UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da ação da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* e de suas frações na inibição do crescimento de fungos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós – Graduação em Toxicologia,
para a obtenção do título de Mestre em
Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia

Orientado: Welligton de Mattos Santussi

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santussi, Welligton de Mattos

Estudo da ação da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* e de suas frações na inibição do crescimento de fungos. Ribeirão Preto, 2007.
p.90 : il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani.

1. *Tityus serrulatus*. 2. TsTX-I. 3. Fungos Filamentosos

Folha de Aprovação

Nome do aluno: Welligton de Mattos Santussi

Título do trabalho: Estudo da ação da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* e de suas frações na inibição do crescimento de fungos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós – Graduação em Toxicologia,
para a obtenção do título de Mestre em
Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus queridos pais,Waldir e Wanderléia Santussi, pelo apoio, pelo crédito, pela confiança e principalmente por terem me ensinado que a educação é o maior patrimônio do ser humano.

E a minha querida esposa, Rogéria, pelo carinho e dedicação em tempo integral, e pela coragem em alçar vôo e comigo descobrir novos horizontes.

Amo muito todos vocês !

Agradecimientos

A minha ilustre orientadora, Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes, por ter aceito mais esse desafio e por prover o conhecimento técnico e científico necessário para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório com quem dividimos nossas angustias e vitórias cotidianas, em especial à Dr^a Daniela Trinca Bertazzi, pela grande amizade, pelas valiosas dicas e pelos inesquecíveis momentos de descontração na hora do café.

Às Técnicas, Karla e Flávia pela disposição em colaborar com o trabalho sempre que necessário, e aos demais técnicos do departamento pela cooperação.

À Cidinha, por auxiliar em todos os processos burocráticos envolvidos na pesquisa e pelas dicas pra controlar a ansiedade e perder peso.

Aos professores, Cris, Caliri, Fernando e Marco Antonio, pela agradável convivência nesses dois anos da minha estada no laboratório.

À professora Dr^a. Suraia Said, pela cessão dos fungos e pelo provimento de conhecimento técnico e disciplinar no trato com os mesmos.

E a todos os demais professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, que contribuíram de forma intelectual ou com a concessão de equipamentos fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos Vocês Meu muitíssimo obrigado!

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

Resumo

SANTUSSI, W.M. Estudo da ação da peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* e de suas frações na inibição do crescimento de fungos. 2007. 90f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2007.

Os peptídeos Antimicrobianos são componentes da imunidade inata de organismos procariotos e eucariotos, e são utilizados na primeira linha da defesa imune desses organismos. Neste trabalho, nós avaliamos os efeitos da peçonha de *Tityus serrulatus* (PTs) e de sua principal toxina, a TsTX-I, uma β -neurotoxina, no crescimento dos fungos. A TsTX-I foi isolada da PTs por cromatografia de troca iônica. Sua pureza foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (C18). A inibição do crescimento de diferentes fungos filamentosos (*Neurospora crassa*, *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium waksmanii*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium veridicatum*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenix*, *Aspergillus fumigatus* e *Talaromyces flavus*) foi avaliada por ensaio quantitativo em leitor de microplacas como descrito por (Broekaert et al., 1990). A PTs (100 e 500 μ g) foi mais ativa na inibição do crescimento de *A. nidulans*, *A. terreus*, *P. verrucosum* e *P. corylophilum*. A TsTX-I (6, 3, 1,5 e 0,7 μ g) mostrou atividade antifúngica dose-dependente contra *A. nidulans*, inibindo até 100% o crescimento em concentrações superiores a 3 μ g/poço. A inibição do crescimento de *A. nidulans* foi mais intensa quando a TsTX-I foi adicionada ao meio de cultura no tempo inicial do que após 6 h de germinação livre. A adição de íons Ca^{++} ao meio de cultura potencializou a ação da TsTX-I contra *A. nidulans*, *P. verrucosum* e *P. corylophilum*. Ensaio realizado na presença de um conhecido bloqueador de canais para Na^+ , a Tetrodotoxina, mostraram que esta não foi capaz de interferir na atividade antifúngica da TsTX-I. A TsTX-I induz despolarização em terminações nervosas por alterar o mecanismo de ativação de canais para sódio e peptídeos da peçonha de escorpiões que atuam como desestabilizadores de membrana parecem ser parte de um sistema de defesa antibacteriano e antifúngico destes animais. É provável que a TsTX-I induza a despolarização das membranas dos fungos e este efeito pode estar, pelo menos em parte, relacionado à sua atividade antifúngica.

Palavras Chave: 1. *Tityus serrulatus*. 2. TsTX-I. 3. Atividade antifúngica

Abstract

SANTUSSI, W.M. Antifungal properties of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin TsTx-I. 2007. 90f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2007.

Antimicrobial peptides appear to be ubiquitous and multipotent components of the innate immune defense arsenal used by both prokaryotic and eukaryotic organisms. They are used in the first line of immune defense. In this work, we evaluate the effects of *Tityus serrulatus* venom (Tsv) and its major toxin TsTX-I, a β -neurotoxin, on fungi growth. TsTX-I was isolated from Tsv by ion-exchange chromatography. Its purity was confirmed by reverse-phase (C18) high performance liquid chromatography. The growth inhibition of different filamentous fungi (*Neurospora crassa*, *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium waksmanii*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium veridicatum*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenix*, *Aspergillus fumigatus*, and *Talaromyces flavus*) was evaluated by quantitative microplate reader assay (Broekaert et al., 1990). Tsv (100 μ g and 500 μ g) was more active in inhibiting growth of *A. nidulans*, *A. terreus*, *P. verrucosum* and *P. corylophilum*. TsTX-I (6 μ g, 1.5 μ g and 0.7 μ g) showed dose-dependent antifungal activity against *A. nidulans*, inhibiting 100% of fungal growth at concentration of 3 μ g/well. The growth inhibition of *A. nidulans* was more intense when TsTX-I was added to culture medium at the initial time than after 6 h of free germination. The addition of Ca^{++} ions on culture medium increased TsTX-I action against *A. nidulans*, *P. verrucosum* and *P. corylophilum*. Assays carried out in the presence of tetrodotoxin, a known Na^+ channel blocker, showed that it was not able to interfere on TsTX-I antifungal activity against *A. nidulans*. TsTX-I induces depolarization on nerve endings and it is known that the action of membrane destabilizing peptides in scorpion venoms seems to be part of an antibacterial and antifungal defense system. It is probably that TsTX-I induces depolarization of fungi membranes and this effect is, at least in part, responsible for its antifungal activity.

Keywords: 1. *Tityus serrulatus*. 2. TsTX-I. 3. antifungal activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular do Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol.

Figura 2- Estrutura molecular da Nistatina e Amfotericina B

Figura 3- Estrutura molecular da flucitosina

Figura 4- Principais equinocandinas em uso ou em desenvolvimento

Figura 5- Conidióforo, esterigmatas e conídios de *A.nidulans*

Figura 6- *Tityus serrulatus* Lutz & Mello

Figura 7- Distribuição geográfica de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* no estado de São Paulo

Figura 8- Perfil cromatográfico obtido de 400mg da peçonha de *T.serrulatus* em CM-celulose-52

Figura 9- Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes

Figura 10- Perfil representativo da troca de sais das frações obtidas através da cromatografia em CM-celulose-52

Figura 11- Perfil cromatográfico da fração XIII da PTs em Coluna de troca iônica C-18

Figura 12- Efeito do PTs sobre o crescimento dos fungos: *P. corylophyllum*; *T. flavus*; *N. crassa*; *A. nidulans*; *A. niger* e *P. ochrochloron*

Figura 13- Efeito do PTs sobre o crescimento dos fungos: *A. phoenix*; *A. terreus*; *P. verrucosum*; *P. viridicatum*; *P. wakismanii*; *A. fumigatus*

Figura 14- Ação das frações de I a VIII sobre o crescimento de *A. terreus*

Figura-15- Ação das frações IX, X, XI, XII-A e XII-B, sobre o crescimento de *A. terreus*

Figura 16- Ação da TsTX-I sobre o fungo *A. terreus*

Figura 17- Ação das frações de I a VIII sobre o crescimento de *P. verrucosum*

Figura 18- Ação das frações IX, X, XI, XII-A e XII-B, sobre o crescimento de *P. verrucosum*

Figura 19- Ação da TsTX-I sobre o fungo *P. verrucosum*

Figura 20- Ação da TsTX-I sobre o fungo *P. corylophilum*

Figura 21- Ação das frações de I a VIII sobre o crescimento de *A. nidulans*

Figura 22- Ação das frações IX, X, XI, XII-A e XII-B, sobre o crescimento de *A. nidulans*

Figura 23- Efeito da TsTX-I sobre o crescimento de *A. nidulans*

Figura 24- Ação das frações de I a IV na presença de 1 mM de CaCl_2 , sobre o fungo *A. nidulans*

Figura 25- Ação das frações de V a VIII na presença de 1 mM de CaCl_2 , sobre o fungo *A. nidulans*

Figura 26- Ação das frações de IX a XI na presença de 1 mM de CaCl_2 , sobre o fungo *A. nidulans*

Figura 27- Ação das frações de XII-A e XII-B na presença de 1 mM de CaCl_2 , sobre o fungo *A. nidulans*

Figura 28- Ação da TsTX-I em presença de CaCl_2

Figura 29- Efeito da TsTX-I sobre o crescimento de *A. nidulans* na presença de bloqueador de canal para Na^+ , Tetrodotoxina (TTX)

Figura 30- Ensaio para análise de alterações na morfologia fúngica

Figura 31- Estrutura molecular da TsTX-I

Figura 32- Estrutura Molecular da Drosomicina

Figura 33- Alinhamento das seqüências de aminoácidos da TsTX-I e Drosomicina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição geográfica dos escorpiões do gênero *Tityus* no Brasil.

Tabela 2- Recuperação das frações cromatografadas da Peçonha de *Tityus serrulatus*.

Tabela 3- Contagem de UFC de *A. nidulans* na presença de 3 µg de TsTX-I, em meio PDA.

e da Tityustoxina-I (TsTX-I)

Tabela 4- Contagem de UFC de *A. nidulans* na presença de 1,5 µg de TsTX-I, em meio PDA suplementado com 1 mM de CaCl₂.

Tabela 5- Análise da atividade hemolítica a Peçonha de *Tityus serrulatus*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>A. phoenix</i>	<i>Aspergillus phoenix</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>N.crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>P. wakismanii</i>	<i>Penicillium wakismanii</i>
<i>P. corylophilum</i>	<i>Penicillium corylophilum</i>
<i>P. ochrocloron</i>	<i>Penicillium ochrocloron</i>
<i>P. verrucosum</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
<i>P. veridicatum</i>	<i>Penicillium veridicatum</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth (meio liquido)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TTX	Tetrodotoxina
PTs	Peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Reagentes.....	18
3.2. Aparelhos utilizados	18
3.3. Peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	18
3.4. Animais.....	18
3.5. Obtenção da peçonha solúvel.....	19
3.6. Cromatografia da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	19
3.7. Determinação do gradiente de concentração do tampão.....	20
3.8. Determinação da quantidade de proteínas.....	20
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida	20
3.10. Hemólise direta	21
3.11. Meios de cultura	21
3.12. Fungos	21
3.13. Ensaios de atividade antifúngica.....	22
3.14. Análise de alterações morfológicas.....	22
3.15. Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Purificação e critérios de Pureza.....	24
4.1.1. Perfil cromatográfico da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> em CM-Celulose-52	24
4.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	26
4.1.3. Dessalinização das frações.....	27
4.1.4. Cromatografia da fração XIII da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> em Coluna de fase reversa	28
4.2. Ensaios de atividade antifúngica da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>	29
4.2.1. Ensaios de atividade antifúngica das Frações I a VIII da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> sobre o fungo <i>A. terreus</i>	31
4.2.2. Ensaios de atividade antifúngica das frações IX a XII da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> sobre o crescimento de <i>A. terreus</i>	32
4.2.3. Ação da TsTX-I sobre o fungo <i>A. terreus</i>	33
4.2.4. Ensaios de atividade antifúngica das frações I a VIII da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> sobre o fungo <i>P. verrucosum</i>	34
4.2.5. Ensaios de atividade antifúngica das frações IX a XII da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> sobre o crescimento de <i>P. verrucosum</i>	35

4.2.6 Ação da TsTX-I sobre o fungo <i>P. verrucosum</i>	36
4.2.7 Ação da TsTX-I sobre o fungo <i>P. corylophilum</i>	37
4.2.8 Ensaio de atividade antifúngica das Frações I a VIII da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> sobre o fungo <i>A. nidulans</i>	38
4.2.9 Ensaio de atividade antifúngica das Frações IX a XII da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i> sobre o crescimento de <i>A. nidulans</i>	39
4.2.10 Ensaio de atividade antifúngica da TsTX-I em <i>A. nidulans</i>	40
4.2.11 Ação das frações de I a IV em presença de 1mM de CaCl ₂ em <i>A. nidulans</i>	41
4.2.12 Ação das frações de V a VIII em presença de 1mM de CaCl ₂	42
4.2.13 Atividade das frações de IX a XI em presença de 1mM de CaCl ₂	43
4.2.14 Atividade das frações de XII-A e XII-B em presença de 1mM de CaCl ₂	44
4.2.15 Análise da ação da TsTX-I sobre o fungo <i>A. nidulans</i> na presença de mais cálcio..	45
4.3 Ensaio de atividade antifúngica da TsTX-I em presença de TTX.....	46
4.4 Determinação do tipo de atividade da toxina.	47
4.5 Contagem de UFC em concentração de 1,5µg na presença de 1mM CaCl ₂	47
4.6 Ação da TsTX-I sobre <i>Cândida albicans</i> em presença e ausência de 1mM de CaCl ₂ em meio RPMI.....	48
4.7 Hemólise direta.....	49
4.8. Análise de alterações morfológicas.....	50
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

I ntrodução

1. Introdução

Infecções fúngicas, visão geral

O progresso científico ocorrido na área da saúde nos últimos anos, em termos de técnicas preventivas e curativas, foi notável. Porém, a difusão e massificação de técnicas como o transplante de órgãos e a quimioterapia anticâncer originaram uma situação que vem se agravando continuamente (DEBONO; GORDEE, 1994; WHITE et al., 1998). A consequência é um aumento de infecções fúngicas oportunistas, principalmente em ambientes hospitalares, como tem sido registrado nas últimas duas décadas (STEPHENSON, 1997).

O maior uso de agentes antibacterianos e antimicóticos em anos recentes resultou no surgimento de resistência a estes fármacos. Um estudo com pacientes portadores de vírus HIV em fase terminal revelou que 33% destes apresentaram cepas resistentes de *Candida albicans* em suas cavidades orais (WHITE et al., 1998). Assim tornou-se urgente a necessidade de uma nova geração de agentes antimicóticos, uma vez que muitos dos fármacos atualmente em uso clínico têm efeitos colaterais indesejáveis, são ineficazes contra novos fungos ou levam a um rápido desenvolvimento de resistência (GHANNOUM; RICE, 1999).

Dados obtidos em hospitais dos Estados Unidos mostram que *Candida sp* responde por cerca de 8% a 10% do total de infecções de corrente sangüínea com comprovação microbiológica. Por outro lado, dados de necropsia mostram que até 25% dos pacientes com câncer morrem com evidência de envolvimento de vísceras por agentes fúngicos, particularmente *Candida sp* e *Aspergillus sp*. Em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, 20% podem evoluir com infecções fúngicas invasivas, dependendo do órgão transplantado. Importante observar que a mortalidade associada a tais micoses em pacientes imunocomprometidos pode chegar a 100% (COLOMBO, 2003).

A resistência clínica de fungos tem sido definida como a persistência ou progressão de uma infecção apesar do uso de terapias antimicrobianas apropriadas. Resistência primária ou intrínseca é atribuída a um microrganismo que se mostra resistente sem pré-exposição ao agente em questão. Já a resistência secundária ou adquirida ocorre após prévio e ou prolongado contato do microrganismo com um dado fármaco (WHITE et al., 1998).

Principais antimicóticos de uso clínico e seu modo de ação

As drogas antifúngicas exercem ações fungistáticas (apenas inibem o crescimento) ou fungicidas, direta ou indiretamente. O termo “fungicida” é empregado livremente para identificar agentes com atividade contra fungos tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, principalmente para aplicações agrícolas ou industriais. Para aplicações nos campos da veterinária e saúde pública, os termos, “antifúngico” e “fármaco antimicótico” são aplicados (GHANNOUM; RICE, 1999).

Os fármacos antimicóticos empregados atualmente são distintos em termos do espectro de atividade, potência, índice terapêutico, desenvolvimento de resistência e modo de ação (BOERGERS, 1980; FOSTER et al., 1987; FUJIMURA et al., 1992).

Os antimicóticos podem ser agrupados didaticamente em três classes com base em seus locais de ação: agentes azólicos, os quais inibem a síntese de ergosterol em diferentes etapas da via metabólica; agentes poliênicos, que interagem físico-quimicamente com esteróis da membrana fúngica; e flucitosina, capaz de inibir a síntese de macromoléculas, como DNA e proteínas (GHANNOUM; RICE, 1999). Recentemente foi acrescentada ao grupo dos antimicóticos uma nova classe de medicamentos, as equinocandinas, que inibem a síntese de β - glucano destruindo a estrutura da parede celular provocando lise fúngica (DIOMEDI, 2004).

Azóis

Os azóis são antimicóticos, químicos, de largo espectro, atuando sobre leveduras e bolores, apresentam um anel imidazol livre unido a outros anéis aromáticos por meio de uma união N-C em posição 1. Os imidazóis foram descobertos em 1949, sendo que o nitrato de imidazol foi utilizado experimentalmente pela primeira vez em 1967. Atualmente dispõe-se de vários derivados do imidazol para uso sistêmico ou tópico no tratamento de diversas infecções micóticas. A ação fungistática ou fungicida é dependente da concentração da droga. Recentemente os triazólicos têm recebido maior destaque, sobretudo o fluconazol e o itraconazol, ambos com largo espectro de ação e efeitos tóxicos bastante reduzidos. Pela sua freqüente utilização, tem-se observado resistência entre os fungos, principalmente por espécies de *Candida* (LACAZ; NEGRO, 1991; ARENAS, 1993; ALVES, et al., 1999).

O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos. Os imidazóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol desmetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura. Isto causa

alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas, que resultam em necrose celular (RICHARDSON; WARNOCK, 1993; ALVES et al., 1999). A metabolização dos azóis é principalmente por via hepática, sendo os efeitos colaterais mais comuns náuseas e vômitos, quando utilizados por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas no uso tópico (SANDE; MANDELL, 1987; ARENAS, 1993).

Figura 1. Azóis mais utilizados: **A-** Cetoconazol, **B-** Fluconazol e **C-**Itraconazol (disponível on line em www.doctorfungus.org).

Poliênicos

Os antibióticos poliênicos possuem um grande anel lactônico macrocíclico e semelhante aos macrolídios antibacterianos como a eritromicina, daí serem chamados macrolídios poliênicos. A estrutura ativa o anel macrolídio com suas partes rígida lipofílica e flexível hidrofílica (SANDE; MANDELL, 1987). A anfotericina B é um antibiótico poliênico derivado do *Streptomyces nodosus*, cujo mecanismo de ação, se baseia na ligação com os esteróis da membrana celular, provocando uma alteração funcional com saída de metabólitos essenciais, nucleotídeos e proteínas, levando à morte celular (SANDE; MANDELL, 1987; RICHARDSON; WARNOCK, 1993).

A Anfotericina B é um dos antibióticos que mais causam efeitos colaterais, os quais se manifestam com regularidade nos pacientes que a utilizam. A droga é altamente irritante para o endotélio vascular, sendo a flebite um parafefeito freqüente. Junto com a

flebite, a maioria dos pacientes queixa-se de mal-estar, cefaléia, calafrios e apresentam febre durante a infusão venosa do antibiótico (TAVARES, 2001).

A nistatina, isolada do *Streptomyces noursei*, pertence ao grupo dos antibióticos poliênicos. É levemente hidrossolúvel e atua lesando a membrana citoplasmática dos fungos sensíveis e sua ação pode ser tanto fungicida como fungistática, estando indicada como terapia tópica em micoses superficiais, de pele e mucosa, principalmente na candidíase, sendo extremamente tóxica para uso parenteral. Nas doses terapêuticas, por via oral, a absorção pelo trato gastrointestinal é praticamente inexistente (SANDE; MANDELL, 1987).

Atualmente uma nova formulação da nistatina, nistatina lipossomal, está sendo utilizada, com menos efeitos tóxicos que a fórmula original, causando menos hemólise como efeito colateral. A nistatina lipossomal tem largo espectro de ação, atuando contra *Allescheria* sp, *Alternaria* sp, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, várias espécies de *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus neoformans*, *Mucor*, *Penicilium*, *Rhizopus*, *Rhodotorulla*, *Sporothrix* sp, *Trichosporon* sp, entre outros, mas não foi ativa contra algumas cepas de *Fusarium* testadas. Ela foi efetiva contra leveduras resistentes *in vitro* a outros antifúngicos como fluconazol, itraconazol e anfotericina B (HERBRECHT, 2000).

Na prática clínica, a nistatina só é utilizada para o tratamento de candidíase superficial, da pele e mucosas (inclusive esofágica, intestinal e vaginal). A administração por via intramuscular e intravenosa não é recomendada, pois a nistatina é muito tóxica, sendo capaz de causar hemólise, necrose e abscessos frios nos locais da injeção. Isto se deve a imediata ligação da nistatina nos esteróis das membranas das hemácias e células tissulares, causando a sua destruição. Sendo assim, só é empregada em uso tópico ou por via oral para tratamento da mucosa bucal e digestiva (TAVARES, 2001).

Figura 2. Principais poliênicos de uso clínico: **A-** Nistatina e **B-** Anfotericina B .(disponível on line em www.doctorfungus.org)

Flucitosina

A flucitosina ou 5-fluorocitosina é convertida em 5-fluorouracil na célula fúngica, pela enzima citosina desaminase, que é metabolizado em ácido 5-fluorodesoxiuridílico, o qual inibe a timidilato sintetase. O 5-fluorouracil é incorporado ao RNA em substituição ao uracil, alterando a síntese protéica na célula fúngica. As células dos mamíferos não convertem grandes quantidades de flucitosina em 5-fluorouracil, o que é determinante para a ação seletiva desses compostos. A droga é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, distribuindo-se amplamente pelo corpo, atingindo concentrações elevadas no líquido cefalorraquidiano. Os efeitos colaterais podem ser anemia, leucopenia e trombocitopenia, náuseas, vômitos, diarreia e enterocolite grave e hepatomegalia (SANDE; MANDELL, 1987; RICHARDSON; WARNOCK, 1993). A flucitosina atua contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida* sp, *Cladosporium* sp. *Phialophora*, não tendo efeito sobre *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Absidia* e *Rhizopus* (SANDE; MANDELL, 1987; LACAZ; NEGRO, 1991; RICHARDSON; WARNOCK, 1993). A manifestação de alterações cutâneas como: despigmentação, exsudação, ulceração e formação de crostas, foi descrita em cães com criptococose ou aspergilose tratados com associação flucitosina e anfotericina B e/ou triazoles. Sendo que, com a suspensão da flucitosina e a manutenção do restante dos medicamentos cessaram-se as alterações (MALIK et al., 1996).

Figura 3. Estrutura molecular da flucitosina (disponível on line em www.doctorfungus.org).

Equinocandinas : Caspofungina; Micafungina; Anidulafungina

As equinocandinas são lipopeptídeos sinteticamente modificados, derivados originalmente da fermentação de caldos de diferentes fungos. O primeiro componente de uma equinocandina foi identificado em 1974 (NYFELER; KELLER, 1974), em 1989 foi identificado o precursor da Caspofungina (MASUREKAR et al., 1992) e em 1990 o precursor da Micafungina (IWAMOTO et al., 1994). Desde então, muitos outros análogos derivados de equinocandinas foram pesquisados e posteriormente tiveram seus ensaios clínicos abandonados, devido a sua alta toxicidade e a sua formulação complexa (DIOMEDI, 2004).

As equinocandinas atuam no complexo de formação da parede celular fúngica, inibindo a enzima β -1,3-D- Glucano sintetase. O mecanismo de ação apresenta uma certa homologia com o mecanismo das penicilinas e seus derivados, que atuam nas transpeptidases e sintetases da parede bacteriana, por isso alguns autores se referem a essas drogas como penicilinas antifúngicas. Considerando que mamíferos não possuem parede celular, esse sítio de ação é estratégico para a ação de antifúngica sem exercer maiores danos ao hospedeiro (MAERTENS; BOOGAERTS, 2003).

As equinocandinas atualmente em uso ou em desenvolvimento, são hexapeptídeos cíclicos anfífilos, com uma cadeia lateral aminoacil-lipídica e peso molecular na casa de 1200 daltons (LUCAS et al., 1996; KURTZ; REX, 2001).

Figura 4- Principais equinocandinas em uso ou em desenvolvimento (DIOMED A.P, 2004)

A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de drogas antibacterianas disponíveis. Como consequência das infecções por fungos representarem o parasitismo de um organismo eucariótico sobre um outro eucariótico (homem e animal), com diferenças fisiológicas muito pequenas, quando comparado a infecções bacterianas, é necessário que as drogas antifúngicas tenham aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais importantes (LACAZ; NEGRO, 1991; ALVES et al., 1999).

Uma provável razão para a escassez de fármacos antifúngicos seria o senso comum até anos recentes de que infecções fúngicas críticas eram muito raras para atrair a atenção das companhias farmacêuticas. Um outro obstáculo é o fato dos fungos (ao contrário das bactérias) serem eucariotos, tornando mais difícil o desenvolvimento de fármacos que inibem o crescimento dos fungos, sem uma consequente toxicidade, inaceitável ao hospedeiro (STEPHENSON, 1997). Portanto o alvo terapêutico de escolha deveria ser a parede celular do fungo ou o sistema que regula o crescimento apical, que é característico e exclusivo dos fungos (ALBENGRES, 1998).

O crescimento apical, resulta de um equilíbrio entre a síntese e expansão de estruturas da parede e da membrana citoplasmática, e da aplicação de forças expansivas, derivadas da pressão de turgor existente no citoplasma e no citoesqueleto (KAMINSKYJ et al., 1992; KAMINSKYJ; HEATH, 1996).

Compreendendo o crescimento e o ciclo de vida de fungos filamentosos

O fungo *Aspergillus nidulans* foi descrito pela primeira vez por Eidam em 1883, sendo este amplamente estudado e hoje é tido como modelo biológico para estudos acadêmicos aplicados (PONTECORVO et al., 1953). Portanto vamos utilizá-lo como referência para exemplificar os mecanismos de crescimento fúngico e seu ciclo vital.

Fungos filamentosos são organismos haplóides, homotáticos e de ciclo de vida curto. O fungo *Aspergillus nidulans*, é facilmente cultivado, sem a necessidade de meios especiais, em temperatura de 37°C. Seu ciclo é formado por três fases, vegetativa, assexual ou conidiogênese e sexual ou ascoporogênese (PONTECORVO, 1952; CLUTTERBUCK, 1997).

O desenvolvimento do ciclo vegetativo pode ocorrer tanto por meio de fragmentos de hifas, como por esporos sexuais e assexuais. O início da germinação do conídio ocorre pelo reconhecimento da fonte de carbono (preferencialmente glicose), e o passo seguinte é a incorporação de água fazendo com que ocorra a expansão do conídio e aumento da adesão em seu substrato, desencadeando então todo o desenvolvimento do conídio e

estabelecendo o crescimento vegetativo (HARRIS,1997; HARRIS; HOFMANN, 1999; HARRIS, 2001). O período de reconhecimento dura aproximadamente 4 horas até o momento que ocorre a primeira divisão mitótica (quebra da dormência), a partir desse momento, nas 8 horas subseqüentes, o volume citoplasmático aumenta cerca de 10 vezes, em decorrência de três divisões nucleares que ocorrem sincronicamente e dão início a formação do tubo germinativo, que apresenta crescimento apical, polarizando seu crescimento na ponta do tubo, fazendo com que o fungo cresça sempre nessa direção pela deposição de parede celular. Após a terceira divisão mitótica o sincronismo das divisões nucleares diminui, e após algumas divisões, com a presença de núcleos próximos a região apical, dá-se início a formação de septos que delimitam células de 2 a 10 núcleos e permitem a passagem de organelas e núcleos entre as células. Uma vez estabelecido o crescimento polarizado da hifa e suas ramificações, tem início a colonização do substrato para a formação do tecido vegetativo, o micélio.

O fungo pode manter-se indefinidamente no estágio vegetativo do seu ciclo de vida, sendo que a conidiogênese normalmente ocorre após este período (KRONSTAD; STABEN, 1997; FIDDY; TRINCI, 1976; GOODAY, 1983; ROSENBERG; KESSEL, 1967; MORRIS, 1976).

A partir do momento em que o tubo germinativo se ramifica, as pontas da hifa deixam de ser o único sítio de crescimento polarizado e então o micélio passa a ter vários pontos de crescimento ativo, e a colônia vai adquirindo o seu aspecto circular, quando cultivada em meio sólido (HARRIS; KRAUS, 1998).

A esporulação assexual e sexual ocorre exclusivamente nas superfícies aeradas, e aproveitando-se desta condição é possível sincronizar e induzir o desenvolvimento da conidiogênese (AXELROD, 1972; LAW; TIMBERLAKE, 1980).

Após aproximadamente 16 horas da germinação do esporo, observa-se a primeira evidência fenotípica de especialização da hifa. A hifa aérea ramificada diferencia-se em conidióforo (figura 5), estrutura reprodutora do ciclo assexual. O processo de desenvolvimento e diferenciação do conidióforo até a formação do conídio, constitui a conidiogênese (ADAMS et al.,1998).

Figura 5- Conidióforo, esterigmatas primário e secundário e conídios de *A.nidulans* (Charles Mims University of Geórgia USA. Microscopia eletrônica de varredura. Disponível on-line em, www.biomedica.cellbiology.ubc.ca)

Peptídeos antimicrobianos

Venenos e toxinas de origem natural têm provocado grande fascinação nos homens devido ao seu poder de promover efeitos farmacológicos drásticos. Desde 1850 com os experimentos realizados utilizando o curare, o veneno das flechas dos índios sul-americanos, toxinas têm sido usadas cientificamente para elucidar mecanismos de ação fisiológica. Hoje toxinas podem ser utilizadas terapeuticamente e também podem ser o ponto de partida para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (STENLAKE, 1986; BOWMAN; SUTHERLAND, 1986).

Peptídeos antimicrobianos são antigas ferramentas evolutivas de defesa contra patógenos, amplamente encontrados na natureza em bactérias, protozoários, plantas e animais (ZELEZETSKY et al., 2004).

Desde o descobrimento de peptídeos antimicrobianos em invertebrados em 1981 por Boman e colaboradores, mais de 170 moléculas com estas propriedades foram isoladas de artrópodes, anfíbios, plantas e mamíferos (STEINER et al., 1981; BULET et al., 1999; GANZ; LEHRER, 1991). Todas elas compartilham características em comum, como baixo peso molecular (~ 5kDa), carga positiva em pH fisiológico, e a grande maioria são moléculas anfipáticas (possuem um grupo hidrofóbico e um hidrofílico), apresentando fitas β , pontes dissulfeto, α -hélices ou misturas dessas estruturas (BULET et al., 1999).

A maior parte dos estudos descritos na literatura, dizem respeito à atividade antibacteriana. A atividade antifúngica tem sido estudada para apenas alguns poucos peptídeos. A Drosomicina foi o primeiro peptídeo isolado de inseto a apresentar propriedade antifúngica. Trata-se de um peptídeo de 44 resíduos de aminoácidos incluindo 8 cisteínas ligadas internamente por 4 pontes dissulfeto: Cys1-Cys8, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 e Cys4-Cys7 (MICHAUT et al., 1996).

Peptídeos antimicrobianos têm sido isolados da peçonha de aranhas, marimbondos, abelhas e serpentes (KRISHINAKUMARI et al., 1997; YAN; ADAMS 1998).

Estudos realizados com peptídeos provenientes da peçonha de *Bothrops jararaca*, inibiram a germinação conidial e o desenvolvimento de hifas em fungos *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum* e *Candida lindemuthianum*. A análise microscópica sugeriu alterações na morfologia celular dos fungos, provavelmente pela ação de proteases presentes na peçonha e pela capacidade da mesma de interferir na permeabilização da membrana (DAÍ et al., 2002; GOMES et al., 2005).

Um pool da peçonha bruta de seis diferentes espécimes de *Crotalus durissus cumanensis*, apresentou a capacidade de inibir o crescimento de 20 espécies de fungos, entre elas a *Cândida sp* e o *Sporothrix schenckii* (MAGALDI et al., 2002).

Estudos realizados na Universidade da Califórnia com peptídeos isolados da peçonha da aranha *Lycosa carolinensis*, denominados lycotoxinas I e II, demonstraram efetividade na inibição do crescimento de cepas de *Candida albicans*, provavelmente pela capacidade da peçonha de desestabilizar eletronicamente a membrana celular do fungo, formando poros e alterando a permeabilidade da membrana (YAN.; MICHAEL.; ADAMS, 1998).

Em carrapatos, foram isolados dois fatores antibacterianos da hemolinfa de *Dermacentor variabilis*, que apresentam atividade contra bactérias Gram – positivas. Um desses fatores apresenta massa 14,5 kDa e apresenta semelhanças com a lisozima (JONHS et al., 1998).

, Foi detectada atividade antibacteriana e antifúngica na hemolinfa e no conteúdo intestinal de carrapatos *Boophilus microplus* não desafiados por infecções bacterianas. Um dos fatores identificados possui massa de 10 kDa e similaridade com outros peptídeos antimicrobianos (FOGAÇA et al., 1999).

Embora existam muitos trabalhos sobre a resposta imunológica em artrópodes, eles estão praticamente restritos a insetos, crustáceos e limulídeos. O estudo de outros grupos de artrópodes pode ser importante para se entender os processos de defesa de

maneira mais ampla, possibilitando compreender as relações existentes entre os vários sistemas bem como sua origem (FOELIX, 1996).

Toxinas escorpiônicas

Os escorpiões têm atraído a atenção dos zoologistas devido a sua capacidade de resistir às agressões do meio ambiente e a sua resistência excepcional a infecções bacterianas (GOYFFON; LANDON, 1998).

Os escorpiões são organismos interessantes devido ao seu tempo de evolução, sua importância médica e sua resistência a microorganismos, pela presença em sua peçonha de uma grande variedade de componentes biologicamente ativos.

A composição da peçonha varia dependendo da área habitada pelo escorpião e do tipo de dieta utilizada. Esta é solúvel em água e pode ser subdividida por centrifugação, obtendo-se uma fração insolúvel, não tóxica, constituída por mucoproteínas e restos de membranas. Na parte solúvel encontram-se os componentes tóxicos, principalmente uma mistura de proteínas básicas, e em menor proporção outros compostos como aminoácidos livres, sais inorgânicos, lipídeos, nucleotídeos, moléculas de baixo peso molecular como serotonina e histamina, inibidores de protease, liberadores de histamina, aminoácidos e outros componentes orgânicos (WATT; SIMARD, 1984; GWEE et al., 1996).

Estas peçonhas são consideradas fontes de neurotoxinas que interagem seletivamente com canais para Na^+ , K^+ ou Ca^{+2} sensíveis à voltagem sendo, portanto, ferramentas essenciais para o entendimento da base molecular da excitabilidade elétrica (VALDIVIA et al., 1992; De Bin et al., 1993). Estas toxinas têm sido utilizadas para estudar as propriedades estruturais e mecanismos de ação dos canais iônicos, examinar com detalhe as várias condutâncias normalmente presentes em diversos tipos de células (HILLE, 1992), identificar diferentes tipos de canais e o papel fisiológico dos mesmos. Também devido a sua alta afinidade, as toxinas podem ser usadas como ferramentas no isolamento de canais e no estudo de sua distribuição (LOMBET; LAZDUNSKI, 1984; LAZDUNSKI et al., 1986).

Apesar de as toxinas escorpiônicas serem amplamente utilizadas como ferramentas para o estudo de canais iônicos, esses venenos podem conter outros peptídeos interessantes como a fosfolipina e a imperatoxina-I, ambos com atividade fosfolipásica, além de peptídeos antimicrobianos e anti-malária (LEGROS; MARTIN-EUCLAIRE, 1997; VERDONCK et al., 2000; MOERMAN et al., 2002; CORZO, 2001).

Segundo Bertazzi et al. (2003), toxinas provenientes da peçonha de *T. serrulatus*, também são capazes de afetar a atividade lítica das vias clássica e alternativa do sistema complemento.

Recentemente foi evidenciada uma grande semelhança entre as toxinas escorpiônicas que atuam em canais para Na^+ e K^+ e defensinas de artrópodes. Essa similaridade sugere que as defensinas dos artrópodes e a neurotoxinas escorpiônicas possuem um ancestral em comum (FROY; GUREVITZ, 2004).

Algumas espécies de escorpiões freqüentemente pulverizam peçonha em seu próprio corpo para limpar a sujeira e se livrar de possíveis microorganismos saprófitas como fungos e bactérias. Esta observação feita pelo professor Gonzalez Sponga do Departamento de Biologia e Química do Instituto Universitário Pedagógico de Caracas Venezuela, que sugere a hipótese de que a peçonha desses escorpiões possa conter algum tipo de antibiótico (TORRES-LARIOS et al., 2000).

Recentemente, foram isolados e seqüenciados três peptídeos bioativos da peçonha de escorpiões sul africanos. Parabutoparina, do escorpião *Parabuthus schelechteri*, e Opitosporina 1 e 2 do escorpião *Opisthophthalmus caninatus*. Os três peptídeos apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica, empregados em concentrações micromolares (WILLEMS et al., 2004). Esses peptídeos pertencem a um grupo de peptídeos catiônicos, anfipáticos, contendo α -hélice e caracterizados pela ausência de cisteína. Membros deste grupo são amplamente encontrados na natureza e fazem parte de mecanismos de defesa inata destes organismos contra diferentes tipos de patógenos (ZASLOF, 2002).

Ensaio realizados com a opitosporina em diferentes concentrações, mostraram inibição do crescimento de fungos. O peptídeo foi capaz de inibir 50% do crescimento dos fungos *Neurospora crassa* (saprófita), *Botrytis cinérea* e *Fusarium culmorum* (fitopatogênicos), e *Saccharomises cerevisiae*. O estudo do mecanismo de ação do peptídeo sugeriu alterações na permeabilidade da membrana (MOERMAN et al., 2002).

O Hadrurin, um peptídeo isolado da peçonha do escorpião mexicano *Hadrurus aztecus*, em estudo recente, inibiu o crescimento de uma série de bactérias, dentre elas *Escherichia coli* e *Enterococcus cloacae* (TORRES-LARIOS et al., 2000).

***Tityus serrulatus*: Localização Geográfica, Acidentes e seu veneno**

O escorpião *Tityus serrulatus*, Lutz e Mello 1922 (Figura 6), mede cerca de 6 -7cm quando adulto e possui tronco marrom escuro com patas, pedipalpos e cauda amarelos. Apresenta serrilha na face dorsal dos segmentos distais da cauda, formada por pequenos dentes que confere o nome *serrulatus* à espécie.

Figura 6- Escorpião *Tityus serrulatus* Lutz & Mello 1922. (Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo).

O escorpião amarelo, como é conhecido, é responsável pelos acidentes de maior gravidade, inclusive óbitos, e pode ser encontrado em uma área que vai do estado do Paraná até a Bahia, ou seja, compreende os estados do sul, sudeste, centro-oeste e nordeste. São notificados anualmente, cerca de 8.000 acidentes, com uma letalidade variando em torno de 0,51%. Os acidentes por escorpiões são mais frequentes no período de setembro a dezembro. Ocorre uma discreta predominância no sexo masculino e a faixa etária de 25 a 49 anos é a mais acometida. A maioria das picadas atinge os membros, havendo predominância do membro superior (mãos e dedos), sendo São Paulo e Minas Gerais os estados que mais registram ocorrências de escorpionismo no Brasil (CENEPI - Ministério da saúde).

Tabela 1. Distribuição geográfica dos escorpiões do gênero *Tityus* no Brasil (disponível on line em www.fns.gov.br/cenepi, consultado em 25/09/2006).

NOME	NOMES	DISTRIBUIÇÃO
CIENTÍFICO	POPULARES	GEOGRÁFICA
<i>T. bahiensis</i>	escorpião marrom	MG, SP, PR, SC, RS, GO, MS
<i>T. cambridgei</i>	escorpião preto	AP, PA
<i>T. costatus</i>	escorpião	MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS
<i>T. fasciolatus</i>	escorpião	GO, DF
<i>T. metuendus</i>	escorpião	AC, AM, PA, RO
<i>T. serrulatus</i>	escorpião amarelo	BA, MG, ES, RJ, SP, DF, GO, PR
<i>T. silvestris</i>	escorpião	AC, AM, AP, PA
<i>T. stigmurus</i>	escorpião	BA, SE, AL, PE, PB, RN, CE, PI

De 1982 a 2000, foram registrados no centro de controle de intoxicações de Ribeirão Preto, que funciona junto a unidade de emergência do Hospital das Clínicas (HC-FMRP-USP), 9.228 pacientes, vítimas de picadas de escorpião. Em 75,2% dos casos o escorpião envolvido no acidente foi *T. serrulatus* e em apenas 9,5% dos casos o escorpião envolvido foi *Tityus bahiensis*, em 15,2% dos casos o agente agressor não foi identificado (CUPO et al., 2003)

A figura 7 demonstra a distribuição de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* no estado de São Paulo, baseado nos casos de envenenamento e registros de ocorrência (EICKSTEDT et al., 1996).

O quadro clínico do envenenamento é avaliado pelas manifestações locais e sistêmicas. As manifestações locais ocorrem em praticamente todos os casos e consistem em dor local de intensidade variável podendo chegar até ao insuportável. Em forma de queimação, agulhadas ou latejante, a dor aumenta de intensidade com a palpação e pode irradiar-se para a raiz do membro acometido. Frequentemente há parestesias. O ponto de inoculação do veneno pode não ser visível, entretanto podem ser encontrados halo eritematoso e edema discretos, sudorese e piloereção (CUPO et al., 2003). Nos envenenamentos mais graves a dor pode ser mascarada pelos efeitos sistêmicos, surgindo após a melhora das condições gerais do paciente.

Figura 7. Distribuição Geográfica de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* no estado de São Paulo (EICKSTEDT et al., 1996).

Manifestações sistêmicas

A liberação de acetilcolina causa aumento de secreção das glândulas, lacrimais, nasais, sudoríparas, da mucosa gástrica e do pâncreas, provocando lacrimejamento, rinorréia, sudorese e vômitos. Podem ser observados tremores, espasmos musculares, miose, bradicardia, hipotensão, priapismo e hipotermia.

Como consequência da liberação de catecolaminas podem ocorrer, midríase, arritmias respiratórias e cardíacas, taquicardia, hipertensão arterial, podendo evoluir para falência cardiocirculatória e edema agudo.

Cefaléia e convulsões causadas por encefalopatia hipertensiva e hemiplegias relacionadas com infarto cerebral, tem sido descritas mais raramente (CUPO et al., 2003).

O veneno de *Tityus serrulatus* (VTs), pode ser obtido por estimulação elétrica do telson do animal. É uma substância mucosa, opalescente e com aspecto leitoso (DINIZ; GONÇALVES, 1956; 1960; FISHER; BOHN, 1957).

O veneno de *T. serrulatus* tem sido extensivamente estudado e muitas de suas toxinas isoladas e caracterizadas (COUTINHO NETTO, 1975; TOLEDO; NEVES, 1976; POSSANI et al., 1977; 1981; SAMPAIO et al., 1983; 1991; MARTIN et al., 1985; ARANTES et al., 1994; PESSINI et al., 2001). Estas toxinas têm sido obtidas por modificações do método original de Gomes e Diniz (1966) que consistia na extração do veneno bruto com água, filtração em gel de sephadex G-25, seguida de cromatografia em CM-celulose 52.

Arantes et al. (1989) desenvolveram uma metodologia para a purificação do veneno de *T. serrulatus*, na qual foi abolida a filtração em gel de sephadex. O extrato do veneno foi cromatografado em coluna de CM-celulose-52 sendo obtidas 13 frações

protéicas (I – XIII), das quais, a XIII foi considerada pura. A caracterização química desta fração mostrou que a mesma é igual a toxina γ (POSSANI et al., 1977) ou TsTX-I (SAMPAIO et al., 1991), sendo a toxina mais abundante do veneno de *T. serrulatus* e a de maior toxicidade (ARANTES et al., 1989).

A TsTX-I, uma β -toxina com 64 aminoácidos, altera a dependência de voltagem da ativação de canais para Na^+ , para potenciais mais negativos, o que causa um aumento da tendência de membrana em deflagrar potenciais espontâneos e repetitivos (JONAS et al., 1986).

Neste trabalho avaliamos se a peçonha de *T. serrulatus*, a TsTX-I e as demais frações obtidas da cromatografia da peçonha em CM-celulose-52, possuem ação contra fungos filamentosos, considerando que a peçonha é rica em toxinas básicas, que possuem estruturas semelhantes às defensinas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL: O presente trabalho tem como objetivo identificar frações da peçonha de *Tityus serrulatus*, que apresentem ação inibitória sobre o crescimento de fungos, identificar e purificar os componentes de cada fração que forem responsáveis por esta ação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- i. Verificar a ação da peçonha de *T. serrulatus* e de suas frações sobre o crescimento dos fungos.
- ii. Purificar a(s) toxina(s) ativa(s) sobre o crescimento dos fungos, através de filtração em gel de Sephadex, cromatografia de troca iônica e/ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- iii. Avaliar possíveis alterações morfológicas dos fungos, induzidas pela toxina ativa.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

- Acrilamida – Sigma Chem. Co.
- Bis-Acrilamida – Sigma Chem. Co.
- “Coomasie Brilliant Blue” G-250 – Sigma Chem. Co.
- Persulfato de amônio – F. Maia S/A Ind. e Com.
- Resina de troca iônica CM-Celulose 52 – Whatman.
- SDS (dodecil sulfato de sódio) – Sigma Chem. Co.
- Temed (Tetrametiltilenodiamina) - Sigma Chem. Co.
- “Potato Dextrose Broth” – Sigma Chem. Co.
- “Potato dextrose agar” – Biolife.

Os demais reagentes e solventes eventualmente utilizados foram em grau analítico.

3.2. Aparelhos Utilizados

- Balança eletrônica digital BG- 400 – Gehaka.
- Balança analítica – Ohaus.
- Centrífuga Sorvall RC2-B.
- Coletor de Frações Ultrorac 2070 da LKB conectado a um sistema ultra violeta da Uvicord e um Registrador
- Condutivímetro RC 16C- Beckman.
- Cuba de Acrílico para eletroforese- Sigma – Aldrich.
- Espectrofotômetro U2001- Hitachi.
- Fonte de Corrente eletroforética EL-500- Deltronix.
- Liofilizador – Virts.
- Sistema de Cromatografia AKTA UPC 900 – GE Health Care.
- Microespectrofotômetro (leitor de ELISA) Sigma

3.3. Peçonha de *Tityus serrulatus* (PTs)

A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, extraída por estímulo elétrico do telson do animal, liofilizada e armazenada a -20°C, foi adquirida da *Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA* - Belo Horizonte, MG.

3.4. Animais

Carneiros merinos adultos machos foram sangrados para obtenção de hemácias utilizadas para ensaio de hemólise.

O material foi fornecido pelo biotério central do campus da USP de Ribeirão Preto.

3.5. Obtenção da peçonha solúvel

A peçonha foi dispersa em solução salina 0,9%, em concentrações pré-definidas e centrifugada a 11269 x g, durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm.

3.6. Cromatografia da peçonha de *Tityus serrulatus*

A cromatografia do extrato bruto da peçonha de *Tityus serrulatus* foi realizada como descrito por ARANTES et al. (1989). Nesta cromatografia foram obtidas 13 frações, sendo que apenas a fração XIII apresentou elevado grau de pureza (TsTX-I), como segue:

A amostra de 400 mg da PTs foi suspensa em 2,0 ml de tampão bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 0,01 mol/L, pH 7,7 a 0 °C. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g, por 10 minutos a 4°C, numa centrífuga Sorvall RC2-B. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de tampão gelado e novamente centrifugado. Os sobrenadantes obtidos foram reunidos e a mistura deixada em repouso por 24h a 0°C e novamente centrifugada a 12.000 x g, por 10 min. A seguir foi retirado o sobrenadante para ser aplicado a coluna, sendo que 20 μL do mesmo foram diluídos em 980 μL de de (NH_4HCO_3) 0,01 mol/L, para a leitura da absorbância em 280 nm.

Uma coluna de 2,5 x 63 cm foi preparada com CM-celulose-52 microgranular da Whatman. O tratamento da resina foi realizado da seguinte maneira: a resina foi suspensa em uma solução de NaOH 0,5 mol/L e após 5 min, filtrada em funil de placa sintetizada sob pressão reduzida e exaustivamente lavada com água destilada até pH neutro. A seguir, foi suspensa em HCl 0,5 mol/L por mais 5 min e novamente lavada com água destilada até pH neutro. Finalmente, a resina foi lavada com NH_4HCO_3 0,01 mol/L, pH 7,8, deaerada e colocada na coluna.

Após o empacotamento da coluna a mesma foi levada para câmara fria a 4°C e lavada com NH_4HCO_3 0,01 mol/L por uma noite, até equilíbrio completo testado por medida de condutividade. O fluxo foi então regulado para 20,5 mL/h.

O extrato do veneno bruto foi aplicado à coluna e eluído com bicarbonato de amônio 0,01 mol/L. A partir do tubo 150 (450 mL) iniciou-se um gradiente convexo de concentração, que consiste de um Kitassato de 1000 mL, contendo NH_4HCO_3 0,01 mol/L,

conectado a coluna e ao funil de separação contendo o tampão 1,0 mol/L. Foram coletadas frações de 3,0 mL, suas absorbâncias determinadas em 280 nm e colocadas em função do número das mesmas. As frações correspondentes a cada pico de absorbância foram reunidas e liofilizadas até completa remoção do sal.

A fração XIII do veneno de *T.serrulatus* (TsTX-I) foi diluída em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e aplicada em coluna de fase reversa C18 (Shim Pack CLC-ODS 5 μ m, 0,46 x 25,0 cm. Shimadzu Instruments Corp., Tokyo, Japan) equilibrada com tampão "A" (5% acetonitrila + 0,1 % ácido trifluoroacético), eluído com gradiente linear do tampão "B" (60% acetonitrila em 0,1 % ácido trifluoroacético), em fluxo de 1mL/min, como descrito anteriormente por Vasconcelos et al. (2005) para garantir a pureza e eliminar possíveis contaminantes.

Para assegurar a total ausência de sais de amônio antes do uso, as frações liofilizadas foram diluídas em solução de cloreto de sódio 0,9% e aplicadas em coluna HI-Trap dessalting conectada a um sistema AKTA de cromatografia líquida de alta pressão, onde eventuais resquícios de sais de amônio foram trocados integralmente por cloreto de sódio 0,9%.

3.7. Determinação do gradiente de concentração do tampão

O valor da concentração do tampão foi obtido experimentalmente, através da medida da condutividade das frações nos tubos.

Os valores de condutividade foram lançados em uma curva padrão, traçados com concentrações molares conhecidas do tampão, obtendo-se assim a concentração molar do sal nos tubos.

3.8. Determinação da quantidade de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método da absorbância 205/280 nm (PETERSON, 1983), e colorimétrico (BRADFORD, 1976)

3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

3.9.1. Sem agentes desnaturantes

A eletroforese em gel sem agentes desnaturantes foi realizada pelo método de Reisfeld et al. (1962), com profundas modificações segundo descrito por Arantes et al, (1989).

O gel foi preparado a 10% (m/v) em acrilamida (acrilamida/bis-acrilamida,0,8/30,0 m/m); tamponado a pH 4,5 por acetato de potássio 0,05 mol/L e contendo 0,5% (v/v) de

TEMED e 0,1% (m/V) de persulfato de amônio. O tampão do eletrodo foi β -alanina, ácido acético 0,035 mol/L pH 4,5. O sistema de eletroforese utilizado foi de minigel® da Sigma.

As amostras foram dissolvidas em 10 μ L de solução saturada de sacarose em quantidade não determinada, mas suficiente para proporcionar uma boa visualização dos seus componentes.

A eletroforese foi realizada com uma voltagem de 100 V e uma corrente de 20 a 25 mA por gel. Decorrido o tempo adequado, determinado pela presença do corante fucsina básica no centro da placa, o gel foi retirado da mesma, mergulhado em água e em seguida corado por 1 hora em Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,2% (m/v) em metanol/água 1:1 (v/v). O gel foi descorado e conservado em ácido acético 7% (v/v).

3.10. Hemólise Direta

Foi coletado sangue de dois carneiros através de punção da veia jugular, em igual volume de solução de Alséver (HOFMAMM; MAYER 1977) como anticoagulante. As hemácias dos carneiros foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada. A solução de hemácias foi padronizada em espectrofotômetro para conter aproximadamente $1,7 \times 10^8$ cel/mL (contadas em câmara de Neubauer).

Para verificar se o veneno e sua fração majoritária TsTX-I, apresentavam atividade lítica, foi realizado o ensaio de hemólise direta, incubando-se 60 μ L da solução padronizada de hemácias com 30 μ L de veneno (500 μ g) ou TsTX-I (6 μ g), e 60 μ L do tampão PBS, por 30 min a 37°C. Após o tempo de incubação os tubos foram resfriados em banho de gelo, adicionados de 150 μ L de PBS gelado, centrifugados a 480 x g, por 10 min. A porcentagem de lise foi determinada pela leitura de absorbância do sobrenadante em 412 nm.

3.11. Meios de Cultura

Preparados de acordo com as especificações do fabricante.

PDA ("potato dextrose agar") 42 mg/mL

PDB ("potato dextrose broth") 12 mg/mL

Os meios foram preparados com água destilada, aquecidos até fervura e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

3.12. Fungos

Os fungos utilizados neste trabalho: *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium waksmanii*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium veridicatum*,

Aspergillus terreus, *Aspergillus phoenix*, *Aspergillus fumigatus* e *Talaromyces flavus*, foram isolados pela professora Dra. Suraia Said, de amostras de solo coletadas na cidade de São Paulo e no pantanal sul-matogrossense. Os fungos foram identificados de acordo com sua morfologia e estruturas de esporulação pela “Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello” (Endereço: Rua Latino Coelho/ 1301, 13087.010 – Campinas, SP, Brasil). *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans* foram obtidos na ATCC. Os fungos foram mantidos por transferência semanais em culturas inclinadas de PDA e armazenados a 4°C.

3.13. Ensaios de atividade antifúngica

Os ensaios de atividade antifúngica do veneno solúvel de *T. serrulatus* e de suas frações, foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Broekaert (1990) com algumas modificações.

Para a preparação das culturas de fungos, os inóculos foram transferidos para tubos contendo PDA e foram mantidos em estufa para crescimento a 30°C no escuro por 7 dias. A suspensão de esporos foi feita adicionando-se 5 mL de água destilada estéril a cada tubo contendo as culturas de fungos. Com o auxílio de uma espátula estéril as colônias eram friccionadas para a liberação dos esporos. A partir de então as suspensões foram filtradas em 3 camadas de gaze estéril e posteriormente diluídas até a concentração de aproximadamente 2×10^5 esporos/mL. Essa densidade foi estabelecida por contagem em câmara de Neubauer, dessa forma obtendo-se aproximadamente 200 esporos em 10 µL de suspensão.

Os ensaios foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços com fundo chato, cada poço contendo 80 µL de potato dextrose broth meia força (12mg/ml), 10 µL de suspensão de esporos contendo aproximadamente 200 esporos ou fragmentos de micélio e 10 µL de veneno solúvel de *Tityus serrulatus* ou de suas frações em concentrações de 100 e 500 µg/poço para PTs e nas concentrações 6, 3, 1,5 e 0,7 µg/poço de TsTX-I, e aproximadamente 3µg/poço das demais frações da peçonha. Também foram feitos controles negativos (brancos) contendo meio de cultura, água estéril e solução salina 0,9%, nas mesmas proporções aplicadas nos ensaios. Após a inoculação as placas foram agitadas para homogenização do meio e permaneceram em repouso por 30 minutos antes da realização da primeira leitura, as demais foram feitas em intervalos de 2 em 2 horas, sendo que não foram realizadas leituras durante a noite. O equipamento utilizado para a realização das leituras foi um leitor de microplacas (Leitor de ELISA) em comprimento de onda de 600 nm.

Todas as análises foram feitas em quadruplicata e todo material envolvido nesse processo foi previamente autoclavado a 120°C por 20 min.

3.14 Ensaio para análise de alterações morfológicas

Volumes definidos de solução salina de TsTX-I (25 e 50µL) em concentração de 0,65 mg/mL, previamente filtrada em membrana estéril de 0,22 µm, foram adicionados a placas de Petri estéreis, com 3,2 cm de diâmetro interno. Sobre a toxina foi adicionado 1 ml de meio PDA em temperatura aproximada de 45°C. A mistura foi homogenizada com o auxílio da ponta da pipeta, que também foi previamente autoclavada. As placas foram devidamente fechadas permanecendo em repouso por aproximadamente 30 minutos para a solidificação do meio. Dessa forma, obtivemos placas com meio de cultura contendo aproximadamente 15 e 30 µg/mL de TsTX-I.

Após a total solidificação, colocamos sobre o meio, membranas de diálise previamente cortadas em dimensão de 1,5 X 1,5cm, hidratadas e autoclavadas, de forma que estas ficaram integralmente em contato com o meio. Após a colocação das membranas inoculamos aproximadamente 200 esporos em um volume total de 10µL sobre as mesmas .

O grupo controle foi constituído da mesma forma, porém na ausência de toxina.

Após a inoculação dos esporos, as placas permaneceram em estufa a 30°C por 12 horas. Após esse período, as membranas foram cuidadosamente descoladas das placas e aplicadas sobre lâminas de vidro, para possibilitar a análise da morfologia e do desenvolvimento das colônias em esteriomicroscópio. As imagens foram fotografadas

O experimento foi feito em duplicata.

3.15 Análise estatística

Os métodos utilizados foram: Teste “t” de Student e ANOVA - one way.

Resultados

4.RESULTADOS

4.1. PURIFICAÇÃO E CRITÉRIOS DE PUREZA

4.1.1. Perfil Cromatográfico da peçonha de *Tityus serrulatus* em CM-Celulose-

52

A peçonha solúvel de *Tityus serrulatus* cromatografada em coluna de CM-celulose-52, como descrito no item 4.2, forneceu 12 frações, que foram denominadas: I, II-III, IV, V, VI, VII-VIII, IX, X, XI, XIIA, XII B e XIII (figura 8). A porcentagem de recuperação para esta cromatografia foi de 97,01% (tabela 2), em termos de A_{280} .

Figura 8. Perfil cromatográfico do extrato obtido de 400 mg da PTs em CM-celulose-52. Coluna de 2,4 x 63,0 cm, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01mol/L, pH 7,7. Fluxo: 26,7mL/h; volume coletado por tubo: 3,0 mL; temperatura: 4 °C. A amostra foi inicialmente eluída com 150 mL de NH_4HCO_3 0,01mol/L, pH 7,7, iniciando-se a seguir um gradiente convexo de concentração do mesmo tampão de 0,01 a 1,0mol/L.

TABELA 2 - Recuperação das Frações obtidas da cromatografia em CM-celulose-52 da peçonha de *Tityus serrulatus*

FRAÇÕES OBTIDAS	% DO ELUÍDO *
I	24,05
II-III	11,52
IV	0,82
V	3,61
VI	1,39
VII-VII	18,64
IX	11,27
X	4,04
XI	2,31
XII-A	1,89
XII-B	2,56
XIII	14,91
Tubos laterais	2,99
Recuperação Total	97,01

* A recuperação foi calculada pela absorvância em 280 nm.

4.1.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida para Proteínas Básicas

A figura 9, mostra o resultado obtido da eletroforese sem SDS das frações I, II-III, IV, V, VI, VII-VIII, IX, X, XI, XIIA, XIIB e XIII obtidas da cromatografia da peçonha bruta, onde a fração XIII que corresponde a TsTX-I, aparece como banda única, evidenciando a pureza da toxina.

Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes

Amostras

1. Fucsina básica	6. Fração VI (19 µg)	11. Fração XII-A (24 µg)
2. Fração I (20,8 µg)	7. Fração VII-VIII (21µg)	12. Fração XII-B (38 µg)
3. Fração II-III (41,5 µg)	8. Fração IX (20 µg)	13. Fração XIII (7 µg)
4. Fração IV (42 µg)	9. Fração X (15 µg)	14. PTs (30 µg)
5. Fração V (39 µg)	10. Fração XI (22 µg)	

Gel de poliacrilamida a 10%, tampão β -alanina/HAc 0,035 M, pH 4,5. Pré-corrida de 30 min a 100 V e de 29 a 20 mA. Corrida de 1h e 10 min a 100V e de 25 a 3,8 mA. Corado por 3h com coomassie brilliant blue G-250 (0,2% em água: metanol, 1:1, v/v), e descorado com ácido acético a 7% (v/v).

4.1.3. Dessalinização das frações

O tampão bicarbonato de amônio residual presente nas amostras mesmo após a liofilização foi eliminado e trocado por solução salina (0,9% NaCl).

Figura 10- Perfil representativo da troca de sais das frações obtidas através de cromatografia em CM-Celulose-52 da peçonha solúvel de *T. serrulatus*. A dessalinização foi feita em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna “HI-Trap Dessalting Sephadex G-25, da GE-healthcare”, equilibrada em NaCl 0,9%. A curva da absorbância (azul) mostra o pico da eluição das proteínas enquanto que a variação da condutividade (em vermelho) mostra a eluição do sal, evidenciada pelo aumento da condutividade do material eluído.

4.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da fração XIII da peçonha de *T. serrulatus* (TsTX-I) em coluna de Fase Reversa C-18.

A cromatografia da TsTX-I em coluna de fase reversa foi realizada para confirmar a pureza da amostra. Este processo permite também a eliminação de sais presentes na amostra.

Figura 11- Perfil cromatográfico da fração XIII da peçonha de *T. serrulatus* (TsTX-I) em coluna de fase reversa C18 (Shim Pack CLC-ODS 5 μ m, 0,46 x 25,0 cm, Shimadzu Instruments Corp., Tokyo, Japan) equilibrada com tampão “A” (5% acetonitrila + 0.1 % ácido trifluoroacético), eluído com gradiente linear do tampão “B” (60% acetonitrila em 0.1 % ácido trifluoroacético), em fluxo de 1 mL/min, como descrito anteriormente por Vasconcelos et al, (2005).

4.2. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PEÇONHA DE *T. serrulatus*.

O crescimento de diferentes fungos foi avaliado na presença e ausência de 100 μg e 500 μg de PTs, mostrando atividade contra *P. corylophilum*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *P. verrucosum*, e foi capaz de aumentar os índices de crescimento em *N. crassa* e *P. wakismanii*.

Figura 12. Efeito da PTs no crescimento dos fungos. O crescimento dos fungos foi monitorado pela leitura da absorbância das culturas fúngicas a 600 nm. Controle (O), sem adição da peçonha, PTs 100 μg /poço (Δ) e 500 μg /poço ($\square$). (A) *P. corylophilum*; (B) *T. flavus*; (C) *N. crassa*; (D) *A. nidulans*; (E) *A. niger*, (F) *P. ochrochloron*. Os dados foram apresentados pela média $\pm$ SD (n=4). * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,01).

Figura 13. Efeito da PTs no crescimento dos fungos. O crescimento dos fungos foi monitorado pela leitura da absorbância das culturas fúngicas a 600 nm. Controle (O), sem adição de peçonha, PTs 100 µg/poço (Δ) e 500 µg/poço (□). (A) *A. phoenix*; (B) *A. terreus*; (C) *P. verrucosum*; (D) *P. viridicatum*; (E) *P. wakismanii*; (F) *A. fumigatus*. Os dados foram apresentados pela média $\pm$ SD (n=4). * Diferença significativa em relação ao controle ($p<0,01$). † Diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais ($p<0,01$).

4.2.1. Ensaio de atividade antifúngica das frações I, II-III, IV, V, VI e VII-VIII, da peçonha de *T.serrulatus* sobre o fungo *A. terreus*

Na concentração testada (3 µg/poço), as frações I, II-III, V e VII-VIII aumentaram os índices de crescimento fúngico. As demais frações não provocaram variações significativas.

Figura 14- Efeito das frações de I a VIII sobre o crescimento de *A. terreus*. Controle (O), Frações (Δ). Todas as frações foram aplicadas na concentração de 3 µg/poço. Os dados foram representados pela média ± SD (n= 4). * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

4.2.2. Ensaio de atividade antifúngica das frações IX, X, XI, XII- A e XII- B da peçonha de *T. serrulatus* sobre o fungo *A. terreus*

O experimento sugere que na concentração testada (3 $\mu\text{g/poço}$), as frações XI e XII-B promoveram reduções significativas no crescimento em relação ao controle, as demais frações testadas não foram capazes de promover alterações no crescimento fúngico.

Figura 15- Efeito das frações IX, X, XI, XII-A e XII-B, sobre o crescimento de *A. terreus*. Controle (O), Frações (Δ). Todas as frações foram aplicadas na concentração de 3 $\mu\text{g/poço}$. Os dados foram representados pela média $\pm$ SD (n= 4). * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

4.2.3. Ação da TsTX-I sobre o fungo *A. terreus*

O experimento sugere atividade dose dependente da toxina sobre o fungo *A. terreus*, e independente da presença de 1mM de CaCl_2 .

Figura 16- Ação da TsTX-I nas sobre o fungo *A. terreus* .

(A) Curvas de crescimento de *A. terreus* na presença de 3 µg de TsTX-I, onde (□) representa a curva controle (ausência de toxina), (◇) representa a curva de crescimento em presença de 3 µg de toxina e ausência de 1 mM de CaCl_2 , e (▽) representa a curva na presença de 3 µg de toxina e de 1mM de CaCl_2 . **(B)** Curvas de crescimento de *A. terreus* na presença de 6µg de TsTX-I, onde (□) representa a curva controle (ausência de toxina), (△) representa a curva de crescimento em presença de 6µg de toxina e ausência de 1mM de CaCl_2 , e (◇) representa a curva na presença de 6 µg de toxina e de 1mM de CaCl_2 . * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$), ‡ Diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

4.2.4. Ensaio de atividade antifúngica das frações I, II-III, IV, V, VI e VII-VIII, da peçonha de *T. serrulatus* sobre o fungo *P. verrucosum*

O experimento sugere que na concentração testada (3 $\mu\text{g/poço}$), as frações de I a VIII não foram capazes de promover alterações no crescimento fúngico.

Figura 17- Efeito das frações de I a VIII sobre o crescimento de *P. verrucosum*. Controle (O), Frações (Δ). Todas as frações foram aplicadas na concentração de 3 $\mu\text{g/poço}$. Os dados foram representados pela média $\pm$ SD (n= 4).

4.2.5. Ensaio de atividade antifúngica das frações IX, X, XI, XII- A e XII- B da peçonha de *T. serrulatus* sobre o fungo *P. verrucosum*

O experimento sugere que na concentração testada (3 $\mu\text{g/poço}$), as frações supra citadas não foram capazes de promover alterações no crescimento fúngico.

Figura 18- Efeito das frações IX, X, XI, XII-A e XII-B, sobre o crescimento de *P. verrucosum*. Controle (O), Frações (Δ). Todas as frações foram aplicadas na concentração de 3 $\mu\text{g/poço}$. Os dados foram representados pela média $\pm$ SD (n= 4).

4.2.6. Ação da TsTX-I sobre o fungo *P. verrucosum*

O experimento sugere atividade dose dependente, potencializada pela presença de 1mM de CaCl_2 .

Figura 19- Ação da TsTX-I sobre o fungo *P. verrucosum* .

(A) Curvas de crescimento de *P. verrucosum* na presença de 3 µg de TsTX-I, onde (□) representa a curva controle (ausência de toxina), (◇) representa a curva de crescimento em presença de 3 µg de toxina e ausência de 1mM de CaCl_2 , e (O) representa a curva na presença de 3 µg de toxina e de 1 mM de CaCl_2 . **(B)** Curvas de crescimento de *P. verrucosum* na presença de 6 µg de TsTX-I, onde (□) representa a curva controle (ausência de toxina), (Δ) representa a curva de crescimento em presença de 6 µg de toxina e ausência de 1 mM de CaCl_2 , e (O) representa a curva na presença de 6 µg de toxina e de 1 mM de CaCl_2 . * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$), ‡ Variância significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

4.2.7. Ação da TsTX-I sobre o fungo *P. corylophilum*

O experimento indica um aumento na atividade da toxina de forma significativa na presença de 1mM de CaCl_2 .

Figura 20- Ação da TsTX-I sobre o fungo *P. corylophilum*

(A) Curvas de crescimento de *P. corylophilum* na presença de 3 µg de TsTX-I, onde (□) representa a curva controle (ausência de toxina), (◇) representa a curva de crescimento em presença de 3 µg de toxina e ausência de 1mM de CaCl_2 , e (▽) curva na presença de 3 µg de toxina e de 1 mM de CaCl_2 . **(B)** curvas de crescimento de *P. corylophilum* na presença de 6 µg de TsTX-I, onde (□) representa a curva controle (ausência de toxina), (O) representa a curva de crescimento em presença de 6 µg de toxina e ausência de 1mM de CaCl_2 , e (Δ) representa a curva na presença de 6 µg de toxina e de 1 mM de CaCl_2 . * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$). † Diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

4.2.8. Ensaio de atividade antifúngica das frações I, II-III, IV, V, VI e VII-VIII, da peçonha de *T. serrulatus* sobre o fungo *A. nidulans*

Na concentração testada (3 $\mu\text{g/poço}$), as frações de I, II-III e VII-VIII não foram capazes de promover alterações no crescimento fúngico. As frações IV e V apresentaram variâncias significativas em relação ao controle em apenas um tempo na curva de crescimento.

Figura 21- Efeito das frações de I a VIII sobre o crescimento de *A. nidulans*. Controle (O), Frações (Δ). Todas as frações foram aplicadas na concentração de 3 $\mu\text{g/poço}$. Os dados foram representados pela média $\pm$ SD (n= 4). * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) .

4.2.9. Ensaio de atividade antifúngica das frações IX, X, XI, XII- A e XII- B da peçonha de *T. serrulatus* sobre o fungo *A. nidulans*

Na concentração testada (3 $\mu\text{g/poço}$), as frações de IX, X, XI e XII-A não foram capazes de promover alterações no crescimento fúngico. A fração XII-B apresentou diferenças significativas em relação ao controle.

Figura 22 – Efeito das frações IX, X, XI, XII-A e XII-B, sobre o crescimento de *A. nidulans*. Controle (O), Frações (Δ). Todas as frações foram aplicadas na concentração de 3 $\mu\text{g/poço}$. Os dados foram representados pela média $\pm$ SD (n= 4). * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

4.2.10. Ensaio de atividade antifúngica da TsTX-I

A fração XIII da peçonha de *T. serrulatus*, a toxina TsTX-I, foi capaz de inibir até 100% da germinação nas concentrações mais elevadas. Em concentrações mais baixas promove um retardo no crescimento, sendo que esta se mostrou mais efetiva quando inoculada no T0 (Tempo zero, início do ensaio).

Figura 23. Efeito da TsTX-I no crescimento de *A. nidulans*

O crescimento dos fungos foi monitorado pela leitura da absorbância das culturas fúngicas a 600nm. Controle (O, sem adição de toxina), TsTX-I (□). (A) TsTX-I, 6 μg/poço, adicionada à cultura no tempo zero; (B) TsTX-I, 6 μg/poço, adicionada a cultura após 6h; (C) TsTX-I, 3 μg/poço, adicionada a cultura no tempo zero; (D) TsTX-I, 3 μg/poço, adicionada a cultura após 6h. (E) TsTX-I, 1,5 μg/poço, adicionada a cultura no tempo zero; (F) TsTX-I, 1,5 μg/poço, adicionada a cultura após 6 h. Os dados foram apresentados pela média ±SD (n=4). * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,01).

4.2.11. Ensaio de atividade antifúngica das frações I, II-III e IV, na presença e ausência de 1mM de CaCl_2 sobre o fungo *A. nidulans*.

A fração II-III foi capaz de aumentar os índices de crescimento independentemente da presença ou ausência de 1 mM de CaCl_2 . A fração IV na presença de CaCl_2 , aumentou os índices de crescimento de forma significativa nos tempos 22 e 24 h.

Figura 24- Curvas de crescimento de *A. nidulans* em meio suplementado com as frações de I a IV, em presença e ausência de 1mM de CaCl_2 , onde (O) corresponde ao grupo controle e (Δ) corresponde ao grupo experimental. * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$).

4.2.12. Ensaio de atividade antifúngica das frações V, VI e VII-VIII, na presença e ausência de 1 mM de CaCl_2 , sobre o fungo *A. nidulans*

O experimento sugere que a fração VI em ausência de cálcio foi capaz de promover uma redução significativa no crescimento do fungo nos tempos 44 e 48h. As demais frações não promoveram alterações significativas.

Figura 25- Curvas de crescimento de *A. nidulans* em meio suplementado com as frações de V a VII-VIII, em presença e ausência de 1 mM de CaCl_2 , onde (O) corresponde ao grupo controle e (Δ) corresponde ao grupo experimental. * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$).

4.2.13 Ensaio de atividade antifúngica das frações IX, X e XI, na presença e ausência de 1 mM de CaCl_2 sobre o fungo *A. nidulans*

O experimento sugere que as frações IX e X promoveram reduções estatisticamente significativas nos tempos 44 e 48h na ausência de 1 mM de CaCl_2 . A fração XI aumentou os índices de crescimento, tendo sua atividade acentuada pela presença de CaCl_2 .

Figura 26- Curvas de crescimento de *A. nidulans* em meio suplementado com as frações de IX a XI, em presença e ausência de 1mM de CaCl_2 , onde (O) corresponde ao grupo controle e (Δ) corresponde ao grupo experimental. * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$).

4.2.14. Ensaio de atividade antifúngica das frações XIIA e XIIB, na presença e ausência de 1 mM de CaCl_2 , sobre o fungo *A. nidulans*.

O ensaio sugere que as frações XII-A e B, são capazes de reduzir o crescimento do fungo, sendo que a Fração XII-B se mostrou mais ativa e potencializada pela presença de 1 mM de CaCl_2 no meio.

Figura 27- Curvas de crescimento de *A. nidulans* em meio suplementado com as frações de XII-A e XII-B IV, em presença e ausência de 1mM de CaCl_2 , onde (O) corresponde ao grupo controle e (Δ) corresponde ao grupo experimental. * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$).

4.2.15. Ação da TsTX-I sobre o fungo *A. nidulans* na presença de mais cálcio.

O experimento sugere que a presença de mais cálcio no meio de cultura não interfere no crescimento normal do fungo, e que a toxina tem sua atividade potencializada.

Figura 28- Ação da TsTX-I sobre o fungo *A. nidulans* na presença de CaCl_2 . O quadro “A” representa as curvas de crescimento de *A. nidulans* na ausência de toxina e em presença e ausência de 1 e 5 mM de CaCl_2 no meio de cultura. O quadro “B” representa as curvas de crescimento de *A. nidulans*, na presença de 1,5 µg de TsTX-I, onde as curvas representam respectivamente: (O) ausência de CaCl_2 , (Δ) 1 mM de CaCl_2 e ($\square$) 5 mM de CaCl_2 e ($\diamond$) controle sem CaCl_2 . * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,01).

4.3. Atividade da TsTX-I na Presença de Tetrodotoxina (TTX)

Os resultados obtidos nos ensaios da TsTX-I na presença de TTX, um bloqueador de canais para Na^+ , mostram que a TTX não alterou a atividade antifúngica da TsTX-I.

Figura 29 – Efeito da TsTX-I sobre o crescimento de *A. nidulans* na presença de Tetrodotoxina (TTX). (O) controle, (Δ) Toxinas. (A) TsTX 3 μg /poço; (B) TsTX-I 1,5 μg /poço; (C) TTX 1,5 μg /poço; (D) TTX 3 μg /poço + TsTX-I 3 μg /poço; (E) TTX 1,5 μg /poço + TsTX-I 1,5 μg /poço. As toxinas quando empregadas isoladamente foram inoculadas no tempo zero e quando aplicadas em conjunto, a TTX foi inoculada no tempo zero e TsTX-I 30 minutos após a inoculação da primeira. Os dados foram representados pela média $\pm$ SD (n= 4). * Diferença significativa em relação ao controle (p<0,01).

4.4. Determinação do tipo de atividade inibitória da toxina. (fungicida ou fungistática)

O experimento sugere que em concentração igual ou superior a 3µg por poço com concentração estimada de até 200 esporos, a toxina TsTX-I exerce atividade fungicida contra o fungo *A. nidulans*. visto que o numero de unidades formadoras de colônia (UFC) foi quase reduzido a zero.

Tabela 3. Contagem de UFC de *A. nidulans* na presença de 3µg de TsTX-I, em meio PDA.

	UFC	Desv
Controle	28	± 0,95
TsTX-I 3µg	0,5	± 0,57

Após 12 horas de incubação com a toxina, o conteúdo do poço (≈ 200 esporos em 100uL) foi ressuspensionado em 300µL de água estéril e aplicado em 4 placas(100uL/placa) contendo meio PDA sólido e levadas a estufa 30°C, as leituras foram realizadas após 24 h de crescimento. O grupo controle foi constituído nas mesmas circunstâncias porém na ausência de toxina. Os valores expressados representam a média do número de colônias formadas em cada placa, N = 4.

4.5 Contagem de UFC de *A. nidulans* na presença de 1,5µg de TsTX-I em meio PDA e PDA suplementado com 1 mM de CaCl₂.

O experimento sugere que em concentração de 1,5 µg por poço, com densidade estimada de até 200 esporos, a toxina TsTX-I foi capaz de inibir 38% do numero de esporos germinados de *A. nidulans*, em relação ao grupo controle, em um período de 24hs.

Tabela 4. Contagem de UFC de *A. nidulans* na presença de 1,5µg de TsTX-I, em meio PDA suplementado com 1mM de CaCl₂.

	UFC	Desv
Controle	34	± 0,96
TsTX-I 1,5µg	21	± 2,4

Após 12 horas de incubação com a toxina, o conteúdo do poço (≈ 200 esporos em 100uL) foi ressuspensionado em 300µL de água estéril e aplicado em 4 placas(100uL/placa) contendo meio PDA sólido e levadas a estufa 30°C. As leituras foram realizadas após 24 hs de crescimento. O grupo controle foi constituído nas mesmas circunstâncias porém na ausência de toxina. Os valores expressos representam a média do número de colônias formadas em cada placa, N = 4.

4.6. Ação da TsTX-I sobre *Cândida albicans* em presença e ausência de 1 mM de CaCl_2 em meio RPMI.

A ação desta toxina sobre leveduras de *C. albicans* foi testada em concentrações que variaram de 1,5 a 10 μg por poço, onde se seguiu o mesmo protocolo de preparação utilizado para os microensaios com fungos filamentosos. Nas condições testadas, a toxina não foi capaz de inibir o crescimento das leveduras.

4.7. Teste de hemólise direta.

O experimento demonstra que, PTs e sua fração majoritária TsTX-I, nas concentrações testadas, não promovem lise de hemácias

Tabela 5. Análise da atividade hemolítica do PTs e sua fração majoritária TsTX-I sobre hemácias de carneiro.

	Abs 412nm *	% de lise
Controle Positivo	0,499 +/- 0,001	100 %
Controle negativo	0,007 +/- 0,001	0 % *
VTs 500 µg	0,007 +/- 0,001	0% *
TsTX-I 6 µg	0,013 +/- 0,001	< 1% *

* Valores médios da Abs em 412 nm $\pm$ SD (n= 3).

4.8. Ensaio para Análise de alterações morfológicas

O ensaio sugere que a Toxina TsTX-I é capaz de reduzir o alongamento das hifas de *A. nidulans*, de forma dose dependente, sem promover alterações morfológicas no fungo.

Figura 30- Morfologia de *A. nidulans* na ausência e presença de TsTx-I.

(A) Grupo Controle; **(B)**- Grupo experimental, meio suplementado com 15 µg de TsTx-I; **(C)**- Grupo experimental, meio com 30 µg de TsTx-I, todos fotografados após 12hs de crescimento em aumento 200X. As setas no grupo “C” indicam esporos emitindo tubo germinativo e esporos ainda não germinados.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A busca por novos peptídeos antibacterianos e antifúngicos tem se intensificado nos anos mais recentes, na tentativa de encontrar novos agentes terapêuticos, em função do desenvolvimento de resistências aos antibióticos pelos microorganismos.

Tem-se tornado claro que peptídeos catiônicos antimicrobianos endógenos, são parte da imunidade inata de plantas, invertebrados e vertebrados. O arsenal antimicrobiano utilizado pelos insetos para se defenderem de microorganismos invasores, é essencialmente composto por peptídeos e polipeptídeos catiônicos de cadeias curtas, com ação antibacteriana e antifúngica. Existe uma ampla diversidade de peptídeos antimicrobianos, com diferentes alvos e mecanismos de ação, todavia esses peptídeos apresentam algumas propriedades em comum. Eles têm afinidade por lipídeos de membrana e sua especificidade para membranas microbianas em muitos casos, tem sido relacionada à carga positiva dos mesmos, favorecendo a interação com os lipídeos aniônicos expostos pelos microorganismos (EPAND et al., 1999).

Esses pequenos peptídeos, também chamados de defensinas, são amplamente difundidos na natureza e constituem a primeira linha de defesa de organismos vivos contra fungos e bactérias. Os peptídeos que atuam na defesa inata do hospedeiro contra fungos podem ser divididos em dois grupos, os morfogênicos e os não morfogênicos. Peptídeos antifúngicos de ação morfogênica são aqueles capazes de reduzir o alongamento das hifas e induzir uma hiper ramificação; já os peptídeos não morfogênicos são capazes de reduzir o alongamento das hifas sem causar nenhum tipo de distorção morfológica (BROEKAERT et al., 1995; THOMMA et al., 2003).

Muitas defensinas de insetos e plantas apresentam similaridade estrutural, algumas neurotoxinas escorpiônicas tem estrutura semelhante à defensinas e são conhecidos bloqueadores de canais para potássio (GARCIA et al., 2001). Baseados na similaridade topográfica entre esses bloqueadores para potássio e as defensinas, um mesmo mecanismo de ação foi sugerido para a defensina isolada da ervilha (*Pisum sativum*) Psd1 (ALMEIDA et al., 2002).

A MsDef1, uma defensina extraída da alfafa, apresenta resíduos em posição homologa aos sítios ativos do conhecido bloqueador de canais para cálcio KP4 e também semelhante à toxina bloqueadora de canais para sódio AaHIII, extraída da peçonha do escorpião *Androctonus australis* (SPELBRINK et al., 2004).

Considerando que a peçonha de *T. serrulatus* é rica em proteínas catiônicas com ação sobre canais iônicos, que são características de algumas toxinas antifúngicas, este

trabalho teve como objetivos estudar a ação da mesma sobre o crescimento de fungos filamentosos e isolar o componente responsável pela sua ação antifúngica.

O ensaio em microplacas utilizado para determinação da inibição do crescimento dos fungos, foi escolhido como método experimental por ser um ensaio rápido e de fácil manuseio, além de se poder trabalhar com um grande número de amostras. Este ensaio também requer quantidades mínimas de substância teste, uma vez que o volume total da cultura é de apenas 100 μL , e menos de 200 esporos por poço são suficientes para realizar os testes. Além disso, as leituras são realizadas em leitor de microplacas, de forma rápida precisa e não destrutiva (BROEKAERT et al., 1990).

Os ensaios realizados com 12 diferentes fungos filamentosos mostraram que PTs (100 e 500 μg), foi capaz de reduzir o crescimento de *A. nidulans*, *A. terreus*, *P. verrucosum* e *P. corylophilum*, de forma dose dependente. Por outro lado, PTs também foi capaz de intensificar o crescimento de outros fungos analisados (*T. flavus*, *N. crassa*, *A. niger*, *P. ochrochloron*, *A. phoenix*, *P. viridicatum*, *P. wakismanii* e *A. fumigatus*), Provavelmente devido a capacidade do fungo de converter os componentes do veneno em fontes alternativas de nutrientes, uma vez que o veneno do escorpião é composto por uma mistura complexa de muco, componentes de baixo peso molecular (sais e compostos orgânicos) e muitas proteínas básicas neurotóxicas.

Toxinas que atuam em canais para Na^+ sensíveis a voltagem são as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos do envenenamento escorpiônico e são classificadas em duas classes: α e β -neurotoxinas. As α -neurotoxinas retardam a inativação dos canais para Na^+ induzindo um prolongamento da fase de repolarização do potencial de ação. As β - neurotoxinas mudam a dependência de voltagem da ativação dos canais para sódio para potenciais mais negativos, aumentando a tendência da célula em disparar potenciais espontaneamente e repetitivamente, causando aumento do influxo de Na^+ . A despolarização induz a abertura de canais para cálcio sensíveis a voltagem, promovendo a entrada desse íon, que por sua vez, aumenta ainda mais a despolarização celular (CESTÉLE; CATERRAL, 2000).

Foi Avaliada a ação de todas as frações obtidas da cromatografia da PTs em coluna de troca catiônica CM-Celulose-52, sobre o crescimento de fungos sensíveis a PTs, ou seja: *A. nidulans*, *A. terreus* e *P. verrucosum*. Apenas a TsTX-I (fração XIII) foi altamente efetiva, apresentando inibição do crescimento em baixas concentrações, principalmente para *A. nidulans*. Estes dados indicam que a TsTX-I é, provavelmente, a principal responsável pelo efeito antifúngico apresentado pela PTs.

A TsTX-I, toxina que apresentou atividade antifúngica em nossos experimentos, é um peptídeo catiônico (pI~9,7) e é a toxina mais abundante presente na peçonha de *T. serrulatus* (ARANTES et al.,1994). A TsTX-I é uma β -neurotoxina, com 61 resíduos de aminoácidos e 6873 Da (Pinheiro et al.,2003), isolada por cromatografia de troca iônica da PTs, em um único passo cromatográfico. O pico simétrico da TsTX-I nas cromatografias de troca iônica e fase reversa (fração XIII) e a presença de banda única em PAGE e SDS-PAGE, asseguram a pureza da amostra.

A TsTX-I, (6 μ g, 3 μ g, 1,5 μ g e 0,7 μ g), mostrou uma atividade antifúngica dose dependente contra *A. nidulans*, inibindo até 100% do crescimento do fungo nas concentrações de 6 e 3 μ g/poço, sendo que em concentrações mais baixas, um retardo do crescimento é evidenciado quando a toxina é inoculada no meio de cultura no tempo inicial, T0, o que não ocorre quando inoculada após 6 horas de crescimento livre do fungo.

Nossos ensaios sugerem que a ação da TsTX-I é potencializada na presença de Ca^{++} , diminuindo em aproximadamente 40% o numero de esporos viáveis em um período de 24hs, quando comparado ao controle feito no meio normal.

O aumento da concentração de Ca^{++} no meio também potencializou a ação da toxina contra outros fungos menos sensíveis também de forma dose dependente, como foi observado nos ensaios com os fungos *P. verrucosum* e *P. corylophilum* (figuras 19 e 20). No entanto o aumento de ions Ca^{++} no meio, não teve importância significativa sobre o crescimento de *A. terreus*, que apresentou uma diminuição no crescimento de forma dose depente de toxina e independente dos íons cálcio.

Outras frações da peçonha podem também exercer uma leve atividade antifúngica em meio suplementado com 1 mM de CaCl_2 . Foi o que observamos, principalmente nos ensaios com a fração XII-B (figura 27), onde ficou evidenciada a capacidade desta fração em promover um retardo no crescimento fúngico que foi potencializado pelo aumento da concentração de íons Ca^{++} no meio.

A presença de atividade antifúngica na fração XII-B pode estar relacionada ao fato desta fração conter o precursor da TsTX-I (dados não publicados).

A TsTx-I apresenta similaridade estrutural à uma defensina já conhecida, a Drosomicina. Embora nem todas as características da inibição do crescimento das hifas sejam semelhantes, diferindo principalmente na promoção de alterações morfogênicas que são observadas na ação da Drosomicina e não são observadas na ação da TsTX-I, a similaridade estrutural pode sugerir sítios de ação semelhantes.

Figura 31- Estrutura molecular da TsTX-I. (disponível online em www.rcsb.org).

Figura 32- Estrutura molecular da Drosomicina. (disponível online em www.ebi.ac.uk/pdbsum)

	1	10	20	30	40	50	6062				
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----										
TsTX-I	KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGS										
Drosomicina:	SSGYCAMPACCYCYGLPNWVKYMDRATNKC										
Consensus	dcdhercKgpCa!rdnetCrReCgeegrSSGhCappa.CuCeGc.....										

Figura 33- Alinhamento das seqüências de aminoácidos da TsTX-I e Drosomicina. As seqüências foram alinhadas pelo software MULTALIN. Os aminoácidos em vermelho representam consenso superior a 90% e os azuis até 50%.

Os resultados obtidos sugerem que a ação antifúngica da TsTX-I pode ser mediada pela interação dessa toxina com receptores da membrana fúngica, uma vez que este é um peptídeo catiônico, desestabilizando as estruturas da membrana e alterando a sua permeabilidade.

A drosomicina, um peptídeo rico em cisteínas, apresenta uma potente atividade antifúngica, mas é inefetivo contra bactérias, e também não apresenta efeito hemolítico contra eritrócitos bovinos (BULET et al., 1999). A drosomicina inibe a germinação dos esporos em altas concentrações e diminui o crescimento das hifas em concentrações mais baixas. Esta diminuição do crescimento ocorre pela diminuição do alongamento da hifa, com concomitante aumento da ramificação. A Drosomicina se mostrou efetiva contra *N. crassa*, e induziu uma parcial redução no crescimento das hifas de *Botrytis cinérea* (FEHLBAUM et al., 1994). No entanto, essa parcial redução no crescimento é observada apenas na presença de cátions divalentes (Ca^{++}). Um efeito semelhante é observado com defensinas de plantas (BROEKAERT et al., 1997). O mecanismo de ação responsável pela atividade antifúngica desse peptídeo ainda precisa ser elucidado. Todavia, quando defensinas de plantas são adicionadas aos fungos, elas promovem influxo de cálcio e efluxo de potássio, alcalinização do meio de incubação e mudanças nos potenciais de

membrana. Essas modificações são consequência da interação dos peptídeos antifúngicos com os receptores alvo, agindo como pontos âncora, enquanto o peptídeo penetra na membrana (THEVISSSEN et al., 1997). Os receptores alvo ainda precisam ser identificados.

A ação de peptídeos em veneno de escorpião que desestabilizam as membranas, parece ser parte de um sistema de defesa antibacteriano e antifúngico. Todavia eles, provavelmente, também contribuem para hiperexcitabilidade neuronal e indução da dor durante o envenenamento escorpiônico, devido a sua ação despolarizante sobre os terminais nervosos. Despolarização em células da raiz ganglionar do dorso de ratos foi observada para a parabutoprina. Esse mecanismo pode contribuir para a imobilização da presa (STEINER et al., 1981; MOERMAN et al., 2002).

Concluindo, a inibição do crescimento fúngico induzida pela PTs ou pela sua toxina majoritária, TsTX-I, ocorre provavelmente pela interação dessa toxina com receptores de membrana, que induzem a despolarização da membrana fúngica e esta despolarização é, provavelmente, intensificada pelo aumento do Ca^{++} no meio de cultura. O sítio de interação da TsTX-I com a membrana fúngica pode mostrar similaridade estrutural com canais para Na^+ sensíveis a voltagem de células excitáveis. No entanto, não são canais para Na^+ , visto que a tetrodotoxina não alterou a ação da TsTX-I. O mecanismo envolvido, aparentemente, não é por lise celular, visto que a PTs e a TsTX-I não são capazes de induzir hemólise, como observado para algumas toxinas antifúngicas.

É evidente que um organismo vivo tão bem estruturado como um escorpião, que resistiu a mais de 350 milhões de anos de evolução, modificações no seu habitat e no ambiente global como um todo e que permanece até os dias atuais com um número muito pequeno de predadores naturais e em constante processo de reprodução e crescimento populacional, tenha mecanismos muito bem montados de defesa, seja contra predadores ou contra microorganismos que possam vir a parasitá-lo. Esse fato já é suficiente para justificar que muito investimento e muitos anos de pesquisa ainda serão necessários para desvendar todas as artimanhas responsáveis pela incrível resistência desse organismo.

O estudo da ação não só da fração XIII como das demais frações que apresentaram indícios significativos de atividade, se faz necessário, como uma tentativa de desvendar seus mecanismos de ação e, dessa forma, gerar ferramentas que nos façam compreender melhor o metabolismo fúngico, bem como sua composição estrutural e quais seriam seus sítios alvo interessantes para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

Enfim, a mistura complexa de proteínas que constitui a peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, é uma fonte inesgotável de material de pesquisa e um potencial gerador de ferramentas de estudo para as mais diversas áreas da ciência. A toxina TsTX-I, já conhecida pela sua atividade em canais para sódio, foi mais uma vez evidenciada em nosso trabalho como uma potente ferramenta para o estudo, dessa vez para pesquisa de antifúngicos. Contudo, muitos estudos ainda serão necessários para elucidar seus sítios ativos na membrana fúngica e seu real mecanismo de ação.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- Nossos experimentos mostraram que a peçonha de *Tityus serrulatus* foi capaz de promover diferentes padrões de alteração no perfil de crescimento de diversos fungos. O estudo isolado de cada uma das frações cromatográficas da peçonha, nos revelou uma forte atividade antifúngica da fração XIII, que corresponde à toxina TsTX-I, contra o fungo *A. nidulans*. No entanto, essa toxina, embora tenha se mostrado ativa, não foi capaz de promover reduções com a mesma intensidade em outras espécies de fungos, como as do gênero *Penicillium* e também com outras espécies do gênero *Aspergillus*.
- Outras frações da peçonha também demonstraram capacidade de alterar os perfis de crescimento fúngico, seja aumentando seus índices como também reduzindo em alguns casos, mas não de forma tão intensa como observado com a TsTX-I.
- A TsTX-I apresenta estrutura tridimensional e composição em aminoácidos semelhantes às de pequenos peptídeos já conhecidos, que pertencem a um grupo de proteínas denominado defensinas, que são compostos responsáveis pela imunidade inata de organismos vivos e estão presentes em plantas, insetos, répteis, mamíferos, etc.
- A ação da TsTX-I, à semelhança de outras toxinas catiônicas, deve envolver despolarização da membrana do fungo, que é intensificada pelo aumento da concentração de Ca^{++} do meio.
- A ação da TsTX-I não foi inibida pela TTX, indicando que não está relacionada a canais para Na^+ sensíveis à voltagem.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS T.W.; WIESER, J.K.; YU, J.H. asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Washington. V.62, p.35-54, 1998.

ALBENGRES HERVÉ E., LOUË L., TILLEMENT J-P., Systemic antifungal agents. **Drug Safety**. Auckland. V.18, N.2, Fevereiro 1998, pp. 83-97(15)

ALMEIDA, M.S; CABRAL K.M; KURTENBACH, E.; ALMEIDA, F.C; VALENTE, A.P. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. **J.Mol.Biol.** New York V.315,p. 749-757, 2002.

ALVES, S.H; LOPES, J.O.; CURY, A.E. **Teste de suscetibilidade aos antifúngicos: por que, quando e como realizar**. Disponível on line na Internet em 05 de abril de 1999. <http://www.newslab.com.br/antifung.htm>

ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R., A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: Isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**. Oxford. 27, 907-916. 1989.

ARANTES, E.C., RICCIOPPO NETO, F., SAMPAIO, S.V., VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochim. Biophys. Acta**. Amsterdam 1199, 69-75. 1994.

ARENAS, R. **Micologia medica ilustrada**. México : Nueva editorial interamericana, 1993. Cap.34. Antimicoticos; p.359-376.

AXELROD, D.E. Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**. Reading,U.K, v .73, p. 181-184, 1972.

BERTAZZI, D.T; ASSIS-PANDOCHI, A.I; AZZOLINI, A.E; TALHAFFERRO,V.L; LAZZARINI, M; ARANTES, E.C. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. **Toxicon**, Oxford. V. 41, p. 501-508, 2003

BOERGERS, M. Mechanisms of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. **Rev. Infect. Dis**. Chicago.V.2, n.4, p.520-34,1980.

BOWMAN, W. C.; SUTHERLAND, G. A. Vecuronium (ORG-NC-45). In: New Neuromuscular Blocking Agents, **Handbook of Experimental Pharmacology**. ed. Kharkevich, D.A. Vol. 79, pp. 419–443. (1986). Berlin: Springer-Verlag

BREDFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. **Anal. Biochem.**, New York. V 72, p. 248-254, 1976

BROEKAERT, W.F., TERRAS, F.R.; CAMMUE, B.P.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiol. Lett.** Amsterdam. 69, 55-60, 1990.

BROEKAERT, W.F., TERRAS, F.R.; CAMMUE, B.P; OSBORN, R.W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant. Physiol.** Stuttgart. V.108, p. 1353-1358, 1995.

BROEKAERT, W.F., CAMMUE, B.P.A., DE BOLLE, C.F. Antimicrobial peptides in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.** Boca Raton. 16:297-323, 1997.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and Comparative Immunology.** New York n. 23, p. 329-344, 1999.

CESTÉLE, S.; CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxins action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie.** Paris. v. 82, p. 883-892, 2000.

CLUTERBUCK, J.A.; The validity of *Aspergillus nidulans* linkage map. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando. v .21, p. 267-277. 1997

COLOMBO A.L, Infecções Fúngicas: mudança no cenário epidemiológico, **Prática Hospitalar.** São Paulo. N29, 2003.

CORZO, G.; ESCOUBAS, P.; VILLEGAS, E.; BARNHAM, K. J.; HE ,W.; NORTON, R. S.; NAKAJIMA, T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. **Biochem. J.** New York. V.359, p.35–45, 2001.

COUTINHO NETTO, J. Purificação e caracterização parcial da Tityustoxina. Ribeirão Preto. Tese de doutorado. Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1975.

CUPO, PALMIRA.; MARISA M. DE AZEVEDO-MARQUES.; SYLVIA EVELYN HERING. Acidentes por animais peçonhentos: Escorpiões e Aranhas. **Simpósio de Urgências e Emergências Toxicológicas.** V. 36, cap. 5, 490-497, 2003.

DAI, L.; CORZO G.; NAOKI, H.; ANDRIANTSIFERANA, M.; NAKAJIMA, T. Purification, structure- function analysis, and molecular characterization of novel linear peptides from scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** New York V.293, p.1514–1522, 2002.

DE BIN, J.A.; MAGGIO,J.E.; STRICHARTZ,G.R. Purification and characterization of cholorotoxin, a chloride channel ligand from venom of the scorpion. **Am.J.Physiol.(Cell Phiol)**, Washington, v. 264, p. 361-369, 1993

DEBONO, M.; GORDEE, R.S. Antibiotics that inhibit cell wall development. **An.Rev.Microbiol.** Palo Alto v. 48, p. 471-97, 1994.

DINIZ, C.R.; GONÇALVES, J.M. Some chemical and pharmacological properties of brazilian scorpion venoms, In: **Venoms**, Buckley, E.E.; Porges, N. Washington; A.A.A.S Press.,p. 131-144,1956.

DINIZ, C.R.; GONÇALVES, J.M. Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone eletroforesis. **Biochem. Biophys. Acta.** Amsterdam. V.41, p. 470-477, 1960.

DIOMEDI A.P. Nuevos Antifúngicos: las equinocandinas. **Rev. Chil. Infectologia.** Santiago. V 21, p.89-121, 2004.

EIKSTEDT, V.R.D.; RIBEIRO, L.A.; CANDIDO, D.M.; ALBUQUERQUE M.J.; JORGE, M.T. 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. **J.Venom. Animal. Toxins, Botucatu**, V2, n2, p.92-105, 1996.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J.. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochim. Biophys. Acta.** Amsterdam. V1462, p.11-28, 1999.

FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W.F.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Insect Immunity: septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant anti-fungal peptides. **Journal of Biological Chemistry**; San Francisco. V269, 33159-63, 1994.

FIDDY, C.; TRINCY, A.P. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, Reading. v. 97, p.169-184, 1976.

FISHER, F.G.; BONH, H. The Toxins of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* . **Hoppe- Seylers Z. Physiol. Chem.** Berlin v.306, p. 269-272, 1957

- FOELIX, R.F. Biology of spiders. **Harvard University Press**, Cambridge, Massashusetts/London, 305pp. 1996
- FOGAÇA, A. C.; P. I. DA SILVA, JR.; M. T. M. MIRANDA, A.G.; BIANCHI, A.; MIRANDA, P. E.; RIBOLLA.; S. DAFFRE. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment. **J. Biol. Chem.** V.274, p. 25330-25334, Baltimore, 1999.
- FOSTER, K. E.; BURLAND, T.G.; GULL, K. A mutant betatubulin confers resistance to the action of benzimidazole-carbamate microtubule inhibitors both in vivo and in vitro. **Eur. J. Biochem.** Oxford. V.163,n.3,p.449-55, 1987.
- FROY O.; GUREVITZ M. Arthropod defensins illuminate the divergence of scorpion neurotoxins. **J.pept.Sci**; Chichester.10(12): 714-718.2004
- FUJIMURA, M.; OEDA, K.; INOUE,H.; KATO, T. A single amino-acid substitution in the beta tubulin gene of *Neurospora* confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. **Curr. Genet.** New York. V.21 n. 4-5, p 399-404, 1992.
- GANZ,T.; LEHRER,R.I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. **Mol. Med. Today**, Cambridge. 5: 292-297 (1999).
- GARCIA, M.L; GAO, Y; MCMANUS, O.B; KACZOROWSKI, G.J. Potassium channels: from scorpion venoms to high resolution structure. **Toxicon.** V. 39, p. 739-748, Oxford. 2001.
- GHANNOUM, M.A; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action,mechanisms with of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microbial. Rev.** V. 12, n. 4, p. 501-17, 1999.
- GOMES V.M.; CARVALHO, A.O.; DA CUNHA, M.; KELLER, M.N.; BLOCH JR, C.; DEOLINDO, P.; ALVES, E.W. Purification and carактерization of a novel peptide with antifungal acticity trom *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon.** Oxford. 45, 817-827. 2005
- GOODAY, G.W. The hiphae tip. In: Smith, J.E. **Fungal Diferentiaion.** A Contemporary Synthesis. New York: Deker,1983. p.315-356.
- GOYFFON M. & LANDON C., Scorpion toxins and defensins. C. R. Seances **Soc Biol Fil.** Paris.1998;192(3):445-62
- GWEE, M. C. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. CHEAH.; L.S.; WONG, P. T. H.; GONG, J. P.; KINI, R. M. Estudios of venom from the Black scorpion *Heterometrus longimatus* and some other scorpion species. **J. Toxicol.,Toxin Rev.**, New York, v.15, 37-57. 1996

- HARRIS, S. D.; The duplication cycle in *Aspergillus nidulans* . **Fungal Genetics and Biology**, Orlando. V.22, p.1-12.1997.
- HARRIS, S. D.; HOFMANN, A. F. Tedford for hyphae morfogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* . **Genetics**. Baltimore v151, p.1015-1025, 1999.
- HARRIS, S. D., Septum formation in *Aspergillus nidulans*. **Current Opinion in Microbiology**, London.v.4, p. 736-739,2001.
- HARRIS, S. D.; KRAUS, P. Regulation of septum formation in *Aspergillus nidulans* by a DNA damages checkpoint pathway. **Genetics**. Baltimore. v. 151, p. 1055-1567, 1998.
- HERBRECHT, R. **New drugs**. Lipossomal nystatin (Nyotran®). Disponível on line na Internet em 16 de dezembro de 2000. <http://www.aspergillus>.
- HILLE, B. Mechanism of block. In: ionic channels of extable membranes, Sunderland: **Sinder Assoc. Inc.**; p. 390-422,1992
- HOFMAMM, J.G.; MAYER, M.M. Immune hemolysis and complement fixation. In : WILLIAMS C.A.; CHASE, M.W.(ed) Methods in imonology and immunochemistry. New York. **Academic Press**, P140, 1977.
- IWAMOTO T, FUJIE A, NITTA K, HASHIMOTO S, OKUHARA M, KOHSAKA M. WF11899A, B and C, novel antifungal lipopeptides, I: taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties. **J Antibiot (Tokyo)**; V47, p.1084-91, 1994.
- JONAS, P.; VOGEL, W.; ARANTES, E.C.; GIGLIO J.R. Toxin of the scorpion *Tityus serrulatus* modifies by ativation and inactivation of sodium permeability of nerve membrane. **Pflugers arch**. Berlin, V.407, p. 92-99, 1986
- JONHS, R.;SOMENSHINE, D.E. & HYNES, W.L.. Control of the bacterila infections in the hard tick *Dermacentor variabilis*: evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolinph. **J. Med. Entomol**. Lanham 35(4): 458-464. 1998.
- KAMINSKYJ, S.G.; HEATH I.B.; Studies on saprolegnia ferax sugest the general importance of the cytoplasm in determining hyphal morphology. **Mycologia**. Lancaster v. 88, n1, p 20-37, 1996
- KAMINSKYJ, S. G. W.; GARRILL, A.; HEATH, I. B. The regulation between turgor and tip growth in *Saprolegnia ferax*: turgor is necessary, but not sufficient to explain apical extension rates. **Exp. Mycol**. New York.V.16, p 64-75, 1992

KRISHNAKUMARI, V.; NAGARAJ R. Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. **J. Pept. Res.** Copenhagen V 50. p. 88-93.1997

KRONSTAD, J. W.; STABEN, C. Mating types in filamentous fungi. **Annual Review of Genetics**. Palo Alto. v.31, p.271-276, 1997.

KURTZ M B, REX J H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. **Adv. Protein. Chem.** New York; V 56 p423-75, 2001.

LACAZ, C. S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo : Savier, 1991. Cap.38. p.616-651.

LAW, D.J.; TIMBERLAKE, W. E. Developmental regulation of lacase level in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**. Washington.v.144, p. 509-517. 1980

LAZDUNSKY, M. voltage-dependent channels in the skeletal-muscle. **Muscle nerve**, New York. V.9 (5), p. 3-3, 1986.

LEGROS, C. ; MARTIN-EAUCCLAIRE, M. F. Scorpion toxins. C. R. **Sciences Soc. Biol. Fil.** Paris 191, 34 5–380, 1997.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews. Drug Discovery** 2,London. P.790-802, 2003

LOMBET A., LAZDUNSKI M. Characterization, solubilization, affinity labeling and purification of the cardiac Na⁺ channel using Tityus toxin gamma. **Eur J Biochem**. Oxford. 1984 Jun 15;**141**(3):651–660.

LUCAS R, DE SANTE K, HATCHER B, HEMINWAY J, LACHNO R, BROOKS S. LY303366 single dose pharmacokinetics and safety in healthy volunteers. **Program and Abstracts of the 36rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; September 15-18; New Orleans, American Society of Microbiology**: abstr F-50,1996.

MAERTENS J, BOOGAERTS M. Caspofungina in the treatment of candidosis and aspergillosis. **Int. J. Infect. Dis.** Hamilton; V7 p.94-101,2003.

MAGALDI, S.; GIRON, M. E.; AGUILAR, I.; RODRIGUEZ ACOSTA. Antifungal activity of *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Mycoses**. Grosse Verlag. 45, 19-21. 2002

- MALIK, R.; MEDEIROS, C.; WIGNEY, D. I. Suspected drug eruption in seven dogs during administration of flucytosine. **Aust Vet J**, Sydney. v. 74, n. 40, p. 285-288, 1996b.
- MARTIN, M. F.; BECHIS, G.; EL AYEB, M.; SAMPIERI, F.; BRANDO, T.; DINIZ, C. R.; ROCHAT, H. Purification and characterization of eight toxins from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, Oxford, v 23, p. 594, 1985
- MASUREKAR P S, FOUNTOULAKIS J M, HALLADA T C, SOSA M S, KAPLAN L. Pneumocandins from *Zalerion arboricola*, II: modification of product spectrum by mutation and medium manipulation. **J Antibiot (Tokyo)**; V45 p.1867-74;1992.
- MICHAUT, L. ; FEHLBAUM, P. ; MONIATTE, M. ; VAN DORSSELAER A. ; REICHHART J. M. ; BULET, P. Determination of the disulfide array of the first inducible antifungal peptide from insects: drosomycin from *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**. Amsterdam. 395, 6-10, 1996
- MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOF, L.; THEVISSSEN, K.; TYTGAT, J.; VAN ELDERE, J.; VAN DER WALT, J.; VERDONCK, F. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. **Eur. J. Biochem**. Oxford. 269, 4799–4810. 2002.
- MORRIS, N. R. Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**. London. v.26, p.237 - 254, 1976.
- NYFELER R, KELLER S W. Metabolites of microorganisms, 143: echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from *Aspergillus nidulans* var *echinulatus* : isolation and structural components. **Helv. Chim. Acta**. Basel. V 57 p.2459-77.1974.
- PESSINI, A. C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, Oxford. v.30, I.10, p. 1495-1504, Oxford.2001.
- PETERSON, G.L. Determination of total protein. IN: **Methods in Enzimology: Enzyme structure** , v91, Part 1, (Hirs, C.H.W.; Timasheff, S.N.; Eds) Academic press, New York, 1983.
- PINHEIRO, C.B.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I.. Structural analysis of *Tityus serrulatus* Ts1 neurotoxin at atomic resolution: insights into interactions with Na⁺ channels. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr**. Copenhagen. 59, 405–415, 2003.
- PONTECORVO, G. Non random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. **Nature**. London V.170, p. 204, 1952

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J.; The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**. New York. V.5, p 141-238, 1953.

POSSANI, L. D.; MARTIN, B. M.; MOCHCA-MORALES, J. & SVENDSEN, I. Purification and characterization of the major toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Carlsberg Res. Commun.**, New York, V.46, p.195-205, 1981

POSSANI, L. D.; ALAGON, A. C.; FLETCHER, JR., P. L.; ERIKSON B. M. Purification and properties of mammalian toxins from the brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, V. 180, p.394-403, 1977

REISFIELD, R.A.; LEWIS, W.J.; WILLIAMS, D.F. Disk eletrophoresis of basic proteins and peptides on poliacrylamide gels. **Nature**, London, v195, p281-283, 1962.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal infection - Diagnosis and management**. London : Blackwell, 1993. Cap.3: Antifungal drugs: 17-43.

ROSEMBERG, R. F.; KESSEL, M. Synchrony of nuclear replication in individual hyphae of *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**. Baltimore. v. 94, p. 1464-1471, 1967.

SAMPAIO, S. V.; LAURE, C. J.; GIGLIO, J. R. Isolation and Characterization of toxic proteins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, Oxford, v 21, p.265-77, 1983.

SAMPAIO, S. V., ARANTES, E. C., PRADO, W. A., RICCIOPPO NETO, F., GIGLIO, J. R. Further characterization of toxins T₁IV (TsTX-III) and T₂IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**. Oxford. 29, 663-672, 1991.

SANDE, M. A.; MANDELL, G. L. Drogas antimicrobianas - Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro : Guanabara, 1987. Cap.54. p.799-807.

SPELBRINK, R.G.; DILMAC, N.; ALLEN, A.; SMITH, T.J.; SHAH, D.M.; HOCKERMAN, G.H. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. **Plant Physiology**. Lancaster V. 135, p. 2055-2067, 2004.

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, A.; BENNICH, H.; BOMAN, H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**. London. V292, p.246-8, 1981.

STENLAKE, J. B., in "New neuromuscular blocking agents". **Handbook of experimental pharmacology**, (ed.D.A.Kharkevich), Berlin: Springer Verlag, 263-276.1986

STEPHENSON, J. Investigators seeking new ways to stem rising tide of resistant fungi. **Medical news & perspectives**, Mahwah. 227, 1, 1997.

TAVARES W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**- 3ª edição, cap. 24 . Rio de Janeiro, 2001.

THEVISSSEN, K.; OSBORN, R. W.; ACLAND, D. P.; BROEKAERT, W. F. Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. **J. Biol. Chem.** Baltimore; 272, 32176-81, 1997.

THOMMA, B.P; CAMMUE, B.P; THEVISSSEN, K. Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. **Curr. Drug Targets Infect Disord.** Hilversum. V.3, p.1-8, 2003.

TOLEDO, D. V.; NEVES, A. G. A. Purification and partial characterization of a second toxin from the scorpion *Tityus serrulatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** London, V55b, p.249-53, 1976.

TORRES –LARIOS, A., GURROLA, G. B., ZAMUDIO,F. Z. & POSSANI, L. D Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. **Eur. J. Biochem.** Oxford. 267, p. 5023-5031.2000

VALDIVIA, H. H.; KIRBY, M. S.; LEDERER, W. J.; CORONADO, R. Scorpiontoxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} - release channel of skeletal and cardiac Muscle. **Proc. natn. acad. sci.** Washington, v.89, p12185-9,1992.

VERDONCK, F.; BOSTEELS, S.; DESMET, J.; MOERMAN, L.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; TYTGAT, J.; VAN DER WALT, J. A novel class of pore-forming peptides in the venom of *Parabuthus schlechteri* Purcell (Scorpions: Buthidae). **Cimbebasia** 16,24 7–260, 2000.

WATT, D. D & SIMARD, J. M., Neurotoxic proteins in scorpion venom. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews [J. TOXICOL.: TOXIN REV.]**. New York. Vol. 3, no. 2-3, pp. 181-221. 1984.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington. v.11, 2.2,p.382-402,1998.

WILLEMS, J., MOERMAN, L., BOSTEELS, S., BRUYNEEL, E., RYNIERS, F., VERDONCK, F. Parabutopirin- an antibiotic peptide from scorpion venom- can both induce activation and inhibition of granulocyte cell functions. **Peptides**. New York. 25, 1079-1084. 2004

YAN L.; ADAMS M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **J. Biol. Chem.** Baltimore. 273, 2059-2066.1998

ZASLOFF M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms, **Nature**. London. V415, p.389-395. 2002.

ZELEZETSKY I., PAG U., ANTICHEVA N., SAHL HG., TOSSI A.: Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin(2004).**Archives of Biochemistry and Biophysics**. New York.434,358-364