair, pintar um alvo”.

Homer Adkins Burton

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	18
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	20
1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo principal	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Escorpiões	27
3.2 Espécie <i>Tityus serrulatus</i>	32
3.3 Escorpionismo	37
3.4 Controle químico de artrópodes peçonhentos	41
3.5 Controle biológico de artrópodes	45
3.6 Metabólitos secundários associados ao gênero <i>Paecilomyces</i>	51
3.7 Metabólitos secundários associados à espécie <i>Paecilomyces formosus</i>	60
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 Fluxograma da metodologia utilizada no estudo	63
4.2 Bioensaio experimental de avaliação de isolados de fungos filamentosos com repelência e mortalidade para <i>T. serrulatus</i> (1ª etapa)	64
4.2.1 Área de estudo - Aspectos físicos / territoriais / geográficos	64
4.2.2 Captura e seleção dos espécimes de escorpiões	65
4.2.3 Coleta e isolamento fúngicos	66
4.2.4 Manutenção e assepsia dos espécimes de escorpiões	66
4.2.5 Bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico	66
4.2.6 Bioensaio para avaliação de mortalidade aos isolados fúngicos	67
4.2.7 Análise estatística do bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico	68
4.2.8 Purificação, isolamento e identificação morfológica dos isolados de fungos filamentosos	68
4.3 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> da interação fungos-escorpiões (2ª etapa)	70

4.3.1 Preservação dos isolados de fungos filamentosos para o bioensaio	70
4.3.2 Modelagem do bioensaio <i>in vivo</i> (Protocolos A e B)	70
4.3.3 Análise estatística do bioensaio	72
4.4 Bioensaio <i>in vivo</i> para avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> expostos aos cinco isolados de fungos selecionados (3ª etapa)	73
4.5 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> de repelência e mortalidade de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp. (4ª etapa)	74
4.5.1 Obtenção de extrato bruto dos isolados de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	74
4.5.2 Partição líquido-líquido para obtenção de frações ativas de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	74
4.5.3 Modelagem do bioensaio para teste <i>in vivo</i> de repelência e mortalidade	75
4.5.4 Bioensaio <i>in vivo</i> para avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> expostos às frações aquosa e acetato de etila de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp. e ao solvente etanol	75
4.6 Bioensaio <i>in vivo</i> para avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> submetidos às frações ativas resultantes da fração acetato de etila de <i>Paecilomyces</i> sp. (5ª etapa)	76
4.6.1 Extração em Fase Sólida (SPE)	76
4.6.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	76
4.6.3 Teste de toxicidade para avaliação de solventes utilizados no bioensaio	77
4.6.4 Bioensaio <i>in vivo</i> com as frações ativas de <i>Paecilomyces</i> sp.	78
4.7 Caracterização molecular e identificação taxonômica do isolado de fungo selecionado	78
4.7.1 Extração de DNA do isolado de fungo selecionado	78
4.7.2 Amplificação (PCR) e Sequenciamento das Regiões ITS do rDNA	79
4.7.3 Classificação filogenética da espécie do isolado fúngico selecionado	80
4.8 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a EM de alta resolução	80
4.9 Pesquisa de metabólitos secundários em banco de dados	80
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 Bioensaio experimental de avaliação de isolados de fungos filamentosos com repelência e mortalidade para <i>T. serrulatus</i> (1ª etapa)	81
5.1.1 Bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico	81
5.1.2 Bioensaio para avaliação de mortalidade aos isolados fúngicos	81

5.1.3 Análise estatística do bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico	81
5.1.4 Seleção de isolados de fungos para 2ª etapa de bioensaios	83
5.2 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> da interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos (2ª etapa)	84
5.2.1 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> da interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos liofilizados (protocolo A - repelência)	84
5.2.2 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> da interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos liofilizados (protocolo A - mortalidade)	86
5.2.3 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> da interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (protocolo B - repelência)	88
5.2.4 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> da interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (protocolo B - mortalidade)	91
5.2.5 Seleção de isolados de fungos com maior atividade sobre <i>T. serrulatus</i> com base nos critérios de repelência e mortalidade	93
5.3 Bioensaio <i>in vivo</i> para avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> expostos aos cinco isolados de fungos selecionados (3ª etapa)	94
5.3.1 Isolamento de fungos filamentosos de <i>T. serrulatus</i> em câmara úmida	96
5.4 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> de repelência e mortalidade de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp. (4ª etapa)	98
5.4.1 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> de repelência de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	98
5.4.2 Bioensaio para teste <i>in vivo</i> de mortalidade de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	99
5.4.3 Bioensaio <i>in vivo</i> para avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> expostos às frações aquosa e acetato de etila de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp. e ao solvente etanol	100
5.5 Bioensaio <i>in vivo</i> para avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> submetidos às frações ativas resultantes da fração acetato de etila de <i>Paecilomyces</i> sp. (5ª etapa)	101
5.5.1 Extração em Fase Sólida (SPE)	101
5.5.2 Teste de toxicidade para avaliação de solventes utilizados no bioensaio	102
5.5.3 Bioensaio <i>in vivo</i> com as frações ativas de <i>Paecilomyces</i> sp.	103

5.6 Análise dos registros de temperatura e umidade nos bioensaios	104
5.7 Caracterização molecular e identificação taxonômica do isolado de fungo selecionado	106
5.7.1 Identificação molecular da espécie do isolado de fungo selecionado	106
5.7.2 Classificação taxonômica da espécie do isolado fúngico selecionado	107
5.8 Caracterização química das frações com maior efeito escorpionicida (C e D)	110
5.9 Pesquisa de compostos associados em banco de dados	113
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
REFERÊNCIAS	117
ANEXOS	131

RESUMO

Atividade escorpionicida de metabólitos secundários de *Paecilomyces formosus* em bioensaios *in vivo* com *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones: Buthidae)

As pragas urbanas constituem enormes riscos para a saúde de nossas comunidades, em uma relação sinantrópica em que os artrópodes peçonhentos assumem um papel primordial. Iniciativas de controle são efetivadas em regiões de elevada incidência, como no caso do município de Americana, estado de São Paulo, através de captura mecânica de escorpiões em cemitérios municipais, desde 2006. Durante essas atividades, verificou-se que os escorpiões evitavam ambiências com a presença de fungos filamentosos, levantando a hipótese de que existiria uma possível barreira biológica nociva aos mesmos. Nesse contexto, esse trabalho objetivou o estudo de interações entre isolados de fungos filamentosos e escorpiões coletados de um mesmo ambiente, através de cinco etapas de bioensaios. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, considerando-se um delineamento experimental casualizado em blocos. Foi realizado o teste F da análise da variância ao nível de 5% de significância. As médias de cada ambiência testada de cada bioensaio foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os resultados indicaram dois isolados de fungos (*Mucor* sp. e *Phialophora* sp.) com maior potencial de repelência e três isolados (*Paecilomyces* sp. - isolado 1, *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp. - isolado 4), com maior mortalidade para *T. serrulatus*. Em sequência, foram selecionados os isolados de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. com indicação de maior mortalidade. Os extratos brutos desses isolados foram submetidos a partições líquido-líquido com acetato de etila e água para obtenção de frações ativas, com avaliação de maior efeito escorpionicida para a fração acetato de *Paecilomyces* sp. A fração acetato de *Paecilomyces* sp. foi submetida a uma extração em fase sólida com 19 frações resultantes que foram submetidas a cromatografia em camada delgada, com a seleção de seis frações por similaridade. Duas frações ativas C e D apresentaram maior efeito escorpionicida em bioensaio e foram analisadas em cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, resultando em um composto ativo de massa molar de 375 Da. No banco de dados Dictionary of Natural Products (CHEMnetBASE) foram encontrados 137 metabólitos secundários compatíveis com esse composto, mas sem referência de atividade inseticida que estivesse associada ao efeito escorpionicida demonstrado nos bioensaios. A identificação molecular do isolado de *Paecilomyces* sp. indicou uma sequência de 569 pb para a espécie *Paecilomyces formosus*.

Palavras-chave: Escorpionismo; Controle químico; Controle biológico; Espectrometria de massas; Efeito escorpionicida

ABSTRACT

Scorpionicidal activity of secondary metabolites from *Paecilomyces formosus* in vivo bioassays with *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones: Buthidae)

Urban pests pose enormous risks to the health of our communities, in a synanthropic relationship in which venomous arthropods play a primordial role. Control initiatives are carried out in regions of high incidence, such as in the municipality of Americana, São Paulo State, through mechanical capture of scorpions in cemeteries since 2006. During these activities, it was verified that the scorpions avoided environments with the presence of filamentous fungi, raising the hypothesis that there would be a possible biological barrier harmful to them. In this context, this work aimed to study the interactions between isolates of filamentous fungi and scorpions harvested from the same environment through five stages of bioassays. The data obtained were statistically analyzed, considering a randomized block design. The F test of the analysis of variance was performed at the 5% level of significance. The means of each environment tested from each bioassay were compared by the Tukey test ($\alpha = 0.05$). The results indicated two isolates of fungi (*Mucor* sp. and *Phialophora* sp.) with higher potential for repellency and three isolates (*Paecilomyces* sp., *Rhizopus* sp. and *Fusarium* sp.) with a higher mortality to *T. serrulatus*. In sequence, the isolates of *Paecilomyces* sp. and *Rhizopus* sp. were selected with indication of higher mortality. The crude extracts of those isolates were submitted to liquid-liquid partitions with ethyl acetate and water to obtain active fractions, with evaluation of a higher scorpionicidal effect for the acetate fraction of *Paecilomyces* sp. The acetate fraction of *Paecilomyces* sp. was subjected to a solid phase extraction with 19 resulting fractions, again submitted to thin layer chromatography, with the selection of six fractions by similarity. Two active fractions (C and D) presented a higher scorpionicidal effect and were analyzed by ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, resulting in an active compound of 375 Da molar mass. In the Dictionary of Natural Products (CHEMnetBASE) database were found 137 secondary metabolites compatible with this compound but without reference to insecticidal activity that was associated with the scorpionicidal effect demonstrated in the bioassays. The molecular identification of *Paecilomyces* sp. indicated a 569 bp sequence for the species *Paecilomyces formosus*.

Keywords: Scorpionism; Chemical control; Biological control; Mass spectrometry; Scorpionicidal effect

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relógio geológico e configuração de Pangeia, com indicação de caminhos hipotéticos de colonização costeira por escorpiões de origem marinha	28
Figura 2 - Diagrama dos principais órgãos sensoriais dos escorpiões	30
Figura 3 - <i>Tityus serrulatus</i> apresentando fluorescência sob luz ultravioleta	32
Figura 4 - Morfologia externa de um escorpião	33
Figura 5 - Mapas de distribuição geográfica e modelagem espacial da ocorrência de espécies de importância médica no estado de São Paulo	34
Figura 6 - Efeitos fisiopatológicos e clínicos do envenenamento sistêmico causado por escorpiões	35
Figura 7 - Situação epidemiológica do escorpionismo no mundo	38
Figura 8 - Gráfico comparativo entre acidentes escorpiônicos e ofídicos no Brasil	39
Figura 9 - Incidência e letalidade de acidentes por escorpiões em São Paulo	40
Figura 10 - Microcápsulas de inseticida em exoesqueleto de artrópode	42
Figura 11 - Modo de ação dos inseticidas	42
Figura 12 - Crescimento em placa e micrografia de <i>Metarhizium anisopliae</i> e <i>Beauveria bassiana</i>	46
Figura 13 - Micotoxinas de peptídeo-sintetases de origem não ribossômica (NRP)	52
Figura 14 - Micotoxinas de policetídeo-sintetases (PK)	53
Figura 15 - Compostos com atividades inseticidas (beauvericins e beauveriolides) isolados de espécies de <i>Paecilomyces</i>	54
Figura 16 - Principais metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Paecilomyces</i> (1)	55
Figura 17 - Principais metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Paecilomyces</i> (2)	58
Figura 18 - Principais metabólitos secundários isolados de <i>Paecilomyces formosus</i>	61
Figura 19 - Vista aérea do cemitério municipal da Saudade em Americana/SP, com demonstração dos pontos de captura de escorpiões	64
Figura 20 - Método de captura mecânica de escorpiões em cemitérios municipais de Americana/SP	65

Figura 21 - Módulo experimental para bioensaio de teste de interação entre fungos e escorpiões	67
Figura 22 - Módulo experimental para bioensaio de avaliação de patogenicidade entre fungos e escorpiões	68
Figura 23 - Modelo esquemático de bioensaio com <i>T. serrulatus</i> em exposição aos isolados de fungos	70
Figura 24 - Detalhe do modelo experimental de bioensaio com <i>T. serrulatus</i>	71
Figura 25 - Modelo esquemático de bioensaio para avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i>	73
Figura 26 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos liofilizados (Protocolo A/ Repelência/ Série 1)	85
Figura 27 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos liofilizados (Protocolo A/ Repelência/ Série 2)	85
Figura 28 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B/ Repelência/ Série 1)	89
Figura 29 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B/ Repelência/ Série 2)	89
Figura 30 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B/ Repelência/ Série 3)	90
Figura 31 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B/ Mortalidade/ Série 1)	92
Figura 32 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B/ Mortalidade/ Série 2)	92
Figura 33 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B/ Mortalidade/ Série 3)	93
Figura 34 - Gráfico do bioensaio <i>in vivo</i> para avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> expostos aos cinco isolados de fungos	95
Figura 35 - Espécimes mortos de <i>T. serrulatus</i> apresentando crescimento de fungos filamentosos em câmara úmida	96
Figura 36 - Gráfico do bioensaio de repelência de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	99
Figura 37 - Gráfico do bioensaio de mortalidade de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp. e ao solvente etanol	101

Figura 38 - CCD revelada pelos reagentes de solução de ácido fosfomolíbdico (PMA), Dragendorff e ninidrina, respectivamente	102
Figura 39 - Gráfico do bioensaio de mortalidade de <i>T. serrulatus</i> às frações ativas resultantes da fração acetato de etila de <i>Paecilomyces</i> sp.	104
Figura 40 - Morfologia de <i>Paecilomyces formosus</i>	108
Figura 41 - Placas de cultivo em BDA e micrografia do fungo <i>Paecilomyces formosus</i>	108
Figura 42 - Árvores filogenéticas das sequências de loci analisadas ITS e beta-tubulina	109
Figura 43 - Cromatograma em modo positivo da fração C	110
Figura 44 - Cromatograma em modo negativo da fração C	111
Figura 45 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração C, no tempo de retenção 5,568	111
Figura 46 - Espectro de massas de alta resolução em modo negativo da fração C, no tempo de retenção 5,568	112
Figura 47 - Cromatograma em modo positivo da fração D	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Situação epidemiológica do escorpionismo nos estados brasileiros	39
Tabela 2. Inseticidas com indicação para controle químico de escorpiões (carbamatos e benzoiluréias)	43
Tabela 3. Inseticidas com indicação para controle químico de escorpiões (piretróides)	44
Tabela 4 - Principais metabólitos secundários produzidos pelo gênero <i>Paecilomyces</i> (fonte biológica, fórmula e peso molecular)	56
Tabela 5. Esquema da análise de variância (ANOVA) para o delineamento experimental casualizado em blocos (DBC) proposto para o bioensaio	72
Tabela 6. Valores médios das contagens de fêmeas adultas de <i>Tityus serrulatus</i> por tratamento e turno de observação	82
Tabela 7. Valores médios das contagens de fêmeas adultas com filhotes de <i>Tityus serrulatus</i> por tratamento e turno de observação	82
Tabela 8. Apresentação dos isolados de fungos filamentosos purificados e identificados morfolologicamente para o bioensaio com <i>T. serrulatus</i>	83
Tabela 9. Interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos liofilizados (protocolo A - repelência)	84
Tabela 10. Interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos liofilizados (protocolo A - mortalidade)	87
Tabela 11. Interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (protocolo B - repelência)	88
Tabela 12. Interação da espécie <i>T. serrulatus</i> com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (protocolo B - mortalidade)	91
Tabela 13. Índice de mortalidade da espécie <i>T. serrulatus</i> em biotério testemunha, durante bioensaio <i>in vivo</i>	94
Tabela 14. Avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> aos isolados de fungos	94
Tabela 15. Identificação morfológica de fungos isolados de <i>T. serrulatus</i> mortos em bioensaio	97
Tabela 16. Avaliação de repelência de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	98

Tabela 17. Avaliação de mortalidade de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp.	99
Tabela 18. Avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> às frações aquosa e acetato de etila de <i>Paecilomyces</i> sp. e <i>Rhizopus</i> sp. e ao solvente etanol	100
Tabela 19. Avaliação da mortalidade de <i>T. serrulatus</i> às frações ativas resultantes da fração acetato de etila de <i>Paecilomyces</i> sp.	103
Tabela 20 - Quadro comparativo dos registros de temperatura e umidade nos bioensaios	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
BD	Batata-dextrose
BDA	Batata-dextrose-ágar
C ₁₈	Sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano
CCD	Cromatografia em camada delgada
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	espectrometria de massa
K ⁺	íon potássio
kDa	kilodalton
LC/ES MS	Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray
MALDI-TOF MS	Espectrometria de Massas por Tempo de Voo com Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
Máx.	Máxima
MEA	Meio de extrato de malte
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min.	Minutos
Mín.	Mínima
m/z	Relação massa carga
Na ⁺	íon sódio
nm	nanômetro
pb	pares de bases nitrogenadas

RMN	Ressonância magnética nuclear
UPLC-HRMS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a EM de alta resolução
UV	Ultravioleta
μ	Micro

1 INTRODUÇÃO

As pragas urbanas assumiram uma progressão geométrica em escala de proliferação em muitas regiões do planeta. Apresentam enormes riscos para a saúde e bem-estar de nossas populações, através de interações antagônicas estabelecidas entre várias espécies de artrópodes e o homem, sendo causadoras de agravos e doenças com potencial risco de morte.

Dentro desta relação de um antagonismo sinantrópico, os artrópodes peçonhentos assumem um papel primordial, com as espécies de escorpiões causando acidentes de importância médica e repercussão epidemiológica crescente. As responsabilidades públicas em seu controle são tratadas de forma negligenciada por muitos governos, assim como no Brasil (SOUZA, 2010). Poucos recursos são aplicados na pesquisa de novos tratamentos, medicamentos e metodologias de controle (SOUZA, 2014).

O grave problema do escorpionismo ocasiona nas regiões tropicais e subtropicais milhões de acidentes e milhares de mortes, principalmente de crianças. O Brasil apresenta uma taxa anual média de 32 casos por 100.000 habitantes e uma mortalidade de 0,14% (BUCARETCHI et al., 2014).

Houve um aumento de quase 600% no número de acidentes e mortes causados por escorpiões nos últimos 15 anos, como resultado da expansão urbana sobre áreas antes ocupadas por matas, e do acúmulo de lixo e entulho nas cidades (BRASIL, 2017a, 2017b). Desde 2011, ocorreram mais de 60.000 casos por ano de acidentes por escorpiões no Brasil, causados por espécies de importância médica, principalmente *Tityus serrulatus* (BRASIL, 2017a).

Algumas iniciativas para o controle desta praga urbana foram efetivadas em determinadas regiões, como no caso do município de Americana, no estado de São Paulo, através da utilização pela Secretaria de Saúde, desde 2006, de um método de captura mecânica de escorpiões em focos de infestação nos cemitérios municipais (BRITES-NETO; BRASIL, 2012).

Durante o procedimento de abertura de sepulturas para captura desses animais foi observado que os espécimes não se abrigavam em sepulturas com evidência de contaminação compatível com fungos filamentosos.

Com base nessas observações de campo, foi levantada a hipótese de que poderia existir alguma interação biológica nociva aos escorpiões causada pelos fungos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar as interações antagonistas entre fungos e escorpiões da espécie *Tityus serrulatus* em ensaios *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar e isolar fungos filamentosos em sepulturas de cemitério urbano com infestação por escorpiões.
- Realizar ensaios *in vivo* entre escorpiões e isolados de fungos filamentosos provenientes do mesmo habitat.
- Selecionar isolados de fungos filamentosos mais promissores quanto ao potencial escorpionicida.
- Obter os extratos brutos dos fungos selecionados e avaliar quanto ao potencial escorpionicida.
- Avaliar o perfil químico de extratos dos isolados de fungos selecionados.
- Obter frações semipuras ativas e caracterizá-las quimicamente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Escorpiões

O Filo Arthropoda von Siebold, 1848 corresponde a mais de 80% das espécies animais existentes, incluindo os aracnídeos (Subfilo Chelicerata Heymons, 1901; Classe Arachnida Lamarck, 1801), dos quais fazem parte os escorpiões, classificados como alguns dos artrópodes mais ancestrais, tanto na origem como na morfologia do corpo, na Ordem Scorpiones C. L. Koch, 1850; Subordem Neoscorpionina Thorell & Lindström, 1885; Infraordem Orthosternina Pocock, 1911 (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; LOURENÇO, 2015a).

Na história natural dos escorpiões, estudos paleontológicos registraram seu surgimento há 450 milhões de anos (Período Siluriano do Paleozóico) no ambiente marinho, sendo quase todos aquáticos ou anfíbios (JERAM, 2001). Através da descoberta de espécies fósseis pertencentes a uma das subordens mais antigas da classe dos aracnídeos (SISSOM, 1990), foi classificada a Subordem Branchioscorpionina Kjellesvig-Waering, 1986, incluindo 18 a 21 superfamílias com 41 a 47 famílias extintas de escorpiões, segundo diferentes autores (LOURENÇO, 2015a). Uma espécie fóssil em particular despertou grande atenção, *Praearcturus gigas* Woodward, 1871 (antigamente considerado um isópode gigante), com origem biogeográfica no Período Devoniano do Paleozóico (419 - 410 milhões de ano) do Reino Unido. Com características de um notório predador, apresentando proporções de um metro de comprimento, teria sobrevivido a todos os grandes cataclismos, como um ancestral dos escorpiões sobreviventes e observadores privilegiados tanto do fim dos dinossauros (230 - 65 milhões de anos) como do surgimento do homem na face da Terra (2 milhões de anos).

Desde o Período Siluriano, muitos estuários pouco profundos e grandes massas terrestres deslocadas dos oceanos, começaram a formar habitats ideais para a colonização dos escorpiões. Este processo continuou durante toda a formação subsequente da massa continental de Pangeia (Figura 1), no Período Triássico do Mesozóico (há 250 milhões de anos). A isto, seguiu-se um processo mais passivo e associado com a dispersão de espécies, em resposta à fragmentação progressiva de Pangeia (LOURENÇO, 2015a), originando a atual configuração dos continentes e a diversidade de padrões biogeográficos observados

entre grupos modernos de escorpiões (famílias e gêneros), desde o Mesozóico até os dias atuais (LOURENÇO, 2015a).

Figura 1 - Relógio geológico e configuração de Pangeia, há cerca de 300-200 milhões de anos, com indicação de caminhos hipotéticos de colonização costeira por escorpiões de origem marinha (setas).

Os escorpiões modernos se adaptaram aos mais variados tipos de hábitat em todos os continentes, ocupando quase todos os ecossistemas terrestres (savanas, desertos, cerrados, florestas temperadas e tropicais), onde seu sucesso adaptativo ocorreu em razão de sua plasticidade fisiológica, bioquímica, ecológica e comportamental (OUTEDA-JORGE, 2010).

Existem cerca de 2.200 espécies desse artrópode quelicerado, distribuídas em 22 famílias descritas em todo o mundo (Akrauidae Levy, 2007; Bothriuridae Simon, 1880; Buthidae C. L. Koch, 1837; Chactidae Pocock, 1893; Chaerilidae Pocock, 1893; Diplocentridae Karsch, 1880; Euscorpiidae Laurie, 1896; Hadogenidae Lourenço, 1999; Hemiscorpiidae Pocock, 1893; Heteroscorpionidae Kraepelin, 1905; Hormuridae Laurie, 1896; Iuridae Thorell, 1876; Lisposomidae Lawrence, 1928; Microcharmidae Lourenço, 1996; Pseudochactidae Gromov, 1998; Scorpionidae Latreille, 1802; Scorpipidae Kraepelin, 1905; Superstitioniidae Stahnke, 1940; Troglotayosicidae Lourenço, 1998; Typhlochactidae Mitchell, 1971; Urodacidae Pocock, 1893; Vaejovidae Thorell, 1876) exceto na Antártida (PRENDINI; WHEELER, 2005; LOURENÇO, 2015a, 2016).

No Brasil são relatadas cinco famílias (Buthidae, Chactidae, Bothriuridae, Euscorpiidae e Hormuridae) com seus 23 gêneros e cerca de 160 espécies, correspondendo a 8% da diversidade de espécies do mundo (BRASIL, 2009; PORTO; BRAZIL; SOUZA, 2010; LOURENÇO, 2015a). A família Buthidae é representada por 82 espécies, distribuídas em oito gêneros: *Ananteris* Thorell, 1891; *Isometrus* Ehrenberg, 1828; *Microtityus* Kjellesvig-Waering, 1966; *Physoctonus* Mello-Leitão, 1934; *Rhopalurus* Thorell, 1876; *Troglorhopalurus* Lourenço, Baptista & Giupponi, 2004; *Zabius* Thorell, 1893; e *Tityus* C. L. Koch, 1836 (PORTO; BRAZIL; SOUZA, 2010).

Tityus é o gênero neotropical que apresenta a maior diversidade de escorpiões, com cinco subgêneros (*Tityus* C. L. Koch, 1836; *Atreus* Gervais, 1843; *Caribetityus* Lourenço, 1999; *Archaeotityus* Lourenço, 2006; *Brazilotityus* Lourenço, 2006) (LOURENÇO, 2006) e mais de 220 espécies descritas na América do Sul, América Central e Caribe, sendo 54 destas espécies no Brasil (PORTO; BRAZIL; SOUZA, 2010; LOURENÇO, 2016). A distribuição associada com os seres humanos e a toxicidade de seu veneno contribuem para que os casos mais graves e letais de escorpionismo sejam determinados pelas espécies deste gênero (BORGES et al., 2010).

A abundância de espécies de escorpiões depende de fatores climáticos que podem ter um efeito significativo sobre a sua distribuição. A densidade de populações de escorpiões é altamente variável e dependente de fatores ambientais abióticos (temperatura, precipitação e umidade) e bióticos (disponibilidade de presas) (STOCKMANN, 2015). As duas principais espécies de importância médica neste gênero, *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 e *Tityus bahiensis* (Perty, 1833), apresentam maior dinâmica populacional no período mais quente e úmido (PORTO; BRAZIL, 2010).

Os escorpiões são possuidores de uma das taxas metabólicas mais baixas do reino animal, podendo permanecer longos períodos sem alimentação, em razão de sua capacidade fisiológica de reserva energética no hepatopâncreas e a alta capacidade de minimizar a perda de água na respiração (HJELLE, 1990).

Experimentalmente, os escorpiões sobreviveram por até 12 meses, sem água ou alimento, e por 3 anos com água, mas sem alimentação. Em condições naturais, escorpiões podem passar muitos dias em seus abrigos sem alimentação, na ausência de presas (STOCKMANN, 2015).

A presença de receptores sensitivos (pectíneas e tricobótrias), utilizados na percepção de vibrações no substrato e na detecção de alterações químicas no ambiente (HJELLE, 1990; BROWNELL, 2001), permite adotarem estratégias de sobrevivência frente às adversidades ambientais, tornando estas espécies de artrópodes muito resistentes. Os escorpiões dependem essencialmente de órgãos mecano-sensoriais, sensilas tarsais nas pernas e tricobótrias (pelos sensoriais) nos pedipalpos, e órgãos quimio-sensoriais, sensilas nas pectíneas, para guiarem seu comportamento de orientação no ambiente (JIAO; ZHU, 2010) (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama dos principais órgãos sensoriais dos escorpiões.

Os escorpiões em geral são aracnídeos de hábitos fototáticos negativos (GAFFIN et al., 2012). Em razão de seu ritmo circadiano, possuem diferentes padrões de atividade durante o dia, sendo a maioria noturna ou mais ativa ao entardecer. Durante o dia, adotam hábitos criptozoicos, descansando em suas tocas ou abrigos, rachaduras em pedras ou cascas de árvores (JERAM, 2001; STOCKMANN, 2015).

Os escorpiões são animais vivíparos, apresentando gestação de três a cinco meses para o gênero *Tityus* e um período entre o nascimento e a dispersão dos filhotes de aproximadamente 14 dias para as espécies *T. bahiensis* e *T. serrulatus* (BRASIL, 2009).

Lourenço et al. (1996) compararam taxas teóricas de reprodução em análise de dinâmica populacional entre duas espécies de escorpiões, *Tityus fasciolatus* Pessôa, 1935 (reprodução sexuada) e *T. serrulatus* (reprodução partenogenética),

concluindo que após a 5ª geração haveria em torno de dois milhões de novos indivíduos para a espécie sexuada e trinta e três milhões para a espécie partenogenética. Em razão de sua elevada prolificidade, em associação com a toxicidade de seu veneno, e aliada a uma capacidade invasiva em habitações humanas, a espécie *T. serrulatus* representa um enorme problema para a Saúde Pública (LOURENÇO; CUELLAR, 1995).

Os escorpiões apresentam mecanismos fisiológicos de proteção contra intoxicações exógenas, através da capacidade voluntária de fechamento dos espiráculos por longos períodos de tempo (HADLEY, 1990), diminuindo assim a perda de água respiratória e levando ao catabolismo anaeróbico (STOCKMANN, 2015). A presença de quimiorreceptores em suas tricobótrias (cerdas especializadas na superfície do exoesqueleto), permitem a detecção de alterações químicas presentes em aerossóis e superfícies de contato (ROOT, 1990; GAFFIN; BROWNELL, 2001), dificultando assim as estratégias de controle químico nos ambientes de infestação.

Os escorpiões são bastante resistentes a muitas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, devido aos processos imunológicos, fagocitários e humorais, pela ação de peptídeos antimicrobianos ricos em cisteína (defensinas, androctoninas e butininas) na formação de poros em membranas, aumentando a permeabilidade celular microbiana (EHRET-SABATIER et al., 1996; GOYFFON; TOURNIER, 2014).

Além dos peptídeos com atividade antimicrobiana, existem outros de nova estrutura, como moléculas órfãs cujas funções biológicas ainda não estão devidamente esclarecidas, mas que podem ter um importante papel na história de vida dos escorpiões (PIMENTA et al., 2001).

3.2 Espécie *Tityus serrulatus*

Figura 3 - Espécime adulto de *T. serrulatus* (A) apresentando fluorescência sob luz ultravioleta (B).
Fotos: José Brites Neto, 2014.

Espécimes adultos de *T. serrulatus* (Figura 3) apresentam de 55-70 mm de comprimento total e possuem coloração variável entre o amarelo claro e amarelo escuro com uma mancha triangular marrom escuro, orientada para trás, na sua extremidade dorsal anterior (SOUZA et al., 2009).

O corpo é dividido em cefalotórax (prossoma) e abdomen (opistossoma), que se subdivide em pré-abdomen (mesossoma) e pós-abdomen (metassoma ou cauda) (Figura 4). No prossoma, mesossoma e metassoma observam-se manchas marrons, em contraste com a cor predominante amarela. Apresentam na região posterior, ao longo da face dorsal do terceiro e quarto segmentos metassomais, a presença de grânulos modificados como espinhos serrilhados. O prossoma tem um par de pedipalpos com pinças, um par de quelíceras, e quatro pares de pernas amarelas. Na região ventral, possuem uma estrutura denominada pectínea, em formato de pentes (com 21 a 25 dentes por pente). O mesossoma consiste de sete segmentos, enquanto o metassoma compreende cinco segmentos e o telson, uma vesícula elíptica com dente subaculear espinóide bem proeminente, o ferrão. No telson encontramos um par de glândulas produtoras de veneno (COLOGNA et al., 2009; ALMEIDA, 2010).

Figura 4 - Morfologia externa de um escorpião (vista dorsal e ventral).

T. serrulatus está entre as 11 espécies partenogenéticas existentes e descritas por Lourenço (2008). Através de uma partenogênese telítica e apomítica (toda a descendência, composta por fêmeas idênticas à mãe, gerada a partir de óvulos não fertilizados sob divisão celular por mitose), cada fêmea adulta apresenta dois partos anuais (20 filhotes por parto), atingindo em média 160 filhotes durante sua vida (LOURENÇO, 2008; BRASIL, 2009; SCHOLTE et al., 2009).

A espécie *T. serrulatus*, considerada nativa do estado brasileiro de Minas Gerais, adaptou-se à vida sinantrópica de forma oportunista, durante várias décadas desde a sua descrição, gerando novas populações em ambientes antrópicos das regiões Sudeste, Sul e Central do Brasil, expandindo-se rapidamente nas áreas urbanas dos estados da Bahia, São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Distrito Federal (PUCCA et al., 2015a; LOURENÇO, 2015b). Alguns surtos de infestação registrados principalmente nas regiões Sudeste e Nordeste causaram graves problemas para a Saúde Pública no país, com crescente número de acidentes em humanos e óbitos em crianças (LOURENÇO; EICKSTEDT, 2009; LUCAS et al., 2010).

Mediante estratégias reprodutivas de colonização e proliferação em áreas urbanas, esta espécie (juntamente com *T. bahiensis*) foi determinante na evolução

do escorpionismo no Brasil, com elevada importância médica e grave repercussão epidemiológica no estado de São Paulo, determinando áreas (Figura 5) de alto risco para acidentes na Grande São Paulo, no Vale do Rio Paraíba e na região nordeste do estado (EICKSTEDT et al., 1996; BRITES-NETO; DUARTE, 2015).

Figura 5 - Mapas de distribuição geográfica e modelagem espacial da ocorrência de espécies de importância médica no estado de São Paulo.

A picada de *T. serrulatus* (conhecido vulgarmente como escorpião amarelo) provoca intensa dor local e sinais clínicos relacionados aos efeitos de interação das proteínas neurotóxicas (α -neurotoxinas e β -neurotoxinas), principalmente com os canais de sódio voltagem-dependente (grupo de toxinas: Ts1, Ts2, Ts3, Ts4, Ts5, Ts17 e Ts18) e potássio voltagem-dependente (grupo de toxinas: Ts6, Ts7, Ts8, Ts9, Ts15, Ts16 e Ts19), resultando na liberação de grande quantidade de mediadores químicos neurotransmissores (acetilcolina, adrenalina e noradrenalina) nas membranas celulares excitáveis (COLOGNA et al., 2009; PUCCA et al., 2015b).

Devido aos neurotransmissores liberados, os sintomas no paciente acidentado ocorrem com intensidade variável (Figura 6), com as catecolaminas causando midríase, hiperglicemia, taquicardia, hipertensão arterial, graves efeitos cardiomiopáticos, edema agudo pulmonar e choque cardiogênico, enquanto que a acetilcolina pode induzir vômitos, salivação, sudorese, miose, tremores e espasmos musculares, bradicardia, arritmias cardíacas e hipotensão arterial (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2009; ISBISTER; BAWASKAR, 2014; CUPO, 2015).

Figura 6 - Efeitos fisiopatológicos e clínicos do envenenamento sistêmico causado por escorpiões.

O veneno de *T. serrulatus* é composto por neurotoxinas moduladoras dos canais iônicos seletivos de sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{++}) e cloro (Cl^-), aminas bioativas, hipotensinas, enzimas (hialuronidase, metaloproteinase, serinoprotease), peptídeos potencializadores de bradicinina, inibidores de calicreína plasmática e proteínas alergênicas (PUCCA et al., 2015b; BORDON; COLOGNA; ARANTES, 2015).

Pimenta et al. (2001) utilizando dois diferentes métodos de análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS ou LC/ES MS) encontraram 380 massas moleculares constituintes de frações tóxicas do veneno de *T. serrulatus*, a maioria das quais proteínas de baixo peso molecular (<10 kDa).

Os sinais clínicos de envenenamentos graves observados em crianças envolvem sintomas de algias e parestesias, náuseas, salivação excessiva, sudorese profusa, vômitos incontrolláveis, desidratação, tremores, alternância entre inquietude e prostração, manifestações neurológicas, convulsões, taquicardia sinusal, hipertensão, insuficiência cardiocirculatória, perfusão capilar diminuída, bradicardia, hipotensão, arritmias cardíacas graves, alterações cardiorrespiratórias, taquipnéia,

dispnéia, edema pulmonar, choque cardiogênico, coma e morte (BUCARETCHI et al., 2014).

Pode também ocorrer uma glicogenólise hepática, leucocitose e hipopotassemia, além do aumento nos níveis de enzimas aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, creatina quinase e várias citocinas (CUPO et al., 2009; CUPO, 2015). Em casos graves, a hipertensão é frequentemente seguida de hipotensão e a taquicardia por bradicardia, dependendo da predominância de efeitos adrenérgicos ou colinérgicos, respectivamente (CUPO et al., 2009).

Uma característica bastante peculiar da maioria das espécies de escorpiões (com exceção de espécies da família Chaerilidae) é sua fluorescência ciano-esverdeada em exposição à luz ultravioleta na gama de 320-400 nm (LOURENÇO, 2012). Todas as espécies da família Buthidae, incluindo *T. serrulatus*, apresentam compostos fluorescentes reticulados com proteínas epicuticulares.

Esse material fluorescente é provavelmente parte da mistura complexa de mucopolissacarídeos e lipídios, produzidos por glândulas dérmicas e epidérmicas, que são trazidos para a epicutícula através de poros e canais de cera para proporcionar a qualidade impermeável do tegumento (HJELLE, 1990).

Existem duas moléculas fluorescentes solúveis presentes na exocutícula hialina e mesocutícula dos escorpiões, o ácido β -carbolina-3-carboxílico e a 7-hidroxi-4-metilcumarina (STACHEL; STOCKWELL; VAN VRANKEN, 1999; FROST et al., 2001; WANKHEDE, 2004).

Algumas teorias indicam que essa cutícula funcionaria como um coletor de fótons em todo o exoesqueleto (absorvância), com posterior transdução da luz UV para o verde ciano e retransmissão da informação ao sistema nervoso central (excitação). Desta forma, os escorpiões usariam essa regulação para detectar abrigo, tendo em vista que o bloqueio de qualquer parte da cutícula diminuiria o sinal de emissão da onda eletromagnética (BROWNELL, 2001).

Há muitas hipóteses sobre o papel da fluorescência do escorpião, como um verdadeiro enigma sobre sua função biológica. Uma possibilidade é que a fluorescência não serviria a nenhuma função comportamental e que os produtos químicos fluorescentes seriam simplesmente subprodutos metabólicos (WANKHEDE, 2004).

Outras hipóteses sugerem que esta função estaria associada com a sensibilidade visual, a comunicação intraespecífica durante o acasalamento em

espécies sexuadas, a atração de presas, a proteção contra a luz ultravioleta como uma espécie de bloqueador solar, a amplificação de luz para mediar respostas no ambiente ou a um sinal aposemático para potenciais predadores (KLOOCK, 2005, 2008).

Com base no fenômeno da fluorescência, primeiramente descrito em estudos de Lawrence (1954) e Pavan e Vachon (1954); Stahnke (1972) e Lowe, Kutcher e Edwards (2003) sugeriram a utilização da luz ultravioleta como ferramenta para coleta de espécimes em pesquisas de campo. Segundo Sissom, Polis e Watt (1990), dispositivos portáteis de luz ultravioleta são métodos de escolha para a detecção e coleta de escorpiões em pesquisas biológicas.

Em 2005, com base nessas recomendações, um dispositivo de luz ultravioleta foi desenvolvido para aplicação em Saúde Pública, visando trabalhos de captura noturna de escorpiões da espécie *T. serrulatus*, em áreas urbanas do município de Americana/SP (BRITES-NETO; BRASIL, 2012; BRITES-NETO; GALASSI, 2012).

3.3 Escorpionismo

Os processos de urbanização contribuíram significativamente para mudanças ambientais globais de várias formas e em várias dimensões (WENTZ et al., 2014). O crescimento urbano em muitos municípios e as alterações antrópicas derivadas em áreas de preservação e reservas naturais favoreceram a migração de muitas espécies silvestres para o ambiente sinantrópico.

As ações antrópicas aceleraram a expansão das áreas urbanas e extinguiram muitas áreas rurais e naturais (BARRAVIEIRA, 1999), alterando a ecologia das paisagens pela redução de ambiências silvestres, com seus habitats e nichos de preservação e favorecendo o surgimento de muitas pragas urbanas adaptadas ao novo ecossistema (CANDIDO, 1999).

Neste contexto, algumas espécies de escorpiões adaptaram-se facilmente aos grandes centros urbanos, principalmente as espécies partenogenéticas, ecologicamente oportunistas, invasoras, colonizadoras, dominantes e de grande aptidão dispersiva (BRITES-NETO; BRASIL, 2012).

Os gêneros considerados mais perigosos no mundo são encontrados na África norte-saariana, no Sahel africano, na África do Sul, no Oriente Próximo e Oriente Médio (*Androctonus* Ehrenberg, 1828; *Buthus* Leach, 1815; *Hottentotta*

Birula, 1908; *Leiurus* Ehrenberg, 1828), na América do Sul (*Tityus* C. L. Koch, 1836), no sul da Índia (*Mesobuthus* Vachon, 1950) e no México (*Centruroides* Marx, 1889), sendo responsáveis por envenenamentos graves com letalidade de 0,27%, envolvendo a exposição de uma população de 2,3 bilhões de pessoas (CHIPPAUX; GOYFFON, 2008).

As raras estatísticas existentes sugerem que crianças e idosos são mais susceptíveis a este tipo de envenenamento (CHIPPAUX, 2012), com uma incidência global anual de 1,19 milhões de indivíduos acidentados e 3.271 mortes por escorpiões. A incidência e a gravidade dos acidentes por animais peçonhentos são elevadas, em razão da ausência de uma adequada atenção médica por parte dos serviços de saúde, sendo um agravo negligenciado de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).

Os dados epidemiológicos demonstram que há diferenças na distribuição geográfica das espécies de escorpiões e nos cuidados de saúde aos acidentados em cada região (TANAJURA; BRAZIL; TELES, 2013). Essas variáveis são muito importantes, visto que existem problemas graves e frequentes de identificação errônea das espécies de importância médica, observados em diversos casos de acidentes, prejudicando a eficácia no tratamento e o sucesso no controle deste agravo causado por escorpiões no país (LOURENÇO, 2016).

O escorpionismo é um problema atual de saúde pública em várias partes do mundo (Figura 7), transformando-se em ameaça frequente ao bem estar e qualidade de vida da população, com coeficientes de incidência de acidentes por escorpiões triplicados nos últimos dez anos (BRITES-NETO; BRASIL, 2012).

Figura 7 - Situação epidemiológica do escorpionismo no mundo.

Figura 8 - Gráfico comparativo entre acidentes escorpiônicos e ofídicos no Brasil.
Fonte: Brasil, 2017a, 2017c.

De acordo com o Ministério da Saúde, os acidentes escorpiônicos foram os de maior número de notificações de acidentes por animais peçonhentos no Brasil, no período de 2004 a 2015 (Figura 8), com incidência em todos os 26 estados brasileiros e o Distrito Federal. Em 2015, 74.598 casos foram registrados (BRASIL, 2017a), e ocorreram mais óbitos (119) do que em acidentes ofídicos (107) (Brasil, 2017b, 2017d). Minas Gerais foi o estado com maior registro de casos, seguido de São Paulo, Bahia (com a maior letalidade), Pernambuco e Alagoas (com o maior coeficiente de incidência) (Tabela 1).

Tabela 1 - Situação epidemiológica do escorpionismo nos estados brasileiros. 2014.

Estado	Casos	Coeficiente de Incidência*	Óbitos	Letalidade (%)
Minas Gerais	19.442	93,8	18	0,09
São Paulo	12.555	28,5	3	0,02
Bahia	11.929	78,9	32	0,27
Pernambuco	9.589	103,4	7	0,07
Alagoas	8.083	243,3	2	0,02

*número de casos/100.000 habitantes

ANO	Nº CASOS		COEF. INCIDÊNCIA*		Nº ÓBITOS		% LETALIDADE	
	Estado/SP	Americana	Estado/SP	Americana	Estado/SP	Americana	Estado/SP	Americana
2000	2379	76	6,42	41,62	0	0	0	0
2001	2888	115	7,67	61,78	1	0	0,03	0
2002	3406	117	8,92	61,66	1	0	0,02	0
2003	3872	100	10,00	51,69	4	0	0,10	0
2004	4359	97	11,11	49,15	2	0	0,04	0
2005	4663	123	11,53	61,34	3	0	0,06	0
2006	4291	148	10,45	72,60	1	0	0,02	0
2007	4392	151	10,34	75,84	2	0	0,04	0
2008	5566	126	13,57	61,98	4	0	0,07	0
2009	5547	108	13,40	52,62	3	0	0,05	0
2010	7261	123	17,60	58,39	1	0	0,01	0
2011	7017	198	16,96	93,04	0	0	0	0
2012	9463	218	22,58	101,46	3	0	0,03	0
2013	11464	321	27,36	142,95	3	1	0,02	0,31
2014	12513	296	29,86	130,41	2	0	0,01	0
2015	15107	353	34,60	153,93	7	0	0,04	0
2016	18829	365	43,12	157,59	5	0	0,02	0

Fonte : Divisão de Zoonoses/CVE Sinanw/SinanNet / PVCC/VEP/UVISA/SMS-Americana/SP.

*Coeficiente de Incidência por 100.000 Habitantes (Pop. DATASUS).

Figura 9 – Incidência e letalidade de acidentes por escorpiões no estado de São Paulo em comparação com o município de Americana.

No ano de 2015, os acidentes escorpiônicos apresentaram um coeficiente de incidência de 43 acidentes para 100.000 habitantes (BRASIL, 2017e) e causaram 119 óbitos no Brasil (BRASIL, 2017b). Em 2016, no estado de São Paulo, ocorreram 18.160 acidentes e 5 óbitos, com um coeficiente de incidência de 42 acidentes para 100.000 habitantes. Esta situação epidemiológica demonstrou maior gravidade no município de Americana-SP, na medida em que o índice de 134 acidentes escorpiônicos/100.000 habitantes, apresentou uma incidência três vezes maior que o índice estadual (Figura 9).

Com a seleção e colonização de novos habitats e a sua proliferação e interação em ambiências urbanas, tais como galerias de esgoto e cemitérios (em razão de seu hábito criptozóico), os escorpiões otimizaram sua manutenção (BRASIL, 2009) em resposta às condições ambientais que promoveram o seu crescimento, sobrevivência e sucesso reprodutivo (LIRA et al., 2013).

Portanto, sob este risco que representam para a saúde humana, em algumas situações, tornou-se necessário controlar o tamanho dessas populações de escorpiões, visto ser inviável a sua erradicação (BRASIL, 2009).

As medidas de controle e manejo populacional de escorpiões foram baseadas nas atividades de remoção dos animais das áreas de infestação e modificação das

condições de ambientes favoráveis à sua ocorrência, permanência e proliferação, incluindo a execução de trabalhos de conscientização da população (BRASIL, 2009).

Através da Instrução Normativa IBAMA n. 141/2006 foi regulamentado o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva, incluindo os escorpiões. A execução desta atividade de manejo foi atribuída aos municípios, com objetivos de registrar, capturar e controlar animais nocivos à saúde do homem, cabendo ao estado a supervisão dessas ações (Portaria/ Ministério da Saúde nº 1.172 de 2004).

3.4 Controle químico de artrópodes peçonhentos

Segundo dados da OMS, sobre pesticidas e sua aplicação para o controle de vetores e pragas de importância para a saúde pública, suspensões concentradas (SC) ou emulsões concentradas (EC) de bendiocarb (0,25–0,5%), chlorpyrifos (0,2–0,5%) ou propoxur 2% poderiam ser utilizadas para controlar escorpiões, sob rigoroso critério técnico de aplicações por pulverização, em áreas residenciais com elevada infestação. No entanto, inseticidas piretróides não seriam recomendados por causarem irritação dos escorpiões, aumentando o perigo de acidentes para os residentes (WHO, 2006).

Vários inseticidas comerciais foram registrados no Ministério da Saúde para controle químico de escorpiões, havendo uma grande discussão no âmbito técnico-científico sobre sua utilização, alimentada pela falta de consenso nos critérios laboratoriais e de campo, para avaliação da eficácia de princípios ativos e metodologias de aplicação (SOUZA, C., 2011, 2012).

A utilização de agentes químicos para o controle do escorpionismo, com critérios de escolha que envolvam a demanda da população, a disponibilidade de recursos técnicos, as dotações financeiras disponíveis, o conhecimento científico e a responsabilidade técnica é uma atribuição da vigilância em saúde, dentro do Sistema Único de Saúde (SUS) (OLIVEIRA; SOUZA, 2011).

A utilização de formulações inseticidas à base de piretróides microencapsulados (Figura 10) contribuiu muito no processo de controle químico destes aracnídeos, sendo o protocolo mais recomendado por reduzir a indução de efeito desalojante e por minimizar efeitos repelentes derivados da capacidade dos escorpiões perceberem substâncias químicas no ambiente (RAMIRES; NAVARRO-SILVA; MARQUES, 2011; SOUZA, 2012).

Figura 10 – Microcápsulas de inseticida em exoesqueleto de artrópode.
Fonte: Google, 2014.

Os inseticidas são classificados de acordo com o modo de ação referente ao processo bioquímico de interação do princípio ativo com o seu alvo fisiológico (Figura 11), determinando toxicidade e mortalidade, com alvos específicos no sistema nervoso (neurotóxicos), no processo bioquímico de síntese de quitina e no sistema endócrino (reguladores de crescimento), no metabolismo energético e respiratório, atuando como fagodeterrentes (promovendo a interrupção do repasto sanguíneo) ou desintegradores das células epiteliais do mesêntero (ETO, 1990; WARE, 1994).

Figura 11 - Modo de ação dos inseticidas. Classificação pelo alvo fisiológico.
Fonte: IRAC, 2016.

No modo de ação dos piretróides e carbamatos, os alvos fisiológicos são nervos e músculos e as benzoiluréias atuam sobre o crescimento e desenvolvimento dos artrópodes.

Os carbamatos são neurotóxicos que atuam na transmissão sináptica como inibidores da enzima acetilcolinestase, através de ligação carbamilada, resultando em acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos (Tabela 2). Os sinais de intoxicação por carbamatos incluem tremores, convulsões, colapso do sistema nervoso central e morte (IRAC, 2017).

As benzoiluréias são reguladores de crescimento dos artrópodes que atuam como inibidores (tipo 0) da biosíntese de quitina (polissacarídeo de N-acetilglucosamina), modificando a formação do exosqueleto (Tabela 2). O processo final de polimerização (catalizado pela enzima quitina sintetase) sofre alterações, afetando diretamente a ecdise dos estágios imaturos (larvas e pupa) e promovendo interferências transovarianas em fêmeas expostas, reduzindo a fecundidade de sua oviposição (IRAC, 2017).

Tabela 2 - Inseticidas com indicação para controle químico de escorpiões.

Carbamatos		
Bendiocarb		Fórmula molecular: $C_{11}H_{13}NO_4$ Peso molecular: $223.228 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Benzoiluréias		
Flufenoxuron		Fórmula molecular: $C_{21}H_{11}ClF_6N_2O_3$ Peso molecular: $488.77 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Fonte: NCBI PubChem Database, 2017; FAO, 2017; WHOPES, 2017.

Os piretróides (tipo I e II) são neurotóxicos que atuam na transmissão axônica como moduladores de canais de sódio distribuídos ao longo do axônio, mantendo-os abertos e permitindo um fluxo excessivo de íons Na^+ para o interior da célula nervosa (LAUFER; PELHATE; SATTELLE, 1985) (Tabela 3). Os sinais de intoxicação nos artrópodes resultam na transmissão de impulsos repetitivos e descontrolados, hiperexcitabilidade, perda de locomoção ("knockdown"), paralisia e morte (IRAC, 2017).

Tabela 3 - Inseticidas com indicação para controle químico de escorpiões.

Piretróides		
<i>alpha</i> -Cypermethrin		Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_3$ Peso molecular: $416.298 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Bifenthrin		Fórmula molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClF}_3\text{O}_2$ Peso molecular: $422.872 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Cyfluthrin <i>beta</i> -Cyfluthrin		Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{FNO}_3$ Peso molecular: $434.288 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Deltamethrin		Fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_3$ Peso molecular: $505.206 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
<i>lambda</i> -Cyhalothrin		Fórmula molecular: $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClF}_3\text{NO}_3$ Peso molecular: $449.854 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Fonte: NCBI PubChem Database, 2017; FAO, 2017; WHOPES, 2017.

As atuais recomendações para controle químico de escorpiões em áreas urbanas consistem no uso alternativo de moléculas microencapsuladas de *lambda*-cyhalothrin CS (suspensão de encapsulado 2,5-10%) e deltamethrin ME (microemulsão 2,5%); *alpha*-Cypermethrin 3% em associação de suspensão concentrada (SC) com o Flufenoxuron 3%; Cyfluthrin CE (concentrado emulsionável 5%); *beta*-Cyfluthrin SC (suspensão concentrada 1,25%); Bifenthrin SC (suspensão concentrada 10-20%); e Bendiocarb WP (pó molhável 80%).

3.5 Controle biológico de artrópodes

Ecologicamente, existem mais de 700 espécies de fungos em 100 gêneros, classificadas dentro de um grupo de microrganismos entomopatogênicos altamente especializados (ZHOU et al., 2015).

Ao longo da evolução, os artrópodes desenvolveram uma incrível resistência aos microorganismos, resultando em uma adaptação excepcional para uma variedade de ambientes naturais, muitas vezes considerados bastante insalubres para os padrões humanos. Essa resposta aos desafios microbiológicos ocorreu pela rápida produção de peptídeos antimicrobianos (defensinas), que possuíam atividade de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e fungos. Esses peptídeos são sintetizados na gordura corpórea, nas células epiteliais, e em determinadas células da hemolinfa, sendo em seguida espalhados ao longo de todo o corpo para combater infecções. Mais de 70 defensinas (polipeptídeos antimicrobianos de cadeia longa com 33 a 46 resíduos de aminoácidos) foram investigadas e identificadas até hoje em vários artrópodes, incluindo os escorpiões, consistindo em um verdadeiro arsenal de defesas naturais, desafiadoras aos estudos de controle biológico (ČEŘOVSKÝ; BÉM, 2014).

No entanto, há muitas pesquisas relatando a eficácia de uso potencial de diferentes entomopatógenos no controle biológico de pragas. As espécies de fungos entomopatogênicos mais comuns são *Beauveria bassiana* Vuillemin, 1912 e *Metarhizium anisopliae* Sorokin, 1883 (Figura 12), utilizadas em programas de controle para fins agrícolas e florestais (İNCİ; KILIÇ; CANHİLA, 2014).

Figura 12 - Crescimento em placa e micrografia de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*.
Fonte: NARO (2017).

O fungo *M. anisopliae* produz enzimas hidrolíticas (lipases, proteases e quitinases) que promovem a degradação cuticular em combinação com a pressão mecânica exercida por estruturas de infecção, denominadas apressórios e blastoporos, no processo de penetração e disseminação no seu hospedeiro artrópode (SOUZA, B., 2011). O processo de infecção começa com a adesão de conídios à superfície do hospedeiro e a ação de várias proteínas que medeiam este processo, como as adesinas e enzimas fosfatases (WEBSTER et al., 2015).

O ciclo das relações fungo-hospedeiro dependerá sempre das condições ambientais, como temperatura, umidade, luz, radiação ultravioleta, assim como das condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro, apresentando as seguintes fases: adesão, germinação, formação de apressórios, formação do grampo, penetração, colonização, reprodução e disseminação (SILVA, 2000).

Fuxa e Tanada (1987) afirmaram em seus estudos que os fungos entomopatogênicos são caracterizados por causarem epizootias, possuírem alta taxa de crescimento, produção elevada de unidades infectantes, capacidade de sobrevivência no ambiente do seu hospedeiro, capacidade de resistir às barreiras físico-químicas do tegumento e da hemolinfa do hospedeiro e capacidade de provocar sua morte rapidamente, havendo muitos isolados diferentes de fungos com variação em virulência, patogenia e alcance de hospedeiro. Diferentemente das

bactérias, protozoários e vírus, os fungos podem infectar os artrópodes não somente pelo intestino, mas também pelos espiráculos e particularmente pela superfície do tegumento. Os esporos (conídios) dos fungos entomopatogênicos infectam o hospedeiro e sob temperatura e umidade favoráveis aderem à cutícula, penetram em seu interior e germinam produzindo hifas, determinando assim a morte do artrópode por destruição tecidual e ocasionalmente através de toxinas produzidas pelo próprio fungo (CONNOLE, 1969). Basicamente, o modo de ação dos fungos utilizados no controle biológico de artrópodes compreende a germinação de conídios, a formação de apressórios, penetração e colonização, podendo em alguns casos ocorrer a ingestão do fungo pelo hospedeiro (MAKITA et al., 2011).

Dentre os mecanismos de interação em ambientes tropicais a associação mutualística facultativa entre leveduras e larvas e adultos de moscas das espécies de *Drosophila* demonstrou possuir um papel importante para estudos de estrutura de comunidades e coevolução destes dois grupos envolvidos em modelagens de ecologia microbiana (MORAIS; ROSA, 2000).

O entomopatógeno *B. bassiana* foi geneticamente modificado, com uma neurotoxina de escorpião e uma protease de *M. anisopliae*, visando aumentar a eficácia inseticida em bioensaio contra a lagarta de *Dendrolimus punctatus* e adultos da traça grande da cera *Galleria mellonella*, demonstrando que a engenharia genética é uma possível alternativa para aumentar a virulência fúngica com recombinantes derivados como ingredientes valiosos para o futuro do controle de pragas de insetos. No entanto, esta aplicação prática exigirá mais dados sobre a segurança ambiental de fungos geneticamente modificados em seus efeitos sobre insetos hospedeiros não-alvo e a possibilidade de fluxo gênico (LU et al., 2008).

Os biopesticidas fúngicos foram avaliados em seu potencial de virulência dos fungos entomopatogênicos (*B. bassiana* e *M. anisopliae*) na transmissão da malária, impondo muito menos seleção para resistência que os inseticidas, cuja eficácia é ameaçada pela evolução de mosquitos resistentes (LYNCH et al, 2012). A eficiência larvicida de nanopartículas sintetizadas pelo fungo *Aspergillus niger* foi testada em larvas dos mosquitos *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (SONI; PRAKASH, 2012). George et al. (2013) comprovaram em bioensaio a atratividade testada de 95% de fêmeas *Anopheles stephensi* para esporos de *B. bassiana*, em avaliação quanto ao potencial uso bioinseticida para o controle de vetores da malária.

Em pesquisas de controle biológico com fungos, trabalhos desenvolvidos com *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram excelentes resultados em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (MONTEIRO et al., 1998), *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* e *Boophilus decoloratus* (KAAYA; HASSAN, 2000), em pulgas *Ctenocephalides felis felis* (MELO, 2006) e em triatomíneos *Triatoma infestans* (FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011).

O fungo *Aspergillus ochraceus* foi isolado de *Rhipicephalus sanguineus* (infectados em condições naturais), causando nestes a ausência de oviposição, com evolução para mumificação e morte (ESTRADA-PEÑA; GONZÁLEZ; CASASOLAS, 1990). O isolamento de fungos em carrapatos foi reportado por Mwangi et al. (1991) com o isolamento de *Aspergillus* sp., *Beauveria* sp., *Penicillium* sp., *Torrubiella* sp., *Cephalosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp. e *Mucor* sp. de carrapatos naturalmente infectados. Monteiro et al. (2003) observaram o isolamento de fungos em carrapatos ixodídeos das espécies *Rhipicephalus sanguineus* e *Boophilus microplus* naturalmente infectados por colônias de *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

D'Alessandro, Humber e Luz (2012), demonstraram que isolados de *B. bassiana* e *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*) (encontrados infectando fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* coletadas em cavalos) e isolados de *P. lilacinum* e *M. anisopliae* (detectados em solos coletados em habitats de pastagens típicas do Brasil Central) provavelmente agem como antagonistas naturais de populações de *A. cajennense*, especialmente na época das chuvas, considerando importante explorar o potencial desses patógenos no desenvolvimento dos principais ingredientes ativos de micoacaricidas para o controle dos vetores da febre maculosa e outras importantes doenças transmitidas por carrapatos.

Em outro trabalho, Morais-Urano, Chaga e Berlinck (2012), avaliaram a ação acaricida de peptídeos cíclicos com atividade biológica (destruxinas), isoladas do fungo entomopatogênico *Beauveria felina*, em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, com resultado de aproximadamente 30% de eficácia.

Cafarchia et al. (2015) demonstraram que uma suspensão de conídios de um isolado nativo de *B. bassiana* foi altamente virulenta para todos os estágios de desenvolvimento do ciclo de vida (ovos, larvas, ninfas e adultos) de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, sugerindo sua utilização potencial como um agente biológico eficaz no controle de populações desta espécie de carrapatos no ambiente.

Um total de 58 espécies de fungos já foram descritas infectando pelo menos 73 espécies de Acari, tanto em condições naturais como em experimentos de laboratório, sendo as espécies *B. bassiana*, *M. anisopliae* sensu lato, *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*), *Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*) e *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*), as mais importantes em infecções naturais de carrapatos ixodídeos. Entre estes fungos, *B. bassiana* e *M. anisopliae* atualmente e historicamente têm sido os gêneros mais estudados para controle de carrapatos, mesmo sendo considerados patógenos "não-especialistas" de Acari. O isolamento de fungos entomopatogênicos de carrapatos infectados naturalmente tem sido relatado frequentemente, mas na verdade não há comprovação de epizootias fúngicas em carrapatos (FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012).

Ainda dentro da Classe Arachnida (Ordem Araneae), Beys-da-Silva (2009) atestou a eficiência de uma alternativa para o controle da aranha-marrom (*Loxosceles* sp.), obtendo uma taxa de mortalidade de 100% (para jovens e adultos) de 9 a 12 dias após a aplicação por aspersão de uma suspensão aquosa de conídios do fungo *M. anisopliae*, sugerindo o desenvolvimento de estratégias específicas em saúde pública que poderiam reduzir a ocorrência de loxoscelismo no Brasil e outros países, com milhares de casos por ano (BEYS-DA-SILVA et al., 2013).

Apesar da existência de muitos resultados de pesquisas sobre as atividades de fungos entomopatogênicos no controle biológico de invertebrados no Filo Arthropoda, estes estudos estão relacionados em sua maioria com espécies pertencentes à Classe Insecta (MELO, 2006; FORLANI; PEDRINI; JUÁREZ, 2011; LYNCH et al, 2012; SONI; PRAKASH, 2012 e GEORGE et al., 2013) e à Ordem Ixodida, dentro da Classe Arachnida (ESTRADA-PEÑA; GONZÁLEZ; CASASOLAS, 1990; MONTEIRO et al., 1998; KAAAYA; HASSAN, 2000; MONTEIRO et al., 2003; MORAIS-URANO; CHAGAS; BERLINCK, 2012; D'ALESSANDRO; HUMBER; LUZ, 2012).

Atualmente, inexistem publicações sobre experimentos específicos relacionados com a pesquisa de fungos patogênicos para o controle biológico de espécies integrantes da Ordem Scorpiones. Há um único relato, descrito por Santana-Neto et al. (2010), sobre a ocorrência natural de *Fusarium solani* em *Tityus stigmurus*, mediante a observação dos espécimes infectados pelo fungo, isolado de

quelíceras e regiões intersegmentais, e determinante da redução da locomoção e alimentação, e posterior morte do hospedeiro.

No Brasil, os micopesticidas à base de *M. anisopliae* representam 65% dos produtos nacionais, seguido por *B. bassiana* (20%), *Lecanicillium* sp. (7,5%) e *Sporothrix insectorum* (7,5%), tendo insetos-alvo distribuídos em 10 ordens taxonômicas, com destaque para Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera e Orthoptera (MICHEREFF FILHO; RODRIGUES DE FARIA; WRAIGHT, 2007). Apesar de que estes fungos já estejam disponíveis comercialmente como biopesticidas e submetidos a vários testes toxicológicos e ecotoxicológicos que os classificaram como inofensivos aos seres humanos, seria necessário reavaliar continuamente o risco destas questões de saúde, com ênfase em pessoas idosas, doentes e jovens (KANZOK; JACOBS-LORENA, 2006). Ao mesmo tempo, mais pesquisas devem monitorar o impacto da aplicação desses fungos, sobre outros inimigos naturais da espécie-alvo, para que não se introduza ou aumente artificialmente a presença de um controlador biológico, em detrimento de outros igualmente importantes dentro de um ecossistema (VERÍSSIMO, 2013).

Segundo Fernandes e Bittencourt (2008), os estudos derivados das pesquisas de controle biológico com fungos entomopatogênicos devem considerar em suas análises; a associação de produtos químicos e biológicos em programas de manejo integrado; o impacto dos agentes de controle biológico em artrópodes não-alvos; a eficácia de programas de controle biológico em diferentes ambientes e ecossistemas; a segurança para animais e humanos; o processo de infecção do fungo no hospedeiro e a resposta imune deste à infecção fúngica; o estabelecimento de empresas com capacidade para a produção em massa de conídios e a formulação do produto final; o aumento da vida útil do produto biológico; e a educação dos consumidores. Além desses aspectos, as condições ambientais no campo, incluindo especialmente a alta temperatura, a forte radiação solar ultravioleta e a dessecação, poderão reduzir a persistência de conídios no ambiente de tratamento e interferir negativamente sobre a eficácia do controle biológico por fungos entomopatogênicos (FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012).

O grande potencial dos fungos como agentes patogênicos para pragas indicaria que seu uso no controle biológico de escorpiões da espécie *T. serrulatus* também poderia ser promissor. Além disso, o Brasil apresenta uma biodiversidade ainda pouco explorada quanto aos seus microorganismos e suas aplicações. Devido

a demanda por novas opções de controle dessas pragas urbanas, estudos nesse contexto são de extrema importância juntamente a outras formas de controle que possam integrar um manejo mais eficiente.

Este fato foi demonstrado por Bahiense, Fernandes e Bittencourt (2006) em laboratório, mediante uma associação do fungo *M. anisopliae* com um carrapaticida de base piretróide aplicados em larvas de linhagens resistentes de *Rhipicephalus microplus*, com resultados no aumento na taxa de mortalidade com índices de até 96,9%, indicando que esta associação poderia ser uma estratégia auxiliar no controle integrado destes ectoparasitas.

Mais recentemente, outro estudo confirmou que o uso combinado de fungos e acaricidas químicos em condições de campo, apresentou índice elevado de eficácia de tratamento (97,9%), em relação ao uso comparado isolado de *M. anisopliae* (56,3%) e uso isolado do acaricida químico (71,1%), sendo uma alternativa interessante no controle de populações de carrapatos resistentes. A combinação de acaricidas químicos associados a agentes biológicos estimulará o uso e a consolidação do controle biológico de pragas entre profissionais e agricultores, mediante resultados de estudos que permitam o desenvolvimento de um produto comercialmente viável (WEBSTER et al., 2015).

3.6 Metabólitos secundários associados ao gênero *Paecilomyces*

Os fungos entomopatogênicos são elementos importantes para o controle das populações naturais de muitas espécies de pragas, existindo mais de 100 micoinsecticidas para uso comercial em todo o mundo. Muito interesse está despertado no uso de agentes fúngicos para o controle biológico como alternativa aos pesticidas químicos. Muitas micotoxinas foram encontradas a partir de fungos entomopatogênicos, sendo classificadas de acordo com sua estrutura química em duas classes principais, de acordo com suas vias biossintéticas: micotoxinas de peptídeo-sintetases não-ribossomais (NRP) e micotoxinas de policetídeo-sintetases (PK).

Micotoxinas	Fungo entomopatogênico	Bioatividade
Cicadaeptins	<i>Cordyceps heteropoda</i> <i>Isaria sinclairii</i>	Atividade antibacteriana Inibição da secreção de acetilcolina
Culicinins	<i>Culicinomyces clavissporus</i>	Inibição de células tumorais da mama
Efraeptins	<i>Tolypocladium</i> spp.	Atividade inseticida Atividade antifúngica Inibidores de adenosinatrifosfatases
Neofraeptins	<i>Geotrichum candidum</i>	Atividade inseticida
Bassianolides	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Verticillium lecanii</i>	Atividade inseticida Inibição da contração muscular
Beauvericins	<i>Beauveria</i> spp. <i>Paecilomyces</i> spp.	Atividade inseticida Atividade fungicida Atividade antitumoral Citotoxicidade
Beauverolides	<i>Beauveria</i> spp. <i>Paecilomyces</i> spp.	Inibição da imunidade dos insetos
Beauveriolides	<i>Beauveria</i> spp.	Antiaterogênico Atividade antiobesidade
Conoideocrellide	<i>Conoideocrella tenuis</i> <i>Paecilomyces militaris</i>	
Paecilodepsipeptides	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	Atividade antiproliferativa Atividade antitumoral
Cordycommunin	<i>Ophiocordyceps communis</i>	Inibição de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Destruixins	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Aschersonia</i> sp.	Atividade inseticida Atividade herbicida Atividade citotóxica
Hirsutellides	<i>Hirsutella kobayashii</i>	Antimalárica
Hirsutides	<i>Hirsutella</i> spp.	
Isariins	<i>Isaria cretacea</i>	Atividade inseticida
Isaridins	<i>Isaria</i> spp.	Inibição do crescimento de <i>Plasmodium falciparum</i>
Isarolides	<i>Isaria</i> spp.	
Serinocyclins	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Atividade inseticida
Verticilides	<i>Verticillium</i> spp.	Inibição da enzima acil-CoA: colesterol aciltransferase Inibição dos receptores de rianodina em baratas
Cyclosporines	<i>Beauveria</i> <i>Verticillium</i> <i>Trichoderma polysporum</i> <i>Cylindrocarpon lucidum</i>	Atividades inseticidas Efeito imunossupressor
Cordyheptapeptides	<i>Cordyceps</i> spp.	Atividade antimalárica Citotoxicidade para linhas de células Vero

Modificado de Hu, Li e Zhang (2016).

Figura 13 - Micotoxinas de peptídeo-sintetases de origem não ribossômica (NRP).

Quimicamente, NRPs (Figura 13) são metabólicos secundários compostos de aminoácidos específicos ou modificados e ácidos hidroxílicos, sendo sintetizados através de um mecanismo precursor multienzimático (thiotemplate) não-ribossômico.

A biossíntese de PKs (Figura 14) e seus derivados envolve múltiplos processos enzimáticos característicos de cada fungo (a exemplo das ceto-sintases, aciltransferases, carboxilases, ciclases, desidrases, aromatases, redutases, tioesterases e lacases), onde os genes de codificação envolvidos são frequentemente encontrados em clusters (HU; LI; ZHANG, 2016).

Micotoxinas	Fungo entomopatogênico	Bioatividade
Annullatins	<i>Cordyceps annullata</i>	Exibição de potente atividade agonista em relação aos receptores canabinóides CB1 e CB2.
Cryptosporioptide A	<i>Cordyceps gracilioides</i>	Inibição da atividade das proteínas tirosina fosfatases
Cytochalasins	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Inibição da interação actina-cofilina
Farinosones A, B, and C	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Atividade citotóxica
Fumosorinones	<i>Isaria fumosorosea</i>	Inibição da tirosina fosfatase para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2
Indigotides	<i>Cordyceps indigotica</i>	
Militarinones	<i>Paecilomyces militaris</i>	Atividade citotóxica
Opaliferin	<i>Cordyceps</i> sp.	
Pinophilin C	<i>Cordyceps gracilioides</i>	Inibição da atividade das proteínas tirosina fosfatases
Tenellin	<i>Beauveria bassiana</i>	
Terreusinone A	<i>Cordyceps gracilioides</i>	Inibição da atividade das proteínas tirosina fosfatases
Tenuipyrone	<i>Isaria tenuipes</i>	
Torrubiellones	<i>Torrubiella</i> sp.	Antimalárica
13-Hydroxyindigotide A	<i>Cordyceps indigotica</i>	
8-O-Methylindigotide B	<i>Cordyceps indigotica</i>	
Oosporein	<i>Cordyceps cardinalis</i>	Antibiótica Antifúngica Antitumoral
Bassianin	<i>Beauveria</i> spp.	Inibição da Na ⁺ K ⁺ ATPase da membrana dos eritrócitos Inibição das enzimas Ca ²⁺ ATPases

Modificado de Hu, Li e Zhang (2016).

Figura 14 - Micotoxinas de poliketideo-sintetases (PK).

Muitos compostos ativos com propriedades inseticidas foram isolados dos fungos entomopatogênicos, tais como hexadepsipeptídeos cíclicos (destruxinas), beauvericinas, bassianolides, beauveriolides, lactamas (piridovericina e paecilosetina), alcalóides (isariotinas e cordipiridonas) e um novo antibiótico piridônico (acantomicina) (WEI et al., 2014).

Os fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* têm sido fonte de novos metabólitos secundários farmacologicamente ativos, representados principalmente pelas paecilotoxinas (peptídeos lineares altamente tóxicos, também designados por leucinostatinas) de *P. lilacinus*, paeciloquinonas (antraquinonas, inibidores da proteína tirosina quinase) de *P. carneus* P-177, paecilosetina (derivado de ácido tetrâmico, antibiótico) de *P. farinosus*, e uma série de tricotecenos de *P. tenuipes* (YANG et al., 2009). *Paecilomyces* apresenta bioatividade patogênica relatada para insetos das ordens Homoptera, Lepidoptera e Coleoptera (ZHOU et al., 2015).

No banco de dados CHEMnetBASE (DNP 25.2) encontramos 150 registros de compostos com atividade biológica conhecida, isolados para o gênero *Paecilomyces*. Dois desses compostos, Beauvericin e Beauveriolide (Figura 15; Tabela 4), foram isolados com atividade inseticida descrita de origem das espécies, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces tenuipes*.

Figura 15 - Compostos com atividades inseticidas (beauvericins e beauveriolides) isolados de espécies de *Paecilomyces*. Fonte: CHEMnetBASE (2017).

As enniatinas, compostos análogos da beauvericina, são hexadepsipeptídeos cíclicos produzidos pelos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* possuindo propriedades antibacterianas (GROVE e POPLE, 1980).

A beauvericina pode ser biosintetizada por fungos do gênero *Paecilomyces*, sendo uma micotoxina com atividade biológica inseticida, antimicrobiana, antiviral e citotóxica (WANG e XU, 2012).

Os beauveriolides são cyclodepsipeptídeos isolados como metabólitos secundários dos fungos entomopatogênicos *Beauveria tenella* e *Paecilomyces fumosoroseus* (JEGOROV et al., 1994).

Figura 16 – Principais metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Paecilomyces* (1).

O composto Catenioblin B (Figura 16-A; Tabela 4) é uma piranona derivada, isolada do fungo entomopatogênico *Paecilomyces cateniobliquus*, com boa atividade inibitória do crescimento de insetos (WU et al., 2012; SRINIVAS; HÜGEL; KRISHNA, 2014).

O Ácido decilsalicílico (Figura 16-B; Tabela 4) (análogo do ácido anacárdico) foi isolado do fungo *Paecilomyces variotii*, apresentando atividade antibacteriana contra patógenos humanos e marinhos (LIU et al., 2012).

Wei et al. (2014) isolaram um novo composto de oxybis cresol denominado Verticilatin (Figura 16-C; Tabela 4), a partir de culturas dos fungos entomopatogênicos *Paecilomyces verticillatus*, com atividade inibidora significativa das enzimas fosfatases com alvos celulares e da proteína enzimática cathepsina B.

Tabela 4 - Principais metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Paecilomyces* (fonte biológica, fórmula e peso molecular).

Composto	Fonte Biológica	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)
Beauvericin	<i>P. tenuipes</i> <i>P. fumosoroseus</i>	C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	783,96
Beauveriolide I	<i>P. fumosoroseus</i>	C ₂₇ H ₄₁ N ₃ O ₅	487,64
Catenioblin B	<i>P. cateniobliquus</i>	<u>C₈H₁₂O₄</u>	172,18
6-Decylsalicylic acid	<i>P. variotii</i>	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	278,39
Farinosone A	<i>P. farinosus</i>	C ₂₅ H ₂₇ NO ₄	405,49
Formosusin A-B-C	<i>P. formosus</i>	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃	291,39
Formoxazine	<i>P. formosus</i>	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	195,09
Paecilaminol	<i>Paecilomyces</i> sp.	C ₂₀ H ₄₃ NO	313,57
Paecilin A	<i>Paecilomyces</i> sp.	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₄	638,58
Paecilocin A-D	<i>P. variotii</i>	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	262,35
Paecilocin B-C	<i>P. variotii</i>	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	308,42
Paecilodepsipeptide A	<i>P. cinnamomeus</i>	C ₄₀ H ₄₇ N ₅ O ₉	741,84
Paecilomide	<i>P. lilacinus</i>	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	237,26
Paecilomycin B	<i>Paecilomyces</i> sp.	C ₁₉ H ₂₄ O ₈	380,39
Paecilomycin C-D	<i>Paecilomyces</i> sp.	C ₁₉ H ₂₆ O ₉	398,41
Paecilomycin J	<i>Paecilomyces</i> sp.	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	382,41
Paecilomycine A-B-C	<i>P. tenuipes</i>	C ₁₉ H ₂₆ O ₆	350,41
Paecilomycone B	<i>P. gunnii</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,24

Composto	Fonte Biológica	Fórmula Molecular	Peso Molecular (g/mol)
Paecilomycone C	<i>P. gunnii</i>	C ₁₅ H ₁₃ NO ₅	287,27
Terreusinone	<i>P. formosus</i>	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₄	330,38
Saintopin	<i>Paecilomyces</i> sp.	C ₁₈ H ₁₀ O ₇	338,27
Variotin	<i>P. formosus</i>	C ₁₇ H ₂₅ NO ₃	291,39
Verticilatin	<i>P. verticillatus</i>	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	298,38

Guo et al. (2007) verificaram que uma extração do micélio do fungo *Paecilomyces* sp., obtida por uma mistura de acetato de etila, metanol e clorofórmio, proporcionou o isolamento de um novo dímero metabólito denominado Paecilin A (Figura 16-D; Tabela 4) e seu monômero Paecilin B, que apresentaram efeitos de inibição sobre células KB e a topoisomerase I humana, em ensaios de citotoxicidade e efeitos anticancer.

Farinosone A (Figura 16-E; Tabela 4) e B foram isoladas do extrato micelial do fungo entomopatogênico *Paecilomyces farinosus* juntamente com farinosona C, um novo metabólito derivado da etapa inicial da biossíntese de alcalóides da piridona (CHENG et al., 2004).

Quatro policetídeos (Paecilocin A-B-C-D) (Figura 16-F; Tabela 4) foram isolados do fungo *Paecilomyces variotii*, derivados da água-viva *Nemopilema nomurai*, apresentando estruturas químicas elucidadas por análises espectroscópicas de RMN. Estes compostos mostraram atividade inibitória contra bactérias patogênicas fármaco-multirresistentes (*Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahemolyticus*) (LIU et al., 2011).

Ui et al. (2006) isolaram um inibidor da NADH-fumarato redutase de uma cepa do fungo *Paecilomyces* sp. Este composto amino-álcool (Paecilaminol) (Figura 16-G; Tabela 4) apresenta uma base de cadeia longa de esfingolipídios e estrutura estabelecida como 2-amino-14,16-dimetil-3-octadecanol. O sistema NADH-fumarato redutase é encontrado em muitos organismos anaeróbios, fazendo parte do metabolismo respiratório de endoparasitas nematódeos. As atividades

endoparasiticidas do Paecilaminol e uma moderada atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas foram demonstradas por estes autores.

Yang et al. (2009) estudaram os processos envolvidos na síntese do Paecilodepsipeptídeo A (Figura 16-H; Tabela 4), isolado do fungo patogênico *P. cinnamomeus*, cujo extrato apresentou atividade citotóxica moderada para duas linhagens celulares do câncer, KB e BC, juntamente com os seus derivados lineares Paecilodepsipeptídeos B e C. O Paecilodepsipeptídeo A apresentou também atividade contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, causador da malária.

O composto Saintopin (Figura 16-I; Tabela 4) foi isolado a partir de *Paecilomyces* sp. apresentando atividade citotóxica para linhagens de células tumorais, por inibição de enzimas nucleares (DNA-topoisomerases) essenciais para o controle da topologia do DNA em células de mamíferos, nos processos de replicação, transcrição e recombinação. As DNA-topoisomerasas I e II são enzimas que alteram a conformação do DNA através de um rearranjo de suas cadeias de oligonucleotídeos. A enzima DNA-topoisomerase II já foi identificada como o alvo celular primário para vários agentes antitumorais clinicamente importantes em humanos (YAMASHITA et al., 1990; ISHIYAMA et al., 1998).

Figura 17 - Principais metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Paecilomyces* (2).

Xu et al. (2010, 2012, 2013) relataram o isolamento, a elucidação estrutural e a atividade biológica de um grupo de metabólitos secundários policetídeos fúngicos, derivados da lactona do ácido resorcílico e denominados Paecilomycin (Figura 17-A; Tabela 4). Estas paecilomycinas isoladas a partir da cultura micelial sólida de *Paecilomyces* sp. possuem propriedades estrogênicas, antifúngicas, citotóxicas, antimaláricas (ação antiplasmodial sobre *Plasmodium falciparum*), nematocidas e atividades inibitórias sobre ATPases e cinases.

Os tricotecenos (Paecilomycine A, B e C) são sesquiterpenóides (Figura 17-B; Tabela 4), produzidos pelo fungo *Paecilomyces tenuipes*, que apresentam uma grande variedade de efeitos biológicos (antibacterianos, antifúngicos, inseticidas e citostáticos). Paecilomycine A demonstrou atividade de importância para a biossíntese do fator neurotrófico em células gliais (KIKUCHI et al., 2004). Zhou et al. (2015) investigaram metabólitos secundários produzidos por cultivos sólidos de *Paecilomyces* sp., obtendo o isolamento e elucidação da estrutura de dois diterpenóides denominados Paecilomycine A e B e um novo diterpeno do tipo labdano.

Paecilomide (Figura 17-C; Tabela 4), um novo alcaloide derivado da piridona e potente inibidor da acetilcolinesterase, foi isolado do extrato de *Paecilomyces lilacinus*, com estrutura elucidada por modernas técnicas de ressonância magnética nuclear e por espectrometria de massa, em pesquisa realizada por Teles e Takahashi (2013).

Lu et al. (2014) verificaram estruturas químicas no extrato metanólico do micélio de *Paecilomyces gunnii*, cultivado em meio líquido, submetido à espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Os estudos de estrutura e atividade dos metabólitos isolados (Paecilomycone A-B-C) (Figura 17-D; Tabela 4) demonstraram uma atividade de inibição da tirosinase (também chamada polifenoloxidase), que é uma enzima oxidoredutase que contém cobre (metaloenzima) e está envolvida na síntese de melanina. Neste processo de produção da melanina, a tirosinase catalisa a hidroxilação da L-tirosina para produzir L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e oxida a L-DOPA para produzir dopaquinona, como enzima oxidativa de dois fenóis e de uma série de reações precursoras da dopaquinina. A tirosinase desempenha um papel importante na metamorfose e imunidade dos insetos, onde a enzima provoca o escurecimento enzimático, como função defensiva nos mesmos. Desta forma, inibidores de tirosinase em metabólitos

secundários de fungos entomopatogênicos podem atuar como importantes componentes inseticidas para suprimir este mecanismo de defesa.

3.7 Metabólitos secundários associados à espécie *Paecilomyces formosus*

Para a espécie *P. formosus*, quatro principais compostos ativos já foram isolados; Formoxazine, Terreusinone, Formosusin e Variotin.

Os compostos Formosusin (A, B e C) e Variotin (Figura 18-A; Tabela 4) foram isolados a partir de culturas do fungo *Paecilomyces formosus*, tendo suas estruturas determinadas por análise espectroscópica.

Formosusin A apresentou atividade inibitória seletiva *in vitro* para a enzima DNA polimerase β de mamíferos (MIZUSHINA et al., 2014). As DNA polimerases β são enzimas de cadeia polipeptídica de 39 kDa, que desempenham papéis importantes no processo de múltiplas vias de reparo do DNA, sendo fator essencial para manutenção da integridade do DNA genômico. Existem três vias de reparo do DNA; reparo de excisão de nucleotídeos danificados, de incompatibilidade de DNA e de excisão de base. Há ampla evidência de que esta enzima deva ser um alvo significativo para pesquisas de novos tratamentos quimioterápicos para o câncer e de patologias neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (YAJIMA et al., 2016).

YUN et al. (2016) isolaram uma nova pirrolo-oxazina, denominada Formoxazine (Figura 18-B; Tabela 4), e um derivado da pirroloquinona, Terreusinone (Figura 18-C; Tabela 4), a partir do extrato bruto de *Paecilomyces formosus*. Estes metabólitos apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* multirresistentes e com base na atividade biológica das pirrolo-oxazinas, indicaram um potencial valor quimioterapêutico, como um agente antitumoral, antioxidante, neuroprotetor e antiinflamatório.

Khan et al. (2012a) observaram uma agregação significativa de prolina em plantas associadas a uma cepa endofítica de *P. formosus* em crescimento sob estresse salino, ocasionando um declínio no influxo iônico dentro das massas celulares visando à manutenção de seu equilíbrio osmótico. Khan et al. (2012b) investigaram a influência de *P. formosus* sobre a termotolerância do pepino (*Cucumis sativus*) a tensões de temperaturas altas (38 °C) e baixas (8 °C), demonstrando que as plantas inoculadas pelo endófito apresentaram crescimento

significativamente mais elevado sob condições de alta temperatura. Estes estudos revelaram que as interações mutualistas de fitohormônios produzidos por *P. formosus* (giberelinas e uma auxina, o ácido indolacético), podem melhorar o crescimento das plantas hospedeiras em cultivos de arroz e atenuar significativamente os impactos negativos do estresse salino e térmico em plantios de pepino (WAQAS; KHAN; LEE, 2014).

Figura 18 - Principais metabólitos secundários isolados de *Paecilomyces formosus*.

As espécies de *Paecilomyces* são patógenos emergentes capazes de causar doença invasiva em humanos (hialohifomicose). As espécies de *Paecilomyces* mais frequentemente envolvidas são *P. variotii* e *P. lilacinus* causadoras de um número crescente de infecções com sinais clínicos relacionados a lesões superficiais da pele e dos tecidos moles, endoftalmites severas associadas à queratites e perda da visão e endocardites graves (BARKER et al., 2014).

Kuboi et al. (2016) relataram um caso de infecção cutânea causada por *P. formosus* em paciente pediátrico (recém-nascido prematuro) demonstrando que esta espécie determinaria infecções oportunistas relacionadas a quadros específicos de imunodeficiências em crianças.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma da metodologia utilizada no estudo

4.2 Bioensaio experimental de avaliação de isolados de fungos filamentosos com repelência e mortalidade para *T. serrulatus* (1ª etapa)

4.2.1 Área de estudo (aspectos físicos, territoriais e geográficos)

O Cemitério Municipal da Saudade (Figura 19) fica localizado em área urbana (54.534 m²) do município de Americana/SP (latitude 22°43'43.7"S; longitude 47°19'09.5"W).

Figura 19 - Vista aérea do cemitério municipal da Saudade em Americana/SP (A), com demonstração dos pontos de captura de escorpiões (B). Foto (A): Aluisio Nazareno Bertalia, 2011.

O município está situado geograficamente na região leste de São Paulo, limitado ao Norte pelo município de Limeira, a Nordeste por Cosmópolis, a Oeste por Santa Bárbara D'Oeste, ao Sul por Nova Odessa e a Leste por Paulínia.

Sua extensão territorial possui uma área total de 133,6 km², com uma área urbana ocupada de 92 km² e área rural de 32,3 km², estando inserido em uma bacia hidrográfica composta por uma represa com área de 9,3 km² (Represa do Salto Grande) e pelos Rios Piracicaba, Jaguari, Atibaia e Ribeirão Quilombo. Possui um clima tropical, relevo em depressão periférica e altitude de 545 metros. Com uma população de 229.322 habitantes, o município está dividido em dez áreas de planejamento urbano e uma área de preservação ambiental, apresentando uma densidade demográfica de 1.593 habitantes/km² (FELICIANO, 2016).

4.2.2 Captura e seleção dos espécimes de escorpiões

No período de abril a outubro de 2014, foram capturados no cemitério, em período noturno, 1.500 escorpiões da espécie *T. serrulatus*, com o uso de luz ultravioleta (UV) (Figura 20). Os espécimes foram transportados para um biotério do Programa de Vigilância e Controle de Carrapatos e Escorpiões (PVCE) da Secretaria de Saúde.

Figura 20 - Método de captura mecânica de escorpiões em cemitérios municipais de Americana/SP. Foto: José Brites Neto, 2012.

No biotério, as fêmeas adultas (partenogenéticas) foram identificadas de acordo com a revisão taxonômica de Souza et al. (2009) e selecionadas adotando-se uma padronização em tamanho, pelo comprimento do prossoma mais mesossoma, medindo entre 20 e 30 mm.

A manutenção em biotério foi realizada em conformidade com a Instrução Normativa nº 141, de 19 de dezembro de 2006 e a Instrução Normativa nº 154, de 01 de março de 2007, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA e sob autorização para atividades com finalidade científica/SISBIO nº 20562 (Anexo 1).

4.2.3 Coleta e isolamento fúngicos

Foram coletadas amostras de material biológico, através de raspados das paredes internas de 10 (dez) sepulturas com fungos, do cemitério municipal da Saudade.

Em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes, no laboratório de análises químicas do Departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP, as amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultivo YEPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose) sem antibiótico, e mantidas em B.O.D. a 27 °C. Após o desenvolvimento das colônias e inspeção diária das placas, os isolados em crescimento foram utilizados em um primeiro ensaio experimental.

4.2.4 Manutenção e assepsia dos espécimes de escorpiões

Os escorpiões foram colocados em caixas plásticas desinfetadas com protocolo de higienização à base de solução de hipoclorito de sódio 1% (NaClO), álcool etílico hidratado 70% e Lysoform bruto (0,45% de cloreto de benzil alquil dimetil amônio).

Os escorpiões utilizados nos bioensaios foram submetidos a um protocolo de assepsia com imersão por 5 segundos em solução de hipoclorito de sódio 1% (NaClO), 5 segundos em água destilada, 5 segundos em álcool 70% e novamente por 5 segundos em água destilada.

Foram previamente alimentados com baratas da espécie *Periplaneta americana*, também submetidas a protocolo de assepsia com imersão por 5 segundos em solução de hipoclorito de sódio 1% (NaClO) e 5 segundos em água destilada.

4.2.5 Bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico

Foi desenvolvido um módulo experimental para os bioensaios (BRITES-NETO et al., 2014), constituído de cinco caixas de plástico (54 cm de comprimento x 37 cm de largura x 37 cm de altura, com capacidade para 56,1 litros) conectadas entre si por meio de um tubo transparente (15 cm de comprimento por duas polegadas de diâmetro), a partir de uma caixa central de distribuição (Figura 21).

Figura 21 - Módulo experimental para bioensaio de teste de interação entre fungos e escorpiões.
Foto: José Brites Neto, 2014.

Excetuando-se a caixa de distribuição, as demais caixas foram envoltas em plástico preto, visando diminuir a influência de luz sobre o ciclo circadiano dos escorpiões (que apresentam maior atividade no período noturno). Em cada uma das quatro caixas, foram colocados recipientes com água.

De forma intercalada nas quatro caixas conectadas à caixa de distribuição foram colocadas placas de Petri com isolados fúngicos em apenas duas delas, permanecendo as outras duas como caixas de controle sem placas. Foram adicionados no primeiro dia do experimento, 100 (cem) escorpiões na caixa de distribuição, procedendo-se a leituras diárias quantitativas (a cada 12 horas) do número de exemplares em cada ambiência, durante um período de 45 dias seguidos.

Durante os procedimentos de leitura do experimento foram registrados dados de temperatura e umidade no sítio experimental.

4.2.6 Bioensaio para avaliação de mortalidade aos isolados fúngicos

Foram utilizadas dez caixas de plástico (39 cm de comprimento x 27 cm de largura x 14 cm de altura, com capacidade para 8,6 litros) da seguinte forma: uma caixa controle contendo 10 (dez) escorpiões e nove caixas contendo 10 (dez) escorpiões e uma placa de Petri com isolados fúngicos em crescimento (Figura 22).

Os escorpiões foram contaminados individualmente por esfregaço direto na placa de cultivo fúngico, sendo todos os mortos encaminhados para análise laboratorial no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ.

Figura 22 - Módulo experimental para bioensaio de avaliação de patogenicidade entre fungos e escorpiões. Foto: José Brites Neto, 2013.

4.2.7 Análise estatística do bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico

Os dados obtidos com as leituras quantitativas diárias do número de escorpiões em cada ambiência, foram analisados estatisticamente, considerando-se um ensaio fatorial no delineamento inteiramente casualizado, com dois fatores (presença ou não de fungos nas caixas) e turnos de observação (7 horas e 19 horas) em 45 dias de observação.

4.2.8 Purificação, isolamento e identificação morfológica dos isolados de fungos filamentosos

A identificação morfológica dos isolados de fungos foi realizada a nível de gênero, em colaboração com o Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni, no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ.

Para o processamento dos escorpiões mortos, realizou-se uma degermação do exoesqueleto, com passagem em solução de álcool iodado, seguida de clorexidina a 2% e água estéril (para retirada do resíduo de clorexidina e iodo), passagem em solução salina estéril acrescida de cloranfenicol (200 mg L^{-1}) e lavagem final em água destilada estéril.

Cada um dos exemplares de cada grupo foi colocado em meio líquido Sabouraud dextrose a 4%, para comprovar a degermação. Os demais, degermados, foram separados em partes de seus segmentos corporais, que foram triturados e semeados em placas de Petri contendo meio Sabouraud sólido.

A partir do crescimento das colônias, as mesmas foram identificadas. Todas as amostras foram isoladas e as identificações de fungos filamentosos foram realizadas mediante prévio cultivo em meio Sabouraud dextrose agar, para reativação de estruturas fúngicas.

Procedeu-se ao preparo de lâminas utilizando fragmento colonial, entre lâmina de microscopia e lamínula, acrescido de lactofenol azul de algodão ou clarificante (para colônias muito escuras ou negras), passando-se posteriormente para a execução da técnica de cultivo em lâmina e técnica da fita adesiva, que permitem a visualização de estruturas íntegras dos fungos, empregando-se na montagem o mesmo corante e clarificante.

Na observação de lâminas preparadas por estas técnicas verificou-se se os conídios e demais estruturas fúngicas eram hialinos ou escuros, septados ou não, e no caso dos conídios serem septados, se as divisões eram longitudinais, transversais ou em ambos os sentidos, assim como o tamanho e formato destes.

Procurou-se ainda estabelecer se os conídios eram formados diretamente de uma hifa, de conidióforos curtos ou a partir de estruturas mais complexas, como fiálides oriundas de vesículas montadas sobre estipes.

Foi observada a presença ou não de esporangióforos terminando em esporângios contendo esporangiósporos. Nos casos em que as estruturas de reprodução assexuada não eram formadas, estimulou-se sua produção pela passagem do fungo em meios específicos para estimular a conidiogênese.

Complementarmente, foram utilizadas provas de assimilação de compostos carbonados e nitrogenados, assim como provas de fermentação, segundo Hoog et al. (2000).

4.3 Bioensaio para teste *in vivo* da interação fungos-escorpiões (2ª etapa)

Foram realizados dois protocolos de interação denominados A e B, onde A avaliou a interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos liofilizados e B com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo.

4.3.1 Preservação dos isolados de fungos filamentosos para o bioensaio

Os doze isolados de fungos identificados foram transferidos para meio Sabouraud. Após surgimento das colônias, preparou-se uma suspensão salina padrão de conídios (cultura monospórica) e desta foi retirada uma alíquota de 0,5 mL para ser semeada e multiplicada em meio de cultura BDA (Acumedia – 39 g L⁻¹) e outra para ser semeada, multiplicada e liofilizada.

Foi providenciado bioestoque pelo método de Castellani (1939), para preservação de colônias puras dos fungos em água destilada esterilizada, sendo posteriormente armazenado em temperatura ambiente.

Para a reativação, fragmentos dos estoques foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidos em B.O.D. a 27 °C.

4.3.2 Modelagem do bioensaio *in vivo* (protocolos A e B)

Figura 23 - Modelo esquemático de bioensaio com *T. serrulatus* em exposição aos isolados de fungos.

Foi utilizado o módulo experimental previamente desenvolvido para o bioensaio (Figura 21), sendo colocados 100 espécimes de escorpiões da espécie *T. serrulatus* na caixa central de distribuição e, nas outras quatro caixas, quatro isolados de fungos (um em cada caixa). Os ensaios foram testados em três séries de exposição, num total de doze isolados de fungos e foram realizados em dois protocolos de interação A e B (Figura 23).

No protocolo A, foram utilizadas placas com isolados de fungos liofilizados. No protocolo B foram utilizadas placas de Petri com os isolados de fungos inoculados em meio de cultivo.

Os escorpiões foram submetidos à caixa central de distribuição, mantidos aleatoriamente com livre mobilidade dentro do sistema experimental, e monitorados durante um período de 15 dias seguidos, no período da manhã, com observações diárias quanto ao número de exemplares vivos e mortos (Figura 24).

Figura 24 - Detalhe do modelo experimental de bioensaio com *T. serrulatus*.
Foto: José Brites Neto, 2014.

Os critérios para avaliação de morbidade em escorpiões (condição de vivo, infectado e morto, considerando-se ainda o fenômeno biológico específico da tanatose - comportamento de defesa de animais que simulam a própria morte para enganar predadores) foram baseados no repertório comportamental desta espécie em cativeiro, em conformidade com o material-testemunho descrito por Mineo, Franco-Assis e Del-Claro (2003) e Colombo e Alencar (2014), em estudos de etogramas sob condições de laboratório.

Durante os procedimentos de leitura do experimento foram registrados dados de temperatura e umidade no sítio experimental.

Foi avaliado o índice de mortalidade de escorpiões em biotério testemunha durante os períodos de leitura experimental (12/05/2014 a 28/10/2014).

4.3.3 Análise estatística do bioensaio

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, considerando-se um delineamento experimental casualizado em blocos (DBC), com 4 tratamentos e 15 blocos (Tabela 5). Foi realizado o teste F da análise da variância ao nível de 5% de significância. As médias de cada ambiência testada de cada bioensaio foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Admitidas as pressuposições, a ANOVA foi formulada com a contagem diária do número de escorpiões vivos e mortos, durante 15 dias seguidos, em cada uma das ambiências contendo um isolado de fungo filamentoso, sendo quatro isolados testados em cada uma das três séries, nos dois protocolos de interação (A e B).

Os dados de contagens de escorpiões foram transformados pela raiz quadrada. Os resultados de comparação entre médias obtidos pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, permitiram selecionar os isolados de fungos que determinaram maior repelência aos escorpiões (menor média significativa) e maior mortalidade (maior média significativa).

Tabela 5 - Esquema da análise de variância (ANOVA) para o delineamento experimental casualizado em blocos (DBC) proposto para o bioensaio.

Causas de variação (C.V.)	Graus de liberdade (G.L.)
Blocos	14
Tratamentos	3
Resíduo	42
Total	59

4.4 Bioensaio *in vivo* para avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* expostos aos cinco isolados de fungos selecionados (3ª etapa)

Os cinco isolados selecionados nos bioensaios de protocolos A e B (*Paecilomyces* sp. isolado 1, *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. isolado 4, *Mucor* sp. e *Phialophora* sp.) foram avaliados quanto ao seu potencial escorpionicida.

Para este fim, foram colocados 30 espécimes de escorpiões da espécie *T. serrulatus* em cada caixa de observação (01 a 05), contendo os cinco isolados de fungos (um em cada caixa) e na caixa testemunha (06) (Figura 25).

Os escorpiões foram mantidos e monitorados durante um período de 15 dias seguidos, no período da tarde, com observações diárias quanto ao número de exemplares vivos e mortos.

Os escorpiões mortos foram acondicionados em câmara úmida, em tubos cônicos estéreis do tipo falcon de 50 ml, com algodão hidrófilo embebido em água Milli-Q, visando avaliar crescimentos fúngicos em seu exoesqueleto.

Vinte e quatro escorpiões mortos e mantidos em câmara úmida apresentaram crescimento de fungos filamentosos, que foram replicados em placas com BDA e submetidos à identificação morfológica.

Figura 25 - Modelo esquemático de bioensaio para avaliação da mortalidade de *T. serrulatus*.

4.5 Bioensaio para teste *in vivo* de repelência e mortalidade de *T. serrulatus* às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. (4ª etapa)

4.5.1 Obtenção de extrato bruto dos isolados de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp.

Os isolados dos fungos *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. foram cultivados em meio líquido para obtenção de extrato bruto. Para cada isolado, cinco discos de Agar (5 mm de diâmetro) foram transferidos do meio de cultivo em BDA, contendo o micélio dos fungos, para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 180 mL de meio líquido BD 20%. Cinco frascos de cada isolado foram mantidos durante 10 dias em incubadora com agitação constante de 150 rpm a 28 °C.

Após o crescimento dos fungos, o micélio foi separado do meio de cultivo por filtração. O filtrado foi submetido a um sistema de filtração a vácuo, com a utilização de membranas Millipore (74 mm de diâmetro – 0,22 µm de porosidade), obtendo-se assim o extrato bruto de cada isolado.

4.5.2 Partição líquido-líquido para obtenção de frações ativas de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp.

Os extratos brutos de *Rhizopus* sp. e *Paecilomyces* sp., após congelamento em freezer a -80 °C e liofilização, foram submetidos a partições líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila e água Milli-Q (300 mL em três repetições), obtendo-se duas frações: a fração aquosa e a fração acetato de etila.

A fração aquosa foi liofilizada para a retirada de toda a água presente e a fração acetato de etila concentrada em um evaporador rotativo para a retirada do solvente orgânico.

As amostras foram codificadas, pesadas, armazenadas em refrigeração e posteriormente submetidas a ensaios de atividade com escorpiões.

4.5.3 Modelagem do bioensaio para teste *in vivo* de repelência e mortalidade

Repetiu-se a utilização do módulo experimental desenvolvido para o bioensaio (Figura 21), composto por cinco caixas conectadas entre si, a partir de uma caixa central de distribuição.

Foram colocados 120 espécimes de escorpiões da espécie *T. serrulatus* na caixa central, e as demais quatro caixas pulverizadas com as seguintes frações ativas de extratos brutos (fração aquosa de *Rhizopus* sp.; fração acetato de etila de *Rhizopus* sp.; fração aquosa de *Paecilomyces* sp. e fração acetato de etila de *Paecilomyces* sp.).

Os escorpiões foram monitorados durante um período de 15 dias seguidos, no período da manhã, com observações diárias quanto ao número de exemplares vivos e mortos.

4.5.4 Bioensaio *in vivo* para avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* expostos às frações aquosa e acetato de etila de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. e ao solvente etanol

As frações aquosa e acetato de etila de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. e o solvente etanol foram avaliados quanto ao seu potencial escorpionicida.

Foram colocados 35 espécimes de escorpiões da espécie *T. serrulatus* em cada caixa de observação, contendo as frações aquosa e acetato de etila de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. e o solvente etanol (um em cada caixa) e uma caixa testemunha, conforme modelo esquemático anterior (Figura 25). Os escorpiões foram mantidos e monitorados durante um período de 15 dias seguidos, no período da tarde, com observações diárias quanto ao número de exemplares vivos e mortos.

4.6 Bioensaio *in vivo* para avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* submetidos às frações ativas resultantes da fração acetato de etila de *Paecilomyces* sp. (5ª etapa)

4.6.1 Extração em fase sólida (SPE)

As frações ativas foram separadas utilizando-se cromatografia em fase normal em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak de 10g (60 mL) (Phenomenex®). A fase estacionária foi de sílica-gel e a fase móvel utilizou um gradiente de solventes orgânicos de diferentes polaridades (todos de grau PA): diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH).

A) diclorometano/acetato de etila 9:1	J) acetato de etila/metanol 9:1
B) diclorometano/acetato de etila 8:2	K) acetato de etila/metanol 8:2
C) diclorometano/acetato de etila 7:3	L) acetato de etila/metanol 7:3
D) diclorometano/acetato de etila 6:4	M) acetato de etila/metanol 6:4
E) diclorometano/acetato de etila 5:5	N) acetato de etila/metanol 5:5
F) diclorometano/acetato de etila 4:6	O) acetato de etila/metanol 4:6
G) diclorometano/acetato de etila 3:7	P) acetato de etila/metanol 3:7
H) diclorometano/acetato de etila 2:8	Q) acetato de etila/metanol 2:8
I) diclorometano/acetato de etila 1:9	R) acetato de etila/metanol 1:9
	S) 100% metanol

Foi aplicada a massa de 1,06 g de amostra seca da fração acetato de etila do extrato bruto de *Paecilomyces* sp., dissolvida em 5 ml da proporção 9DCM:1AcOEt. Em seguida, procedeu-se a corrida de 100 ml de cada eluente, resultando em 19 frações recolhidas (A até S).

4.6.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para monitoramento cromatográfico e análises químicas qualitativas, após a secagem do material de cada fração, foi realizada uma cromatografia em camada delgada (CCD) com as 19 frações, em eluição DCM/MeOH 9:1. Para este tipo de cromatografia foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 (20 x 20 cm)

(Macherey-Nagel®) sobre poliéster com indicador de fluorescência/UV 254 nm (Polygram® Sil G/UV 254 nm, 0,20 mm).

As frações obtidas, diluídas em solvente apropriado, foram aplicadas nas cromatofolhas (CCD) e após a eluição foram inspecionadas sob a luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Posteriormente foram reveladas com reagentes específicos para detectar compostos naturais com atividade.

Foram utilizados os reagentes de solução de ácido fosfomolibdico (PMA) para a detecção de compostos redutores, lipídios e esteróis; solução do reagente Dragendorff para a detecção de alcaloides e/ou substâncias com heteroátomos contendo pares de elétrons livres; e solução de ninidrina para a detecção de aminoácidos e aminas primárias.

Para o reagente PMA foram adicionados 5 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de etanol, sendo borrifado à placa CCD e aquecido a 100 °C por 5-10 minutos em chapa aquecedora.

Para o reagente Dragendorff foram adicionados 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial (solução A). Separadamente foram adicionados 40 mL de água e 8 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água (solução B). As duas soluções foram misturadas na proporção de 1:1, com posterior aplicação na placa de CCD e secagem a temperatura ambiente.

Para a solução de ninidrina foi adicionada 0,2 g de ninidrina em 100mL de acetona, sendo após homogeneização aplicada sobre a placa CCD e aquecida a 100 °C por 5 minutos em chapa aquecedora.

4.6.3 Teste de toxicidade para avaliação de solventes utilizados no bioensaio

Foram avaliados três solventes (etanol 70%, etanol 100% e dimetilsulfóxido/ DMSO) e um surfactante (Tween 20) para utilização em bioensaios *in vivo* com escorpiões *T. serrulatus*.

Foram utilizados 50 espécimes da espécie *T. serrulatus* que foram individualmente pulverizados com cada solvente (50 por solvente) e mantidos em observação por 10 dias seguidos, para avaliação do número de exemplares vivos e mortos.

4.6.4 Bioensaio *in vivo* com as frações ativas de *Paecilomyces* sp.

Após a reunião de frações por similaridades em CCD, seis frações foram definidas para a realização de bioensaio *in vivo* com *T. serrulatus*. As seis frações (A, B, C, D, E e F) definidas pela CCD foram secas e pesadas, sendo cada uma posteriormente dissolvida em 10 ml de etanol 70%, em frasco de vidro com pulverizador.

Foram pulverizados individualmente 50 escorpiões da espécie *T. serrulatus* para cada fração (dose/jato de 0,2 ml por escorpião), sendo estes acondicionados em caixas de observação e mantidos 50 escorpiões não tratados em caixa testemunha.

Os escorpiões foram mantidos e monitorados durante um período de 15 dias seguidos, no período da manhã, com observações diárias quanto ao número de exemplares vivos e mortos e de sinais indicativos de intoxicação.

4.7 Caracterização molecular e identificação taxonômica do isolado de fungo selecionado

O isolado *Paecilomyces* sp. do qual foram obtidos extratos e frações que apresentaram efeito escorpionicida nos bioensaios realizados, foi submetido à caracterização molecular para validação molecular da identificação do gênero/espécie. Estas análises moleculares foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, responsável pelo Laboratório de Microbiologia do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

4.7.1 Extração de DNA do isolado de fungo selecionado

O isolado fúngico foi crescido em 50 mL de meio líquido BD (caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água, [pH 6,0]) durante 5 a 7 dias a 28 °C. Após esse período foi realizada uma centrifugação a 20.000X *g* por 10 minutos para retirar o excesso de meio de cultura.

Cerca de 1 g do conteúdo micelial foi submetido a um processo de filtração para retirar todo o excesso de água e posteriormente, aproximadamente 100 mg do material micelial foi macerado em nitrogênio líquido. Cada uma das amostras foi

submetida à extração do DNA total utilizando o kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

A integridade do DNA extraído, assim como sua quantificação foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v), preparado em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA), onde foram aplicados 5µl dos DNAs extraídos junto a 3µl de um tampão de corrida *Loading buffer* 6x (Azul de bromofenol 0,05% (p/v); Sacarose 40% (p/v); EDTA 0,1M (pH 8,0); SDS 0,025% (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta (*DNr* Bio-imaging Systems Minibis pro 16mm). As quantidades de DNA extraídos das amostras variaram entre 5 e 10 ng.µl⁻¹ de DNA.

4.7.2 Amplificação (PCR) e Sequenciamento das Regiões ITS do rDNA

A região hipervariável ITS do DNA do isolado fúngico foi amplificada utilizando os primers ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl - pH 8,4); (3,7 mM de MgCl₂, 1 mM de dNTP, 0,05 U.µL⁻¹ de *Taq* DNA polimerase - Invitrogen), 0,2 µM de primer ITS-1, 0,2 µM de primer ITS-4 e, aproximadamente, 5 ng de DNA. Posteriormente, as reações foram inseridas em termociclador (Veriti® Thermal Cycler, Applied Biosystems, Waltham, USA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, após os ciclos, uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. O fragmento amplificado de aproximadamente 600pb, foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2% a 7 volts.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1Kb (Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo e fotodocumentado sob luz UV. Posteriormente, os fragmentos amplificados foram purificados com o kit *GFX PCR* (Amersham Pharmacia Biotech) e sequenciados.

4.7.3 Classificação filogenética da espécie do isolado fúngico selecionado

A classificação filogenética foi realizada utilizando a sequência de nucleotídeos do rDNA do isolado fúngico. Inicialmente, as sequências de nucleotídeos foram analisadas comparativamente via BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra a base de dados do GenBank, que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor score de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados. Dessa forma, foram consideradas as sequências que apresentaram os valores mais altos de similaridade com as sequências submetidas.

4.8 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a EM de alta resolução

As análises de UPLC-HRMS foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, responsável pelo Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

As frações resultantes foram submetidas à análise em UPLC-HRMS para a determinação de suas massas moleculares. As amostras foram eluídas em metanol e H₂O grau ULC-MS (9:1) na concentração de 0,01 mg mL⁻¹, sendo injetado 10 µL da amostra.

Foi utilizado cromatógrafo de ultra eficiência com bomba quaternária (Waters® XEVO G2-Xs QToF) em modo positivo com detector ZSpray (ESI/APCI/ESCI®) com faixa de detecção entre 100 e 1000 Da e energia de ionização de 30 V. Como fase estacionária foi utilizada coluna de sílica derivatizada com grupos octadesil (Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈, 1,7 µm, 2,1 x 50 m) e fase móvel em gradiente de 10 minutos (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão de 0,5 mL min⁻¹.

4.9 Pesquisa de metabólitos secundários em banco de dados

Após aquisição dos espectros de massas foi realizada pesquisa no banco de dados Dictionary of Natural Products (CHEMnetBASE).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaio experimental de avaliação de isolados de fungos filamentosos com repelência e mortalidade para *T. serrulatus* (1ª etapa)

5.1.1 Bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico

Neste bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico, foram identificados doze gêneros e duas espécies de fungos a partir dos isolamentos das placas com crescimento microbiano e do processamento de 14 escorpiões mortos neste protocolo: *Mucor* spp. (oito isolados); *Aspergillus* spp. (seis isolados); *Scopulariopsis* spp. (quatro isolados); *Cunninghamella* spp. (um isolado); *Fusarium* spp. (seis isolados); *Micelia sterilia* (um isolado); *Penicillium* spp. (nove isolados); *Neospora* spp. (um isolado); *Syncephalastrum* spp. (dois isolados); *Cladosporium* spp. (um isolado); *Trichosporon* spp. (dois isolados); *Aspergillus fumigatus* (três isolados); *Absidia* spp. (dois isolados) e *Rhizopus* spp. (dois isolados).

5.1.2 Bioensaio para avaliação de mortalidade aos isolados fúngicos

No bioensaio para avaliação de mortalidade, foram identificados cinco gêneros e uma espécie de fungos a partir de isolamentos das placas com crescimento microbiano e do processamento de 16 escorpiões mortos neste protocolo: *Fusarium* spp. (isolados em 70% das ambiências testadas); *Cladosporium* spp. (isolados em 20% das ambiências testadas); *Paecilomyces* spp. (isolado em 10% das ambiências testadas); *Phialophora* spp. (isolado em 10% das ambiências testadas); *Acremonium* spp. (isolado em 10% das ambiências testadas) e *Micelia sterilia* (isolado em 10% das ambiências testadas).

5.1.3 Análise estatística do bioensaio para avaliação de repelência ao ambiente fúngico

Para o bioensaio proposto neste experimento de avaliação da repelência ao ambiente fúngico foi utilizada a espécie *Tityus serrulatus* e realizada uma análise de variância (ANOVA) com os dados das contagens de escorpiões (fêmeas adultas e fêmeas adultas com filhotes) nas duas caixas em cada tratamento (controle e exposição ao fungo) e em dois turnos de observação (7 horas e 19 horas), os quais

foram previamente transformados em raiz quadrada, para atendimento das pressuposições do modelo matemático.

A tabela 6 apresenta as médias das contagens de fêmeas adultas de *Tityus serrulatus* e a comparação das mesmas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 6 - Valores médios das contagens de fêmeas adultas de *Tityus serrulatus* por tratamento e turno de observação.

Tratamento	Manhã (7 h)	Tarde (19 h)
Controle	50,47 A a*	42,62 B a
Com colônias	38,53 A b	33,89 B b

*Médias de tratamentos com letras maiúsculas diferentes nas linhas ou com letras minúsculas diferentes nas colunas, diferiram significativamente entre si ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

Houve um número maior de fêmeas adultas de *Tityus serrulatus* no período da manhã, tanto no grupo controle como no grupo com colônias de fungos. Assim como, um número maior de fêmeas adultas de *Tityus serrulatus* nas caixas controle, tanto no período da manhã como no período da tarde. Isto comprova que o ambiente com colônias de fungos reduziu significativamente a permanência de fêmeas adultas, independente de qualquer influência do turno de observação.

A tabela 7 apresenta as médias das contagens de fêmeas adultas com filhotes de *Tityus serrulatus* e a comparação das mesmas pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 7 - Valores médios das contagens de fêmeas adultas com filhotes de *Tityus serrulatus* por tratamento e turno de observação.

Tratamento	Manhã (7 h)	Tarde (19 h)
Controle	6,67 A a*	6,11 A a
Com colônias	2,16 A b	2,22 A b

*Médias de tratamentos com letras maiúsculas diferentes nas linhas ou com letras minúsculas diferentes nas colunas, diferiram significativamente entre si ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

As médias das contagens de fêmeas adultas com filhotes de *Tityus serrulatus* no período da manhã não diferiram significativamente ($P>0,05$) do observado pela tarde, tanto no grupo controle como no grupo com colônias de fungos. Assim como,

houve um número maior de fêmeas adultas com filhotes de *Tityus serrulatus* nas caixas controle, tanto no período da manhã como no período da tarde. Isto comprova que o ambiente com colônias de fungos reduziu significativamente a permanência das fêmeas adultas com filhotes, independentemente de qualquer influência do turno de observação.

5.1.4 Seleção de isolados de fungos para 2ª etapa de bioensaios

Com base nesse estudo preliminar, foram selecionados doze isolados de fungos que foram purificados e identificados morfológicamente (Tabela 8) para novos bioensaios *in vivo*.

Tabela 8 - Apresentação dos isolados de fungos filamentosos purificados e identificados morfológicamente para o bioensaio com *T. serrulatus*.

Amostra	Isolado de fungo filamentoso
1	<i>Mucor</i> sp.
2	<i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 1)
3	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 1)
4	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 2) com <i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 2)
5	<i>Phialophora</i> sp.
6	<i>Acremonium</i> sp.
7	<i>Rhizopus</i> sp.
8	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 3)
9	<i>Micelia sterilia</i>
10	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 4)
11	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 5)
12	<i>Beauveria bassiana</i>

5.2 Bioensaio para teste *in vivo* da interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos (2ª etapa)

5.2.1 Bioensaio para teste *in vivo* da interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos liofilizados (protocolo A - repelência)

Para o bioensaio com isolados de fungos em estado liofilizado, obtivemos resultados comparativos de médias de contagens de escorpiões vivos (Tabela 9), através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 9 - Interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos liofilizados (protocolo A - repelência).

Média de contagem do número de escorpiões vivos em cada tratamento.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 1	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 2) com	30,47	A
	<i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 2)		
	<i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 1)	22,27	B
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 1)	20,80	B
	<i>Mucor</i> sp.	15,07	C
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 2	<i>Acremonium</i> sp.	24,07	A
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 3)	21,40	A
	<i>Rhizopus</i> sp.	20,67	A
	<i>Phialophora</i> sp.	14,53	B
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 3	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 5)	24,60	A
	<i>Beauveria bassiana</i>	22,20	A B
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 4)	18,93	B C
	<i>Micelia sterilia</i>	16,33	C

Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.

As médias de *Mucor* sp. e *Fusarium* sp. (isolado 2) com *Paecilomyces* sp. (isolado 2) diferiram significativamente entre si e de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Paecilomyces* sp. (isolado 1) e *Fusarium* sp. (isolado 1) (Figura 26).

Figura 26 – Gráfico do bioensaio de interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos liofilizados (Protocolo A / Repelência / Série 1).

A média de *Phialophora* sp. diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Acremonium* sp., *Fusarium* sp. (isolado 3) e *Rhizopus* sp. (Figura 27).

Figura 27 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos liofilizados (Protocolo A / Repelência / Série 2).

Não houve diferença significativa entre as médias de isolados de fungos, *Fusarium* sp. (isolado 5), *Beauveria bassiana*, *Fusarium* sp. (isolado 4) e *Micelia sterilia*.

No período de execução da Série 1 (12 a 26/05/2014) a temperatura ambiente externa oscilou de 23,8 °C a 25,8 °C e a umidade ambiente externa variou de 42 a 70%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 23,6 °C a 26,0 °C e a umidade interna variou de 58 a 89%.

No período de execução da Série 2 (28/05 a 11/06/2014) a temperatura ambiente externa oscilou de 22,1 °C a 24,5 °C e a umidade ambiente externa variou de 45 a 65%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 22,6 °C a 25,4 °C e a umidade interna variou de 77 a 88%.

No período de execução da Série 3 (25/06 a 09/07/2014) a temperatura ambiente externa oscilou de 23,3 °C a 24,7 °C e a umidade ambiente externa variou de 42 a 57%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 23,3 °C a 25,1 °C e a umidade interna variou de 70 a 84%.

5.2.2 Bioensaio para teste *in vivo* da interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos liofilizados (protocolo A - mortalidade)

Para o bioensaio com isolados de fungos em estado liofilizado, obtivemos resultados comparativos de médias de contagens de escorpiões mortos (Tabela 10), através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 10 - Interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos liofilizados (protocolo A - mortalidade).

Média de contagem do número de escorpiões mortos em cada tratamento.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 1	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 2) com	0,67	A
	<i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 2)		
	<i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 1)	0,20	A
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 1)	0,20	A
	<i>Mucor</i> sp.	0,13	A
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 2	<i>Rhizopus</i> sp.	1,20	A
	<i>Acremonium</i> sp.	0,33	A B
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 3)	0,33	A B
	<i>Phialophora</i> sp.	0,13	B
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 3	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 5)	0,93	A
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 4)	0,60	A B
	<i>Micelia sterilia</i>	0,40	A B
	<i>Beauveria bassiana</i>	0,20	B
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			

Não houve diferença significativa entre as médias dos isolados de fungos, *Fusarium* sp. (isolado 2) com *Paecilomyces* sp. (isolado 2), *Paecilomyces* sp. (isolado 1), *Fusarium* sp. (isolado 1) e *Mucor* sp.

Não houve diferença significativa entre as médias dos isolados de fungos, *Rhizopus* sp., *Phialophora* sp., *Acremonium* sp. e *Fusarium* sp. (isolado 3).

Não houve diferença significativa entre as médias dos isolados de fungos, *Fusarium* sp. (isolado 5), *Beauveria bassiana*, *Fusarium* sp. (isolado 4) e *Micelia sterilia*.

5.2.3 Bioensaio para teste *in vivo* da interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (protocolo B - repelência)

Para o bioensaio com isolados de fungos em estado cultivado, obtivemos resultados comparativos de médias de contagens de escorpiões vivos (Tabela 11), através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 11 - Interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (protocolo B - repelência).

Média de contagem do número de escorpiões vivos em cada tratamento.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 1	<i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 1)	27,73	A
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 1)	23,00	A B
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 2) com <i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 2)	19,67	B
	<i>Mucor</i> sp.	13,53	C
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 2	<i>Rhizopus</i> sp.	14,07	A
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 3)	7,07	B
	<i>Phialophora</i> sp.	6,53	B
	<i>Acremonium</i> sp.	6,53	B
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 3	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 4)	17,27	A
	<i>Micelia sterilia</i>	12,07	B
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 5)	9,33	B
	<i>Beauveria bassiana</i>	9,20	B
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			

A média de *Mucor* sp. diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Paecilomyces* sp. (isolado 1), *Fusarium* sp. (isolado 1) e *Fusarium* sp. (isolado 2) com *Paecilomyces* sp. (isolado 2) (Figura 28).

Figura 28 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B / Repelência / Série 1).

A média de *Rhizopus* sp. diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Fusarium* sp. (isolado 3), *Phialophora* sp. e *Acremonium* sp. (Figura 29).

Figura 29 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B / Repelência / Série 2).

A média de *Fusarium* sp. (isolado 4) diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Micelia sterilia*, *Fusarium* sp. (isolado 5) e *Beauveria bassiana* (Figura 30).

Figura 30 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B / Repelência / Série 3).

No período de execução da Série 1 (06 a 20/08/2014) a temperatura ambiente externa oscilou de 21,7 °C a 24,5 °C e a umidade ambiente externa variou de 38 a 57%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 21,6 °C a 25,1 °C e a umidade interna variou de 72 a 88%.

No período de execução da Série 2 (24/09 a 07/10/2014) a temperatura ambiente externa oscilou de 25,3 °C a 27,5 °C e a umidade ambiente externa variou de 36 a 59%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 25,4 °C a 28,2 °C e a umidade interna variou de 63 a 89%.

No período de execução da Série 3 (14 a 28/10/2014) a temperatura ambiente externa oscilou de 28,7 °C a 31,7 °C e a umidade ambiente externa variou de 32 a 50%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 28,5 °C a 32,1 °C e a umidade interna variou de 61 a 79%.

5.2.4 Bioensaio para teste *in vivo* da interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (protocolo B - mortalidade)

Para o bioensaio com isolados de fungos em estado cultivado, obtivemos resultados comparativos de médias de contagens de escorpiões mortos (Tabela 12), através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 12 - Interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (protocolo B - mortalidade).

Média de contagem do número de escorpiões mortos em cada tratamento.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 1	<i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 1)	1,47	A
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 1)	0,27	B
	<i>Mucor</i> sp.	0,20	B
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 2) com	0,13	B
	<i>Paecilomyces</i> sp. (isolado 2)		
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 2	<i>Rhizopus</i> sp.	3,00	A
	<i>Phialophora</i> sp.	1,13	B
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 3)	0,93	B
	<i>Acremonium</i> sp.	0,80	B
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05) pelo teste de Tukey.			
	Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Série 3	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 4)	3,00	A
	<i>Fusarium</i> sp. (isolado 5)	0,73	B
	<i>Micelia sterilia</i>	0,60	B
	<i>Beauveria bassiana</i>	0,33	B
Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0.05) pelo teste de Tukey.			

A média de *Paecilomyces* sp. (isolado 1) diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Fusarium* sp. (isolado 1), *Mucor* sp. e *Fusarium* sp. (isolado 2) com *Paecilomyces* sp. (isolado 2) (Figura 31).

Figura 31 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B / Mortalidade / Série 1).

A média de *Rhizopus* sp. diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Phialophora* sp., *Fusarium* sp. (isolado 3) e *Acremonium* sp. (Figura 32).

Figura 32 - Gráfico do bioensaio de interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B / Mortalidade / Série 2).

A média de *Fusarium* sp. (isolado 4) diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Fusarium* sp. (isolado 5), *Micelia sterilia* e *Beauveria bassiana* (Figura 33).

Figura 33 – Gráfico do bioensaio de interação da espécie *T. serrulatus* com isolados de fungos inoculados em meio de cultivo (Protocolo B / Mortalidade / Série 3).

5.2.5 Seleção de isolados de fungos com maior atividade sobre *T. serrulatus* com base nos critérios de repelência e mortalidade

A avaliação da interação entre escorpiões da espécie *T. serrulatus* e 12 isolados de fungos filamentosos testados, realizada nos dois protocolos experimentais delineados, demonstrou que os isolados de *Mucor* sp. e *Phialophora* sp., apresentaram as menores médias significativas de escorpiões vivos em suas ambiências, caracterizando uma maior repelência de escorpiões a estes fungos testados nos protocolos experimentais.

Os isolados de *Paecilomyces* sp. (isolado 1), *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp. (isolado 4), apresentaram as maiores médias significativas de escorpiões mortos em suas ambiências, caracterizando uma maior mortalidade de escorpiões em relação a estes fungos testados nos protocolos experimentais.

Considerando que nas questões envolvidas no controle químico de pragas urbanas, com enfoque para escorpiões, a repelência pode ser um fator de dispersão aumentando a casualidade da incidência de acidentes em humanos (WHO, 2006),

em qualquer análise, o efeito escorpionicida deve ser de maior relevância nos processos de controle avaliados, sejam químicos ou biológicos.

Durante o período experimental do bioensaio *in vivo* foram registrados índices de mortalidade de escorpiões em biotério testemunha (Tabela 13).

Tabela 13 - Índice de mortalidade da espécie *T. serrulatus* em biotério testemunha, durante bioensaio *in vivo*.

Fase Experimental		Período	Mortalidade
Protocolo A	1ª série	12/05 a 26/05/2014	12%
Protocolo A	2ª série	28/05 a 11/06/2014	31%
Protocolo A	3ª série	25/06 a 09/07/2014	30%
Protocolo B	1ª série	06/08 a 20/08/2014	15%
Protocolo B	2ª série	24/09 a 07/10/2014	17%
Protocolo B	3ª série	14/10 a 28/10/2014	6%
Média			18,5%

5.3 Bioensaio *in vivo* para avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* expostos aos cinco isolados de fungos selecionados (3ª etapa)

No bioensaio com cinco isolados selecionados nos bioensaios anteriores de protocolos A e B (*Paecilomyces* sp. isolado 1, *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. isolado 4, *Mucor* sp. e *Phialophora* sp.), obtivemos resultados comparativos de médias de contagens de escorpiões vivos (Tabela 14), através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 14 - Avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* aos isolados de fungos.

Média de contagem do número de escorpiões vivos em cada tratamento.		
Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
<i>Phialophora</i> sp.	28.33	A
Testemunha	28.13	A
<i>Fusarium</i> sp.	27.40	A
<i>Mucor</i> sp.	27.20	A
<i>Rhizopus</i> sp.	25.73	B
<i>Paecilomyces</i> sp.	24.20	C

Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si ($P=0,05$).

A média de *Paecilomyces* sp. diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp. e *Phialophora* sp., como também da média testemunha.

A média de *Rhizopus* sp. diferiu significativamente de cada uma das demais médias dos isolados de fungos, *Paecilomyces* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp. e *Phialophora* sp., como também da média testemunha, e não houve diferença significativa entre as médias dos isolados de fungos, *Mucor* sp., *Fusarium* sp. e *Phialophora* sp. e a média testemunha.

Com base nestes resultados, os isolados de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. foram selecionados para a sequência de bioensaios, com indicação de maior mortalidade para *T. serrulatus* (Figura 34).

Figura 34 – Gráfico do bioensaio *in vivo* para avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* expostos aos cinco isolados de fungos.

No período de execução (16 a 30/09/2015) a temperatura ambiente externa oscilou de 23,0 °C a 25,9 °C e a umidade ambiente externa variou de 34 a 49%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 23,5 °C a 26,0 °C e a umidade interna variou de 38 a 78%.

5.3.1 Isolamento de fungos filamentosos de *T. serrulatus* em câmara úmida

Dos 32 escorpiões mortos neste bioensaio, 24 espécimes apresentaram crescimento de fungos filamentosos em câmara úmida (Figura 35), sendo as amostras replicadas em BDA para identificação morfológica (Tabela 15).

Figura 35 – Espécimes mortos de *T. serrulatus* apresentando crescimento de fungos filamentosos em câmara úmida. Fotos: José Brites Neto, 2016.

Houve correspondência entre a presença do isolado das caixas do bioensaio e o crescimento fúngico nos escorpiões mortos, tão somente em relação aos fungos *Mucor* sp. e *Fusarium* sp. que foram isolados em quatro amostras (Tabela 15).

Houve crescimento de fungos considerados oportunistas e/ou contaminantes no isolamento feito em 13 amostras (*Aspergillus* sp.) e 6 amostras (*Fusarium* sp.) dos escorpiões mortos no bioensaio.

Esta observação não comprova uma ação deletéria direta dos isolados fúngicos, sugerindo haver uma possível interferência de metabólitos secundários neste efeito escorpionicida.

Tabela 15 - Identificação morfológica de fungos isolados de *T. serrulatus* mortos em bioensaio.

Amostra	Caixa com isolado	Identificação Morfológica
01	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
02	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
03	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
04	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
05	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
06	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
07	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
08	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
09	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
10	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
11	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
12	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
13	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
14	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
15	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
16	<i>Phialophora</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
17	<i>Phialophora</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
18	<i>Phialophora</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
19	<i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
20	<i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
21	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.
22	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
23	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
24	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.

5.4 Bioensaio para teste *in vivo* de repelência e mortalidade de *T. serrulatus* às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. (4ª etapa)

No bioensaio com as quatro frações ativas de extratos brutos (fração aquosa de *Rhizopus* sp.; fração acetato de etila de *Rhizopus* sp.; fração aquosa de *Paecilomyces* sp. e fração acetato de etila de *Paecilomyces* sp.), obtivemos resultados comparativos de médias de contagens de escorpiões vivos e mortos, através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

5.4.1 Bioensaio para teste *in vivo* de repelência de *T. serrulatus* às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp.

Considerando-se as médias de contagens de escorpiões vivos (Tabela 16), verificou-se que as médias de todas as frações diferiram significativamente entre si.

Tabela 16 - Avaliação de repelência de *T. serrulatus* às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp.

Média de contagem do número de escorpiões vivos em cada tratamento.		
Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
<i>Paecilomyces</i> sp. acetato	33.53	A
<i>Rhizopus</i> sp. aquosa	26.47	B
<i>Rhizopus</i> sp. acetato	17.13	C
<i>Paecilomyces</i> sp. aquosa	10.87	D

Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si ($P=0,05$).

Com base nestes resultados, a fração acetato de *Paecilomyces* sp. apresentou a maior média significativa de escorpiões vivos indicando menor repelência para escorpiões e que a fração aquosa de *Paecilomyces* sp. apresentou a menor média significativa de escorpiões vivos indicando maior repelência para escorpiões (Figura 36).

Figura 36 - Gráfico do bioensaio de repelência de *T. serrulatus* às frações, aquosa e acetato de etila, dos extratos brutos de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp.

No período de execução (27/01 a 10/02/2016) a temperatura ambiente externa oscilou de 24,8 °C a 26,8 °C e a umidade ambiente externa variou de 34 a 50%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 25,2 °C a 27,4 °C e a umidade interna variou de 61 a 79%.

5.4.2 Bioensaio para teste *in vivo* de mortalidade de *T. serrulatus* às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp.

Considerando-se as médias de contagens de escorpiões mortos, verificou-se que a média de *Paecilomyces* sp. (fração acetato) diferiu significativamente de cada uma das demais médias (Tabela 17).

Tabela 17 - Avaliação de mortalidade de *T. serrulatus* às frações aquosa e acetato de etila de extratos brutos de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp.

Média de contagem do número de escorpiões mortos em cada tratamento.		
Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
<i>Paecilomyces</i> sp. acetato	0.93	A
<i>Paecilomyces</i> sp. aquosa	0.27	B
<i>Rhizopus</i> sp. acetato	0.27	B
<i>Rhizopus</i> sp. aquosa	0.13	B

Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si (P=0,05).

Não houve diferença significativa entre as médias de *Rhizopus* sp. (fração aquosa), *Rhizopus* sp. (fração acetato) e *Paecilomyces* sp. (fração aquosa).

Com base nestes resultados, a fração acetato de *Paecilomyces* sp. apresentou a maior média significativa de escorpiões mortos indicando maior efeito escorpionicida no bioensaio.

5.4.3 Bioensaio *in vivo* para avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* expostos às frações aquosa e acetato de etila de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. e ao solvente etanol

Para este bioensaio de mortalidade, obtivemos resultados comparativos de médias de contagens de escorpiões vivos, através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Verificou-se que a média de *Paecilomyces* sp. (fração aquosa) e a média de *Paecilomyces* sp. (fração acetato) diferiram significativamente de cada uma das demais médias testadas (Tabela 18).

Tabela 18 - Avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* às frações aquosa e acetato de etila de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. e ao solvente etanol.

Média de contagem do número de escorpiões vivos em cada tratamento.		
Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
<i>Paecilomyces</i> sp. aquosa	33.47	A
Testemunha	29.20	B
<i>Rhizopus</i> sp. aquosa	28.60	B
Etanol	28.40	B
<i>Rhizopus</i> sp. acetato	27.73	B
<i>Paecilomyces</i> sp. acetato	17.40	C

Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si ($P=0,05$).

Não houve diferença significativa entre as médias de *Rhizopus* sp. (fração aquosa), *Rhizopus* sp. (fração acetato), do solvente etanol e da testemunha.

Com base nestes resultados, verificamos que a fração acetato de *Paecilomyces* sp. apresentou a menor média significativa de escorpiões vivos indicando maior efeito escorpionicida no bioensaio (Figura 37).

Figura 37 - Gráfico do bioensaio de mortalidade de *T. serrulatus* às frações aquosa e acetato de etila de *Paecilomyces* sp. e *Rhizopus* sp. e ao solvente etanol.

No período de execução (13/02 a 27/02/2016) a temperatura ambiente externa oscilou de 24,3 °C a 26,6 °C e a umidade ambiente externa variou de 35 a 43%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 24,4 °C a 27,3 °C e a umidade interna variou de 47 a 67%.

5.5 Bioensaio *in vivo* para avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* submetidos às frações ativas resultantes da fração acetato de etila de *Paecilomyces* sp. (5ª etapa)

5.5.1 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida resultou em 19 frações que foram submetidas a cromatografia em camada delgada (CCD).

Na primeira CCD foram reunidas as frações com similaridade na corrida cromatográfica: A (1) / B (2) / C (3) / D (4) / E (5) / F+G+H+I (6) / J (7) / K+L+M (8) / N (9) / O (10) / P+Q+R+S (11).

Na segunda CCD foram reunidas as frações: 1 (A) / 2+3 (B) / 4 (C) / 5+6+7 (D) / 8 (E) / 9 (F) / 10 (G) / 11 (H).

Na terceira e quarta CCD foram reunidas as frações G+H (G) e F+G (F), respectivamente, resultando em seis frações para o bioensaio (A, B, C, D, E e F).

As placas de CCD foram reveladas com reagentes específicos para detectar compostos naturais com atividade, sendo utilizados os reagentes de solução de ácido fosfomolibdico para a detecção de substâncias redutoras, lipídeos e esteroides; solução do reagente Dragendorff para a detecção de alcaloides e/ou substâncias com heteroátomos contendo pares de elétrons livres; e solução de ninidrina para a detecção de aminoácidos e aminas primárias.

Observou-se uma reação positiva para o ácido fosfomolibdico e a ninidrina e uma reação negativa para o Dragendorff (Figura 38).

Figura 38 – CCD revelada pelos reagentes de solução de ácido fosfomolibdico (a), Dragendorff (b) e ninidrina (c), respectivamente.

5.5.2 Teste de toxicidade para avaliação de solventes utilizados no bioensaio

Resende et al. (2012) testaram e concluíram que os solventes etanol, metanol, acetona e dimetilsulfóxido (1%) e o surfactante Tween 80 (1%) não seriam tóxicos para as larvas de duas espécies de carrapatos ixodídeos.

Considerando a necessidade do uso de solventes que não fossem interferentes quanto à toxicidade nos processos de avaliação de bioensaios com escorpiões, foram testados três solventes e um surfactante comumente indicados em pesquisas com outras espécies de aracnídeos.

Após período de observação de 10 dias seguidos, para avaliação do número de exemplares vivos e mortos, o solvente etanol 70% apresentou a menor toxicidade para escorpiões com uma mortalidade de 4% (2/50). O solvente etanol 100% apresentou mortalidade de 20% (10/50); o solvente DMSO de 76% (38/50) e o surfactante Tween 20 de 100% (50/50).

Com base neste resultado, o solvente etanol 70% foi adotado para aplicação nos protocolos experimentais de bioensaios com escorpiões *T. serrulatus*.

5.5.3 Bioensaio *in vivo* com as frações ativas de *Paecilomyces* sp.

As seis frações apresentaram as seguintes massas para o bioensaio (A=56 mg; B=163 mg; C=516 mg; D=377,6 mg; E=189 mg e F=17 mg), com a seguinte dosagem de ingrediente ativo por escorpião (A=11,2 µg; B=32,6 µg; C=103,2 µg; D=75,52 µg; E=37,8 µg e F=3,4 µg).

Após um período de observação de 15 dias seguidos, a fração D apresentou a maior mortalidade de escorpiões (27/50 = 54%), apresentando um efeito “knock-down” de 30% (15/50) nas primeiras 24 horas e atingindo 50% de mortalidade no 10º dia de atividade. Vários escorpiões apresentaram sinais de hiperexcitabilidade e alterações de comportamento e motilidade. Os demais resultados de mortalidade foram os seguintes: fração C 32% (16/50), fração B 18% (9/50), fração E 18% (9/50), testemunha 14% (7/50), fração A 12% (6/50) e fração F 2% (1/50).

Foram analisados os resultados comparativos de médias de contagens de escorpiões vivos, através do teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Verificou-se que as médias das frações C, D e F diferiram significativamente e individualmente, de cada uma das demais médias, enquanto que não houve diferença significativa entre as médias das frações, A, B e testemunha (Tabela 19). Também não houve diferença significativa entre as médias das frações B e E.

Tabela 19 - Avaliação da mortalidade de *T. serrulatus* às frações ativas resultantes da fração acetato de etila de *Paecilomyces* sp.

Média de contagem do número de escorpiões vivos em cada tratamento.		
Tratamento	Média	Agrupamento (Tukey)
Fração F	49.67	A
Testemunha	46.47	B
Fração A	46.33	B
Fração B	45.93	B C
Fração E	44.27	C
Fração C	40.47	D
Fração D	27.67	E

Médias com diferentes letras diferiram significativamente entre si ($P=0,05$).

Com base nestes resultados, verificamos que as frações C e D apresentaram as menores médias significativas de escorpiões vivos, indicando assim maior efeito escorpionicida no bioensaio (Figura 39).

Figura 39 - Gráfico do bioensaio de mortalidade de *T. serrulatus* às frações ativas resultantes da fração acetato de etila de *Paecilomyces* sp.

Estas frações foram selecionadas quanto à sua atividade biológica, sendo separado um quantitativo de massa de 1mg das frações C e D, para as análises sequenciais por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a EM de alta resolução (UPLC-HRMS).

No período de execução (26/07 a 09/08/2016) a temperatura ambiente externa oscilou de 20,3 °C a 22,3 °C e a umidade ambiente externa variou de 48 a 58%. A temperatura interna no bioensaio oscilou de 20,3 °C a 22,6 °C e a umidade interna variou de 68 a 79%.

5.6 Análise dos registros de temperatura e umidade nos bioensaios

Os registros de dados de temperatura e umidade durante os bioensaios apresentaram estabilidade térmica no período, com pequena oscilação na faixa de temperatura e nos índices de umidade (Tabela 20).

Os fatores abióticos (luz, temperatura e umidade) apresentam grande importância para o ciclo de vida e sobrevivência dos escorpiões, desempenhando papéis críticos na determinação de áreas adequadas para ocorrência de infestações. Grandes variações nesses fatores físicos e químicos envolvidos podem se tornar

limitantes quando associadas naturalmente a longos períodos de seca, inundações por elevada pluviosidade e intensas modificações edáficas. A temperatura e a umidade são fatores significativos para a estruturação de comunidades de invertebrados em ecossistemas, onde flutuações anuais podem determinar uma variação biogeográfica e influenciar na presença ou ausência de espécimes de artrópodes em determinada região (WARD e STANFORD, 1982).

O nível de resposta dos escorpiões ao regime térmico é regulado por padrões de temperatura e amplitudes sazonais, com taxas de mudança relacionadas com outros componentes ambientais, tal como o fotoperíodo. A história térmica a que um organismo foi exposto modela suas respostas operativas em níveis de organização populacional, manifestando-se em escalas de tempo, tanto ecológicas como evolutivas (SILVEIRA, 2004).

Tabela 20 - Quadro comparativo dos registros de temperatura e umidade nos bioensaios.

Período	Ambiente Externo				Ambiente Interno			
	Temperatura (° C)		Umidade (%)		Temperatura (° C)		Umidade (%)	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
12/05 a 26/05/14	23,8	25,8	42	70	23,6	26	58	89
28/05 a 11/06/14	22,1	24,5	45	65	22,6	25,4	77	88
25/06 a 09/07/14	23,3	24,7	42	57	23,3	25,1	70	84
06/08 a 20/08/14	21,7	24,5	38	57	21,6	25,1	72	88
24/09 a 07/10/14	25,3	27,5	36	59	25,4	28,2	63	89
14/10 a 28/10/14	28,7	31,7	32	50	28,5	32,1	61	79
16/09 a 30/09/15	23	25,9	34	49	23,5	26	38	78
27/01 a 10/02/16	24,8	26,8	34	50	25,2	27,4	61	79
13/02 a 27/02/16	24,3	26,6	35	43	24,4	27,3	47	67
26/07 a 09/08/16	20,3	22,3	48	58	20,3	22,6	68	79

Os ritmos circadianos, com padrões de atividades comportamentais reguladas pelo ambiente, dependem das variações nos fatores de luz e temperatura. Níveis extremos em vários fatores abióticos podem determinar a mortalidade de escorpiões, tais como altas temperaturas e grandes tempestades que podem favorecer a ocorrência de incêndios florestais, inundações do solo e enchentes urbanas, respectivamente.

Embora os escorpiões, em geral, sejam artrópodes mesófilos, existem diferenças interespecíficas em suas preferências térmicas. Warburg e Polis (1990) demonstraram que reagem positivamente à umidade e negativamente à temperatura acima de 39 °C e determinaram zonas térmicas para quatro espécies diferentes de escorpiões (15 a 39° C; 23 a 27° C; 32 a 38° C e 34 a 35° C).

Chiariello (2017) apresentou os requerimentos básicos ambientais de temperatura e umidade relativa, para a manutenção de quatro espécies de escorpiões em cativeiro: *Pandinus imperator* (24 a 28 °C; 75 a 80%), *Hadogenes troglodytes* (24 a 30 °C; 70 a 75%), *Heterometrus longimanus* (24 a 32 °C; 70 a 75%) e *Hadrurus arizonensis* (24 a 30 °C; 55 a 65%).

Segundo Hoshino, Moura e De Paula (2006), *T. serrulatus* é uma espécie que apresenta grande resiliência e tolerância a diferentes zonas térmicas, com maior atividade observada em temperaturas entre 14°C e 38°C.

Em nosso experimento, os espécimes de *T. serrulatus* avaliados em todos os bioensaios, estiveram dentro de sua zona de conforto térmico, em todos os períodos analisados, não havendo influências significativas dos fatores abióticos de luz, temperatura e umidade nos resultados encontrados.

5.7 Caracterização molecular e identificação taxonômica do isolado de fungo selecionado

5.7.1 Identificação molecular da espécie do isolado de fungo selecionado

O resultado indicou uma sequência molecular identificada para a espécie *Paecilomyces formosus* Sakaguchi, May. Inoue & Tada, 1939 ex Houbraken & Samson, 2009 (*comb. nov.* – MycoBank MB512562).

Sequência molecular de *Paecilomyces formosus* (569 pb):

```
AAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCCTCGAGGCCCAACCTCTCATCCGTGTTGT
TAAACACCTGTTGCTTCGGCGGGGCCCGCCGTGGTTCACGCCGTGGCCGCCGG
GGGGCTTCTCGCCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCTCGAACGCTGCC
TTGAAGGTTGCCGTCTGAGTATGAAATTCAATCGTTAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCA
TTCCGAGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGG
TGTGTTGGGTCGACGTCCCCCCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGG
CGCCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACGCGCTCTGGTAGGGT
CGGCCGGCTGGCCAGCCAGCGACCTCACGGTCACCTATTATTTTCTCTTATGT
TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
```

5.7.2 Classificação taxonômica da espécie do isolado fúngico selecionado

Sua classificação taxonômica, de acordo com o Catalogue of Life (2017) e o Mycobank Database (2017), enquadra a espécie dentro do Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Eurotiales, Família Trichocomaceae, Gênero *Paecilomyces*.

O gênero hifomiceto *Paecilomyces* Bainier, 1907 foi estabelecido com base na espécie *Paecilomyces variotii*, sendo caracterizado por conidióforos verticilados com fiálides de base cilíndrica e alongada. Os conídios são tipicamente hialinos, unicelulares, de parede lisa e são produzidos em cadeias basípetas (SAMSON et al., 2009).

O gênero apresenta mais de quarenta espécies reconhecidas. Luangsa-Ard, Hywel-Jones e Samson (2004) apresentaram uma análise filogenética do 18S rDNA, demonstrando que *Paecilomyces* é polifilético em nível de duas ordens de ascomicetos, Eurotiales e Hypocreales.

P. formosus já foi isolado de variados substratos; solos tropicais e subtropicais, plantas e árvores tropicais, esponjas e corais marinhos e no homem (escarro broncoalveolar, medula óssea e sangue). Possuem uma morfologia com estruturas muito características (Figura 40), apresentando crescimento rápido em meio de cultivo (MEA ou BDA) a 30°C com preenchimento total de uma placa de cultivo em 7 dias, conforme demonstrado na figura 41-A.

A chave dicotômica de identificação proposta por Samson et al. (2009), baseia-se nos seguintes caracteres taxonômicos para a espécie *P. formosus*: conidióforos irregularmente ramificados, com conídios castanho acinzentados (medindo entre 3,2 a 5,7 por 2 a 2,9 μm) variáveis em formato, predominantemente elipsoidais a cilíndricos e apresentando extremidades truncadas, e clamidósporos globosos presentes, apresentando paredes lisas e fraca pigmentação, conforme micrografia demonstrada na figura 41-B.

Figura 40 – Morfologia de *Paecilomyces formosus*.

Figura 41 - (A) Placas de cultivo em BDA e (B) micrografia do fungo *Paecilomyces formosus*.
Foto: José Brites Neto, 2016.

Houbraken et al. (2010) adotaram esta taxonomia proposta que utiliza características morfológicas, em combinação com dados de extrólitos e sequências, e analisaram resultados filogenéticos das sequências ITS e beta-tubulina parcial de espécies do complexo de *P. variotii* (Figura 42), observando um alto grau de variação nas sequências ITS e tubulina dos isolados de *P. formosus*, através de dois grupos distintos, com alto suporte de bootstrap (um grupo com a estirpe tipo de *P. formosus*, e outro com a estirpe tipo de *P. lecythidis*).

Figura 42 - Árvores filogenéticas das sequências de loci analisadas: (A) ITS e (B) beta-tubulina.

Concluíram que os dois grupos poderiam representar duas espécies crípticas, uma vez que são morfológicamente semelhantes e produzem o mesmo padrão de extrólitos.

5.8 Caracterização química das frações com maior efeito escorpionicida (C e D)

As frações C e D foram submetidas à análise em UPLC acoplada a espectrometria de massas de alta resolução. Os cromatogramas e os espectros estão apresentados abaixo nas Figuras 43 a 47.

Analisando o cromatograma em modo positivo da fração C, foi observado um sinal intenso no tempo de retenção 5,58 minutos e m/z de 398,24 (Figura 43).

Figura 43 – Cromatograma em modo positivo da fração C.

Condições de análise: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ por 10 minutos.

No cromatograma em modo negativo da fração C, no mesmo tempo de retenção de 5,58 minutos, foi observado um sinal em m/z 374,243 (Figura 44).

A diferença entre unidades de m/z observadas nos dois espectros da fração C sugere que o valor de m/z em 398 em modo positivo corresponda a $[M+Na]^+$ e em modo negativo o valor de m/z 374 corresponda a $[M-H]^-$, indicando que a massa molar deste composto seja 375 Da.

Figura 44 - Cromatograma em modo negativo da fração C.

Condições de análise: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μm) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ por 10 minutos.

Figura 45 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração C, no tempo de retenção 5,568. Condições de análise: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μm) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ por 10 minutos.

Analisando o espectro de massas de alta resolução em modo positivo, confirma-se a presença de um sinal intenso, provavelmente indicando um composto majoritário em m/z 398,2437 referente à massa molar protonada $[M+Na]^+$ e um sinal em m/z 376,2602 referente à massa molar protonada $[M+H]^+$ (Figura 45).

Observa-se ainda neste espectro um valor de m/z em 773,49 referente ao dímero sodiado $[2M+Na]^+$, comum para alguns tipos de compostos.

Na análise do espectro de massas de alta resolução em modo negativo no tempo de retenção 5,568 minutos da fração C, foi observado um sinal em m/z 374,2434 referente à massa molar desprotonada $[M-H]^-$ (Figura 46).

A diferença entre unidades de m/z observadas nos respectivos espectros confirma a sugestão de uma massa molar de 375 Da para este composto.

Figura 46 - Espectro de massas de alta resolução em modo negativo da fração C, no tempo de retenção 5,568. Condições de análise: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ por 10 minutos.

Analisando o cromatograma em modo positivo da fração D, foi observado um sinal em m/z 398,242 no mesmo tempo de retenção de 5,58 minutos observado para a fração C (Figura 47).

Figura 47 - Cromatograma em modo positivo da fração D.

Condições de análise: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 µm) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ por 10 minutos.

Estes dados sugerem que as frações C e D apresentam o mesmo perfil químico, sendo que um mesmo composto presente com massa molar de 375 Da encontra-se em maior quantidade na fração C. Já os demais sinais observados são valores conhecidos de impurezas de solventes, mesmo sendo estes de grau HPLC.

5.9 Pesquisa de compostos associados em banco de dados

A partir destas informações, foi realizada uma busca no banco de dados “Dictionary of Natural Products” (DNP), utilizando-se como palavras-chave de busca a massa do composto de 375 Da (variação de 375,0 a 375,9 Da) e a fonte biológica (*Paecilomyces* ou *P. formosus*) ou uso biológico inseticida, não sendo encontrados resultados compatíveis com nenhuma das opções.

Utilizando-se como palavra-chave somente a massa do composto de 375 Da (variação de 375,0 a 375,9 Da), sem referências sobre fontes biológicas, foram encontrados 137 metabólitos secundários compatíveis.

Como importância biológica descrita para estes compostos foram referenciadas atividades citotóxica, antifúngica, antioxidante, antibacteriana, anti-helmíntica, antitussígena, desincrustante, inibidora do apetite, inibidora da trombina, inibidora da agregação plaquetária e da secreção de serotonina. Dentre as atividades biológicas apresentadas para estes metabólitos secundários não existiu qualquer referência sobre atividades inseticidas que estivessem associadas ao efeito escorpionicida demonstrado nos bioensaios. Devido ao grande número de compostos correspondentes com esta massa molar, purificações nestas frações ativas devem ser realizadas futuramente para atribuição e identificação inequívoca do composto responsável pela atividade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi demonstrada a existência de uma interação desarmônica significativa estabelecida entre cinco isolados de fungos filamentosos (*Mucor* sp., *Phialophora* sp., *Paecilomyces* sp., *Rhizopus* sp. e *Fusarium* sp.) e escorpiões *T. serrulatus*.

O isolado *Paecilomyces* sp. (identificado na análise molecular como da espécie *Paecilomyces formosus*) demonstrou uma maior mortalidade de escorpiões em relação aos demais fungos testados nos bioensaios.

A fração acetato de etila do extrato bruto de *P. formosus* demonstrou significativos resultados de mortalidade para escorpiões, neste estudo de interações.

As frações C e D, obtidas do fracionamento do extrato bruto de *P. formosus*, apresentaram potencial efeito escorpionicida no bioensaio *in vivo* com *T. serrulatus*.

A análise dos espectros de massa de alta resolução sugeriu que as frações C e D possuem o mesmo perfil químico, apresentando um composto com massa molar de 375 Da.

Foram encontrados 137 metabólitos secundários no banco de dados “Dictionary of Natural Products” (DNP), relacionados com a massa do composto de 375 Da (variação de 375,0 a 375,9 Da).

Dentre as atividades biológicas descritas para estes metabólitos secundários não existiu qualquer referência sobre atividades inseticidas que estivessem associadas ao efeito escorpionicida demonstrado nos bioensaios.

Estes resultados conferem ao estudo um caráter inédito quanto a descoberta de compostos com atividade escorpionicida, isolados como metabólitos secundários da espécie de fungo filamentoso *Paecilomyces formosus*. Esta contribuição para pesquisas futuras de inseticidas para o controle químico de escorpiões acrescenta um valor significativo no âmbito da prevenção destes agravos negligenciados pela Saúde Pública, em referência ao escorpionismo global, tanto no controle da espécie *Tityus serrulatus*, como demais espécies de importância médica no mundo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.B. **Atlas das espécies de *Tityus* C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae) do Brasil**. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BAHIENSE, R.C.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, n. 3-4, p. 319-324, 2006. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.05.011.
- BARKER, A.P. et al. Complexities associated with the molecular and proteomic identification of *Paecilomyces* species in the clinical mycology laboratory. **Medical Mycology**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 535-543, 2014. DOI: 10.1093/mmy/myu001.
- BARRAVIEIRA, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: Epub, 1999. 411 p.
- BEYS-DA-SILVA, W.O. **O complexo lipolítico de *Metarhizium anisopliae* e sua relação com o processo de infecção de hospedeiros artrópodes**. 2009. 165 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- BEYS-DA-SILVA, W.O. et al. Susceptibility of *Loxosceles* sp. to the arthropod pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: potential biocontrol of the brown spider. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 107, n. 1, p. 59–61, 2013. DOI: 10.1093/trstmh/trs006.
- BORDON, K.C.F.; COLOGNA, C.T.; ARANTES, E.C. Scorpion Venom Research Around the World: *Tityus serrulatus*. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. (Ed.). **Scorpion Venoms**. Toxinology. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2015, p. 411-437. DOI: 10.1007/978-94-007-6404-0_7.
- BORGES, A. et al. Molecular systematics of the neotropical scorpion genus *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. **Toxicon**, Oxford, v. 55, n. 2-3, p. 436–454, 2010. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.09.011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de controle de escorpiões**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos de Escorpionismo**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/1-Casos-Escorpionismo-2000-2015.pdf>> Acesso em: 12/02/2017(a).
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Óbitos por Escorpionismo**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/3-Obitos-Escorpionismo-2000-2015.pdf>> Acesso em: 12/02/2017(b).

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Casos de Ofidismo**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/1-Casos-Ofidismo-2000-2015.pdf>> Acesso em: 12/02/2017(c).

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Óbitos por Ofidismo**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/3-Obitos-Ofidismo-2000-2015.pdf>> Acesso em: 12/02/2017(d).

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Incidência do Escorpionismo**. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/2-Incidencia-Escorpionismo-2000-2015.pdf>> Acesso em: 12/02/2017(e).

BRITES-NETO, J.; BRASIL, J. Estratégias de controle do escorpionismo no município de Americana, SP. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 9, n. 101, p. 4-15, 2012.

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K.M.R. Modeling of spatial distribution for scorpions of medical importance in the São Paulo State, Brazil. **Veterinary World**, Morbi, v. 8, n. 7, p. 823-830, 2015. DOI: 10.14202/vetworld.2015.823-830.

BRITES-NETO, J.; GALASSI, G.G. Monitoramento epidemiológico de *Tityus serrulatus* em áreas urbanas, mediante dispositivo de luz ultravioleta. **Vetores & Pragas**, Rio de Janeiro, n. 30, p. 16-18, 2012.

BRITES-NETO, J. et al. Experimental study on the effect of microbiological interactions in the scorpion *Tityus serrulatus*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram, v. 3, n. 8, p. 73-83, 2014.

BROWNELL, P. Sensory Ecology and Orientational Behaviors. In: BROWNELL, P.; POLIS, G. (Ed.). **Scorpion biology and research**. New York: Oxford University Press, 2001. p. 159-183.

BUCARETCHI, F. et al. Clinical consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* scorpion stings in the region of Campinas, southeastern Brazil. **Toxicon**, Oxford, v. 89, p. 17-25, 2014. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.06.022.

CAFARCHIA, C. et al. Native strains of *Beauveria bassiana* for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 80, 2015. DOI: 10.1186/s13071-015-0693-9.

CANDIDO, D.M. Escorpiões. In: BRANDÃO, C.R.F.; CANCELLO, E.M. (Ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo**. São Paulo: Fapesp, 1999. v. 5, p. 23-34.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 225, p. 65-72, 1939.

CATALOGUE OF LIFE. **2016 Annual Checklist**. Naturalis Biodiversity Center. Disponível em: <<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2016/>> Acesso em: 19/02/2017.

CDC. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE. Public Health Service. **Pictorial keys to arthropods, reptiles, birds, and mammals of public health significance**. Atlanta: Communicable Disease Center, 1966. 192 p.

ČEŘOVSKÝ, V.; BÉM, R. Lucifensins, the Insect Defensins of Biomedical Importance: The Story behind Maggot Therapy. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 7, n. 3, p. 251-264, 2014. DOI: 10.3390/ph7030251.

CHEMnetBASE. **Dictionary of Natural Products** (DNP 25.2). Taylor and Francis Group, LLC. Disponível em: <<http://dnp.chemnetbase.com>> Acesso em: 30/01/2017.

CHENG, Y. et al. Farinosones A-C, Neurotrophic Alkaloidal Metabolites from the Entomogenous Deuteromycete *Paecilomyces farinosus*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, n. 11, p. 1854-58, 2004. DOI: 10.1021/np049761w.

CHIARIELLO, T.M. Veterinary Care of Scorpions. **Journal of Exotic Pet Medicine**, New York, 2017. In press. DOI: 10.1053/j.jepm.2017.01.030.

CHIPPAUX, J.P. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug Design, Development and Therapy**, Auckland, v. 6, p. 165-173, 2012. DOI: 10.2147/DDDT.S24754.

CHIPPAUX, J.P.; GOYFFON, M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 71-79, 2008. DOI: 10.1016/j.actatropica.2008.05.021.

COLOGNA, C.T. et al. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 16, n. 8, p. 920-932, 2009. DOI: 10.2174/092986609788923329.

COLOMBO, W.D.; ALENCAR, I.D.C.C. Etograma do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* Lutz & Mello 1922 (Scorpiones: Buthidae), em cativeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 576-581, 2014.

CONNOLE, M.D. Effect of fungal extracts on the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 207, 1969. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1969.tb01939.x.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Escorpionismo. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (Ed.). **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2a ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 214-224.

CUPO, P. et al. Escorpiões. In: MARCONDES, C.B. (Ed.). **Doenças Transmitidas e Causadas por Artrópodes**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 481-494.

CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 48, n. 6, p. 642-649, 2015. DOI: 10.1590/0037-8682-0237-2015.

D'ALESSANDRO, W.B.; HUMBER, R.A.; LUZ, C. Occurrence of pathogenic fungi to *Amblyomma cajennense* in a rural area of Central Brazil and their activities against vectors of Rocky Mountain spotted fever. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 188, n. 1-2, p. 156-159, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.02.016.

EHRET-SABATIER, L. et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. **The Journal of Biological Chemistry**, Strasbourg, v. 271, n. 47, p. 29537-44, 1996. DOI: 10.1074/jbc.271.47.29537.

EICKSTEDT, V.R.D. von. et al. Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (Perty) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo - Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 2, n. 2, 1996. DOI: 10.1590/S0104-79301996000200003.

ESTRADA-PEÑA, A.; GONZÁLEZ, J.; CASASOLAS, A. The activity of *Aspergillus ochraceus* (Fungi) on replete females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in natural and experimental conditions. **Folia parasitologica**, České Budějovice, v. 37, n. 4, p. 331-336, 1990.

ETO, M. Biochemical Mechanisms of Insecticidal Activities. In: HAUG, G.; HOFFMANN, H. (Ed.). **Chemistry of Plant Protection. Controlled Release, Biochemical Effects of Pesticides, Inhibition of Plant Pathogenic Fungi**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. v. 6, p. 65-107.

FAO. **Specifications for Agricultural Pesticides in agriculture**. Disponível em: <<http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/jmps/ps-new/en/>> Acesso em: 23/01/2017.

FELICIANO, M.A.M. (Coord.). **Informativo Sócio-Econômico do Município de Americana-SP**. Americana: SEPLAN – Unidade de Estatística e Análise Sócio-Econômica, 2016. n. 32, 145 p.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 71–93, 2008. DOI: 10.1007/s10493-008-9161-y.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 130, n. 3, p. 300-305, 2012. DOI: 10.1016/j.exppara.2011.11.004.

FORLANI, L.; PEDRINI, N.; JUÁREZ, M.P. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. **Research and Reports in Tropical Medicine**, Auckland, v. 2, p. 135–140, 2011. DOI: 10.2147/RRTM.S22961.

FROST, L.M. et al. A coumarin as a fluorescent compound in scorpion cuticle. In: FET, V.; SEIDEN, P.A. (Ed.). **Scorpions 2001**: In Memoriam Gary A. Polis. Burnham Beeches: British Arachnological Society, 2001. p. 365-368.

FUXA, J.R.; TANADA, Y. Epidemiological concepts applied to insect pathology. In: _____. (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. Hoboken: John Wiley & Sons, 1987. p. 3-22.

GAFFIN, D.; BROWNELL, P. Chemosensory Behavior and Physiology. In: BROWNELL, P.; POLIS, G. (Ed.). **Scorpion biology and research**. New York: Oxford University Press, 2001. p. 184-203.

GAFFIN, D.D. et al. Scorpion fluorescence and reaction to light. **Animal Behaviour**, London, v. 83, n. 2, p. 429-436, 2012. DOI: 10.1016/j.anbehav.2011.11.014.

GEORGE, J. et al. Malaria Mosquitoes Attracted by Fatal Fungus. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 5, p. 1-8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0062632.

GOYFFON, M.; TOURNIER, J.-N. Scorpions: A Presentation. **Toxins**, Basel, v. 6, n. 7, p. 2137-2148, 2014. DOI: 10.3390/toxins6072137.

GROVE, J.F.; POPLE, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 103-105, 1980. DOI: 10.1007/BF00443075.

GUO, Z. et al. Spectral Assignments and Reference Data. **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 45, n. 9, p. 777-780, 2007. DOI: 10.1002/mrc.2035.

HADLEY, N.F. Environmental Physiology. In: POLIS, G.A. (Ed.). **The Biology of Scorpions**. Stanford: Stanford University Press, 1990. p. 321-340.

HJELLE, J.T. Anatomy and Morphology. In: POLIS, G.A. (Ed.). **The Biology of Scorpions**. Stanford: Stanford University Press, 1990. p. 9-63.

HOOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed. Utrecht / Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili, 2000. 1126 pp.

HOSHINO, K.; MOURA, A.T.V.; DE PAULA, H.M.G. Selection of environmental temperature by the yellow scorpion *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 60-66, 2006. DOI: 10.1590/S1678-91992006000100005.

HOUBRAKEN, J. et al. Identification of *Paecilomyces variotii* in Clinical Samples and Settings. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 8, p. 2754-2761, 2010. DOI: 10.1128/JCM.00764-10.

HU, Q.; LI, F.; ZHANG, Y. Risks of Mycotoxins from Mycoinsecticides to Humans. **BioMed Research International**, New York, v. 2016, id. 3194321, 2016. DOI: 10.1155/2016/3194321.

İNCİ, A.; KILIÇ, E.; CANHİLAL, R. Entomopathogens in control of urban pests. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Ankara, v. 61, n. 2, p. 155-160, 2014.

IRAC. Insecticide Resistance Action Committee. International MoA Working Group. **IRAC Mode of Action Classification Scheme**. Issued, April 2016. Disponível em: <<http://www.irac-online.org/documents/moa-classification/?ext=pdf>> Acesso em: 23 jan. 2017.

ISBISTER, G.K.; BAWASKAR, H.S. Scorpion Envenomation. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 371, p. 457-463, 2014. DOI: 10.1056/NEJMra1401108.

ISHIYAMA, D. et al. Novel Selective Inhibitors for Human Topoisomerase I, BM2419-1 and -2 Derived from Saintopin. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 51, n. 12, p. 1069-1074, 1998.

JEGOROV, A. et al. Beauverolides L and La from *Beauverla Tenella* and *Paecilomyces Fumosoroseus*. **Phytochemistry**, London, v. 37, n. 5, p. 1301-1303, 1994. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)90402-3.

JERAM, A.J. Paleontology. In: BROWNELL, P.; POLIS, G. (Ed.). **Scorpion biology and research**. New York: Oxford University Press, 2001. p. 370-392.

JIAO, G.B.; ZHU, M.S. Cleaning behaviors in four scorpion species. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 16, n. 2, p. 376, 2010. DOI: 10.1590/S1678-91992010000200017.

KAAYA, G.P.; HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 913-926, 2000. DOI: 10.1023/A:1010722914299.

KANZOK, S.M.; JACOBS-LORENA, M. Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 49-51, 2006. DOI: 10.1016/j.pt.2005.12.008.

KHAN, A.L. et al. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, London, v. 12, n. 3, 2012a. DOI: 10.1186/1471-2180-12-3.

KHAN, A.L. et al. Mutualistic association of *Paecilomyces formosus* LHL10 offers thermotolerance to *Cucumis sativus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Berlin, v. 101, n. 2, p. 267-279, 2012b. DOI 10.1007/s10482-011-9630-x.

KIKUCHI, H. et al. Novel trichothecanes, paecilomycine A, B, and C, isolated from entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 45, n. 33, p. 6225–6228, 2004. DOI: 10.1016/j.tetlet.2004.06.107.

KLOOCK, C.T. Aerial insects avoid fluorescing scorpions. **Euscorpius**: Occasional Publications in Scorpiology, Huntington, n. 21, p. 1-7, 2005.

_____. A comparison of fluorescence in two sympatric scorpion species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 91, n. 2-3, p. 132–136, 2008. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2008.02.008.

KUBOI, T. et al. A case of cutaneous *Paecilomyces formosus* infection in an extremely premature infant. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 339-341, 2016. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.12.003.

LAUFER, J.; PELHATE, M.; SATTELLE, D.B. Actions of Pyrethroid Insecticides on Insect Axonal Sodium Channels. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 16, n. 6, p. 651-661, 1985. DOI: 10.1002/ps.2780160611.

LAWRENCE, R.F. Fluorescence in Arthropoda. **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**, Pretoria, v. 17, n. 2, p. 167-170, 1954.

LIRA, A.F.A. et al. Spatio-temporal microhabitat use by two co-occurring species of scorpions in Atlantic rainforest in Brazil. **Zoology**, Jena, v. 116, n. 3, p. 182-185, 2013. DOI: 10.1016/j.zool.2013.01.002.

LIU, J. et al. Antibacterial Polyketides from the Jellyfish-Derived Fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, n. 8, p. 1826-1829, 2011. DOI: 10.1021/np200350b.

LIU, J. et al. An anacardic acid analog from the Jellyfish-derived fungus *Paecilomyces variotii*. **Natural Product Sciences**, Seoul, v. 18, n.1, p. 8-12, 2012.

LOURENÇO, W.R. Nouvelle proposition de découpage sous-générique du genre *Tityus* C.L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae). **Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa**, Zaragoza, n. 39, p. 55–67, 2006.

_____. Parthenogenesis in scorpions: some history – new data. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 19-44, 2008. DOI: 10.1590/S1678-91992008000100003.

_____. Fluorescence in scorpions under UV light; can chaerilids be a possible exception? **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 335, n. 12, p. 731–734, 2012. DOI: 10.1016/j.crv.2012.11.001.

_____. Scorpion Diversity and Distribution: Past and Present Patterns. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. (Ed.). **Scorpion Venoms**. Toxinology. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2015a. p. 1-23. DOI: 10.1007/978-94-007-6404-0_15.

_____. What do we know about some of the most conspicuous scorpion species of the genus *Tityus*? A historical approach. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 21, n. 20, 2015b. DOI: 10.1186/s40409-015-0016-9.

_____. Scorpion incidents, misidentification cases and possible implications for the final interpretation of results. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 22, n. 21, 2016. DOI: 10.1186/s40409-016-0075-6.

LOURENÇO, W.R.; CUELLAR, O. Scorpions, Scorpionism, Life History Strategies and Parthenogenesis. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 1, n. 2, 1995. DOI: 10.1590/S0104-79301995000200002.

LOURENÇO, W.R. et al. The evolution of scorpionism in Brazil in recent years. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 2, n. 2, 1996. p. 121-134. DOI: 10.1590/S0104-79301996000200005.

LOURENÇO, W.R.; EICKSTEDT, V.R. Escorpiões de importância médica. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (Ed.). **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2a ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 198-213.

LOWE, G.; KUTCHER, S.R.; EDWARDS, D. A powerful new light source for ultraviolet detection of scorpions in the field. **Euscorpius: Occasional Publications in Scorpiology**, Huntington, n. 8, p. 1-7, 2003.

LU, D. et al. Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, n. 3, p. 515-522, 2008. DOI: 10.1007/s00253-008-1695-8.

LU, R. et al. New Tyrosinase Inhibitors from *Paecilomyces gunnii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 49, p. 11917-11923, 2014. DOI: 10.1021/jf504128c.

LUANGSA-ARD, J.J.; HYWEL-JONES, N.L.; SAMSON, R.A. The polyphyletic nature of *Paecilomyces sensu lato* based on 18S-generated rDNA phylogeny. **Mycologia**, Abingdon, v. 96, n. 4, p. 773–780, 2004.

LUCAS, S.M. et al. Butantan Institute: strategies to obtain scorpions for the production of anti-scorpion serum. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 530-533, 2010. DOI: 10.1590/S1678-91992010000400002.

LYNCH, P.A. et al. Prospective malaria control using entomopathogenic fungi: comparative evaluation of impact on transmission and selection for resistance. **Malaria Journal**, London, v. 11, n. 383, p. 1-15, 2012. DOI: 10.1186/1475-2875-11-383.

MAKITA, M.T. et al. Avaliação e seleção de fungos com potencial entomopatogênico para o escorpião amarelo *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones, Buthidae). In: II SEMANA ACADÊMICA DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2011, Seropédica. **Anais da II Mostra de trabalhos da Medicina Veterinária**. Seropédica: UFRRJ, 2011. p. 75-76.

MELO, D.R. **Ação de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae).** 2006. 38 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

MICHEREFF FILHO, M.; RODRIGUES DE FARIA, M.; WRAIGHT, S.P. **Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: Como estamos?** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

MINEO, M.F.; FRANCO-ASSIS, G.A.; DEL-CLARO, K. Repertório comportamental do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* Lutz & Mello 1922 (Scorpiones, Buthidae) em cativeiro. **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 5, n. 1, p. 23-31, 2003.

MIZUSHINA, Y. et al. Formosusin A, a novel specific inhibitor of mammalian DNA polymerase β from the fungus *Paecilomyces formosus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 1070–1076, 2014. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.12.038.

MONTEIRO, S.G.M. et al. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 113-116, 1998.

MONTEIRO, S.G.M. et al. Isolation of fungi in ixodids ticks naturally infected. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 10, n. 1, p. 137-143, 2003.

MORAIS, P.B.; ROSA, C.A. Interações entre *Drosophila* e Leveduras em ambientes tropicais. In: MARTINS, R.P.; LEWINSOHN, T.M.; BARBEITOS, M.S. (Ed.). **Ecologia e comportamento de Insetos**. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, 2000. v. 8, p. 321-336. Série Oecologia Brasiliensis.

MORAIS-URANO, R.P.; CHAGAS, A.C.S.; BERLINCK, R.G.S. Acaricidal action of destruxins produced by a marine-derived *Beauveria felina* on the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 132, n. 3, p. 362–366, 2012. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.08.011.

MWANGI, E.N. et al. Predators, parasitoids and pathogens of ticks: a review. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 1, n. 3, p. 147-156, 1991. DOI: 10.1080/09583159109355195.

MYCOBANK DATABASE. **Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks**. International Mycological Association (IMA). Disponível em: <<http://www.mycobank.org/>> Acesso em: 19/02/2017.

NARO. Growth on a plate and micrograph of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Entomopathogenic Fungi Database** (EPFDB). Disponível em: <<http://www.naro.affrc.go.jp/org/fruit/epfdb/Ebun/Eindex.htm>> Acesso em: 11/02/2017.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. **PubChem BioAssay Database**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 23/01/2017.

OLIVEIRA, J.S.P.; SOUZA, C.M.V. Estudo de caso: Implantação do programa de controle de escorpiões em um município do estado do Rio de Janeiro. In: ESCORPIONISMO - ATUALIZAÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL, 2011, Niterói. **Resumos...** Niterói: Instituto Vital Brazil, 2011.

OUTEDA-JORGE, S. **Corte e aspectos da biologia reprodutiva do escorpião brasileiro *Tityus bahiensis* (Scorpiones: Buthidae)**. 2010. 179 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PAVAN M.; VACHON M. Sur l'existence d' une substance fluorescente dans les teguments des scorpions (Arachnida). **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 239, n. 23, p. 1700-2. 1954.

PIMENTA, A.M.C. et al. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 15, n. 17, p. 1562–1572, 2001. DOI: 10.1002/rcm.415.

PORTO, T.J.; BRAZIL, T.K. Quem são os escorpiões? In: BRAZIL, T.K.; PORTO, T.J. (Ed.). **Os Escorpiões**. Salvador: EDUFBA, 2010. p. 15–32.

PORTO, T.J.; BRAZIL, T.K.; SOUZA, C.A.R. Diversidade de escorpiões do Brasil. In: BRAZIL, T.K.; PORTO, T.J. (Ed.). **Os Escorpiões**. Salvador: EDUFBA, 2010. p. 47–63.

PRENDINI, L.; WHEELER, W.C. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. **Cladistics**, Westport, v. 21, n. 5, p. 446–494, 2005. DOI: 10.1111/j.1096-0031.2005.00073.x.

PUCCA, M.B. et al. Scorpionism and Dangerous Species of Brazil. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. (Ed.). **Scorpion Venoms**. Toxinology. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2015a, p. 299-324. DOI: 10.1007/978-94-007-6404-0_20.

PUCCA, M.B. et al. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. **Toxicon**, Oxford, v. 108, p. 272-284, 2015b. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.10.015.

RAMIRES, E.N.; NAVARRO-SILVA, M.A.; MARQUES, F.A. Chemical Control of Spiders and Scorpions in Urban Areas. In: STOYTCHIEVA, M. (Ed.). **Pesticides in the Modern World** - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment. Rijeka: InTech, 2011. p. 553-600. DOI: 10.5772/16562.

RESENDE, J.D.S.A. et al. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 131, n. 2, p. 139-142, 2012. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.03.002.

ROOT, T.M. Neurobiology. In: POLIS, G.A. (Ed.). **The Biology of Scorpions**. Stanford: Stanford University Press, 1990. p. 341-413.

RUPPERT, E.E; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7a ed. São Paulo: Roca, 2005. 1168p.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. **Persoonia**, Leiden, v. 22, p. 14-27, 2009. DOI: 10.3767/003158509X418925.

SANTANA-NETO, P.L. et al. Natural occurrence of the *Fusarium solani* on *Tityus stigmurus* (Thorell, 1876) (Scorpiones: Buthidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 1, p. 151-153, 2010. DOI: 10.1590/S1519-69842010000100021.

SCHOLTE, R.G.C. et al. Inter- and intrapopulational genetic variability of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 112, n. 2, p. 97-100, 2009. DOI: 10.1016/j.actatropica.2009.07.002.

SILVA, C.A.D. **Microorganismos entomopatogênicos associados a insetos e ácaros do algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2000. doc. 77, 42 p.

SILVEIRA, M.P. **Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. doc. 36, 68p.

SISSOM, W.D. Systematics, Biogeography, and Paleontology. In: POLIS, G.A. (Ed.). **The Biology of Scorpions**. Stanford: Stanford University Press, 1990. p. 64-160.

SISSOM, W.D.; POLIS, G.A.; WATT, D.D. Field and Laboratory Methods. In: POLIS, G.A. (Ed.). **The Biology of Scorpions**. Stanford: Stanford University Press, 1990. p. 445-461.

SONI, N.; PRAKASH, S. Synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Aspergillus niger* and its efficacy against mosquito larvae. **Reports in Parasitology**, Princeton, v. 2, p. 1-7, 2012. DOI: 10.2147/RIP.S29033.

SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010. 56 p.

SOUZA, B.K. ***Metarhizium anisopliae*: Estudo funcional do gene *emp1* e análise transcricional de quitinases em diferentes estágios de diferenciação celular.** 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SOUZA, C.M.V. Padronização da avaliação laboratorial de ferramentas químicas e naturais no controle de escorpiões. In: ESCORPIONISMO - ATUALIZAÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL, 2011, Niterói. **Resumos...** Niterói: Instituto Vital Brazil, 2011.

_____. Notas sobre o Escorpionismo no Brasil e o esforço para seu controle. **Vetores & Pragas**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 19-23, 2012.

_____. Urban Scorpion Populations and Public Health in Brazil. In: MÜLLER, G.; POSPISCHIL, R.; ROBINSON, W.H. (Ed.). **Proceedings of the Eighth International Conference on Urban Pests**. Veszprém: OOK-Press Kft., 2014. p. 217-221.

SOUZA, C.A.R. et al. On the *Tityus stigmurus* complex (Scorpiones, Buthidae). **Zootaxa**, Auckland, v. 1987, p. 1–38, 2009.

SRINIVAS, T.; HÜGEL, H.M.; KRISHNA, P.R. Total synthesis of catenioblin B. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 55, n. 43, p. 5952-5954, 2014. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.09.034.

STACHEL, S.J.; STOCKWELL, S.A.; VAN VRANKEN, D.L. The fluorescence of scorpions and cataractogenesis. **Chemistry & Biology**, London, v. 6, n. 8, p. 531-539, 1999. DOI: 10.1016/S1074-5521(99)80085-4.

STAHNKE, H.L. UV light, a useful field tool. **BioScience**, Washington, v. 22, n. 10, p. 604-607, 1972. DOI: 10.2307/1296207.

STOCKMANN, R. Introduction to Scorpion Biology and Ecology. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. (Ed.). **Scorpion Venoms**. Toxinology. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2015. p. 25-59. DOI: 10.1007/978-94-007-6404-0_14.

TANAJURA, H.S.; BRAZIL, T.K.; TELES, A.M.S. Scorpion accidents in Bahia, Brazil: a retrospective study of underreportings by SINAN in 2006. **Brazilian Journal of Medicine and Human Health**, Salvador, v. 1, n. 2, p. 195-203, 2013. DOI: 10.17267/2317-3386bjmhh.v1i2.247.

TELES, A.P.C.; TAKAHASHI, J.A. Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. **Microbiological Research**, Jena, v. 168, n. 4, p. 204–210, 2013. DOI: 10.1016/j.micres.2012.11.007.

UI, H. et al. Paecilaminol, a New NADH-Fumarate Reductase Inhibitor, Produced by *Paecilomyces* sp. FKI-0550. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 59, n. 9, p. 591-596, 2006. DOI: 10.1038/ja.2006.79.

VERÍSSIMO, C.J. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 14-23, 2013.

WANKHEDE, R.A. **Extraction, Isolation, Identification and Distribution of Soluble Fluorescent Compounds from the Cuticle of Scorpion (*Hadrurus arizonensis*)**. 2004. 61 p. Thesis (Master of Science in Biological Sciences) - Graduate College of Marshall University, Marshall University, Huntington, 2004.

WARBURG, M.R.; POLIS, G.A. Behavioral Responses, Rhythms and Activity Patterns. In: POLIS, G.A. (Ed.) **The Biology of Scorpions**. Stanford: Stanford University Press, 1990. p. 112-122.

WARD, J.V.; STANFORD, J.A. Thermal responses in the evolutionary ecology of aquatic insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 27, p. 97-117, 1982. DOI: 10.1146/annurev.en.27.010182.000525.

WARE, G.W. **The Pesticide Book**. Fresno: Thomson Publications, 1994. 340 p.

WANG, Q.; XU, L. Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 3, p. 2367-2377, 2012. DOI: 10.3390/molecules17032367.

WAQAS, M.; KHAN, A.L.; LEE, I-J. Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. **Journal of Plant Interactions**, Abingdon, v. 9, n. 1, p. 478-487, 2014. DOI: 10.1080/17429145.2013.860562.

WEBSTER, A. et al. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 207, n. 3-4, p. 302-308, 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.11.021.

WEI, P-Y. et al. A novel oxybis cresol verticilatin with highly varying degrees of biological activities from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces verticillatus*. **Journal of Asian Natural Products Research**, London, v. 16, n. 12, p. 1153-1157, 2014. DOI: 10.1080/10286020.2014.959438.

WENTZ, E.A. et al. Supporting Global Environmental Change Research: A Review of Trends and Knowledge Gaps in Urban Remote Sensing. **Remote Sensing**, Basel, v. 6, n. 5, p. 3879-3905, 2014. DOI: 10.3390/rs6053879.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WHO. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. WHO Pesticide evaluation scheme (WHOPES). **Pesticides and Their Application. For the control of vectors and pests of public health importance**. Geneva: World Health Organization, 2006. 114 p.

WHOPES. WHO Pesticide Evaluation Scheme. **Specifications for pesticides used in public health**. Disponível em: <<http://www.who.int/whopes/quality/newspecif/en/>> Acesso em: 23/01/2017.

WU, H-Y. et al. Regulation of the Growth of Cotton Bollworms by Metabolites from an Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces catenibliquus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 22, p. 5604–5608, 2012. DOI: 10.1021/jf302054b.

XU, L. et al. β -Resorcylic Acid Lactones from a *Paecilomyces* Fungus. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 73, n. 5, p. 885-889, 2010. DOI: 10.1021/np900853n.

XU, L. et al. Three New β -Resorcylic Acid Lactones from *Paecilomyces* sp. SC0924. **Chinese Journal of Chemistry**, Shanghai, v. 30, n. 6, p. 1273-1277, 2012. DOI: 10.1002/cjoc.201200406.

XU, L. et al. Paecilomycins J–M, four new β -resorcylic acid lactones from *Paecilomyces* sp. SC0924. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 54, n. 21, p. 2648-2650, 2013. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.03.036.

YAJIMA, A. et al. Synthesis and absolute configuration of formosusin A, a specific inhibitor of mammalian DNA polymerase β . **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 57, n. 18, p. 2012-2015, 2016. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.03.094.

YAMASHITA, Y. et al. Saintopin, a new antitumor antibiotic with topoisomerase ii dependent DNA cleavage activity, from *Paecilomyces*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 43, n. 10, p. 1344-1346, 1990.

YANG, M.J. et al. First total synthesis of paecilodepsipeptide A. **Chinese Chemical Letters**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 527-530, 2009. DOI: 10.1016/j.cclet.2009.01.032.

YUN, K. et al. Formoxazine, a New Pyrrolooxazine, and Two Amines from the Marine-Mudflat-Derived Fungus *Paecilomyces formosus*. **Bulletin of The Korean Chemical Society**, Seoul, v. 37, n. 1, p. 103-104, 2016. DOI: 10.1002/bkcs.10615.

ZHOU, K. et al. Paecilomycines A and B, Novel Diterpenoids, Isolated from Insect-Pathogenic Fungi *Paecilomyces* sp. ACCC 37762. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 98, n. 5, p. 642-649, 2015. DOI: 10.1002/hlca.201400272.

ANEXOS

ANEXO 1

Autorização SISBIO para atividades com finalidade científica

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 20562-6	Data da Emissão: 27/05/2016 01:17	Data para Revalidação*: 26/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Brites Neto	CPF: 842.562.147-04
Título do Projeto: Estudos de uma interação desarmônica observada entre fungos e escorpiões Tityus serrulatus em área de infestação urbana monitorada.	
Nome da Instituição : ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ QUEIROZ	CNPJ: 63.025.530/0025-81

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Pesquisa em nível de doutorado	07/2013	01/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de 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, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jardel Brasil	Pesquisador Auxiliar	273.015.728-08	278641799 ssp-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	AMERICANA	SP	BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO PIRACICABA E JAGUARI	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 33967436

Página 1/4

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 20562-6	Data da Emissão: 27/05/2016 01:17	Data para Revalidação*: 26/06/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: José Brites Neto	CPF: 842.562.147-04
Título do Projeto: Estudos de uma interação desarmônica observada entre fungos e escorpiões Tityus serrulatus em área de infestação urbana monitorada.	
Nome da Instituição : ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ QUEIROZ	CNPJ: 63.025.530/0025-81

1	Captura de animais silvestres in situ	Tityus bahiensis, Tityus serrulatus
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Amblyomma dubitatum (*Qtde: 1000), Amblyomma sculptum (*Qtde: 1000), Tityus bahiensis (*Qtde: 100), Tityus serrulatus (*Qtde: 2000)
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Tityus serrulatus, Tityus bahiensis

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

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Outros métodos de captura/coleta (Luz ultravioleta e Armadilhas de CO ₂), Captura manual, Coleta manual
---	---	---

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ QUEIROZ	Análise laboratorial

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 33967436

Página 2/4