

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Rafael Jose Luis Saavedra Langer

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS COMO TRATAMENTOS ALTERNATIVOS
NOS ACIDENTES ESCORPIÔNICOS**

Belo Horizonte

2025

Rafael Jose Luis Saavedra Langer

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS COMO TRATAMENTOS ALTERNATIVOS
NOS ACIDENTES ESCORPIÔNICOS**

Tese de doutorado apresentada ao programa de
Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia
da Universidade Federal de Minas Gerais,
como parte das exigências para obtenção do
título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui

Coorientador: Dr. Franck Molina

Belo Horizonte

2025

- 043 Langer, Rafael Jose Luis Saavedra.
Estratégias biotecnológicas como tratamentos alternativos nos acidentes escorpiônicos [manuscrito] / Rafael Jose Luis Saavedra Langer. – 2025.
129 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui. Coorientador: Dr. Franck Molina.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Proteínas Recombinantes. 3. Venenos de Escorpião. I. Olórtegui, Carlos Delfin Chávez. II. Molina, Franck Raphael. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



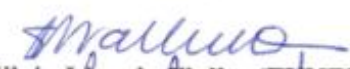
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615





ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE RAFAEL JOSÉ LUIS SAAVEDRA LANGER. Aos vinte e três dias do mês de maio de 2025 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estratégias biotecnológicas como tratamentos alternativos nos acidentes escorpiónicos", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Sílvia Ligório Fialho (Fundação Ezequiel Dias), aprovado; Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense), aprovado; Dr. Jader dos Santos Cruz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Valbert Nascimento Cardoso (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Franck Raphael Molina - Coorientador (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIF), aprovado; Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

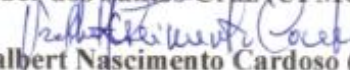
APROVADO
 REPROVADO


O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 23 de maio de 2025.

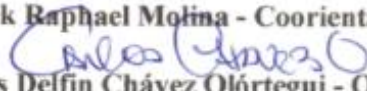

 Dra. Sílvia Ligório Fialho (FUNED)


 Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (UNESC)


 Dr. Jader dos Santos Cruz (UFMG)


 Dr. Valbert Nascimento Cardoso (UFMG)


 Dr. Franck Raphael Molina - Coorientador (CNRS)


 Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui - Orientador (UFMG)

Este trabalho foi realizado:

no Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, ICB, UFMG;

na empresa Sys2Diag, Montpellier, França.

E contou com o apoio financeiro de:

Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG;

CNPq;

Programa CAPES/ CAPES COFECUB;

FAPEMIG.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Carlos Chávez Olórtégui, minha sincera gratidão pela inspiração constante, pelo apoio incansável e pelas oportunidades que generosamente me proporcionou. Agradeço por compartilhar seu vasto conhecimento, por acreditar no meu potencial e por confiar a mim a realização deste trabalho.

À mon co-directeur de thèse, Dr. Franck Molina, merci de m'avoir inspiré, soutenu et accueilli avec bienveillance à Sys2Diag. Tes conseils, tes retours et ton encouragement ont beaucoup compté dans le développement de ma carrière scientifique.

Às Dras. Leticia Lopes de Souza e Tamara Gabriela Fernandes Costa, pela grande disponibilidade, pelos ensinamentos e pela paciência ao longo desses anos de trabalho conjunto no Labimq. As conversas e trocas com vocês foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e como pesquisador.

À Dra. Clara Guerra Duarte, pela constante disponibilidade e incentivo, que foram essenciais ao longo dessa trajetória.

A todos os colegas do Labimq, pelo carinho, amizade e enorme prestatividade. Agradeço pelo apoio experimental, pelo ótimo desempenho nas figurinhas e pela agradável convivência no dia a dia.

Aux amis du laboratoire SYSDIAG à Montpellier, Martin, Mellis, Julie, Ileme, Jérémy, Marc, Ngoc et Malik qui m'ont très bien reçu et qui ont fait que mon séjour en France a été très plaisant.

À Profa. Dra. Simone Odilia Antunes Fernandes e a Ma. Katia Ravacini de Almeida pela valiosa ajuda no processo de radio marcação para os ensaios biodistribuição e cintilografia.

À Ma. Julia Machado Caetano, pela colaboração com a microscopia e a análise das lâminas histológicas.

Aos meus pais, Alicia e Rafael, pelo amor incondicional, pelos inúmeros sacrifícios feitos para que eu pudesse concluir tanto o mestrado quanto o doutorado, e por sempre estarem ao meu lado — mesmo com a distância física — apoiando meu crescimento pessoal e profissional. À minha irmã Alicia, pelo auxílio, amizade e companheirismo ao longo deste percurso.

Aos meus amigos Juan Carlos, Manuel, Beto, Lígia e tantos outros, pelos momentos de leveza e descontração entre as tarefas do dia a dia.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a construção e viabilização deste projeto — sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

Às agências de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES/CAPES-COFECUB, por tornarem este trabalho viável.

Resumo

O escorpionismo é o acidente por animais peçonhentos mais comum no Brasil, com tendência de aumento devido às mudanças climáticas, especialmente em áreas densamente povoadas. O tratamento atual baseia-se no uso de soros heterólogos produzidos por meio da imunização de cavalos com o veneno bruto de *Tityus serrulatus*, cuja elevada toxicidade e complexidade de obtenção motivam a busca por estratégias alternativas. Neste projeto, foi desenvolvida uma proteína quimérica recombinante multi-epitópica (TsMEP), composta por dez epítomos lineares de células B provenientes de hialuronidase e de toxinas para canais de sódio dependentes de voltagem, identificados por SPOT-synthesis. A TsMEP demonstrou ser não tóxica, e os anticorpos produzidos em coelhos apresentaram alta reatividade em ELISA frente aos venenos de escorpiões brasileiros (*T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. obscurus*, *T. stigmurus*), além de *Hadruroides lunatus* (Peru) e *Androctonus australis hector* (Norte da África). Ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo* mostraram que os anticorpos anti-TsMEP neutralizaram parcialmente a atividade hialuronidásica do TsV e reduziram sua letalidade em camundongos.

Outro aspecto crítico do escorpionismo é o papel da hialuronidase na disseminação do veneno do local da picada para a corrente sanguínea e órgãos-alvo, intensificando os efeitos neurotóxicos. Como estratégia de primeiros socorros, foi desenvolvido um hidrogel injetável de polimerização *in situ*, composto por quitosana carboximetilada e ácido hialurônico-aldeído, associado a polifenóis de origem vegetal. A formulação foi projetada para inibir a hialuronidase do veneno de *Tityus serrulatus* e capturar tanto os complexos veneno-polifenol quanto toxinas livres durante a polimerização. Os resultados demonstraram redução significativa da circulação do veneno e do acúmulo em órgãos-alvo quando o hidrogel foi aplicado 10 minutos após a inoculação do veneno, garantindo 100 % de proteção contra uma dose letal de 2 DL₅₀ do veneno de *Tityus serrulatus* em camundongos.

Apesar de inovadoras e promissoras, essas abordagens ainda requerem pesquisas adicionais e validações extensas antes de serem implementadas no manejo do escorpionismo.

Palavras-chave: proteína recombinante; TsMEP; hialuronidase; hidrogel; anti – veneno; carboximethyl chitosan; ácido hialurônico; polifenóis.

Abstract

Scorpionism is the most common envenomation-related accident in Brazil, with increasing incidence due to climate change, especially in densely populated areas. Current treatment relies on heterologous antivenoms produced by immunizing horses with crude *Tityus serrulatus* venom (TsV), but the high toxicity of this immunogen and the challenges of using crude venoms have driven the search for alternative strategies. In this project, we developed a recombinant chimeric multi-epitope protein (TsMEP) derived from ten linear B-cell epitopes of TsV hyaluronidase and voltage-gated sodium channel toxins, identified via SPOT-synthesis. TsMEP was shown to be non-toxic, and antibodies raised in rabbits displayed strong ELISA reactivity against venoms from Brazilian scorpions (*T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. obscurus*, *T. stigmurus*) as well as *Hadruidoidea lunatus* (Peru) and *Androctonus australis Hector* (North Africa). In vitro and in vivo neutralization assays demonstrated that anti-TsMEP antibodies partially inhibited TsV hyaluronidase activity and reduced lethality in mice.

Another critical aspect of scorpionism is the role of hyaluronidase in facilitating venom spread from the sting site to the bloodstream and target organs, worsening the neurotoxic effects. As a first-aid approach, we developed an injectable in situ polymerizable hydrogel formulation combining carboxymethyl chitosan and aldehyde-modified hyaluronic acid with plant-derived polyphenols. This system was designed to inhibit TsV hyaluronidase activity while capturing TsV-polyphenol complexes and free toxins during polymerization. Our results showed significant reductions in venom circulation and target organ accumulation when the hydrogel was applied 10 minutes after venom injection, providing 100 % protection against a 2 LD₅₀ TsV dose in mice.

While these approaches are innovative and promising, further research and extensive validation studies are required before implementation in scorpionism management.

Keywords: recombinant protein; TsMEP; hyaluronidase; hydrogel; anti-venom; carboxymethyl chitosan; hayluronic acid ; polyphenols.

Lista de figuras

Figura 1. Acidentes com escorpiões notificados e mortes relacionadas no Brasil de 2007 a 2020.	19
Figura 2. Aumento da incidência de escorpiões entre os anos de 2007 e 2019 por estado.	20
Figura 3. Principais características morfológicas do escorpião “amarelo” <i>Tityus serrulatus</i> .	21
Figura 4. Níveis de transcrição dos grupos de componentes descritos no veneno de <i>Tityus serrulatus</i> .	22
Figura 5. Estrutura do vetor de expressão e sequência de aminoácidos da TsMEP.	56
Figura 6. Análise da expressão e purificação da TsMEP por SDS – PAGE.	57
Figura 7. Viabilidade celular <i>in vitro</i> da TsMEP e TsV.	58
Figura 8. Atividade hialuronidásica.	58
Figura 9. Reatividade do soro anti-TsMEP contra TsMEP e TsV.	60
Figura 10. Reatividade cruzada do soro anti-TsMEP contra venenos de escorpiões de importância médica.	60
Figura 11. Imunoreatividade de diferentes soros contra TsV e TsMEP.	61
Figura 12. Mapeamento de epítomos da TsMEP pelo método SPOT.	63
Figura 13. Neutralização <i>in vitro</i> da atividade hialuronidase do TsV utilizando soro anti – TsMEP.	65
Figura 14. Atividade hialuronidase (Hyal).	70
Figura 15. Inibição <i>in vitro</i> da atividade da hialuronidase por polifenóis.	71
Figura 16. Influência do tempo de pré-incubação na inibição <i>in vitro</i> da atividade da hialuronidase por uma mistura de polifenóis.	72
Figura 17. Atividade hialuronidase do TsV.	74
Figura 18. Inibição <i>in vitro</i> da atividade da hialuronidase do veneno de TsV por polifenóis.	75
Figura 19. CI ₅₀ dos polifenóis contra a hialuronidase do veneno de TsV e Hyal purificada.	75
Figura 20. SDS-PAGE da interação entre TsV e polifenóis.	76
Figura 21. Caracterização físico-química dos hidrogéis.	78
Figura 22. Mapa de calor do tempo de gelificação <i>in vitro</i> expresso em segundos.	79
Figura 23. Degradação dos hidrogéis em condições fisiológicas.	80
Figura 24. Degradação enzimática dos hidrogéis CMC/AHA e CMC/AHA/INH.	81
Figura 25. Análise da absorção de fluidos pelos hidrogéis.	83
Figura 26. Liberação de inibidores pelos hidrogéis.	84
Figura 27. Liberação do TsV capturado no hidrogel.	85
Figura 28. Ensaio de citotoxicidade em células tratadas com hidrogéis CMC/AHA/INH.	86
Figura 29. Avaliação da variação do peso corporal dos animais durante o estudo de toxicidade <i>in vivo</i> do hidrogel CMC/AHA/INH.	87
Figura 30. Avaliação da toxicidade sistêmica dos hidrogéis CMC/AHA/INH.	87
Figura 31. Gelificação <i>in situ</i> do hidrogel CMC/AHA/INH.	88
Figura 32. Concentração de neurotoxinas do TsV em diferentes tecidos e órgãos.	90

Figura 33. Depuração sanguínea, hidrogel como tratamento de primeiros socorros para picada de escorpião.	91
Figura 34. Retenção do TsV – Tc – 99m dentro do hidrogel em camundongos ao longo do tempo.	93
Figura 35. Biodistribuição de TsV – Tc – 99m.	95

Lista de tabelas

Tabela 1. Neutralização da letalidade do TsV por soro anti-TsMEP.	65
Tabela 2. Inibição da letalidade de TsV.	98

Sumario

1. Introdução	17
1.1. Escorpionismo	17
1.2. Escorpionismo no Brasil	18
1.3. <i>Tityus serrulatus</i>	20
1.4. Veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	22
1.5. Tratamento	26
1.6. Alternativas ao tratamento	28
1.6.1. Peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes	29
1.6.2. Tratamento emergencial	31
2. Objetivos	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. Matérias e métodos	36
3.1. Animais, venenos e reagentes	36
3.2. Desenvolver e caracterizar uma proteína recombinante multi-epitópica (TsMEP) como candidata a antígeno para a produção de antiveneno contra <i>Tityus serrulatus</i>	36
3.2.1. Desenho e construção da proteína quimera recombinante (TsMEP)	37
3.2.2. Expressão e purificação da TsMEP	38
3.2.3. Caracterização biológica da TsMEP	39
3.2.3.1. Citotoxicidade	39
3.2.3.2. Letalidade	40
3.2.3.3. Atividade hialuronidásica	40
3.2.4. Protocolo de Imunização	40
3.2.5. Imuno ensaios para a detecção de anticorpos anti – TsV	41
3.2.5.1.ELISA indireto	41
3.2.5.2. Western blot	41
3.2.5.3.SPOT síntese e imuno ensaio	42
3.2.6. Ensaio de neutralização utilizando anticorpos anti – TsMEP	43
3.2.6.1. Atividade hialuronidásica	43
3.2.6.2. Calculo da Dose Letal média	43
3.2.6.3. Neutralização da letalidade	43
3.3. Desenvolver um hidrogel funcionalizado com polifenóis como primeiro socorro para o tratamento <i>in situ</i> de picadas de escorpião	44
3.3.1. Inibição enzimática <i>in vitro</i>	44
3.3.1.1. Atividade hialuronidásica	44
3.3.1.2. Inibição da atividade hialuronidásica	44
3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS – PAGE	44
3.3.3. Produção de ácido hialurônico – aldeído (AHA)	45
3.3.4. Preparo dos hidrogéis	45
3.3.5. Caracterização dos hidrogéis	45

3.3.5.1. FTIR, micromorfologia e autorreparação	45
3.3.5.2. Tempo de gelificação	46
3.3.5.3. Degradação enzimática	46
3.3.5.4. Degradação em condições fisiológicas	46
3.3.5.5. Absorção de líquidos	47
3.3.5.6. Liberação de inibidores	47
3.3.5.7. Liberação de TsV capturado no hidrogel	47
3.3.5.8. Citotoxicidade	48
3.3.6. Avaliação da gelificação <i>in vivo</i>	49
3.3.7. Testes de toxicidade	49
3.3.8. Avaliação do hidrogel como tratamento <i>in situ</i>	50
3.3.8.1. ELISA sanduiche	50
3.3.8.2. Geração do complexo TsV – Tc – 99m	51
3.3.8.3. Depuração sanguínea	51
3.3.8.4. Biodistribuição	52
3.3.9. Inibição da letalidade de TsV	53
3.3.10. Análise de dados	53
4. Resultados e Discussão	54
4.1. Desenvolver e caracterizar uma proteína recombinante multi-epitópica (TsMEP) como candidata a antígeno para a produção de antiveneno contra <i>Tityus serrulatus</i>	54
4.2. Desenvolver um hidrogel funcionalizado com polifenóis como primeiro socorro para o tratamento <i>in situ</i> de picadas de escorpião	68
5. Conclusões	102
6. Perspectivas	103
7. Referencias	104
8. Anexos	122

1. Introdução

1.1. Escorpionismo

O escorpionismo é um grave problema de saúde pública principalmente em regiões tropicais e subtropicais entre as latitudes 50° N e 50° S, sendo a incidência global do envenenamento estimada em 1.500.000 casos e 2.600 mortes. Esta doença é relevante no norte do Saara, no Oriente Médio, México, Brasil, e na área da bacia amazônica (Guianas, Venezuela e norte do Brasil)¹.

No Velho Mundo, uma das áreas mais afetadas situa-se no norte de África, onde *Androctonus australis*, *Androctonus mauretanicus* e *Leiurus quinquestriatus* são as espécies mais perigosas no Magrebe, sendo a Tunísia o país mais afetado, com uma incidência anual de picadas de escorpião de 420 por 100.000 habitantes, levando a cerca de 40.000 picadas por ano (Lourenço, 2001; Borges et al., 2020). Não muito longe dali, em Marrocos, no interior do país, longe do mar, a incidência é maior que 250 em zonas rurais onde a taxa de letalidade hospitalar se eleva a 9 % devido ao fato de que apenas os casos graves recebem hospitalização ou ao uso insuficiente de antiveneno. Em contraste, regiões do sul da Argélia mantem níveis elevados de acidentes (1.465 picadas anuais de escorpiões por 100.000 habitantes) (Lourenço 2001). Ao sul do continente, *A. australis*, *A. aeneas*, *Buthus occitanus* e *Hottentotta franzwernerii* compõem a fauna de escorpiões potencialmente perigosa para o homem, especialmente para as crianças, cuja mortalidade atinge 23 % em menores de 15 anos no norte do Níger (Bucaretschi et al., 2014). Já na África do Sul, *Parabuthus granulatus* é considerada a espécie mais perigosa e responsável pela maioria dos envenenamentos graves e mortes no país (Nencioni et al., 2018).

Tal como na África, no Oriente Médio as espécies pertencentes aos gêneros *Androctonus* e *Leiurus* são consideradas as mais venenosas. As Forças Armadas israelenses relatam uma incidência de 1 400 picadas em 100 000 soldados operacionais (Cologna et al., 2009), o que é semelhante às áreas rurais da Arábia Saudita, onde a incidência pode ultrapassar

1.000 picadas de escorpião por 100.000 habitantes. Da mesma forma, as tropas americanas estacionadas nesse país relataram uma incidência anual estimada de 2.400 picadas de escorpião por 100.000 soldados (Bertani et al., 2022). Chegando ao subcontinente indiano, *Hottentotta tamulus* é o principal escorpião envolvido nos casos de envenenamento grave, representando 0,6 % das chamadas recebidas pelo centro nacional de venenos com sede em Nova Delhi (Lourenço, 2018).

No Novo Mundo, podemos dividir o continente com base na distribuição e no domínio de certos gêneros. Os escorpiões do gênero *Centruroides* são responsáveis pelos casos notificados no hemisfério norte do continente. *Centruroides sculpturatus* é responsável por 15 000 a 16 000 casos por ano, no sul e oeste dos Estados Unidos. Os acidentes com escorpiões tendem a ser mais comuns nos estados de Texas e Arizona, onde a incidência anual é de 22 acidentes por 100.000 habitantes (Lourenço, 2008). Continuando para o sul, no México são encontradas 11 espécies de interesse clínico, sendo as áreas mais afetadas do país os estados do centro e oeste, especialmente os estados de Durango, afetado por *Centruroides suffusus* que é responsável por 2.000 picadas por ano. No estado de Morelos, acidentes causados por *Centruroides limpidus* apresentam incidência anual de 2 050 picadas por 100 000 habitantes.

Já *C. limpidus tecomanus* é responsável por 1.350 picadas por 100.000 habitantes no estado de Colima. No México, aparentemente os acidentes têm um comportamento sazonal, ocorrendo no final da estação seca que acontece entre os meses de março a junho (Monteiro et al., 2019).

Já na porção sul do continente, há a dominância do gênero *Tityus*. No norte da Venezuela, *Tityus discrepans*, *Tityus caripitensis*, *Tityus arellanoparrai* e *Tityus surorientalis* são responsáveis pelos envenenamentos mais graves, afetando especialmente o Piemonte Andino, atingindo 6.803 casos por 100.000 habitantes nas zonas rurais (Verano-Braga et al., 2008). Na Guiana Francesa, o envenenamento por *Tityus obscurus* é especialmente relevante

em crianças menores de 12 anos, podendo levar à morte dos acidentados (Horta *et al.*, 2014). Aproximadamente 30 % dos pacientes envenenados apresentam complicações graves, com esse índice chegando a 60 % em crianças menores de 3 anos (Ortiz *et al.*, 2015).

1.2. Escorpionismo no Brasil

O escorpionismo, envenenamento causado pelas picadas de escorpiões, é um problema de saúde pública negligenciado no Brasil e, ao longo dos últimos anos, a propagação dos escorpiões nos centros urbanos do país está gerando um incremento acelerado das notificações. Segundo dados do SINAN-SUS, o número de casos confirmados por escorpionismo passaram de 37.370 em 2007 para 166.878 em 2019, reportando-se o crescimento no número de óbitos de 61 para 102 neste período (**Figura 1**).

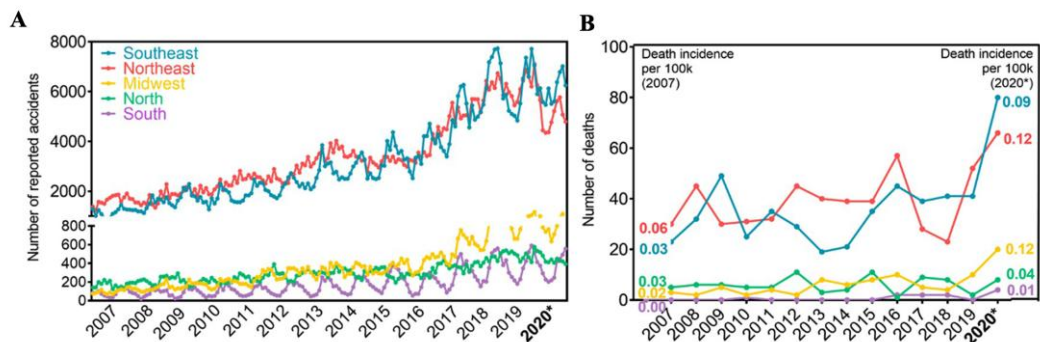


Figura 1. Acidentes com escorpiões notificados e mortes relacionadas no Brasil de 2007 a 2020. (A) Número de acidentes relatados com escorpiões ao longo dos anos para cada região. (B) Número de mortes relacionadas ao escorpionismo por ano para cada região. Incidência de morte por 100.000 habitantes (Guerra-Duarte *et al.*, 2023).

No período de 2007 a 2020, a incidência das notificações por cada 100.000 habitantes aumentou em média 5,75 vezes em todos os estados do país. Apesar disso, os estados tradicionalmente afetados pelo escorpionismo como Minas Gerais (MG), São Paulo (SP) e Bahia (BA), mostraram um crescimento abaixo da média nacional. Estados como Maranhão (MA), Ceará (CE), Mato Grosso do Sul (MS), Distrito Federal (DF) e Goiás (GO) apresentaram um aumento de mais de 10 vezes no índice de acidentes. Esses dados refletem o processo de

colonização por Ts que o Centro-Oeste vem apresentando nos últimos anos. Da mesma maneira, observa-se um elevado aumento das notificações no Sul do país. No Rio Grande do Sul (RS), as notificações de acidentes com escorpiões aumentaram mais de 8 vezes, chamando a atenção para a vigilância e controle da propagação do escorpionismo no Brasil (**Figura 2**) (Guerra-Duarte *et al.*, 2023).

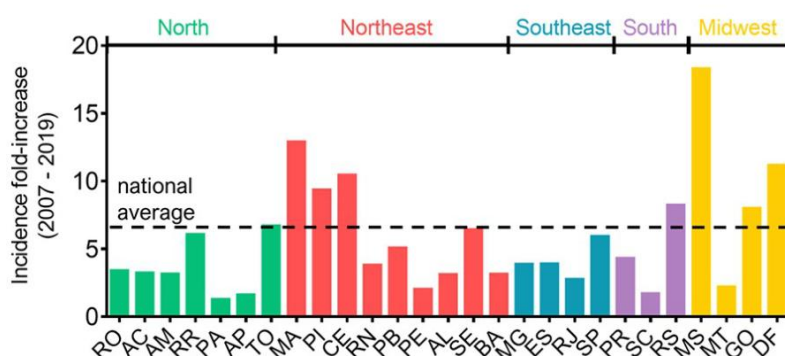


Figura 2. Aumento da incidência de escorpiões entre os anos de 2007 e 2019 por estado (Guerra-Duarte *et al.*, 2023).

1.3. *Tityus serrulatus*

Cerca de 160 espécies de escorpiões, de quatro famílias diferentes, foram descritas até agora no Brasil (Lourenço 2001). No entanto, apenas os escorpiões da família Buthidae são considerados de relevância médica e os acidentes locais são causados principalmente por escorpiões pertencentes ao gênero *Tityus*.

O gênero *Tityus* possui mais de 200 espécies descritas, as quais estão amplamente distribuídas nas Américas Central e do Sul, e compreende escorpiões de maior importância médica em toda a América do Sul (Borges *et al.*, 2015).

No Brasil, existem cerca de 22 espécies descritas para o gênero, mas apenas quatro delas são reconhecidas como as principais responsáveis por acidentes: *Tityus serrulatus* (Ts), *Tityus stigmurus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus obscurus* (Bucarechi *et al.*, 2014; Nencioni *et al.*, 2018; Furtado *et al.*, 2020).

T. serrulatus, conhecido popularmente como “escorpião amarelo”, é o responsável pelos casos mais graves de envenenamento no Brasil. Esses escorpiões geralmente medem de 5 a 7 cm de comprimento com uma coloração de pernas e pedipalpos amarelo pálido, com um tom mais escuro de marrom amarelado no corpo e na ponta da cauda. Apresentam uma serrilha ao longo da face dorsal dos segmentos distais 3 e 4 da cauda, como pequenos dentes, ou serras, que conferem à espécie o nome de “serrulatus” (Cologna et al., 2009) (**Figura 3**).

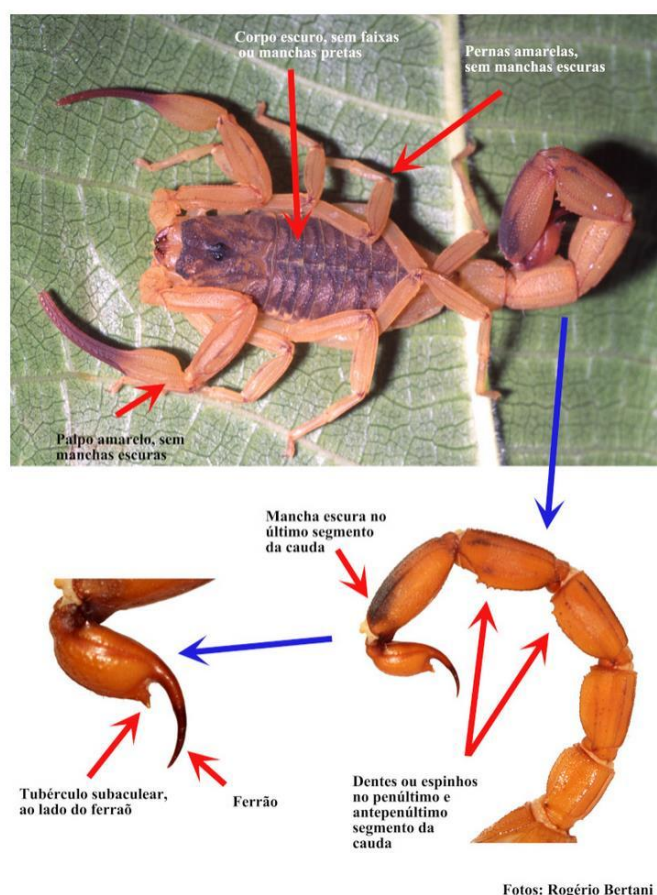


Figura 3. Principais características morfológicas do escorpião “amarelo” *Tityus serrulatus* (Bertani et al., 2022).

Esses escorpiões apresentam uma distribuição geográfica em pelo menos 19 dos 27 estados brasileiros (Lourenço 2018). A expansão desta espécie baseia-se na capacidade de se reproduzir por partenogênese e um único espécime transportado para um novo local, encontrando as condições adequadas, pode facilmente reproduzir-se e desenvolver uma nova colônia (Lourenço 2008; Monteiro et al., 2019). Além disso, os indivíduos podem sobreviver

até 400 dias sem comida, o que contribui para a resistência necessária para sobreviver a deslocamentos extensos, mesmo quando os recursos são limitados.

1.4. Veneno de *Tityus serrulatus*

O veneno de Ts é composto por diversas moléculas como muco, sais inorgânicos, lipídios, aminas, nucleotídeos, enzimas, inibidores de caliceína, peptídeos natriuréticos, proteínas de alta massa molecular, peptídeos, aminoácidos livres e neurotoxinas (**Figura 4**) (Ferreira et al., 1993; Verano-Braga et al., 2008; Alvarenga et al., 2012; Carmo et al., 2014; Horta et al., 2014; Ortiz et al., 2015). Apesar dessa diversidade, as neurotoxinas são as principais responsáveis pelo envenenamento, sendo também as mais estudadas (Pucca et al., 2015).

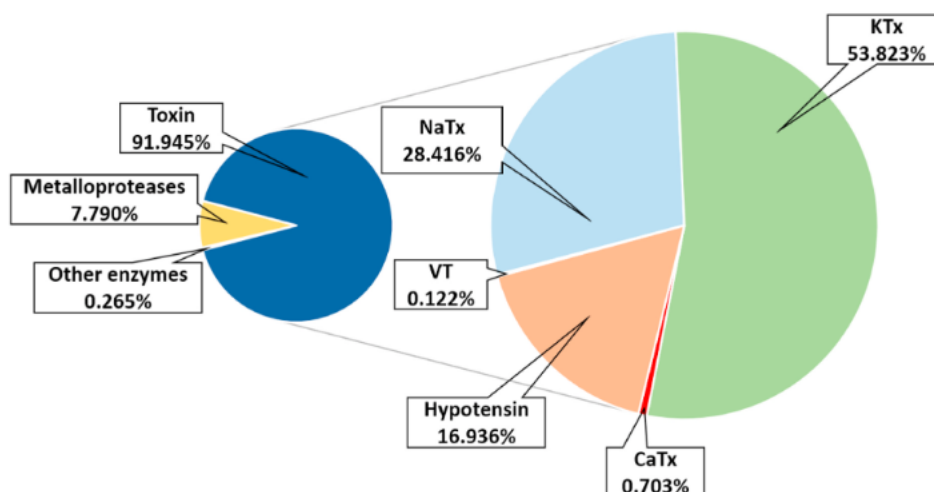


Figura 4. Níveis de transcrição dos grupos de componentes descritos no veneno de *Tityus serrulatus*. As 35 toxinas representam 91,945 % dos transcritos, 25 metaloproteases representam 7,790 % dos transcritos. Os demais grupos (enzimas quitinase, hialuronidase e amidases) representam 0,265 % dos transcritos. O grupo toxina foi dividido em 5 subgrupos, KTx (12 toxinas) representa 53,823% dos transcritos, NaTx (18 toxinas) 8,416% dos transcritos, hipotensina (02 toxinas) 16,936 % dos transcritos, CaTx (01 toxina) 0,703 % dos transcritos e toxinas do veneno (02 toxinas) (VT) representa 0,122 % dos transcritos (Kalapothakis et al., 2021).

As neurotoxinas são as proteínas de cadeia longa, que geralmente têm como alvo os canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC). Elas apresentam 60-76 resíduos de aminoácidos, enlaçados por quatro pontes dissulfeto, e podem ser subdivididas em dois grupos: α -neurotoxinas e β -neurotoxinas, de acordo com seu modo de ação e propriedades de ligação (Stevens et al., 2011; Clairfeuille et al., 2019; Diochot et al., 2021). As estruturas primárias de

ambos os grupos de toxinas são muito semelhantes. Frequentemente, as diferenças entre as sequências das toxinas α e β não são maiores do que aquelas encontradas dentro de cada grupo (de la Vega & Possani 2007; Quintero-Hernandez et al., 2013).

As α -toxinas se ligam ao sítio 3 dos canais VGSC e funcionam impedindo o movimento para fora do segmento S4 do domínio IV do canal, diminuindo ou retardando o mecanismo de inativação (Martin-Euclaire et al., 2019). Este grupo de toxinas pode ser dividido em três subgrupos: α -m, ativo em mamíferos com baixa toxicidade contra insetos, α -i, apresentando alta toxicidade para insetos e as toxinas α -like, as quais são ativas tanto em mamíferos quanto em insetos, com preferência por insetos (Clairfeuille et al., 2019).

As β -toxinas se ligam ao sítio 4 dos canais NaV, especificamente à alça extracelular dos segmentos S3-S4 do domínio II (Ortiz et al., 2015). Essas toxinas prendem o segmento S4, mantendo-o na posição ativada. Essa interação induz uma mudança na dependência de voltagem da ativação do VGSC na direção hiperpolarizante e uma redução na amplitude do pico de sódio (Ortiz et al., 2015). As β -toxinas de escorpiões são classificadas em três categorias: β m para aquelas que atuam seletivamente nos canais VGSC de mamíferos, β -i para aquelas que atuam seletivamente nos canais VGSC de insetos, β -like para aquelas sem preferência entre os canais VGSC de mamíferos e insetos (de la Vega & Possani 2007).

Entre as toxinas mais importantes do TsV temos a Ts1 (β -neurotoxina), Ts2 e Ts3 (α -neurotoxinas) (Barhanin et al., 1982). Ts1 é a principal toxina no TsV, demonstrando uma das maiores afinidades para os canais VGSC de mamíferos e insetos já observadas entre as neurotoxinas de escorpiões ($K_d = 80$ pM para canais VGSC de mamíferos e insetos). A estrutura da Ts1 é composta por 61 aminoácidos (6,8 kDa) com estrutura predominante de folhas β , seguidas por estrutura não ordenada e α -hélice. Essa toxina é muito ativa entre pH 4,5-7,5, sendo inativada em pH 11,5. Ts1 influencia a cinética de ativação deslocando

consideravelmente o ponto médio de ativação desses canais para potenciais mais negativos, causando sua abertura em potenciais de repouso (Barhanin et al., 1982).

Ts2 (64 aminoácidos e 7,18 kDa) tem três cadeias β e uma α -hélice, e está disposta em uma forma triangular formando um motivo α -hélice estabilizado por cisteína e sua sequência de aminoácidos exibe 72 % de identidade com a estrutura primária de Ts1 (Cologna et al., 2012). Além dessa semelhança, a Ts2 desempenha o papel de α -toxina inibindo a inativação de NaV (Cologna et al., 2012). Essa toxina induz alterações neurológicas relacionadas a convulsões, descargas epiléticas moderadas e perda neuronal (Sandoval & Lebrun, 2003). Além disso, estimula a produção de TNF- α , IL-10 e inibe a liberação de óxido nítrico (Zoccal et al., 2011 & 2013).

Ts3 é uma α -toxina que contém 62 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 7,2 kDa e apresenta quatro pontes dissulfeto (Possani et al., 1999). Essa toxina liga-se ao sensor de voltagem do domínio IV do VGSC e retarda sua inativação rápida. A ação sobre os VGSC induz a liberação de catecolaminas, acetilcolina, óxido nítrico, ácido gamaaminobutírico, aspartato e glutamato (Cologna et al., 2009; Bordon et al., 2015)

No TsV também são encontrados componentes enzimáticos como as hialuronidases, que constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação do ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molecular, da matriz extracelular, localizado principalmente nos tecidos conjuntivos moles. Essas enzimas são produzidas por uma variedade de organismos patogênicos, estando presente nos venenos de cobras, invertebrados, peixes e células tumorais (Vaucel *et al.*, 2020).

Do ponto de vista do envenenamento, as hialuronidases individualmente não são tóxicas. Essas enzimas são consideradas fatores de disseminação, uma vez que facilitam a difusão das toxinas nos tecidos, catalisando a hidrólise dos glicosaminoglicanos nos tecidos conjuntivos, contribuindo assim para o envenenamento sistêmico (Khattabi *et al.*, 2011). Como resultado da

atividade enzimática, a degradação dos glicosaminoglicanos produz pequenas moléculas pró-inflamatórias, pró-angiogênicas e imunoestimulantes, induzindo processos fisiológicos e patológicos que promovem um envenenamento sistêmico ainda mais rápido (Albuquerque et al., 2018).

As hialuronidases de *Tityus serrulatus* podem ser divididas em duas isoformas: TsHyal-1 com 44,5 kDa e pI 8,75; e TsHyal-2 com 44,9 kDa e pI 9,17, ambos apresentam 12 resíduos de cisteína (formando 6 ligações dissulfeto), comuns a todas às hialuronidases aracnídicas, apresentando 91 % de similaridade e 83 % de identidade com 66 resíduos diferentes (Horta et al., 2014 e Kularatne et al., 2015). Purificar esta enzima a partir de TsV, permitiu usá-la como imunógeno na produção de soro anti-hialuronidase, o qual foi capaz de inibir e retardar a morte de camundongos após injeção de uma dose letal de TsV, confirmando assim a influência da hialuronidase na letalidade de TsV (Horta et al., 2014). Baseado nessa descoberta, Oliveira-Mendes et al., (2019) avaliaram a neutralização da atividade hialuronidase em diferentes tempos após injeção de TsV, obtendo um atraso na biodistribuição do veneno para órgãos-alvo e seu acúmulo na corrente sanguínea.

Diante disso, acredita-se que a neutralização da atividade hialuronidase e bloqueio da biodistribuição de TsV, poderiam ser utilizados como estratégia de tratamento de primeiros socorros em situações reais de envenenamento, onde a demora na biodistribuição do veneno poderia aumentar o tempo para que as vítimas procurem atendimento médico, especialmente em locais remotos e de difícil acesso a hospitais.

Em conjunto, as toxinas aqui mencionadas são responsáveis pelos sintomas clínicos do escorpionismo, o qual é caracterizado pela presença imediata de dor no local da picada, que pode ser marcante e de alta intensidade. A dor pode se irradiar e estar acompanhada de parestesias locais ou dos membros, eritema, piloereção e sudorese. Essa é a principal queixa que motiva à procura de atendimento médico, sendo descrita pelo paciente como ardor, agulhadas e/ou

latejantes (SINAN SUS 2009). Cerca de duas a três horas em média após a picada, o veneno começa a causar as manifestações sistêmicas da doença, devido à excitação simpática e parassimpática e aparecem manifestações como hipo ou hipertermia e sudorese profunda (Siqueira-Batista et al., 2004). Os pacientes apresentam distúrbios no trato gastrointestinal - como náuseas e vômitos, sialorreia, dor abdominal e diarreia - alterações cardiovasculares como bradicardia ou taquicardia, hipotensão ou hipertensão arterial sistêmica, arritmias e insuficiência cardíaca congestiva, que podem causar edema agudo de pulmão, que por sua vez, podem agravar outras manifestações respiratórias, como taquidispnéia. Além disso, as complicações neurológicas podem se expressar com grande variedade, dependendo da toxicidade do veneno e dos locais afetados (Albuquerque et al., 2018).

Devido aos sinais e sintomas graves, há relatos de óbitos decorrentes do acidente escorpiônico, cuja causa mais comum é a insuficiência respiratória associada a choque circulatório, agravada por desidratação e alterações do equilíbrio hidroeletrolítico (geralmente relacionadas a vômitos exacerbados). Além da idade, peso, estado de saúde do paciente e a presença de doenças crônicas pré-existentes, a análise médica do local da picada e do estado global do paciente é extremamente importante na tomada de decisões dos profissionais de saúde, principalmente em relação à via de administração de tratamentos paliativos ou à utilização do soro anti-escorpiônico específico (Baldini et al., 2010; Fernandes-Barbosa et al., 2022).

1.5. Tratamento

A produção de soro antiescorpiônico no Brasil teve início em 1915, quando Maurano et al., (1915) produziu o primeiro soro antiescorpiônico contra *T. bahiensis*. Lamentavelmente, os anticorpos produzidos não foram eficazes em neutralizar a toxicidade do veneno. Somente dois anos depois foi possível obter um antiveneno eficaz, quando Vilela (1917) o produziu em equinos contra o veneno de *Ts e*, um ano depois, a produção de antiveneno contra escorpiões

brasileiros atingiu níveis de larga escala (Lucas 2003). Nessa época, todo o plasma era usado como soro antiescorpiônico. Posteriormente, as imunoglobulinas foram purificadas para prevenir efeitos adversos associados às outras moléculas heterólogas provenientes do soro. Atualmente, os antivenenos escorpiônicos produzidos pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e pelo Instituto Butantan são compostos por IgGs purificadas que são submetidas à clivagem da pepsina para gerar fragmentos F(ab)'2 neutralizantes, minimizando, ainda mais, os efeitos adversos (Espino-Solis et al., 2009).

Para auxiliar no direcionamento do tratamento, o Ministério da Saúde, subdivide o acidente escorpiônico em 3 categorias de acordo com as manifestações clínicas presentes no paciente:

Leve: caracterizado pela presença de dor e parestesia locais, não necessitando de tratamento específico com soro antiescorpiônico.

Moderado, dor local intensa associada a uma ou mais manifestações, como náuseas, vômitos, sudorese, sialorreia discretos, agitação, taquipneia e taquicardia, recomenda-se de 2 a 3 ampolas de soro via intravenosa.

Grave: além das manifestações citadas na forma moderada, destaca-se também vômitos profusos e incoercíveis, sudorese profusa, sialorreia intensa, prostração, convulsão, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque, sendo recomendado de 4 a 6 ampolas de antiveneno via intravenosa.

Juntamente com a administração da soroterapia, é recomendado o uso de lidocaína 2 % com vasoconstritor no local da picada ou uso de dipirona na dose de 10 mg/kg de peso a cada seis horas. No caso de serem observados distúrbios hidroeletrólíticos e acidobásicos, devem ser tratados de acordo com as medidas apropriadas a cada caso.

Já para as manifestações sistêmicas, especialmente em crianças (casos moderados e graves), os pacientes devem ser mantidos em regime de observação continuada das funções vitais, objetivando o diagnóstico e tratamento precoce das complicações.

1.6. Alternativas ao tratamento

Os antivenenos atualmente utilizados em humanos são de origem equina e, embora tenham se mostrado geralmente eficazes e seguros, apenas uma parte dos anticorpos presentes nesses antivenenos tem valor terapêutico, pois a presença de imunógenos não tóxicos nos venenos utilizados para imunização pode levar à produção de anticorpos terapeuticamente irrelevantes no soro do animal imunizado, além de outros anticorpos direcionados a antígenos aos quais o cavalo teve contato durante sua vida. Estima-se que apenas cerca de 1 - 2,5 % dos anticorpos de antivenenos equinos possam de fato neutralizar toxinas importantes no envenenamento (Pucca et al., 2011).

Diferenças individuais também são observadas nas respostas imunes dos animais produtores, levando a variações entre os lotes produzidos (Rodriguez-Rodriguez et al., 2016). Não se pode ignorar que o veneno por si só exerce efeitos tóxicos nos animais produtores (cavalos), comprometendo sua qualidade de vida (Theakston et al., 2003). Além disso, devido às ínfimas quantidades de veneno que podem ser extraídas dos escorpiões, a produção de antissoros depende de um processo de coleta de veneno laborioso, no qual é necessário triar muitos escorpiões para obter quantidade suficiente de veneno para os ciclos de imunização (Lautsten et al., 2016^b).

Esses desafios podem ser contornados através de implementar técnicas biotecnológicas para não apenas para obter antivenenos mais seguros e eficazes, mas também para estabelecer processos de produção mais sustentáveis e independentes tanto de venenos quanto de animais (Rodriguez et al., 2015; Lautsten et al., 2016^b).

Como um segundo ponto, conhecendo-se a rápida biodistribuição do veneno de escorpião pelo corpo, o tempo para conseguir atendimento médico específico é de extrema importância. Diante disso, desenvolver uma nova estratégia complementar que reduza a biodistribuição do veneno e aumente o tempo do paciente até conseguir tratamento médico específico seria de grande utilidade para reduzir as complicações dessa doença e controlar o envenenamento sistêmico.

O desenvolvimento de alternativas ao tratamento complementar, pode ser direcionado à natureza, a mais antiga fonte de compostos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos. Muitas espécies de plantas evoluíram com a produção de moléculas bioativas para interagir com organismos dentro dos seus ecossistemas, seja como forma de defesa contra a predação ou como meio de favorecer a reprodução. Ao longo da história humana, medicamentos provenientes de uma infinidade de plantas e fungos têm sido utilizados por inúmeras culturas em todo o mundo. A criação de produtos farmacêuticos inspirados em compostos ou produtos naturais, ainda é a forma mais testada na descoberta de novos medicamentos (Butler *et al.*, 2004; Espino – Solis *et al.*, 2009).

1.6.1. Peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes

Por meio de síntese química e técnicas de DNA recombinante, peptídeos e proteínas recombinantes são alternativas a serem utilizadas como imunógenos para tentar alcançar sustentabilidade e maior eficiência na indústria produtora de antivenenos. Chávez-Olórtegui e colaboradores (2002) demonstraram que anticorpos gerados pela imunização utilizando peptídeos sintéticos dos resíduos 1–15 e 49–63 da proteína não-tóxica de Ts (TsNTxP) acoplados a Hemocianina (KLH) apresentam reatividade cruzada com outras toxinas de Ts e exibem atividade neutralizante (Chavez-Olortegui *et al.*, 2002).

Alvarenga *et al.*, (2002) mapearam epítomos contínuos das toxinas TsNTxP e Ts3 e encontraram duas regiões antigênicas principais nas extremidades N e C de ambas as

sequências. Os quatro peptídeos identificados foram acoplados com KLH e utilizados para imunizar coelhos, obtendo-se um soro capaz de neutralizar 58,5 % da letalidade de 2 DL₅₀ de TsV. Além disso, os anticorpos anti-peptídeos apresentaram alta reatividade cruzada contra o TsV, e reatividade média frente a *T. bahiensis*, *T. obscurus*, *T. stigmurus* e *Centruroides sculpturatus*.

Dando continuidade ao mapeamento de epítomos, Machado de Avila et al., 2004, examinaram a localização de epítomos reconhecidos por anticorpos anti-TstFG₅₀ (fração tóxica do veneno de Ts) nas sequências das toxinas Ts1, Ts2 e Ts3. Foram encontrados 15 resíduos na região C-terminal para cada uma das toxinas, sendo provável que os anticorpos apresentem propriedades neutralizantes, uma vez que essa região identificada é parte do "sítio ativo" das neurotoxinas escorpiônicas (Polykarpov et al., 1999; Gurevitz et al., 2001).

Junto aos epítomos lineares, epítomos conformacionais podem ser utilizados de forma alternativa ao veneno total. Em 2010, Guerra-Duarte et al., mapearam epítomos conformacionais na proteína TsNTxP obtendo um maior reconhecimento imunogênico nos resíduos 1–8 e 46–54. Esses resíduos estão distantes na estrutura primária, mas na estrutura tridimensional da TsNTxP formam um epítomo descontínuo na superfície dessa proteína. Ao serem utilizados como imunógenos, os anticorpos produzidos foram capazes de neutralizar em 50 % a letalidade de 2,8 DL₅₀ de TsV.

Dessa forma, a proteína TsNTxP surge como forte candidata à produção de antivenenos a serem utilizados no tratamento de picadas de escorpiões. No entanto, a imunização de cavalos com proteínas purificadas a partir do veneno bruto apresenta desafios significativos, devido a quantidade de material necessário. Tentando contornar esse problema, Guatimosim et al., (2000) produziram uma TsNTxP recombinante, a qual era reconhecida por anticorpos gerados pela TsNTxP nativa e, quando utilizada nos protocolos de imunização, estimulou a produção de anticorpos capazes de reconhecer a fração TstFG₅₀ e o veneno bruto, com capacidade de

proteção de 75 % contra 2 DL₅₀ de TsV, demonstrando a utilidade desta proteína recombinante para o desenvolvimento de novos esquemas de imunização. Buscando aumentar a qualidade dos anticorpos neutralizantes, Mendes et al., (2008) produziram duas formas recombinantes não tóxicas da toxina Ts1 nativa. Essas proteínas, presentes em corpos de inclusão, foram utilizadas como imunógenos, a fim de reduzir o tempo e custo de purificação,

Por outro lado, o maior rendimento de expressão de Ts1₍₂₎ (30 % maior que Ts1₍₁₎) e a maior estabilidade da toxina durante a manipulação favoreceram seu uso. Os anticorpos neutralizantes produzidos forneceram proteção contra 2 DL₅₀ de TsV de 50 % e 75 % para soro anti - Ts1₍₁₎ e anti - Ts1₍₂₎, respectivamente. Com estes estudos, foi demonstrado que as formas recombinantes de toxinas do veneno produzem eficientemente antissoro contra o veneno do escorpião. Os resultados de ensaios neutralizantes utilizando anticorpos obtidos através da imunização com proteínas recombinantes não tóxicas, em combinação com os resultados obtidos com peptídeos sintéticos, podem ajudar a identificar antígenos eficazes, que não requerem o uso de veneno bruto, melhorando a produção de antisoros.

1.6.2. Tratamento emergencial

A utilização de plantas medicinais para minimizar o efeito do envenenamento por animais peçonhentos, é uma prática milenar, de diversas culturas. Diferentes compostos bioativos já foram identificados e demonstrou-se sua atuação na inibição de toxinas presentes nos venenos (Knox *et al.*, 2024). Dentro das diferentes moléculas de origem vegetal, encontramos os polifenóis, compostos fenólicos encontrados em diversas fontes vegetais, apresentando múltiplas propriedades benéficas para a saúde humana (Orsolic *et al.*, 2020; Perez-Torres *et al.*, 2021; Pontes *et al.*, 2021). Além disso, estudos demonstram que os polifenóis apresentam atividade inibitória dos efeitos locais e sistêmicos causadas pelas toxinas do veneno (Kumar & Goel 2019; Cardoso *et al.*, 2020; Rashmi *et al.*, 2020; Salvador *et al.*, 2019). Apresentam também potenciais benefícios para a saúde e podem ser extraídos de fontes naturais abundantes,

o que os tornam acessíveis para estudo e desenvolvimento de novos tratamentos com baixo custo de produção (Cesar *et al.*, 2019).

Dentro das moléculas polifenólicas com atividade inibitória comprovada, destacam-se os flavonoides, metabólitos secundários encontrados em frutas, vegetais e certas bebidas. Os flavonoides têm capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e anticancerígena, juntamente com sua capacidade de modular a função de enzimas celulares essenciais (King & Young, 1999). Ao serem utilizados no tratamento de acidentes com venenos de animais, apresentaram capacidade inibitória tanto contra toxinas isoladas, como contra venenos brutos de diferentes serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* (Lee *et al.*, 2009; Lindahl *et al.*, 1997; Salama *et al.*, 2012; Vander Dos Santos *et al.*, 2018). Um exemplo pontual é a atividade do galato de epigallocatequina (EGCG), um flavonoide abundante na erva mate (*Ilex paraguariensis*), que é capaz de inibir *in vitro* a atividade miotóxica de fosfolipases isoladas do veneno de *Crotalus durissus* (Gómez-Betancur *et al.*, 2016).

Outro grupo representativo de moléculas polifenólicas, são os taninos representados pelo ácido tânico (TA), um tanino hidrolisável presente em diversas fontes naturais como uva, chá verde, café, entre outros. Conhecido pela sua capacidade adstringente, o TA também exibe uma infinidade de benefícios medicinais, como efeitos anticancerígenos, antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores. O TA demonstrou capacidade inibitória contra hialuronidases, metaloproteases e fosfolipases envolvidas em efeitos hemorrágicos, reduzindo o efeito letal do veneno de diferentes espécies de serpentes (Pithayanukul *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2021; Nazato *et al.*, 2010; Kuppusamy *et al.*, 1993; de Jesus *et al.*, 2010).

Outra característica dos polifenóis é a quantidade dos grupos hidroxila, carboxila e anéis fenólicos que permitem uma fácil interação com biopolímeros e macromoléculas mediante ligações amida, tióis e aminas (Sai *et al.*, 2012). Isso permite sua funcionalização com polímeros naturais como o carboximetilquitosan (CMC). Esse polímero semiprocessado é derivado da

deacetilação da quitina e posterior introdução de um grupo carboximetil e é amplamente utilizado por ter as características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, atividade antimicrobiana, baixa imunogenicidade, baixo custo e acessibilidade (Moosavy *et al.*, 2023), tornando-se um importante recurso no desenvolvimento de novos biomateriais para regeneração óssea, adesivos para a pele, curativos para feridas e carreamento de medicamentos (Hong *et al.*, 2023).

Um dos novos biomateriais com promissora aplicação na área biomédica são os hidrogéis, redes tridimensionais de polímeros reticulados, que podem absorver e reter grandes quantidades de água e se caracterizam pelas suas propriedades ajustáveis e métodos versáteis de fabricação (Paulo *et al.*, 2009). O uso dos hidrogéis é encorajado pela possibilidade de que os componentes precursores possam ser injetados através de uma seringa padrão e gelificados localmente (Wang *et al.*, 2020). Sendo assim, os procedimentos de implantação são de menor custo e reduzem o desconforto do paciente, permitindo um tratamento universal que não é limitado pela geometria da cavidade a injetar (Dimatteo *et al.*, 2018; Griffin *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2015). Como exemplo, a pesquisa em cicatrização de feridas é uma das áreas biomédicas que está utilizando esta estratégia para desenvolver hidrogéis formados *in situ* feitos de uma combinação entre polifenóis e polímeros naturais como CMC, ácido hialurônico, alginato de sódio, amido, entre outros, para desenvolver novas terapias e tratamentos de nova geração (Hou *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2022; Jaikumar *et al.*, 2015).

Diante do exposto, essas tecnologias apresentam potencial aplicabilidade para o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento do envenenamento escorpiónico. Portanto, nesse trabalho são apresentadas duas estratégias biotecnológicas inovadoras: a primeira baseia-se na utilização de uma proteína recombinante não tóxica (TsMEP) como imunógeno na produção de soro anti-escorpiónico, tentando reduzir o uso de veneno bruto e aumentar a qualidade de vida dos animais produtores; a segunda abordagem é baseada na

combinação de inibidores de natureza polifenólica com polímeros naturais, com capacidade de formar hidrogéis *in situ* no local da picada do escorpião, que podem bloquear a biodistribuição do veneno e auxiliar no tratamento do envenenamento *per se*, sendo um campo de estudo promissor direcionado ao escorpionismo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e avaliar novas estratégias biotecnológicas para o tratamento dos acidentes escorpiônicos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Desenvolver e caracterizar uma proteína recombinante multi-epitópica (TsMEP) como candidata a antígeno para a produção de antiveneno contra *Tityus serrulatus*.

- Construir e obter a proteína rTsMEP em sistema de expressão procarioto.
- Caracterizar biológica e imunologicamente a proteína rTsMEP.
- Avaliar a capacidade neutralizante dos anticorpos produzidos mediante o uso da proteína rTsMEP como imunógeno.

2.2.2. Desenvolver um hidrogel injetável funcionalizado com polifenóis como primeiro socorro para o tratamento *in situ* de picadas de escorpião.

- Avaliar a capacidade inibitória de moléculas polifenólicas sobre a atividade enzimática de Hialuronidase bovina, como prova de conceito.
- Avaliar a capacidade inibitória de moléculas polifenólicas sobre a atividade hialuronidásica do veneno de *Tityus serrulatus*.
- Desenvolver e caracterizar um hidrogel para transporte dos inibidores de hialuronidase.
- Demonstrar a segurança do sistema desenvolvido mediante ensaios *in vitro* e *in vivo*.
- Validar a estratégia desenvolvida avaliando o bloqueio da biodistribuição do veneno de *Tityus serrulatus* utilizando o sistema produzido.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais, venenos e reagentes

Camundongos linhagem SWISS (20 g) foram obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Coelhos *New Zealand* (3 kg) foram obtidos da Escola de Medicina Veterinária da UFMG, Brasil. Os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, onde receberam alimentação *ad libitum*, acesso contínuo a água e foram mantidos em condições ambientais controladas. O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da UFMG (163/2023; 21/2024 e 129/2024-CEUA/UFMG).

Veneno das espécies de escorpiões *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *T. fasciolatus* foram obtidos do acervo de venenos de nosso laboratório (Labimq). Veneno do escorpião peruano *Hadruroides lunatus* foi doado pelo Centro Nacional de Producción de Biológicos do Instituto Nacional de Salud (INS), Lima, Peru. Venenos das espécies *T. obscurus* e *T. stigmurus* foram doados pelo Dr. Pedro Pereira e Dra. Maria da Glória S. Gomes da Universidade Federal do Pará, Belém e Universidade de Feira de Santana, Bahia, Brasil, respectivamente. Veneno do escorpião norte africano *Androctonus australis hector* foi doado pelo Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Marseille, França.

O veneno de escorpiões adultos foi obtido mediante estimulação elétrica dos télsons, e posteriormente misturado, liofilizado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de ser utilizado, o veneno foi solubilizado em água deionizada e a concentração proteica foi quantificada utilizando o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

O soro anti – TsV foi obtido do acervo de anti-venenos do Labimq. Esse soro foi previamente produzido mediante a imunização de coelhos *New Zealand* com TsV. A carboximetilquitosana (grau de deacetilação 90 %) foi adquirida da Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA. O sal de ácido hialurônico (HA, 99 %, PM 15.000 -18.000 kD), hialuronidase de testículo bovino (Hyal),

brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, $\geq 99\%$), etilenoglicol ($\geq 99\%$), acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), hidróxido de sódio (NaOH), periodato de sódio (NaIO_4 , $\geq 99,8\%$), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Canamicina, o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), anticorpo anti – IgG de coelho conjugado HRP, anticorpo anti – IgG de cavalo conjugado HRP, anti - IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, chloronaphthol, 5-bromo-4-cloro- 3-indolil fosfato, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 brometo de difeniltetrazólio, galato de epigalocatequina, ácido gálico, ácido tânico, quercetina, dimetilsulfóxido (DMSO), $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 e Dubelco Modified Eagles Medium (DMEM) foram adquiridos da Sigma, TX, EUA. Soro Fetal Bovino (FBS), L-glutamina, Penicilina/Estreptomicina, Gentamicina e *cell strainer* 70 μm foram adquiridos da Gibco, Thermo Fisher, MA, EUA. Placas de 96 poços foram adquiridas da Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha. Anti – 6X – His Tag – HRP foi adquirido na Invitrogen, MA, EUA. O isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), foi adquirido da PROMEGA, WI, EUA e o coomassie Brilliant Blue G-250 e a membrana de nitrocelulose de 0,22 μm foram adquiridos da Bio-Rad, CA, EUA.

3.2. Desenvolver e avaliar uma proteína recombinante multi-epitópica (TsMEP) como candidata a antígeno para a produção de antiveneno contra *Tityus serrulatus*.

3.2.1. Desenho e construção da proteína quimérica recombinante (TsMEP)

A proteína recombinante TsMEP foi desenhada utilizando epítopos de neurotoxinas de canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC) e da enzima hialuronidase; previamente identificados por Maria *et al.*, (2005) e Horta *et al.*, (2014), respectivamente. TsMEP contém três epítopos da toxina Ts1 (KEGYLMDHEGCKLSS, IRPSGYCGRESGIKK e LPNWVKVWDRATNKS); dois epítopos da toxina Ts2 (CDGYSKTHLKASSGY e PDHIKVWDYATNKC); três epítopos da toxina Ts3 (KKDGYPVEYDMSAYI,

WNYDNAYSKLSKDK e GLPDSEPTKTNGKCK) e dois epítomos da enzima Hialuronidase (IYPYINYILPGTNQTVPMDF e NITKFPNPNFNGVGVVIDWEAWRPS). A sequência de aminoácidos foi convertida em sequência de nucleotídeos, utilizando dois códons de glicina como espaçadores entre cada um dos epítomos, para ser posteriormente otimizada, sintetizada e inserida no vector de expressão pET 28 b (+) pela empresa Biomatik. A cepa de *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) foi transformada com o vetor e as colônias positivas foram selecionadas utilizando o antibiótico canamicina.

3.2.2. Expressão e purificação da TsMEP

Uma colônia positiva foi escolhida da placa para ser incubada em meio 2xTY (16 g/L peptona, 10 g/L extrato de levedura e 5 g/L NaCl) suplementado com 50 µg/mL de canamicina. A cultura foi incubada a 37 °C, 180 rpm de agitação até atingir a densidade óptica de 0,6 a 600 nm. Atingido esse ponto, a expressão foi induzida pela adição de IPTG na concentração final de 1 mM, e a incubação prosseguiu por mais 3 h a 37 °C. Finalizado esse tempo, a cultura foi centrifugada a 3586 xg por 10 min a 4 °C, sendo o *pellet* celular resultante ressuscitado em tampão de lise (Ureia 8 M, Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 3 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 30 mM; pH 7,4) suplementado com 10 mM de PMSF e 100 µg/mL lisozima. As células ressuscitadas foram submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho maria a 37 °C, e posteriormente sonicadas com 8 pulsos de 9 segundos cada, com amplitude de 37 % (sonicador Fischer Scientific). Em seguida, essa suspensão foi centrifugada a 10 000 xg a 4 °C por 20 minutos. A expressão da TsMEP no sobrenadante obtido foi analisada mediante eletroforeses em gel de poliacrilamida sob condições redutoras.

Após a extração de proteínas, a fração resultante foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando colunas de níquel HP HisTrap™ e o sistema Akta start. Inicialmente, a coluna (5 mL) foi equilibrada com 25 mL de tampão de lise a um fluxo de 5 mL/min. Logo, 10

mL do extrato bacteriano (previamente filtrado em membrana de 0,45 μm) foi adicionado a coluna em fluxo de 0,5 mL/min. Após a passagem de todo o material, a coluna foi lavada com tampão de lise até a absorbância a 280 nm atingir o nível basal. Para eluir a proteína, um tampão de eluição (Na_2HPO_4 10 mM, NaH_2PO_4 3 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM; pH 7,4) foi usado e as proteínas liberadas foram fracionadas. As eluições contendo TsMEP obtidas da purificação foram misturadas e dialisadas contra PBS 100 mM, utilizando uma membrana com poro de 1 kDa. Após a diálise, as amostras foram quantificadas utilizando o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), e posteriormente armazenadas a - 20 °C. A TsMEP purificada e os extratos bacterianos com ou sem indução da expressão proteica foram analisados utilizando SDS-PAGE a 15 %, sob condições redutoras.

3.2.3. Caracterização biológica da TsMEP

3.2.3.1. Citotoxicidade

Para a análise do potencial citotóxico da TsMEP e do TsV, células da linhagem celular derivada de mieloma de camundongo, Sp2/0, foram utilizadas. As células foram cultivadas em DMEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 0,2 % gentamicina, 1 % L-glutamina e 1 % penicilina/estreptomicina e mantidas em atmosfera controlada (5 % CO_2 a 37 °C). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma concentração de 1×10^4 células/poço e incubadas por 24 h a 37 °C. No seguinte dia, o meio de cultura foi removido e diferentes concentrações de TsMEP ou TsV (80 - 0,625 $\mu\text{g/mL}$) diluídos em DMEM, foram adicionadas. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por DMEM contendo 10 % Alamar Blue® (Nakayama *et al.*, 1997; Lopes de Souza *et al.*, 2019). Células incubadas com DMEM sem adição de TsV ou TsMEP foram consideradas como 100 % de viabilidade e os poços sem conteúdo celular foram considerados como controle negativo. Após 3 h de incubação, a fluorescência foi determinada a 540 nm de excitação e 590 nm de emissão no fluorímetro Cytation 5 cell imaging (Biotek). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada por:

Equação (1):

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Fs - Fn}{Fp - Fn} \times 100$$

Onde, F_s é a fluorescência das amostras; F_n é a fluorescência do controle negativo (somente DMEM) e F_p é o controle positivo (células não tratadas, 100% de viabilidade). O ensaio foi realizado em três replicatas independentes.

3.2.3.2. Letalidade

Para avaliar a letalidade da TsMEP, cinco camundongos SWISS (20 g) receberam por via intraperitoneal (i.p.) 0,5 mL de 200 μ g de TsMEP diluída em PBS 100 mM. Os animais foram observados por 24 e 48 h para identificar algum sinal de envenenamento e as mortes foram registradas.

3.2.3.3. Atividade hialuronidásica

Para determinar a atividade hialuronidásica foi seguido o protocolo descrito por Horta *et al.* (2014) com algumas modificações. Curvas de diluição de 10 μ g a 2,5 μ g de TsMEP ou uma concentração fixa de 2,5 μ g de TsV foram preparadas e incubadas em tampão acetato ($C_2H_3NaO_2$ 200 mM e NaCl 150 mM; pH 6,0) com 12,5 μ g de ácido hialurônico (HA) em volume final de 250 μ L. Como controle, foi feita uma curva com 5 pontos de concentrações conhecidas de HA, correspondendo a 0 %, 25 %, 50 %, 75 % e 100 % de HA (12,50; 9,38; 6,25; 3,13 e 0 μ g de HA), em volume final de 250 μ L. As amostras foram incubadas a 37 °C por 15 min. Finalizada a incubação, 500 μ L de solução de parada (2,5 % (p/v) CTAB; 2 % (p/v) NaOH) foram adicionados. A turbidez das amostras foi medida a 405 nm no equipamento Synergy H1 Spectrophotometer (Agilent Technologies — Santa Clara, US).

3.2.4. Protocolo de imunização

Coelhas adultas foram utilizadas como animais produtores de anticorpos anti – TsMEP. Após a coleta de soro pré – imune (PI), dois animais receberam uma injeção subcutânea (s.c.)

de 200 µg de TsMEP utilizando Montanide como adjuvante. Após a primeira injeção, foram administradas 16 *boosters* em intervalos de 14 dias com a mesma dose de TsMEP (200 µg) em adjuvante Montanide. Amostras de sangue foram coletadas 1 semana após a quarta, décima segunda e décima sexta dose.

3.2.5. Imuno ensaios para a detecção de anticorpos anti-TsV

3.2.5.1. ELISA indireto

Após o término das imunizações, testou-se a reatividade do soro imune por ELISA, como descrito por Chavez-Olórtegui et al., (1991). Resumidamente, placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL de uma solução a 5 µg/mL de TsV ou TsMEP diluídos em 0,02 M tampão carbonato pH 9,6, e incubadas durante a noite a 4 °C. Após o bloqueio (2 % caseína em 100 mM PBS) e lavagem das placas (PBS 100 mM- 0,01 % Tween 20), o soro de coelhas PI ou hiperimunes foi adicionado (diluições seriadas de 1/100 a 1/12 800) e as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C. Após a lavagem, o anticorpo secundário anti – IgG de coelho conjugado com peroxidase (HRP) diluído 1/30 000 foi adicionado e incubado por 1 h a 37 °C.

A reação foi observada pela adição de 0.2 µg/mL de OPD por 30 min a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 80 mM, sendo a absorbância determinada a 490 nm. Todas as medições foram feitas em triplicata.

Outro ELISA, utilizando as mesmas condições, foi feito para determinar a reatividade cruzada do soro anti- TsMEP contra o veneno dos escorpiões *T. bahiensis*, *T. obscurus*, *T. stigmurus*, *Androctonus australis* e *Hadruroides lunatus*.

3.2.5.2. Western blot

Amostras contendo 10 µg de TsV ou TsMEP foram solubilizadas em condições redutoras e submetidas a SDS-PAGE utilizando gel de separação a 15 % a 150 V por 1 hora. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,22 µm que foi então bloqueada (PBS 100 mM – 0,3 % Tween 20) por 1 h, seguida de incubação com soro

PI (1/100), anti – TsMEP (1/500), anti – TsV (1/100); anti – 6X – His Tag – HRP (1/5000) ou antiveneno de uso terapêutico (SAV) (1/1000) por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas e incubadas novamente por 1 h com o correspondente anticorpo secundário diluído em PBS 100 mM- 0,05 % Tween 20. Anticorpo anti – IgG de coelho conjugado HRP (1/30 000) foi utilizado para as membranas previamente incubadas com soro anti-TsMEP, anti-TsV ou pré-imune. Para a membrana incubada com SAV, foi adicionado anti-IgG cavalo conjugado com HRP (1/50 000,). Após múltiplas lavagens, foram adicionados os substratos cromogêneos (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 1,38 mM e chloronaphthol 1,39 mM) e H₂O₂ 2,7 mM (Alvarenga *et al.*, 2003) para gerar a aparição visual das bandas proteicas reconhecidas.

3.2.5.3. SPOT síntese e imuno ensaio

Foi preparada por SPOT síntese uma membrana de celulose contendo 58 pentadecapeptídeos sobrepostos por 3 resíduos cobrindo toda a sequência primária da TsMEP com o objetivo de mapear epítomos lineares de células B. A síntese de peptídeos foi realizada usando um sintetizador Multiprep ResPep SL Automatic SPOT (IntavisAG, Bioanalytical Instruments, Germany), como previamente descrito por Laune *et al.*, (Laune *et al.* 2002).

Para os ensaios de imunodeteção, as membranas foram bloqueadas *overnight* com TBS (tampão tris salina) - albumina de soro bovino (3 %), sacarose (5 %). Em seguida, as membranas foram incubadas com soro anti – TsMEP (diluição 1/250). A ligação do anticorpo foi detectada utilizando anti - IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1/10 000) por 90 min, a temperatura ambiente. Após a lavagem, o substrato 5-bromo-4-cloro- 3-indolil fosfato, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 brometo de difeniltetrazólio e MgCl₂ 1 M foram adicionados e um precipitado azul foi formado nos peptídeos reativos. As membranas foram secadas e escaneadas para serem analisadas utilizando o *software* ImageJ, onde cada spot foi quantificado de acordo com o número de *pixels* medidos na própria área. Os valores obtidos foram analisados

utilizando o *software* GraphPad Prism 8,0. Finalmente, as membranas foram fotografadas e regeneradas usando dimetilformamida, seguido por 1 % SDS, 0,1% β -mercaptoetanol em ureia 8 M e por etanol/água/ácido acético (50:40:10 vol/vol/vol) e etanol, sendo armazenada a -20 °C.

3.2.6. Ensaio de neutralização utilizando anticorpos anti – TsMEP

3.2.6.1. Atividade hialuronidásica

Para o ensaio de neutralização, 2,5 μ L de soro PI ou anti – TsMEP foram incubados com 2.5 μ g de TsV por 1 h a 37 °C. Após a incubação, o ensaio seguiu como descrito na seção 3.2.3.3.

3.2.6.2. Cálculo da Dose Letal média

A dose letal média (DL_{50}) foi determinada via o método da escada, no qual cinco grupos de camundongos SWISS (quatro animais de 22 g em cada grupo) receberam via i.p. uma dose diferente de TsV (10, 15, 17, 20 ou 25 μ g), diluídos em 0,5 mL de PBS 100 mM. Os animais foram observados por 24 h. Para o cálculo da DL_{50} , as percentagens das mortes foram transformadas em probit e esses valores foram plotados contra o log (dose), sendo o probit 5 (50 %) o valor da DL_{50} do TsV (Randhawa 2009).

3.2.6.3. Neutralização da letalidade

Para determinar a capacidade neutralizante dos anticorpos anti-TsMEP contra a letalidade do TsV, vinte e um camundongos SWISS foram divididos em quatro grupos. Cada animal recebeu, via i.p., 0,5 mL de uma solução contendo 2 DL_{50} de TsV em PBS 100 mM, os quais foram pré – incubados por 1 h 37 °C com 50 μ L de soro anti-TsMEP (Grupo 1), 100 μ L de soro anti-TsMEP (Grupo 2), 200 μ L de soro anti-TsMEP (Grupo 3) ou 100 μ L de PBS 100 mM (Grupo 4). Os animais foram observados por um período de 24 h e após esse intervalo as mortes foram quantificadas.

3.3. Desevolver um hidrogel injetável funcionalizado com polifenóis como primeiro socorro para o tratamento *in situ* de picadas de escorpião.

3.3.1. Inibição enzimática *in vitro*

3.3.1.1. Atividade hialuronidásica

Seguindo o protocolo descrito por Horta *et al.*, foi feita uma curva de diluição de Hyal (3 – 0,03 unidades) a qual foi incubada em tampão acetato com 12,5 µg de HA em volume final de 250 µL. Após a incubação, os ensaios turbidimétricos foram realizados como descrito na seção 3.2.3.3. Para calcular a concentração efetiva média (CE₅₀) de TsV, curvas de diluição de 2,5 a 0,02 µg de veneno foram preparadas e incubadas com 12,5 µg de HA. O ensaio prosseguiu conforme descrito anteriormente.

3.3.1.2. Inibição da atividade hialuronidásica

Para calcular a concentração inibitória média (CI₅₀) de cada polifenol (galato de epicatequina, ácido gálico, quercetina e ácido tânico), curvas de diluição de 1000 a 15,6 µM foram feitas e incubadas com 5 CE₅₀ de Hyal ou TsV por 1 h a 37 °C. Após a incubação, foram realizados os ensaios turbidimétricos detalhados em 3.2.3.3. Além disso, a influência do tempo na inibição da atividade da hialuronidase foi avaliada. Para isso, a combinação de polifenóis nas concentrações de 1000 e 500 µM foi incubada com 5 EC₅₀ de Hyal em diferentes tempos (2, 5, 10 e 15 minutos).

3.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE

A capacidade dos polifenóis de interagirem com proteínas do veneno foi avaliada mediante a incubação de 15 µg de TsV com a combinação de 500 µM de TA e 500 µM EGCG em volume final de 15 µL. Após incubação de 5 min, a amostra foi centrifugada a 6000 x g por 5 min para separar os agregados solúveis e insolúveis. Finalmente, as amostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel de separação 15 %, sob condições redutoras, durante 1 h a 200 V. As bandas do gel foram visualizadas utilizando Coomassie Brilliant Blue G-250.

3.3.3. Produção do ácido hialurônico – aldeído (AHA)

O AHA foi preparado utilizando o método de oxidação com periodato de acordo com Chen *et al.*, 2023. Para isso, 1 g de HA foi dissolvido em 100 mL de água deionizada. Quando o HA foi completamente dissolvido, foram adicionados, gota a gota, 5 mL de NaIO₄ 940 mM. Em seguida, a mistura foi agitada por 4 h a temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de etilenoglicol para interromper a reação e a mistura permaneceu sob agitação por mais 1 h. A solução foi dialisada (MWCO, 3 000) utilizando água deionizada por 72 h. A água foi trocada pelo menos três vezes ao dia durante a diálise. Finalmente, a solução obtida foi liofilizada. A percentagem de oxidação foi quantificada utilizando t-butil carbazato (Su *et al.*, 2010).

3.3.4. Preparo dos hidrogéis

Diferentes concentrações de polímero CMC e polímero AHA foram dissolvidas em solução salina tamponada com fosfato (PBS 100 mM; pH = 7,4) a 37 °C. Para criar um hidrogel com potencial inibitório, 500 µM de TA e 500 µM de EGCG foram adicionados à solução de polímeros.

3.3.5. Caracterização dos hidrogéis

3.3.5.1. FTIR, micromorfologia e autoreparação

O análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos espectros do HA, AHA, CMC e do hidrogel AHA/CMC foram obtidos utilizando o espectômetro FTIR RX-1 – Perkim Elmer no Departamento de Química da UFMG.

Para a análise de micromorfologia, o hidrogel AHA/CMC/TA/EGCG foram secados no frio, metalizados com ouro e fragmentados. A análise foi feita utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200 FEG – Thermo Fisher) no Centro de Microscopia da UFMG.

Para testar a capacidade de auto-reparação, dois discos de hidrogel (um deles oxidado no ar livre) foram produzidos para ser posteriormente extrudados e misturados uma metade de cada um. Após diferentes tempos os hidrogéis foram fotografados para mostrar a auto – reparação (união das duas metades).

3.3.5.2. Tempo de gelificação

Após a dissolução dos polímeros CMC e AHA/TA/EGCG, estes foram misturados em frasco de vidro (5 mL) e a transição da solução para gel a 37 °C foi observada visualmente invertendo os frascos. O tempo até a solução parar de fluir no frasco foi registrado como tempo de gelificação. Os testes foram realizados em triplicata.

3.3.5.3. Degradação enzimática

Para estudar a degradação enzimática *in vitro*, amostras de hidrogel (500 µL) contendo 18,5 µg de Hyal foram colocadas em frascos de vidro vazios (3,5 x 1,5 cm). Em seguida, 5 mL de PBS foram adicionados aos frascos e incubados a 37 °C. Após serem incubadas por 6 e 24 h, as amostras foram lavadas com água deionizada e liofilizadas. Os pesos secos finais foram registrados como W_f e a porcentagem de degradação foi representada por:

Equação (2):

$$Degradação (\%) = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

Onde, W_i representa o peso seco médio de hidrogéis em 500 µL contendo 18,5 µg de Hyal. Os valores representam médias de três réplicas independentes.

3.3.5.4. Degradação em condições fisiológicas

Diferentes hidrogéis com o mesmo volume foram imersos em 20 mL de PBS 100 mM a 37 °C com agitação a 100 rpm. Durante um período de incubação de 10 dias, a cada dia, a replicata dos hidrogéis foram retirados, lavados com água deionizada e liofilizados. Os pesos secos finais

foram registrados como W_f e a porcentagem de degradação foi representada pela “Equação (2)”, conforme descrito no tópico 3.3.5.2.

3.3.5.5. Absorção de líquidos

O ponto de equilíbrio na absorção de líquidos (ESR) do hidrogel foi determinado por testes de absorção. Hidrogéis completamente gelificados e previamente pesados (W_i) foram imersos em 20 mL de PBS 100 mM a 37 °C. Após diferentes tempos de incubação, certos hidrogéis foram retirados e a água superficial foi cuidadosamente removida com papel filtro para finalmente registrar os pesos finais (W_f). A ESR dos hidrogéis foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

Equação (3):

$$Absorção (\%) = \frac{W_f - W_i}{W_i} \times 100$$

3.3.5.6. Liberação de inibidores

A liberação de polifenóis do hidrogel foi medida a 278 nm usando um espectrômetro UVIKON XS UV/VIS (Secoman Xylem Analytics — Nanterre, França) (Bouhadir *et al.*, 2000). Resumidamente, hidrogéis com o mesmo volume foram imersos em 5 mL de PBS 100 mM e incubados a 37 °C. Em diferentes intervalos de tempos, 1 mL da solução de PBS foi retirado e substituído por 1 mL de PBS 100 mM fresco, para manter constante o volume total do meio (5 mL). A concentração cumulativa de polifenóis liberados dos hidrogéis foi quantificada de acordo com a curva de calibração feita com concentrações conhecidas de TA/EGCG.

3.3.5.7. Liberação de TsV capturado no hidrogel

Para medir a cinética de liberação das neurotoxinas capturadas no hidrogel, 250 μL de hidrogéis de CMC/AHA ou CMC/TA/EGCG/AHA foram polymerizados na presença de 18,5 μg de TsV. Os hidrogéis polymerizados foram imersos em 2 mL de PBS 100 mM e incubados por 48 h a 37 °C. Em tempos predeterminados (6, 24, 30 e 48 h) 100 μL da solução foi retirada e substituída pelo mesmo volume de solução fresca de PBS 100 mM para manter constante o volume total do meio de liberação (2 mL).

A quantificação foi realizada seguindo o protocolo desenvolvido por Chavez-Olórtegui *et al* 1994. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de IgG-F(ab')₂-anti-TsFG₅₀ diluído em tampão bicarbonato de sódio (20 mM) pH 9,6 e incubadas durante a noite a 4 °C. Após o bloqueio e lavagem, foram adicionados 5 μL de PBS 100 mM proveniente da incubação dos hidrogéis em 100 μL e a placa foi incubada por 1 h a 37 °C. Os poços foram lavados e incubados com IgG-F(ab')₂-anti-TsFG₅₀ conjugado com HRP diluído 1/250, por 1 h a 37 °C. A reação foi detectada pela adição de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de OPD por 30 min em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 80 mM sendo a absorbância determinada a 490 nm. Uma curva com diferentes concentrações conhecidas de TsFG₅₀ e TsV (200 ng a 1,5 ng/poço) foi utilizada como padrão. Os valores obtidos a partir da curva foram plotados em um gráfico, e a respectiva equação de regressão linear foi utilizada para estimar a quantidade de neurotoxinas e TsV em cada amostra. TsV e TsFG₅₀ diluídos em PBS 100 mM foram utilizados como controle positivo e somente PBS 100 mM, como controle negativo. Todas as medições foram feitas em triplicata.

3.3.5.8. Citotoxicidade

Para testar a citotoxicidade dos hidrogéis CMC/AHA/INH, foram seguidos os testes de meio de extração e contato direto descritos em “ISO 10993-5:2009: Avaliação biológica de dispositivos médicos”. Resumidamente, as células HaCaT e L929 foram mantidas em meio completo (DMEM de alta glicose, suplementado com 10 % de SFB, 2 % de L-glutamina, 1 %

de Penicilina/Estreptomicina; 0,2 % de Gentamicina) e mantidas sob atmosfera controlada (5 % de CO₂ a 37 °C). Para preparar o meio de extração, 5 mL de hidrogel esterilizado foram incubados em 50 mL de meio completo. Para os testes de contato direto, o hidrogel estéril foi polimerizado em uma placa de petri estéril (21,5 cm²) para formar um filme com cerca de 2 mm de espessura.

As células HaCaT e L929 foram plaqueadas em placas de 96 poços (1 x 10⁴ células/poço) utilizando DMEM completo e foram incubadas durante 24 h a 37 °C em atmosfera a 5 % de CO₂. Em seguida, o meio foi retirado e foram adicionados 100 µL de meio de extração. Para os testes de contato direto, utilizando uma folha de bisturi estéril o hidrogel foi cortado em discos de 5 mm de diâmetro, os quais foram lavados 3 vezes com meio completo e colocados sobre as células plaqueadas. Como controle de toxicidade foi utilizado DMSO a 10 % e como controle negativo DMEM completo. As células foram tratadas por 24 e 72 h. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi determinada adicionando-se DMEM contendo 10 % de alamarBlue™ aos poços. Após 3 h de incubação, a fluorescência foi determinada a 540 nm de excitação e 590 nm de emissão, utilizando o Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific – Waltham, EUA). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela “Equação 1” descrita na seção 3.2.3.1

3.3.6. Avaliação da gelificação *in vivo*

As soluções dos polímeros (CMC e AHA) foram misturadas e injetadas na região dorsal de camundongos SWISS (n = 3). Dez minutos após a injeção o animal foi eutanasiado com overdose de xilazina (30 mg/kg) e cetamina (300 mg/kg) e a pele foi retirada para observar a presença dos polímeros gelificados como hidrogel.

3.3.7. Testes de toxicidade

As soluções dos polímeros (CMC e AHA) foram misturadas e injetadas na região dorsal de camundongos SWISS (n = 6), sendo utilizado PBS 100 mM no grupo controle (n = 6). O peso

dos animais e a área gerada pela injeção do hidrogel na pele foram medidos todos os dias num período de 30 d. No dia 15 e 30 da avaliação, camundongos que receberam o hidrogel (n = 3) e o grupo controle (n = 3), referentes à 15 d e 30 d foram eutanasiados com overdose de xilazina (30 mg/kg) e cetamina (300 mg/kg) e a pele, coração, pulmão, fígado e rins foram removidos para realizar a avaliação histológica.

3.3.8. Avaliação do hidrogel como tratamento *in situ*

Para avaliar a aplicação do hidrogel como tratamento *in situ* para a picada de escorpião, foram seguidas as metodologias de imunodeteção e de radiomarcção, conforme descritas a seguir.

3.3.8.1. ELISA sanduíche

Camundongos SWISS foram subdivididos em três grupos experimentais (n = 5, por grupo), o quais receberam, via s.c., 10 µg de TsV diluído em 50 µL de PBS 100 mM. Dez minutos após a injeção, os animais do grupo 01 receberam uma injeção s.c. de 200 µL de TA/EGCG a 1000 µM no mesmo lugar da injeção de TsV. No grupo 02, os animais receberam 200 µL de hidrogel (CMC/AHA/TA/EGCG) no mesmo lugar da injeção de TsV. E no grupo 03, os animais receberam 200 µL de PBS 100 mM.

Após a segunda injeção, os animais de cada grupo foram subdivididos (n = 3, por subgrupo). Os animais foram anestesiados com xilazina (15 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) e submetidos a punção cardíaca em 30, 60, 120, 240 ou 480 min após a injeção. Foram retirados o fígado, coração, rim e pulmão de cada animal para serem pesados e macerados utilizando *cell strainer* (70 µm). Os extratos obtidos foram centrifugados a 10 000 X g durante 10 min. O sobrenadante foi separado e usado para determinação da quantidade de neurotoxinas presente nos órgãos. O soro dos animais (diluído 1:2) também foi coletado para identificação de neurotoxinas

circulantes. Os testes foram realizados por ELISA sanduíche, seguindo a mesma metodologia descrita na seção 3.3.5.6

3.3.8.2. Geração do complexo TsV – Tc – 99m

Para marcar o TsV com Tc – 99m (IPEN São Paulo), foi preparada uma ampola selada contendo 200 µg de SnCl₂.H₂O diluídos em HCl 250 mM e 50 µg de NaBH₄ diluídos em NaOH 100 mM; na qual foi misturada com 125 µg TsV. Após a aplicação de vácuo, foi adicionado 100 µL de Na^{99m}TcO₄ (3,7 MBq). A solução foi incubada a temperatura ambiente durante 15 min.

A pureza radioquímica da marcação TsV – Tc – 99m foi avaliada mediante cromatografia de camada delgada utilizando acetona como fase móvel, que permite quantificar o ^{99m}TcO₄⁻. A radioatividade das fitas foi determinada utilizando um contador Gama (Wizard2 Automatic Gamma Counter 2470.).

A estabilidade da marcação TsV – Tc – 99m foi avaliada em salina 0,9 % (p/v) a temperatura ambiente e em plasma PI de camundongo a 37 °C. A estabilidade foi avaliada após incubações de 1, 2, 4, 6 e 24 h em cromatografia de camada delgada como foi descrito anteriormente.

3.3.8.3. Depuração sanguínea

Camundongos SWISS foram divididos em quatro grupos experimentais (n = 3 por grupo; de aproximadamente 20 g cada animal), todos recebendo, por via s.c., 10 µg de TsV – Tc – 99m diluído em 50 µL de solução salina a 0,9 % (equivalente a 3,7 MBq). Em diferentes intervalos de tempo (10, 20 e 25 minutos) após a administração do TsV – Tc – 99m, 200 µL da solução de hidrogel foram injetados no mesmo local da injeção de TsV – Tc – 99m.

Os animais foram anestesiados com xilazina (15 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg), e foi realizada uma incisão na cauda para coleta de sangue em tubos previamente pesados nos tempos de 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 240 minutos após a administração do TsV – Tc – 99m. Após a coleta, os tubos foram novamente pesados para determinação da radioatividade por meio

de um contador Gama. Uma dose padrão contendo a mesma quantidade injetada de TsV – Tc – 99m foi contada simultaneamente, sendo definida como 100 % da radioatividade. Os valores obtidos foram utilizados para cálculo da porcentagem da dose injetada por grama de tecido (% ID/g) versus tempo.

Como controle, foi administrado 10 µg de TsV – Tc – 99m diluído em 50 µL de solução salina a 0,9% (equivalente a 3,7 MBq), sem a adição de hidrogel.

3.3.8.4. Biodistribuição

Camundongos linhagem SWISS foram divididos em dois grupos experimentais (n = 13 por grupo, de aproximadamente 20 g cada animal), todos recebendo, por via s.c., 10 µg de ^{99m}Tc-TsV diluído em 50 µL de solução salina a 0,9 % (equivalente a 3,7 MBq). Dez minutos após a administração do radiofármaco, o grupo 01 recebeu 200 µL da solução de hidrogel no mesmo local da injeção de TsV – Tc – 99m, enquanto o grupo 02 não recebeu nenhuma aplicação adicional.

Os animais de ambos os grupos foram subdivididos em tres subgrupos (grupo 01A, 01B e 01C; grupo 02A; 02B e 02C). Trinta minutos após a administração do TsV – Tc – 99m, os animais dos subgrupos 01A e 02A foram anestesiados com xilazina (15 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg) e posicionados horizontalmente sob uma câmara gama (Nuclide™ TH 22, Mediso). As imagens foram adquiridas utilizando um colimador de baixa energia e alta resolução, com matriz de 256×256×16 e tempo de aquisição de 600 s, aplicando uma janela simétrica de 20 % em torno do pico de energia fixado em 140 keV.

Após a aquisição das imagens, os animais foram eutanasiados, e órgãos e tecidos, incluindo coração, pulmões, fígado, baço, rins, intestinos, bexiga, estômago, pele e hidrogel, foram coletados, secos em papel filtro e pesados. A radioatividade de cada tecido foi determinada, e o %ID/g foi calculado conforme descrito anteriormente.

O mesmo procedimento foi realizado com os subgrupos 01B e 02B, 60 minutos após a administração do TsV – Tc – 99m. Já os grupos 01C e 02C foram submetidos aos mesmos procedimentos aos 240 minutos.

3.3.9. Inibição da letalidade de TsV

Camundongos SWISS (n = 14) foram subdivididos em dois grupos (hidrogel e controle), os quais receberam 2 DL₅₀ de TsV (35,38 µg/ 20 g) por via s.c. Dez minutos após a injeção do veneno, o grupo hidrogel recebeu 200 µL do hidrogel no mesmo lugar da injeção de TsV e o grupo controle recebeu 200 µL de PBS 100 mM. Os animais foram observados até 72 h após a injeção sendo contabilizados os óbitos.

3.3.10. Análise de dados

Os resultados foram quantificados e a análise estatística foi feita no *software* GraphPad – Prism (GraphPad Software, Inc., version 8,0). Two-way ANOVA foi utilizada para avaliar estatisticamente as variáveis. *p value* <0,05 foi considerado como significância estatística.

4. Resultados e Discussão

4.1. Desenvolvimento e avaliação de uma proteína recombinante multi-epitópica (TsMEP) como candidata a antígeno para a produção de antiveneno contra *Tityus serrulatus*.

O protocolo tradicional de imunização utilizado na produção de antivenenos emprega o veneno bruto (às vezes atenuado) como imunógeno, administrado juntamente com um adjuvante para induzir a resposta imune humoral nos animais produtores, até que se atinja a potência neutralizante desejada. Desde o desenvolvimento da produção de antivenenos terapêuticos no final do século XIX, diversas transformações foram implementadas no processo, como o uso de diferentes adjuvantes, a variação na quantidade de antígeno injetada e a aplicação em múltiplos sítios de injeção. No entanto, o veneno em si continua sendo utilizado durante esse processo (Garcia y Perez *et al.*, 1988; Aucouturier *et al.*, 2000; Machado de Avila *et al.*, 2004; Ozkan *et al.*, 2006 e Venancio *et al.*, 2013).

Além disso, o veneno é uma mistura complexa de moléculas, nem todas relevantes ou imunogênicas para a produção de anticorpos neutralizantes (Maria *et al.*, 2005 e Pucca *et al.*, 2011). Sob uma perspectiva ética, também é essencial considerar os efeitos tóxicos do veneno aos animais produtores de soro, o que pode comprometer seu bem-estar e qualidade de vida (Theakston *et al.*, 2003).

Nesse contexto, foi desenvolvida a TsMEP, uma alternativa biotecnológica voltada para a obtenção de um anti-veneno mais específico e seguro, além de avançar em direção a uma estratégia mais sustentável. Os epítomos selecionados representam as regiões imunogênicas das α -toxinas Ts2 e Ts3, além da Ts1, a principal β -toxina do veneno, que, em conjunto, são as principais responsáveis pela patogênese do escorpionismo. Essas toxinas provocam a liberação massiva de neurotransmissores, desencadeando a estimulação do sistema nervoso autônomo (Vasconcelos *et al.*, 2005; Cologna *et al.*, 2009 e Pucca *et al.*, 2015). Além disso, foram

adicionados dois epítomos da hialuronidase, a principal enzima responsável pela biodistribuição das neurotoxinas a partir do ponto de inoculação primário (Pessini *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2007; Horta *et al.*, 2014 e Guerra-Duarte *et al.*, 2019).

A sequências selecionadas para a construção da TsMEP foram clonadas no vetor de expressão pET 28b (+), contendo 6xHis-tag (**Figura 5 A**). A sequência de aminoácidos da TsMEP é mostrada na **Figura 5 B** e a localização dos epítomos nas estruturas modeladas das toxinas nativas Ts1 (PDB: [1NPI](#)), Ts2 (AlphaFold: AF-P68410-F1), Ts3 (PDB: [5CY0](#)) e Hialuronidase I (AlphaFold: AF-P85841-F1) foram visualizadas com ChimeraX (Jumper *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2023 e Varadi *et al.*, 2024) (**Figura 5 C**). Após a expressão e purificação, a análise da TsMEP por 15 % SDS – PAGE em condições redutoras mostra uma banda de ≈ 25 kDa (**Figura 6**), compatível com a massa molecular teórica da TsMEP.

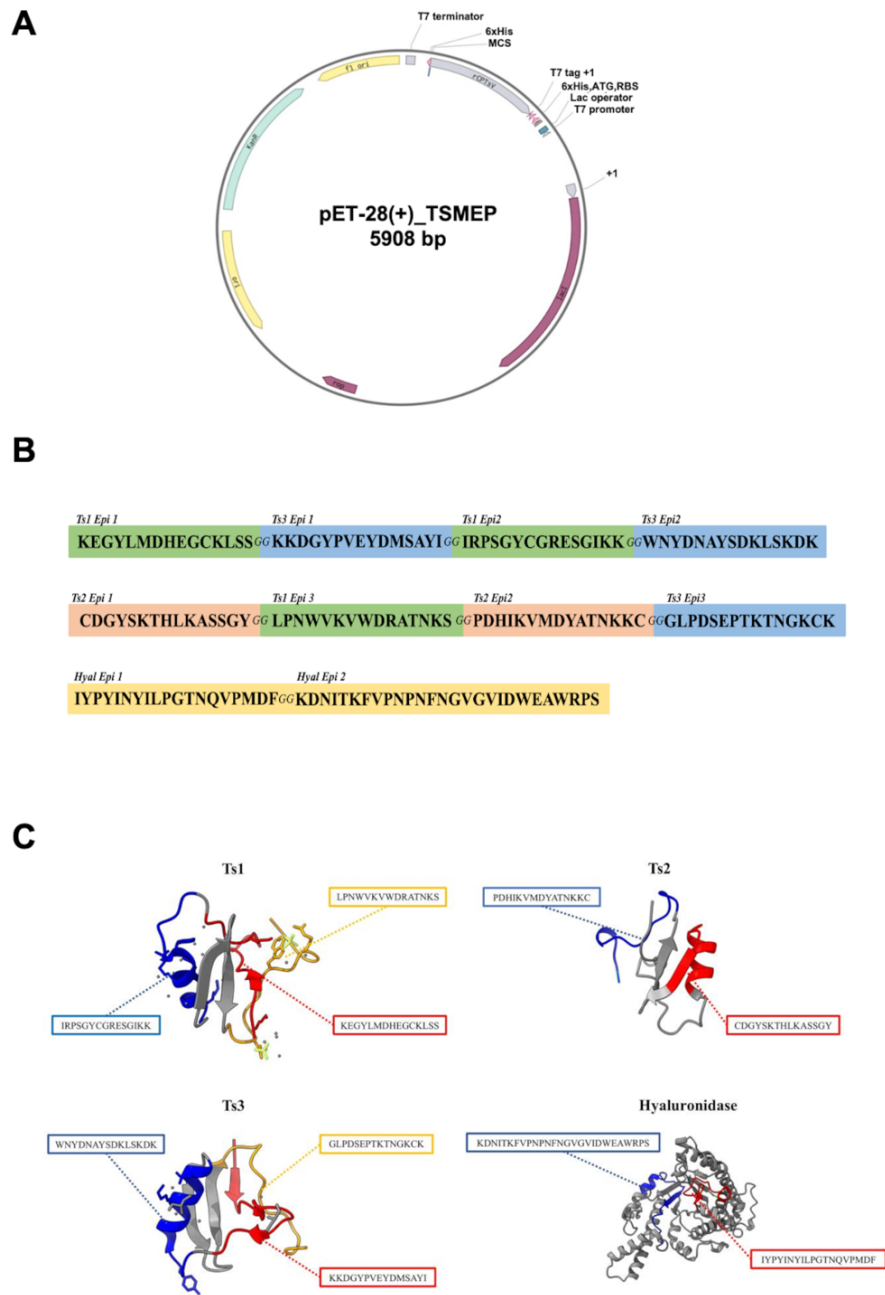


Figura 5. Estrutura do vetor de expressão e sequência de aminoácidos da TsMEP. (A) TsMEP – pET 28b(+). (B) Sequência de aminoácidos mostrando a composição dos epítomos das principais toxinas (Epi) e a localização deles na TsMEP. (C) Epítomos usados para construir a TsMEP e sua localização na estrutura nativa das toxinas.

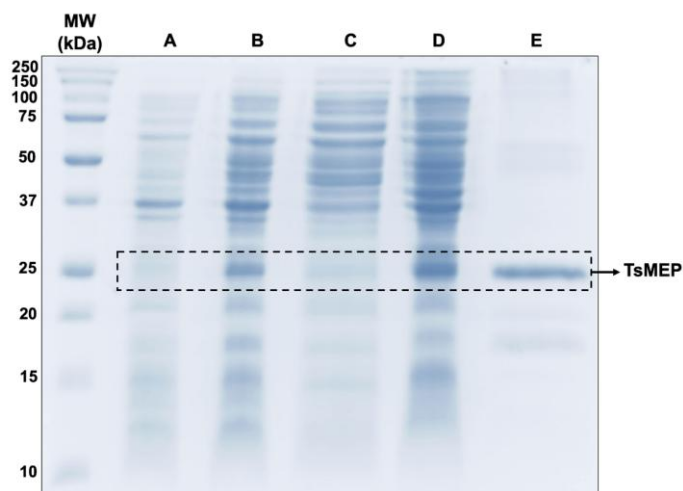


Figura 6. Análise da expressão e purificação da TsMEP. Gel (15 %) foi corado com Coomassie Blue. Na primeira fileira, MW: marcador de massa molecular. A: extrato bacteriano não induzido, B: extrato bacteriano induzido com IPTG a 37 °C por 3 h; C: fração solúvel do extrato bacteriano contendo a TsMEP; D: fração insolúvel do extrato bacteriano e E: TsMEP purificada (10µg). As amostras foram analisadas por SDS-PAGE sob condições redutoras.

Para demonstrar a segurança da TsMEP, foram realizados ensaios de citotoxicidade e letalidade. Os testes de toxicidade celular mostraram que a TsMEP não reduz a viabilidade das células Sp2/0 nas condições testadas, diferentemente do observado com o TsV, que diminui a viabilidade celular de forma concentração-dependente (**Figura 7**). Esse achado foi reforçado pela avaliação da atividade enzimática da TsMEP em comparação com o TsV, demonstrando que concentrações de até 10 µg foram incapazes de degradar o HA (**Figura 8**).

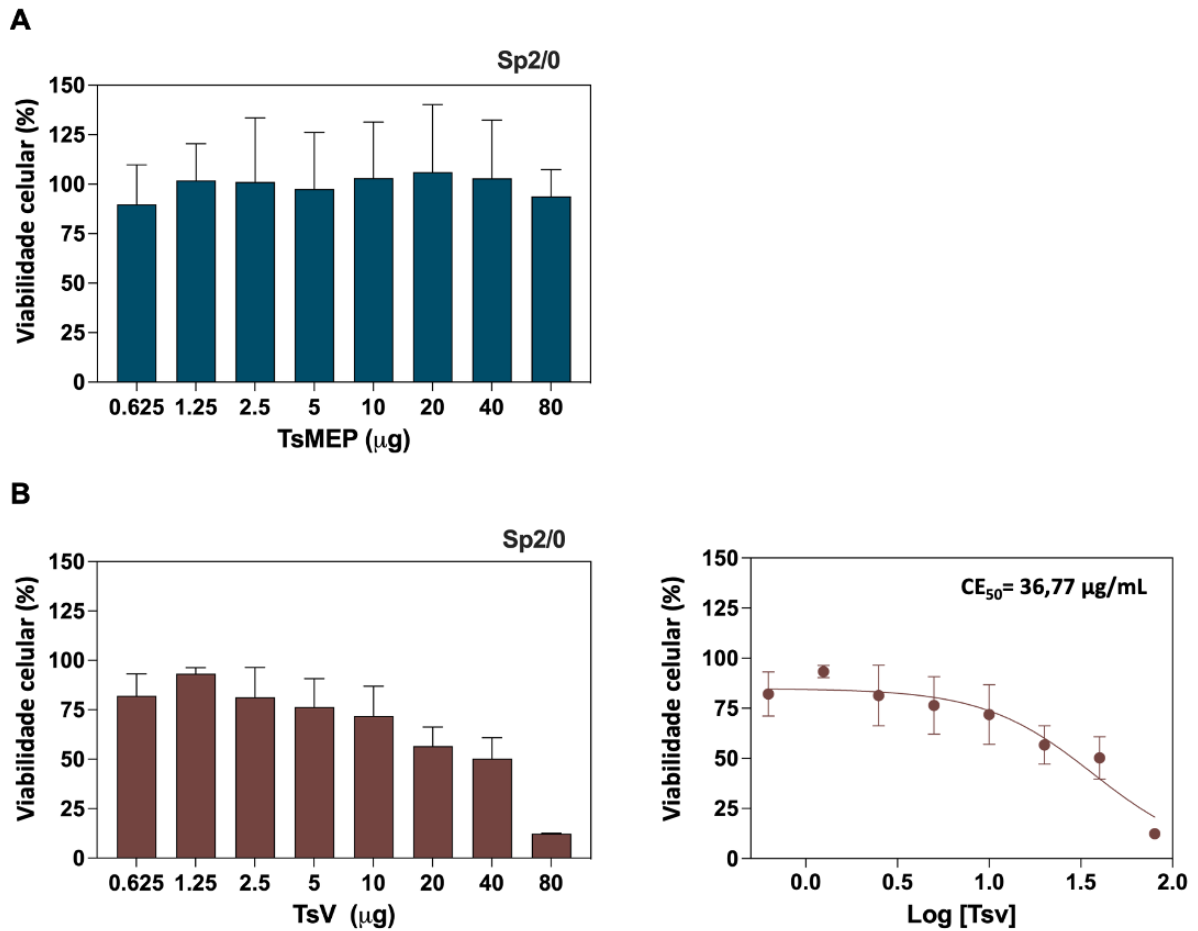


Figura 7. Viabilidade celular *in vitro* da TsMEP e TsV. Viabilidade de células Sp2/0 posterior ao tratamento com diferentes concentrações (80 – 0,625 µg/mL) de (A) TsMEP ou (B) TsV. A viabilidade celular foi analisada utilizando o reagente alamar Blue. Os dados representam a média ± SEM de dois experimentos independentes.

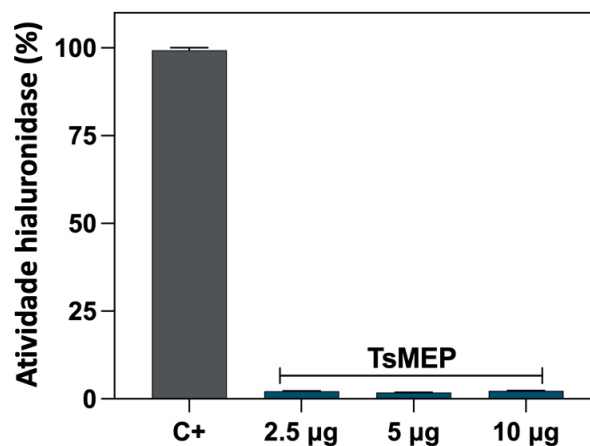


Figura 8. Atividade hialuronidásica. Um teste turbidimétrico foi desenvolvido com concentrações de 2,5, 5 ou 10 µg de TsMEP e 2 µg de TsV como controle positivo (C+). Os valores foram expressos como a porcentagem da atividade hialuronidásica em comparação com uma curva padrão contendo quantidades conhecidas de ácido hialurônico. Os resultados representam a média de triplicatas de três experimentos independentes ± SEM.

Nos testes *in vivo*, a injeção de TsMEP (200 µg por camundongo de 20 g) não foi letal para os animais desafiados, tanto após 24 quanto 48 horas de observação.

Em relação ao veneno bruto ou às suas toxinas isoladas (Ts1, Ts2, Ts3 e hialuronidase), a TsMEP apresenta como vantagem o fato de não possuir toxicidade nem atividade enzimática. Ao longo do tempo, diversas alternativas para a detoxificação de toxinas escorpiônicas foram propostas, incluindo o uso de lipossomas, polimerização química, peptídeos sintéticos, proteínas não tóxicas (como a Ts4) e a expressão de toxinas em corpos de inclusão. No entanto, essas abordagens foram focadas em toxinas individuais (especialmente neurotoxinas α ou β) para estimular a resposta imune (Guatimosin *et al.*, 2000; Alvarenga *et al.*, 2002 e Machado de Avila *et al.*, 2004). Por outro lado, quando o TsV bruto foi detoxificado, observou-se uma perda na capacidade de induzir anticorpos neutralizantes de alta potência e anticorpos específicos contra hialuronidases (Heneine *et al.*, 1986; Garcia y Perez *et al.*, 1988 e Guerra-Duarte *et al.*, 2019).

Outra vantagem é a capacidade da TsMEP de estimular a produção de anticorpos específicos contra TsV (**Figura 9**), demonstrando que de fato os epítomos que a compõem são imunogênicos, que é de suma importância no objetivo de reduzir a utilização de TsV no esquema de produção de soro anti-escorpiônico. Os venenos escorpiônicos apresentam certa similaridade em sua composição e, por isso, os anticorpos anti-TsMEP apresentaram reatividade cruzada por ELISA contra diversos venenos escorpiônicos testados (**Figura 10**), demonstrando um alto reconhecimento contra *T. stigmurus* e uma menor reatividade frente ao veneno de *T. bahiensis*. A vantagem da presença de epítomos conservados (Anexo 1) na conformação da TsMEP permite o reconhecimento de outros venenos escorpiônicos, porém a capacidade neutralizante e protetora do soro anti – TsMEP ainda precisa ser melhor avaliada. A utilização de proteínas recombinantes não tóxicas que contenham epítomos consensos entre

as espécies de interesse clínico no Brasil ou nas Américas, (Polikarpov *et al.*, 1999 e Gurevitz *et al.*, 2001), contribui para o desenvolvimento de um soro pan – escorpônico.

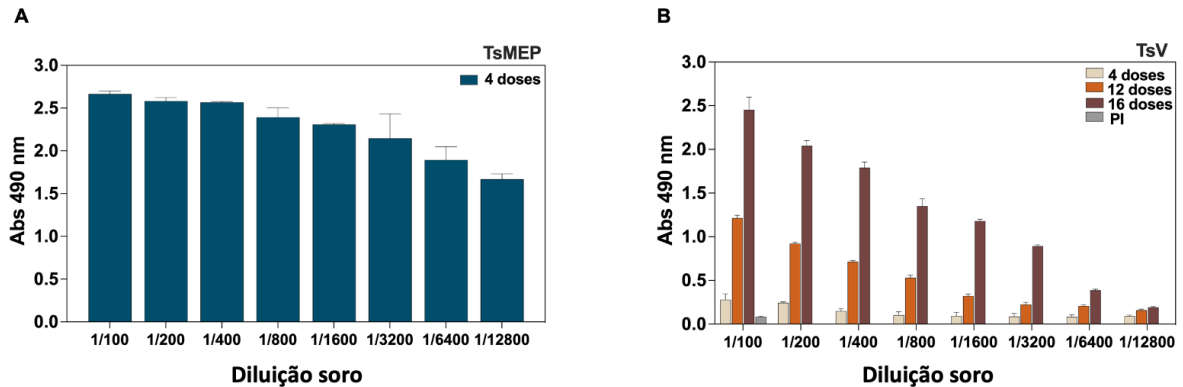


Figura 9. Reatividade do soro anti-TsMEP contra TsMEP e TsV. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de (A) TsMEP ou (B) TsV. Soro anti – TsMEP ou PI foram diluídos (1/100 a 1/12 800). As placas foram incubadas com anticorpo secundário anti – IgG de coelho conjugado com HRP diluído 1/15 000. A reação foi observada pela adição de OPD. Valores de absorbância foram determinados a 490 nm. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas em três experimentos independentes ± desvio padrão (DP).

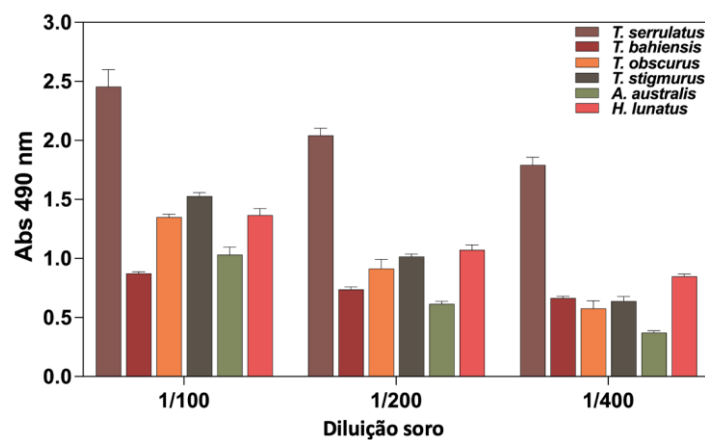


Figura 10. Reatividade cruzada do soro anti-TsMEP contra venenos de escorpiões de importância médica. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de cada veneno. Soro anti – TsMEP ou PI foram diluídos (1/100 a 1/12 800). As placas foram incubadas com anticorpo secundário anti – IgG de coelho conjugado com HRP diluído 1/15 000. A reação foi observada pela adição de OPD. Valores de absorbância foram determinados a 490 nm. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas em três experimentos independentes ± desvio padrão (DP).

Em uma análise mais detalhada, os resultados do Western blot destacam três achados importantes: I) os anticorpos anti – TsMEP são capazes de reconhecer os principais componentes do TsV, incluindo as neurotoxinas (componentes de baixa massa molecular 5–10 kDa) e as hialuronidases (componentes de massa molecular entre 25–50 kDa). II), a TsMEP é

reconhecida tanto por SAV quanto pelo anti-TsV e III) a expressão da TsMEP foi confirmada através do seu reconhecimento pelo anticorpo anti – 6 xHis-tag – HRP (**Figura 11**).

Esses resultados reforçam a capacidade dos epítomos da TsMEP em estimular uma resposta imune contra diferentes toxinas do veneno (**Figura 11**) tornando-a um imunógeno eficaz para auxiliar na produção de antivenenos escorpionicos. Essa abordagem representa uma estratégia inovadora e mais segura, que leva em consideração o bem-estar animal durante o processo de fabricação. Trabalhos anteriores do nosso grupo mostram a eficiência do uso de proteínas recombinantes que mimetizam múltiplos epítomos na produção de antivenenos contra envenenamentos por serpentes e aranhas (Lima *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2020; Molina *et al.*, 2020; Saavedra-Langer *et al.* 2021 e Quispe *et al.*, 2022).

Nas membranas contendo TsMEP, o ensaio de Western blot revelou a presença de bandas de menor massa molecular, variando entre 15 e 20 kDa, que foram detectadas pelos soros imunes (anti-TsMEP, anti-TsV e SAV). Como essas bandas também foram reconhecidas pelos anticorpos anti-6x-His Tag, é provável que correspondam a formas aberrantes da TsMEP.

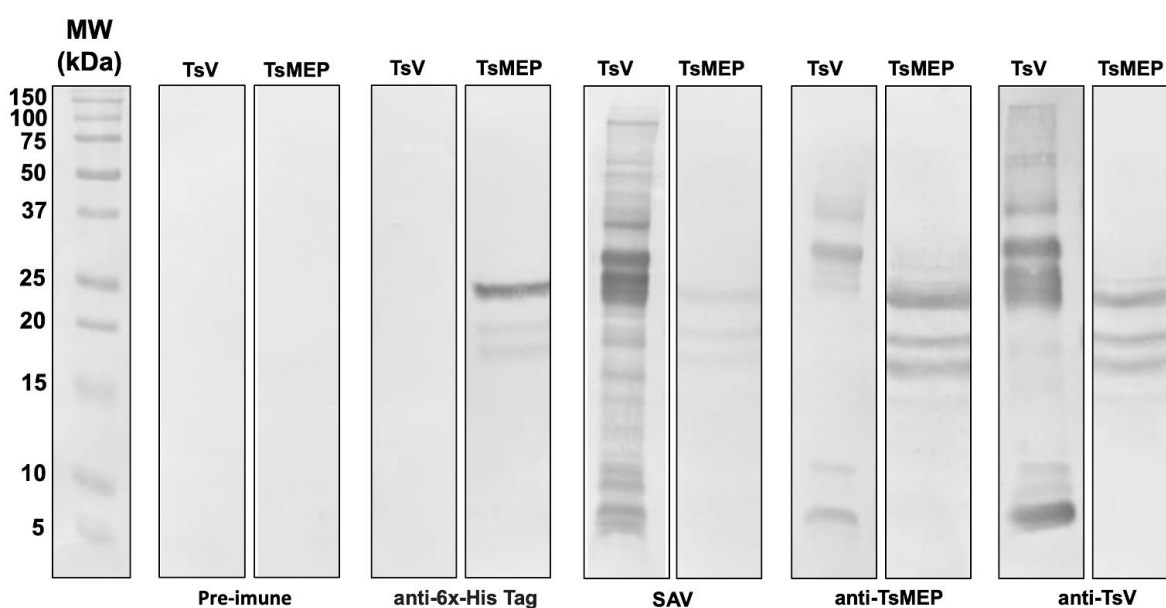


Figura 11. Imunoreatividade de diferentes soros contra TsV e TsMEP. TsV ou TsMEP (10 µg) foram submetidos a SDS-PAGE 15%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com

soros pré-imune (1:100); anti-6×-His Tag-HRP (1:5000); anti veneno de uso terapêutico (SAV; 1:10 000); anti - TsV (1:500) ou anti - TsMEP (1:500). Anticorpo secundário anti - IgG de coelho conjugado HRP (1:30 000) foi usado com as membranas previamente incubadas com soros anti - TsMEP, anti - TsV e pré-imune. Para as membranas incubadas com SAV, utilizou-se anti - IgG de cavalo conjugado com HRP (1:50 000). Após lavagens, a reação foi detectada pela adição dos substratos da HRP (3 3' -diaminobenzidine tetrahydrochloride [DAB] e chloronaftol).

Com a finalidade de obter uma proteína com maior grau de pureza (sem a presença de bandas aberrantes), se sugere o método de eletroeluição como uma alternativa viável, podendo ser utilizado rotineiramente em conjunto com a purificação por afinidade. Essa técnica permite a transferência da banda proteica (TsMEP) do gel por meio de um campo elétrico, com pequenos volumes de recuperação, tornando-se uma opção simples, rápida e economicamente viável para obter amostras mais puras (Seelert & Krause 2008; Borowiec *et al.*, 2016 e Vasquez-Iglesias *et al.*, 2017). Além disso, a otimização das condições de cultivo (meio de cultura, concentração do indutor, temperatura e duração), bem como a promoção da expressão no periplasma bacteriano, poderia melhorar tanto a quantidade quanto a qualidade da proteína recombinante (Hoffmann & Rinas 2004 e Rozkov & Enfors 2004) e devem, portanto, ser consideradas em estudos futuros.

Uma vez confirmado o reconhecimento do TsV e de seus principais componentes (toxinas de baixa e alta massa molecular), os 10 epítomos que compõem a TsMEP foram avaliados a fim de identificar quais deles foram capazes de estimular a produção de anticorpos. A técnica de SPOT revelou que seis epítomos foram completamente reconhecidos pelos anticorpos anti-TsMEP (**Figura 12**), sendo quatro deles correspondentes a neurotoxinas. Das toxinas Ts1 e Ts2, apenas um epítomo de cada foi reconhecido, enquanto da Ts3 foram detectados dois epítomos. O epítomo Ts3 Epi 1 (**KKDGY PVEYDMSAYI**) apresentou a maior reatividade, seguido de Ts1 Epi 2 (**IRPSGYCGRESGIKK**), Ts3 Epi 2 (**WNYDNAYS DKLLSKDK**) e Ts2 Epi 2 (**PDHIKVWDYATNKC**). Ambos os epítomos da hialuronidase mostraram menor reatividade e foram apenas parcialmente reconhecidos: Hyal

Epi 1 (**I**YPYINYIL**P**GT**N**QT**V**P**A**M**D**F) e Hyal Epi 2 (**N**IT**K**F**V**P**N**P**N**F**N**G**V**G**V**I**D**W**E**A**W**R**P**S) (aminoácidos reconhecidos destacados em negrito).

Outros pontos apresentaram reatividade, porém em menor intensidade, conforme determinado pelo ponto de corte estabelecido. O soro PI, utilizado como controle negativo, não mostrou reatividade com a membrana, conforme esperado.

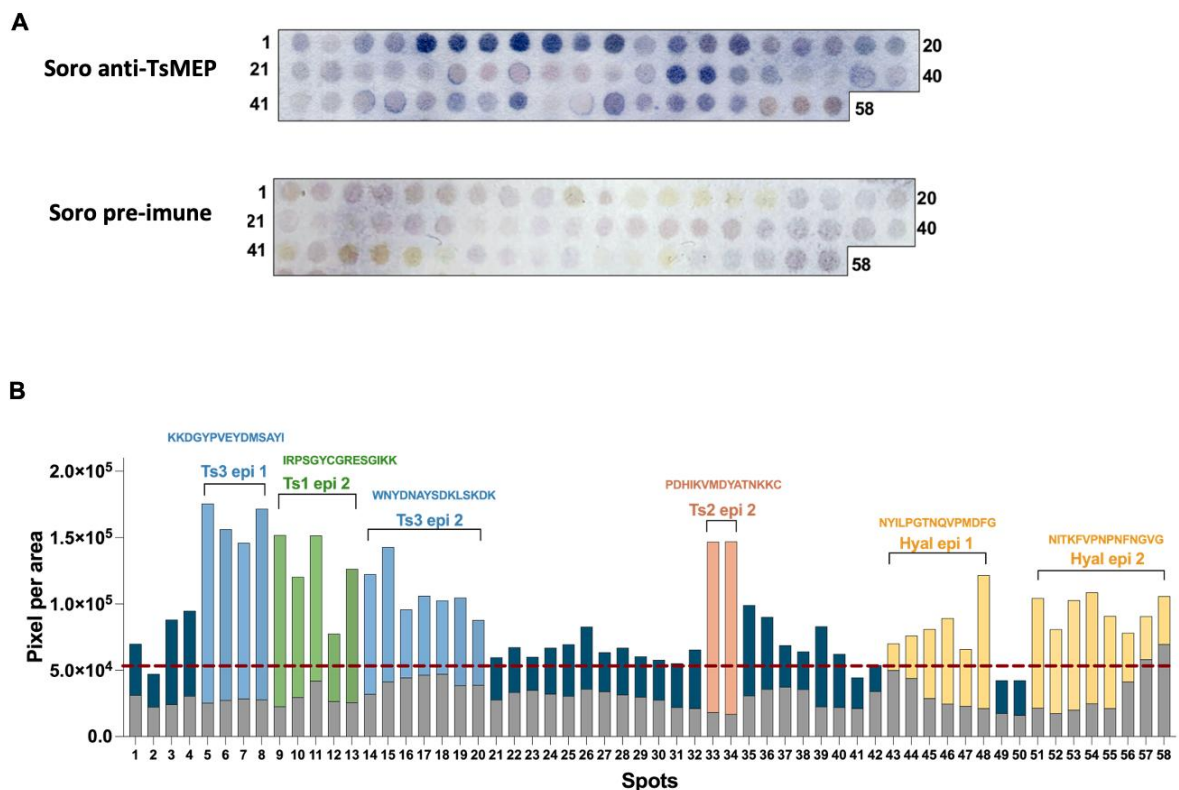


Figura 12. Mapeamento de epítomos da TsMEP pelo método de SPOT. (A) Membrana de celulose contendo peptídeos sobrepostos de 15 aminoácidos da sequência da TsMEP, analisada com soro anti-TsMEP ou soro PI, ambos diluídos 1:250. O anticorpo anti-coelho-AP foi utilizado na diluição de 1:10 000. O substrato MTT-BCIP foi adicionado após a incubação com o anticorpo secundário, revelando os spots reativos em azul na membrana. (B) Reatividade dos spots medida pelo *software* ImageJ. As sequências dos peptídeos correspondentes aos spots reconhecidos são apresentadas. As barras azul-escuro e cinza representam a reatividade do soro anti-TsMEP e do soro pré-imune, respectivamente. Os peptídeos identificados como positivos estão coloridos da seguinte forma: azul-claro (Ts3), verde (Ts1), laranja (Ts2) e amarelo (Hyal).

Maria et al. (2005) demonstraram que as toxinas Ts1, Ts2 e Ts3 possuem três principais regiões antigênicas contínuas localizadas nas regiões N-terminal, central e C-terminal. Dentre essas, os anticorpos direcionados às regiões N-terminais apresentaram potencial capacidade neutralizante (Devaux *et al.*, 1997; Alvarenga *et al.*, 2002; Chavez-Olortzgui *et al.*, 2002 e Maria *et al.*, 2005). O mapeamento de epítomos da TsMEP pelo método de SPOT revelou que, apenas o epítopo 1 da Ts3 está localizado nessa região. Além disso, o N-terminal da Ts1 (**KEGYLMDHEGCKLSS**), a principal β -neurotoxina, não foi reconhecido. No entanto, para atingir esse objetivo, ainda há muito a ser feito, principalmente no aprimoramento do reconhecimento do Epítopo 1 da Ts1 e do Epítopo 2 da Hialuronidase, o que poderia potencialmente induzir uma produção mais eficaz de anticorpos neutralizantes. Para aumentar a potência neutralizante dos anticorpos produzidos, um novo esquema de imunização pode ser desenvolvido. As toxinas nativas presentes no TsV contêm epítomos lineares e conformacionais, estimulando uma resposta imune contra ambos os tipos. No entanto, os anticorpos anti-TsMEP são direcionados principalmente a epítomos lineares. Dessa forma, a alternância entre doses de TsMEP e TsV pode potencializar a produção de anticorpos com maior capacidade neutralizante, ao mesmo tempo em que reduz a quantidade de veneno necessária e seus efeitos tóxicos nos animais produtores.

Neste trabalho, o objetivo central foi utilizar a TsMEP para estimular a produção de anticorpos capazes de neutralizar a toxicidade do TsV, o escorpião de maior importância médica no Brasil. Ensaios de neutralização *in vitro* (**Figura 13**) indicam que esse objetivo foi parcialmente alcançado: os anticorpos gerados contra os dois epítomos da Hialuronidase foram capazes de inibir 65 % da atividade enzimática dessa proteína no veneno. Além disso, em testes *in vivo*, o soro produzido contra a TsMEP neutralizou parcialmente a atividade letal do TsV (2 DL₅₀). Quando volumes maiores de soro foram administrados (200 μ L), a proteção foi de 66 %, e os camundongos desafiados não apresentaram os sinais clínicos (nosicepção, fadiga,

salivação excessiva, dificuldade respiratória) observados nos outros grupos (**Tabela 1**). Embora a proteção total (100 %) ainda não tenha sido alcançada, os resultados demonstram que este imunógeno é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes.

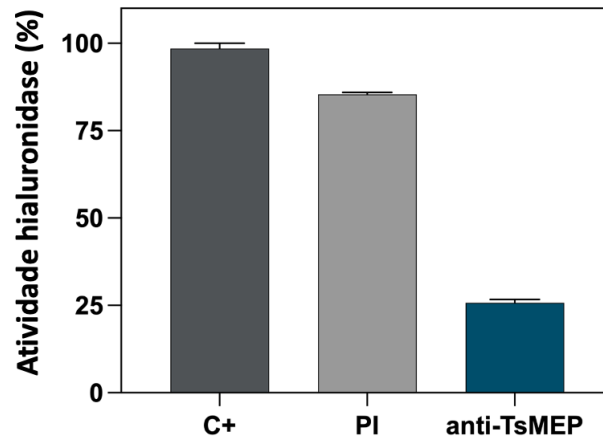


Figura 13. Neutralização *in vitro* da atividade hialuronidásica do TsV utilizando soro anti – TsMEP. TsV (2,5 µg) foi incubado com 2,5 µL de soro pré-imune (PI) ou anti – TsMEP por 1 h a 37 °C. TsV incubado com tampão acetato foi utilizado como controle positivo, C+. Após a incubação, 200 µL de uma solução contendo 2,5 % (p/v) de cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) dissolvido em 2 % de NaOH (p/v) foi adicionado e a turbidez foi medida a 405 nm. Resultados expressam as médias ± SEM de quatro ensaios independentes.

Tabela 1. Neutralização da letalidade do TsV por soro anti-TsMEP

Veneno de <i>T. serrulatus</i> (2 DL ₅₀ /20 g)	Sinais	Sobreviventes/desafiados (%)
Grupo 1: 50 µL soro	Crise imediata, morte em 1 hora	0/6 (0)
Grupo 2: 100 µL soro	Crises e fadiga durante as primeiras horas, mortes após 1 hora	3/6 (50)

Grupo 3:	Fatiga durante a	
200 µL soro	primeira hora, duas	4/6 (66,6)
	mortes após 3 horas.	
Grupo 4:	Crise imediata, mortes	
PBS	em 10 min.	0/3 (0)

Um total de 21 camundongos SWISS foram divididos em quatro grupos e receberam, por via intraperitoneal, 35,38 µg de TsV por 20 g de peso corporal (2 DL₅₀), previamente incubado com 50, 100 ou 200 µL de soro anti-TsMEP, ou PBS (controle). Os camundongos sobreviventes foram contabilizados 24 horas após a injeção.

A análise por SPOT revelou um padrão de reconhecimento que pode explicar a proteção parcial (66 %) observada contra 2 DL₅₀ de TsV (**Tabela 1**). Embora o potencial neutralizante dos anticorpos produzidos ainda possa ser aumentado, estudos anteriores de nosso grupo com proteínas quiméricas recombinantes não tóxicas como a rMEPCTx (*Crotalus durissus terrificus*) e rMEPLox (aranhas do gênero *Loxosceles*) apoiam a utilização de proteínas recombinantes como alternativas na produção de imunobiológicos para o tratamento de acidentes com animais peçonhentos (Lima *et al.*, 2018; Molina *et al.*, 2020). No estudo de Molina e colaboradores, 500 µL de soro anti – rMEPCTx foram capazes de brindar uma proteção de 100 % frente a camundongos desafiados com 2 DL₅₀ (4,8 µg/20 g) de Crotoxina procedente de *Crotalus durissus terrificus*. Já no trabalho de Lima, 100 µL de soro anti – rMEPLox foram capazes de proteger ao 60 % de animais desafiados com 2,5 DL₅₀ (10 µg/20 g) de veneno de *Loxosceles intermedia*, do mesmo jeito, (2 µL de soro anti – rMEPLox) foi capaz de inibir a atividade hialuronidásica do veneno em 60 %. Ao compararmos os três estudos no contexto do uso do soro total, fica evidente que a utilização de anticorpos purificados – seja por afinidade a proteína A ou por especificidade ao veneno – poderia oferecer uma melhora substancial na relação anticorpo/veneno neutralizado (valores em µg). Isso porque, no caso do soro bruto, a capacidade

neutralizante acaba sendo limitada pelo volume necessário para atingir concentrações eficazes, enquanto anticorpos purificados permitiriam alcançar maior eficiência neutralizante sem depender de volumes elevados.

Além disso, a escolha do adjuvante apropriado pode aumentar significativamente a potência neutralizante dos soros e reduzir o número de doses necessárias. Os adjuvantes podem ser classificados em potenciadores imunológicos, que ativam a resposta imune por meio de padrões moleculares associados a patógenos, e sistemas de liberação, que aumentam a apresentação do antígeno ao prolongar sua disponibilidade e promover a fagocitose (Apostolico *et al.*, 2016). Entre os sistemas de liberação, os adjuvantes à base de esqualeno têm se mostrado superiores na indução de respostas humorais robustas, com altos títulos de anticorpos neutralizantes (Stephenson *et al.*, 2005). Mediante a estimulação de um ambiente inflamatório localizado, recrutando células apresentadoras de antígenos e facilitando a ativação de células T, o que desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas. Essa abordagem é particularmente eficaz na estimulação de anticorpos de alta afinidade, duradouros e com reatividade cruzada, tornando-se uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de vacinas e antivenenos (O'Hagan *et al.*, 2012; Nouri *et al.*, 2015; Cioncada *et al.*, 2017; Stelzner *et al.*, 2018; Akache *et al.*, 2022; Dias-Assis *et al.*, 2023; Fox *et al.*, 2023; Kashkooli *et al.*, 2023 e Zhao *et al.*, 2023)

Além disso, novas plataformas de liberação, como hidrogéis injetáveis, podem reduzir ainda mais a necessidade de doses de reforço. Hidrogéis permitem a liberação sustentada do antígeno, aumentando tanto a durabilidade quanto a magnitude da resposta de anticorpos com um menor número de doses (Gale *et al.*, 2021; Nkanga *et al.*, 2022 e Ou *et al.*, 2023). A combinação desses avanços com proteínas recombinantes não tóxicas pode abrir caminho para uma nova geração de antivenenos mais seguros e eficazes.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que uma única proteína não tóxica pode estimular uma resposta imune específica contra uma mistura complexa de proteínas tóxicas

presentes no veneno. A capacidade da TsMEP de induzir anticorpos neutralizantes contra a hialuronidase de *T. serrulatus* representa uma alternativa promissora para bloquear a biodistribuição do veneno a partir do local da picada, reduzindo seus efeitos tóxicos sistêmicos (Horta *et al.*, 2014 e Oliveira-Mendes *et al.*, 2019). Além disso, a TsMEP tem o potencial de reduzir a dependência do TsV no processo de produção de antivenenos. Sua flexibilidade permite a produção em larga escala, além de possibilitar modificações simples para incorporar novos conhecimentos sobre a toxicidade do veneno e o refinamento dos epítomos, abrindo caminho para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e sustentáveis.

4.2. Desenvolver um hidrogel injetável funcionalizado com polifenóis como primeiro socorro para o tratamento *in situ* de picadas de escorpião

O escorpionismo é um importante problema de saúde no Brasil, com um aumento no número de acidentes nos últimos anos, especialmente nas regiões mais populosas do país. O tratamento específico para essa condição é a administração de antiveneno, seja polivalente ou monovalente, disponível apenas em centros de saúde referência. Um dos desafios do escorpionismo é a rápida biodistribuição do veneno, que atinge seu pico na circulação sanguínea em aproximadamente 30 minutos após a picada. No entanto, cerca de 80 % dos pacientes levam até três horas para receber atendimento médico especializado (Oliveira-Mendes *et al.*, 2019; Guerra-Duarte *et al.*, 2023).

Com o objetivo de minimizar os efeitos do envenenamento até a chegada ao atendimento médico, durante décadas foram propostas diversas terapias de “primeiros socorros”, incluindo torniquetes, bandagens constritoras, aplicação de choques elétricos, uso de extratores de veneno, cortes e incisões locais. Contudo, atualmente essas práticas são consideradas ineficazes e desprovidas de sustentação científica robusta, representando, na verdade, mais riscos do que benefícios. Seu uso pode causar danos adicionais às estruturas teciduais ao redor da ferida, introduzir patógenos externos com potencial de gerar infecções, além de provocar

sangramentos que agravam ainda mais o quadro clínico da vítima. Mesmo com essas evidências, uma rápida busca na internet revela que kits de “primeiros socorros” continuam disponíveis comercialmente, tanto em lojas especializadas quanto em supermercados. Muitos desses kits baseiam-se na aplicação de pressão negativa (aproximadamente 1 atm) sobre a ferida, com a promessa de promover a sucção do veneno. No entanto, estudos conduzidos com rigor científico — incluindo protocolos reprodutíveis e submetidos à revisão por pares — demonstraram a ineficácia desses dispositivos (Bush et al., 2000; Welch & Gales, 2001; Alberts, 2004; Bush, 2004). Além disso, observou-se que a falsa sensação de segurança proporcionada por sua utilização frequentemente resulta em atraso na procura por assistência médica especializada, o que pode piorar significativamente o prognóstico do envenenamento (Manduwage *et al.*, 2023).

Diante desse cenário, o presente trabalho propõe uma nova estratégia de tratamento que pode ser aplicado imediatamente no local da picada para bloquear a biodistribuição do veneno. Essa abordagem se baseia na inibição da hialuronidase e na captura do veneno, atuando de forma complementar ao tratamento tradicional com antiveneno.

Devido ao papel crucial da hialuronidase (Hyal) na biodistribuição do veneno de *Tityus serrulatus* (TsV), a inibição de sua atividade pode ser um alvo importante para reduzir os efeitos sistêmicos do envenenamento (Horta et al., 2014). Com base nessa premissa, avaliamos a influência de diferentes inibidores sobre a Hyal como uma prova de conceito. Primeiramente, a CE₅₀ da atividade de Hyal foi determinada e o valor obtido foi de 0,2 unidades (0,74 µg) (**Figura 14**).

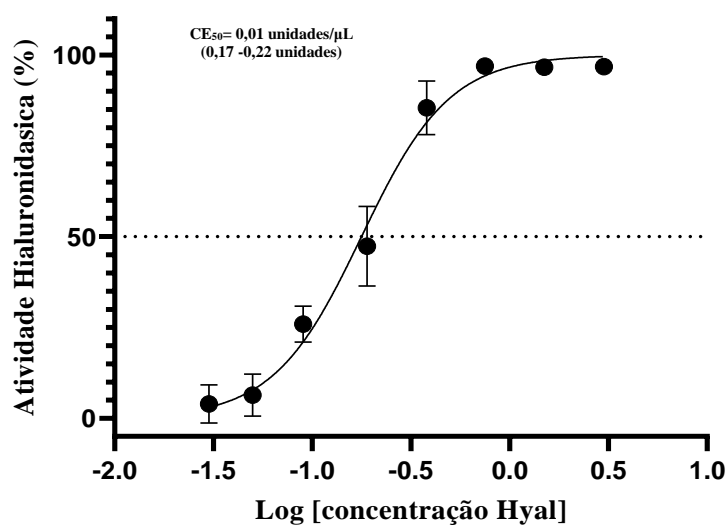


Figura 14. Atividade hialuronidásica (Hyal). Resultados do ensaio turbidimétrico utilizando uma curva de concentração variando de 3 a 0,03 unidades de Hyal. Os valores são expressos como a porcentagem da atividade da hialuronidase em comparação com uma curva padrão contendo quantidades conhecidas de ácido hialurônico (HA). Os resultados representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão (DP).

Para avaliar se os polifenóis poderiam inibir *in vitro* a atividade enzimática da hialuronidase (Hyal), diferentes concentrações (15,6 a 1000 μ M) de cada polifenol foram pré-incubadas com 5 CE₅₀ de Hyal (1 unidade = 3,7 μ g) por 1 hora a 37 °C. Os cinco polifenóis testados demonstraram capacidade de inibição da atividade enzimática, sendo o ácido tânico (TA) o mais eficaz, com uma concentração inibitória média (CI₅₀) de 34,80 μ M, seguido da quercetina (Q), com CI₅₀ de 76,64 μ M, Galato de epigallocatequina (EGCG) com CI₅₀ de 135,10 μ M, e, por fim, o ácido gálico (GA), que apresentou o menor desempenho, com CI₅₀ de 421,20 μ M (Figura 15).

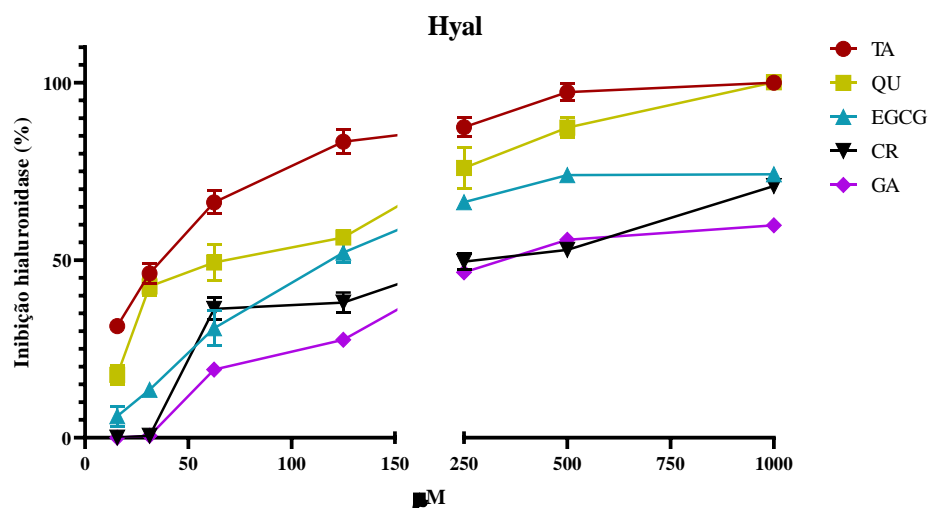


Figura 15. Inibição *in vitro* da atividade da hialuronidase por polifenóis. Hyal (5 CE₅₀) foi incubada com diferentes concentrações (15,6 a 1000 a µM) de cinco polifenóis por 1 hora a 37 °C. Após a incubação, a atividade enzimática foi avaliada. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas em três experimentos independentes ± desvio padrão (DP).

As plantas têm sido historicamente utilizadas na medicina tradicional por suas propriedades terapêuticas contra picadas e mordidas de animais peçonhentos. Um dos focos de interesse nessa área é a identificação de compostos vegetais capazes de inibir toxinas, como a hialuronidase presente no TsV. Entre esses compostos, os polifenóis apresentam um amplo espectro de ações biológicas benéficas à saúde humana por meio de diversos mecanismos, demonstrando um potencial significativo no tratamento de várias doenças (Chu, 2022; Grosso et al., 2022; Sum et al., 2022; Iqbal et al., 2023).

Os polifenóis testados neste estudo mostraram propriedades inibitórias satisfatórias, especialmente o ácido tânico (CI₅₀ = 34,80 µM). A interação entre polifenóis e proteínas ocorre por meio de interações hidrofóbicas e hidrofílicas. Foi descrito que a presença de resíduos de galoil reforça a interação hidrofóbica entre proteínas e polifenóis, desempenhando um papel essencial na formação de complexos não covalentes entre proteínas e polifenóis (Han et al., 2020; Li et al., 2021; Wang et al., 2023; Feng et al., 2023). Além disso, os polifenóis formam ligações de hidrogênio com os grupos carbonila das proteínas, contribuindo para a estabilização

desses complexos (Buitimea-Cantua et al., 2018; Li et al., 2021). O ácido tânico contém dez resíduos de galoiil, o que pode intensificar as interações hidrofóbicas e hidrofílicas com a hialuronidase, o que explicaria sua elevada capacidade inibitórias (**Figura 15**).

Além disso, verificou-se que a combinação de mais de um polifenol não interfere nas propriedades inibitórias. Essa abordagem oferece a vantagem de conter diferentes tipos de moléculas na solução, o que pode contribuir para a formação de uma matriz com alta densidade de reticulação, que poderia aprisionar as moléculas do veneno dentro do hidrogel (Han et al., 2023).

Como nosso objetivo é utilizar polifenóis como base para o desenvolvimento de um tratamento de emergência para o envenenamento por escorpiões, é fundamental identificar a influência do tempo no processo de inibição. Para isso, uma mistura polifenólica em duas concentrações (1000 e 500 μM) foi incubada com 5 EC_{50} de Hyal por diferentes períodos. A inibição da Hyal aumentou tanto com o tempo quanto com a concentração de polifenóis, atingindo mais de 50 % em apenas 2 minutos e chegando a 90 % após 5 minutos de incubação com 1000 μM da mistura de inibidores (**Figura 16**).

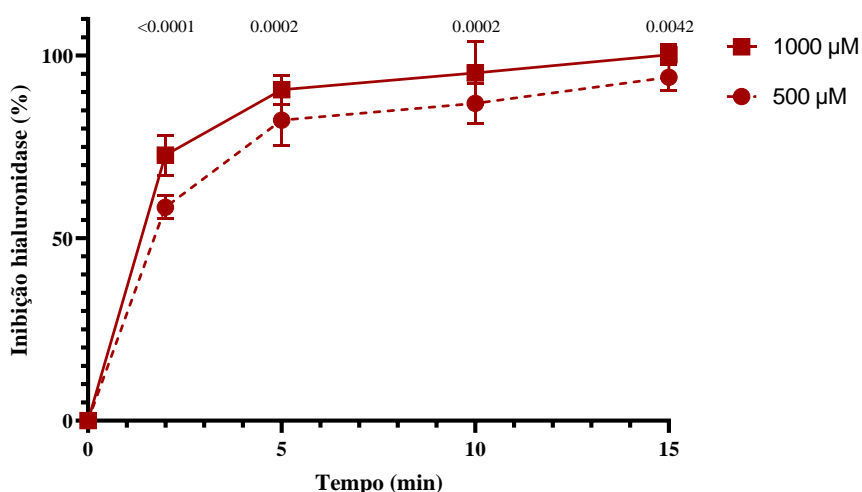


Figura 16. Influência do tempo de pré-incubação na inibição *in vitro* da atividade da hialuronidase por uma mistura de polifenóis. Hyal (5 CE_{50}) foi incubada com diferentes concentrações (1000 ou 500 μM) de uma mistura de polifenóis em diferentes tempos de pré-incubação (0, 5, 10 ou 15 minutos) a 37 °C. Após a incubação, a atividade enzimática foi avaliada. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas em três experimentos independentes \pm desvio padrão (DP).

Os protocolos tradicionais para testar a eficácia neutralizante de antivenenos de uso terapêutico e novos compostos promissores envolvem um período de pré-incubação de 30 minutos do veneno com as moléculas de interesse antes da injeção em camundongos para avaliar a proteção (Pithayanukul et al., 2005; Rodrigues et al., 2019; Gurunathan & Srimathi, 2020; Nayak et al., 2021; Vera-Palacios et al., 2022). No entanto, esse método difere do que ocorre em um envenenamento real, no qual a neutralização/inibição ocorre após a inoculação da peçonha (Gutiérrez et al., 2021).

Como nosso objetivo é alcançar a inativação enzimática para bloquear a biodistribuição do veneno *in situ*, o tempo necessário para atingir uma alta taxa de inibição é um fator crítico. A obtenção rápida de um alto percentual de inativação (> 50 %) em apenas dois minutos de pré-incubação ressalta as características adstringentes dos polifenóis. Indicando a capacidade de poder ser utilizados como um tratamento emergencial a aplicar-se *in situ* no local da picada onde é mais efetivo que sendo utilizado a nível sistêmico, mediante injeção intra venosa (de Moura et al., 2016; Li et al., 2023; Gutiérrez et al., 2021).

Uma vez verificada a capacidade inibitória dos polifenóis sobre a hialuronidase (Hyal) como prova de conceito, avaliamos suas aplicações na inibição da atividade da hialuronidase presente no veneno de *Tityus serrulatus* (TsV). Para isso foi calculada a CE_{50} do TsV, obtendo-se o valor de 0,2365 μg (**Figura 17**), confirmando a presença de uma elevada atividade da hialuronidase no veneno (Alvarenga et al., 2012; Guerra-Duarte et al., 2019).

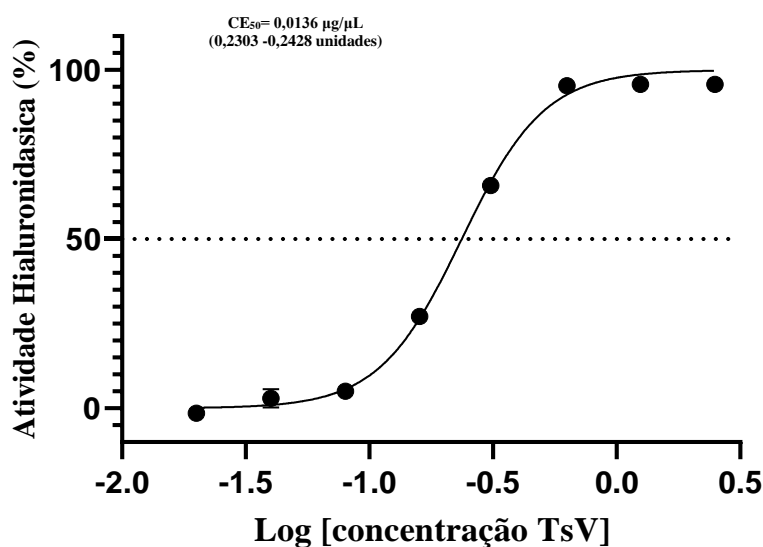


Figura 17. Atividade hialuronidásica do TsV. A) Resultados do ensaio turbidimétrico, utilizando uma curva de concentração variando de 2,5 a 0,02 µg de TsV. Os valores são expressos como a porcentagem da atividade da hialuronidase em comparação com uma curva padrão contendo quantidades conhecidas de ácido hialurônico (HA). **(B)** Cálculo da CE₅₀ da atividade da hialuronidase, utilizando uma curva de concentração de TsV para determinar a concentração capaz de degradar 50 % do HA na solução do ensaio. Os resultados representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão (DP).

Conforme observado na prova de conceito, TA apresentou o maior efeito inibitório, com um CI₅₀ de 4,38 µM, sendo quase 8 vezes menor do que o apresentado para a Hyal purificada. Em seguida, o EGCG apresentou um CI₅₀ de 107,60 µM, seguido pelo GA, com um CI₅₀ reduzido de 236,40 µM. A menor capacidade inibitória foi demonstrada pela Q, com um CI₅₀ de 440 µM, representando um aumento de quase 6 vezes em comparação com a inibição da Hyal purificada (**Figuras 18**).

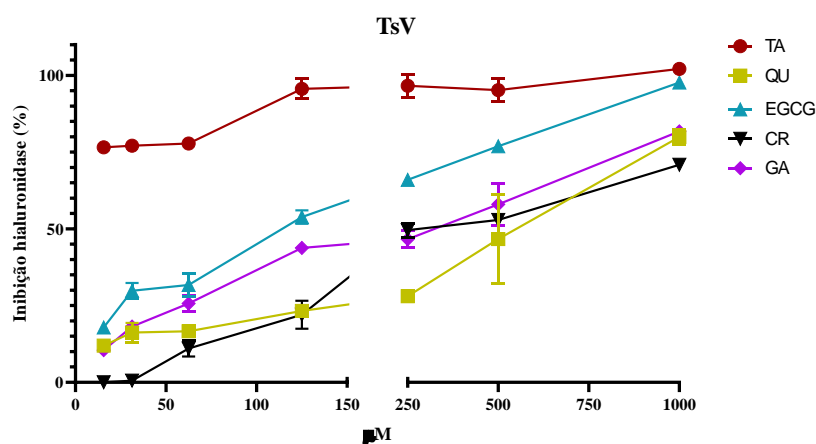


Figura 18. Inibição *in vitro* da atividade da hialuronidase do veneno de TsV por polifenóis. 5 CE₅₀ de TsV foram incubados com diferentes concentrações (15,6 a 1000 µM) de cinco polifenóis por 1 hora a 37 °C. Após a incubação, a atividade enzimática foi avaliada. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes ± desvio padrão (DP).

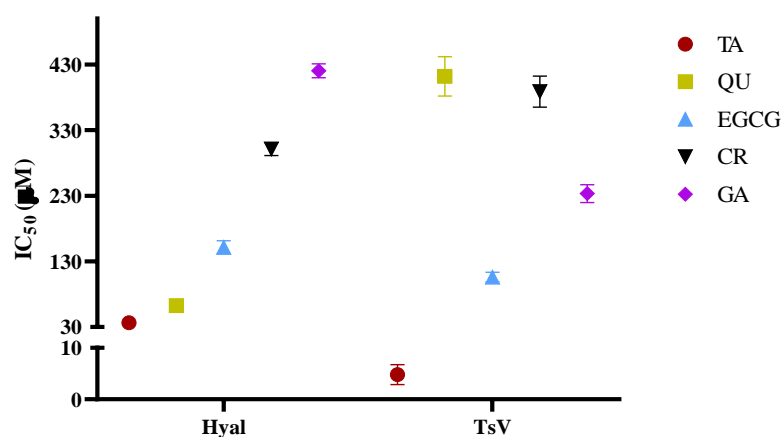


Figura 19. IC₅₀ dos polifenóis contra a hialuronidase do veneno de TsV e Hyal purificada. 5 CE₅₀ de TsV ou Hyal foram incubados com diferentes concentrações de polifenóis. Em seguida, os valores de IC₅₀ foram calculados. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes ± desvio padrão (DP).

Com base em seu desempenho na inibição enzimática, o ácido tânico (TA) e o EGCG foram selecionados para examinar suas interações com as proteínas do TsV. O perfil eletroforético do TsV (**Figura 20, linha 2**) exibe seu padrão característico: componentes de alta massa molecular (entre 50-37 kDa), correspondentes a enzimas, especialmente hialuronidases; e componentes de baixa massa molecular (aproximadamente 10 kDa), correspondentes a

neurotoxinas. Após 5 minutos de incubação (tempo no qual foi observada 90 % de inibição na prova de conceito), um precipitado foi observado nos tubos contendo a mistura de TsV e polifenóis.

Após centrifugação, os componentes de maior massa molecular não foram detectados no sobrenadante, e a banda correspondente às neurotoxinas apresentou intensidade reduzida (**Figura 20, linha 3**); já a mistura dos polifenóis é apreciável na **linha 4**. Esses achados sugerem que a interação entre os polifenóis e o TsV gera complexos insolúveis de proteína-polifenol, verificados no precipitado formado nos tubos após a incubação (**Figura 20, linha 5**).

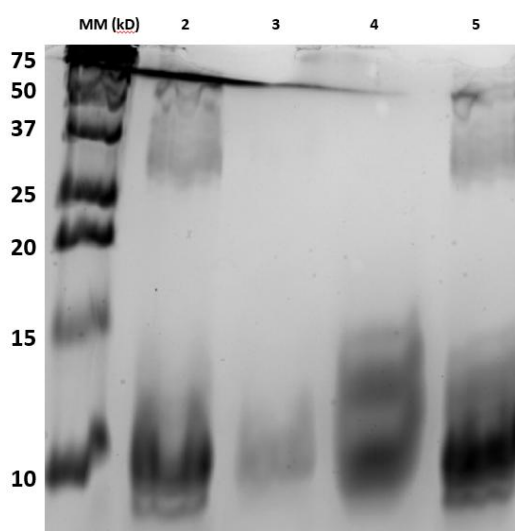


Figura 20. SDS-PAGE da interação entre TsV e polifenóis. O gel de poliacrilamida a 15 % foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad). **MM**: marcador de proteínas. **Linha 2**: 15 µg de TsV. **Linha 3**: sobrenadante da incubação de TsV com a mistura de polifenóis. **Linha 4**: sobrenadante da mistura de polifenóis (1000 µM). **Linha 5**: precipitado resultante da incubação de TsV com a mistura de polifenóis.

A interação entre polifenóis e TsV pode ser explicada pela condição que em altas concentrações proteicas, cenário análogo às condições presentes na área da picada nos estágios iniciais do envenenamento, os polifenóis formam pontes entre as cadeias proteicas até saturar os sítios de interação, resultando na formação de agregados e precipitados de complexos proteína – polifenóis (Canon *et al.*, 2011; Bandyopadhyay *et al.*, 2012; Sahidi and Dissanayaka 2023 e Zhang *et al.*, 2023)

Entretanto, conforme evidenciado na linha 3 da **Figura 20**, nem todos os componentes proteicos participaram da formação de agregados com os polifenóis. Essa situação representa um risco, pois permite que neurotoxinas remanescentes possam difundir-se para a circulação a partir do local da picada (Oliveira-Mendes et al., 2019). Na tentativa de contornar essa questão, propomos a combinação dos inibidores com o hidrogel injetável com capacidade de gelificação *in situ* no local da picada. Essa abordagem visa capturar os complexos formados com polifenóis, inibir a hialuronidase e agregar as neurotoxinas dentro do hidrogel durante sua gelificação. Esse método poderia facilitar a posterior inibição do veneno residual quando os pacientes buscarem atendimento médico.

Para a construção do hidrogel, escolhemos CMC, polímero derivado da quitina, obtida a partir do exoesqueleto de camarões e caranguejos. O CMC tem demonstrado aplicações promissoras como agente antibacteriano, material para curativos e na medicina regenerativa (Geng *et al.*, 2023). Para facilitar as ligações imina necessárias para a formação do hidrogel, o ácido hialurônico modificado com um aldeído foi selecionado como segundo polímero. O ácido hialurônico também tem origem biológica e é amplamente utilizado em tratamentos médicos e cosméticos. Além disso, a incorporação de altas concentrações de ácido hialurônico contribui para a inibição da atividade da hialuronidase (Yoshino et al., 2015).

Como primeiro passo na caracterização do hidrogel, foi utilizada a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para confirmar as modificações do ácido hialurônico aldeídico (AHA) e a formação estrutural do hidrogel. O pico em 1726 cm^{-1} no espectro de FTIR do AHA corresponde à vibração de estiramento da ligação C=O do grupo aldeído (**Figura 20 A**). A formação do hidrogel ocorreu por meio de enlaces imina entre os grupos aldeídos do AHA e os grupos amino do CMC, resultando no pico em 858 cm^{-1} no espectro de FTIR dos hidrogéis (**Figura 21 A**). A caracterização morfológica do hidrogel por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou a morfologia superficial após a gelificação,

na qual se aprecia a estrutura porosa do hidrogel (**Figura 21 B**). Já a capacidade de auto-reparação pode ser observado que a tempos de 120 s, ambas metades misturadas já conformam novamente uma unidade, validada pela sujeição da metade B com a pinça e observando-se que a metade A fica suspensa, mostrando que os pontes imina foram formados novamente entre ambas metades resturando a unidade (**Figura 21 C**)

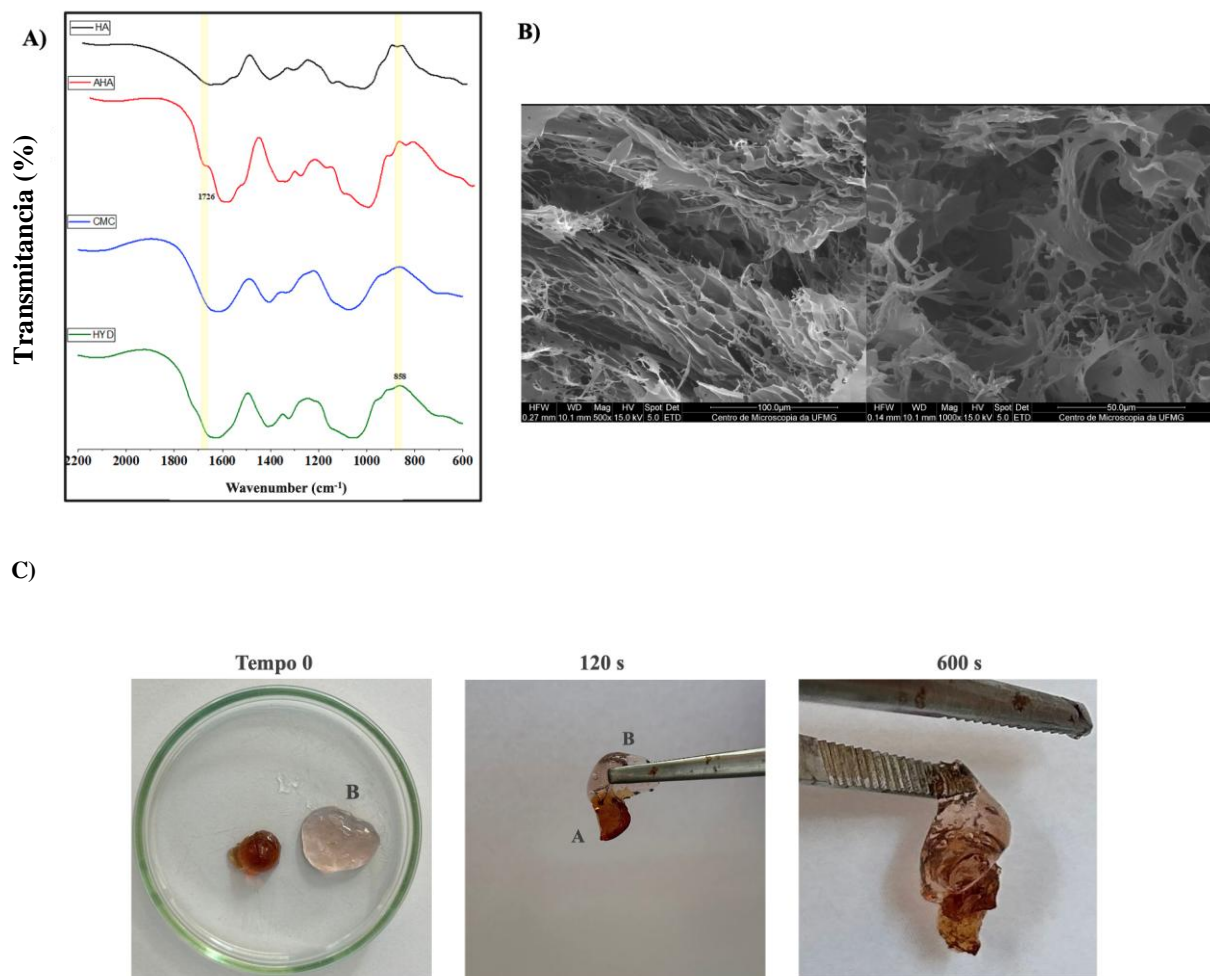


Figura 21. Caracterização físico-química dos hidrogéis. (A) Espectros de FTIR de HA, AHA, CMC e hidrogéis. (B) Imagens de MEV (SEM) de uma seção transversal dos hidrogéis com ampliações de 500x e 1000x. (C) Processo de auto – reparação.

O número de ligações imina formadas entre os grupos amino e aldeído das cadeias poliméricas de CMC e AHA (59 % de oxidação) determina o tempo de gelificação. Hidrogéis

com uma composição de 5 % p/v de cada polímero se gelificaram em mais de 3 minutos, enquanto o aumento na concentração polimérica resultou em tempos de gelificação mais rápidos (**Figura 22**). Após a adição dos inibidores, foi observado um aumento no tempo de gelificação em hidrogéis formados por concentrações poliméricas mais baixas. Esse efeito pode ocorrer porque a formação das ligações CMC/AHA, já dificultada pela menor quantidade de grupos disponíveis, é ainda mais prejudicada pela interação dos inibidores com as cadeias poliméricas.

Além disso, a inclusão de TA e EGCG proporciona maior controle sobre o tempo de gelificação (Chen et al., 2022; Li et al., 2022; Han et al., 2023). Isso acontece porque os polifenóis interagem com os grupos reativos das cadeias macromoleculares, reduzindo o número de pontos livres disponíveis para a reticulação. Essa capacidade de ajustar a taxa de gelificação é vantajosa, pois um tempo de gelificação mais lento facilita as interações com as proteínas do veneno, os polifenóis e a matriz do hidrogel durante o processo de gelificação, permitindo que esses componentes sejam aprisionados na matriz de forma eficaz.

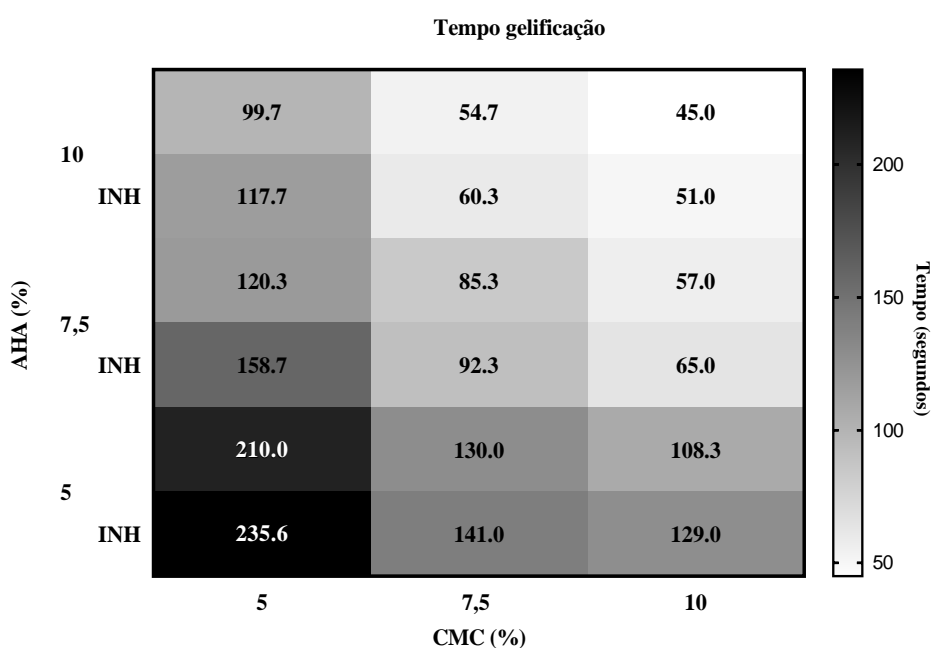


Figura 22. Mapa de calor do tempo de gelificação *in vitro* expresso em segundos. O tempo médio de gelificação de diferentes combinações de hidrogéis com ou sem a adição de inibidores (INH) foi calculado após incubação da mistura das soluções contendo os polímeros CMC e AHA a 37 °C. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes \pm desvio padrão (DP).

Para avaliar se a matriz do hidrogel influencia as propriedades inibitórias dos polifenóis, foram realizados testes de degradação. Em condições fisiológicas, após 10 dias, os hidrogéis sem inibidores retiveram 76 % de sua massa, enquanto os contendo inibidores retiveram 87 % (Figura 23). Isso sugere que a presença de inibidores retarda o processo de degradação sob condições fisiológicas (37 °C, pH 7,4).

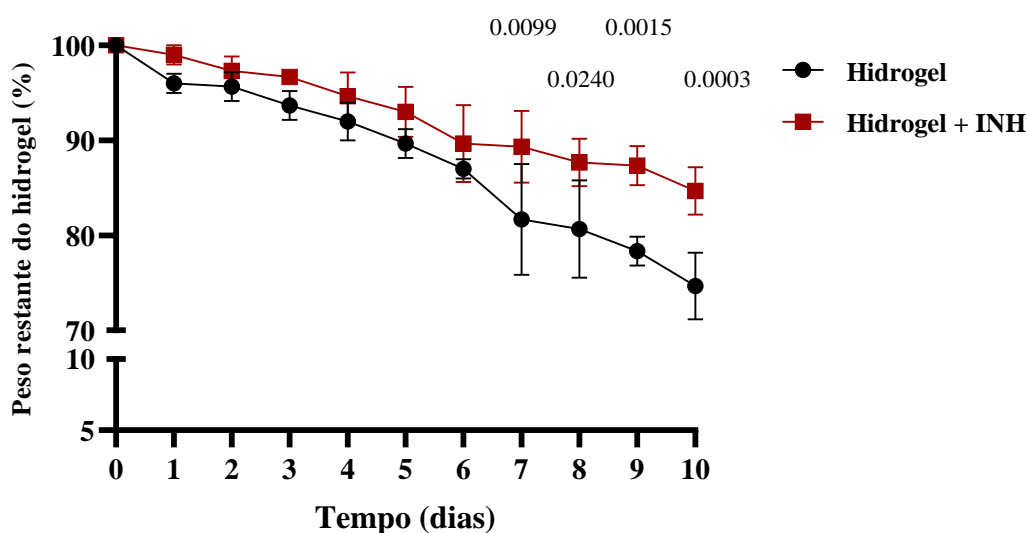


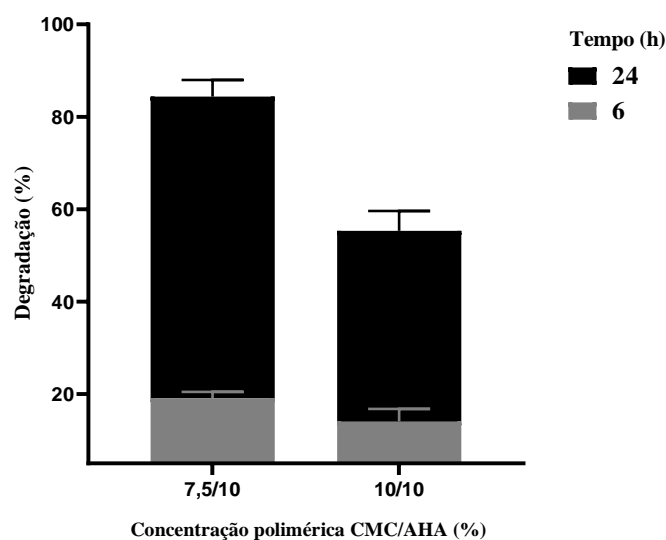
Figura 23. Degradação dos hidrogéis em condições fisiológicas. Hidrogéis formados por CMC/AHA (10 % / 10 %) com e sem suplementação de inibidores (1000 μ M) foram incubados em PBS 100 mM (pH 7,4) a 37 °C com agitação de 100 rpm. Após a incubação, os hidrogéis foram liofilizados e os pesos secos medidos para calcular o peso restante (%) utilizando a Equação (1). Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes \pm desvio padrão (DP).

Avaliando a degradação dos hidrogéis baixo a presença da Hyal (18,5 μ g), observou-se que após 6 horas de incubação, os hidrogéis CMC/AHA (7,5 % CMC / 10 % AHA) e os hidrogéis 10 % CMC/AHA (10 % CMC / 10 % AHA) permaneceram gelificados, com porcentagens de degradação de 19,5 % e 14 %, respectivamente. Após 24 horas, a degradação

aumentou significativamente, alcançando 84 % para o hidrogel 7,5 % CMC / 10% AHA e 55 % para o 10 % CMC / 10 % AHA (**Figura 24 A**).

A adição de polifenóis alterou o comportamento de degradação dos hidrogéis. Após 6 horas, todas as combinações contendo inibidores permaneceram gelificadas, indicando um retardo na degradação enzimática. Após 24 horas de incubação, a degradação foi mínima, variando entre 5 % e 8 % para os hidrogéis contendo 10 % AHA (**Figura 24 B**). Esses resultados mostram que os polifenóis inibem efetivamente a atividade da Hyal, o que poderia potencialmente bloquear a biodistribuição do TsV, tornando este sistema de hidrogel uma solução promissora para o primeiro socorro após uma picada de escorpião (Kim et al., 2021).

A



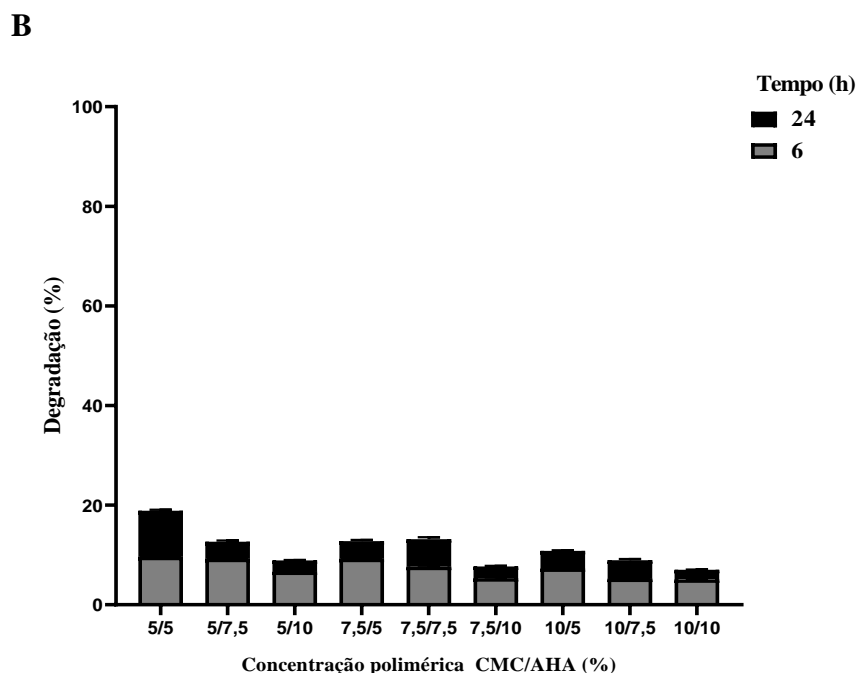


Figura 24. Degradação enzimática dos hidrogéis CMC/AHA (A) e CMC/AHA/INH (B). Os hidrogéis foram polymerizados na presença de 18,5 µg de Hyal. Os pesos secos foram medidos após 6 e 24 horas de incubação em PBS 100 mM a 37 °C, e a degradação (%) foi calculada usando a Equação (1). Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes ± desvio padrão (DP).

Uma vez injetado, espera-se que o hidrogel absorva fluidos dos tecidos circundantes devido à maior pressão osmótica do microambiente. Essa absorção de fluido estimula a liberação de componentes dentro do hidrogel, uma vez que não estão fisicamente ou quimicamente ligados às cadeias poliméricas (Davis et al., 2002; Mandal et al., 2013; Kowalski et al., 2024). O hidrogel CMC/AHA (10 % / 10 %) atingiu o equilíbrio na absorção de fluido após 160 minutos de incubação, alcançando 62 % de absorção, enquanto o hidrogel suplementado com inibidores alcançou 51 % (**Figura 25**).

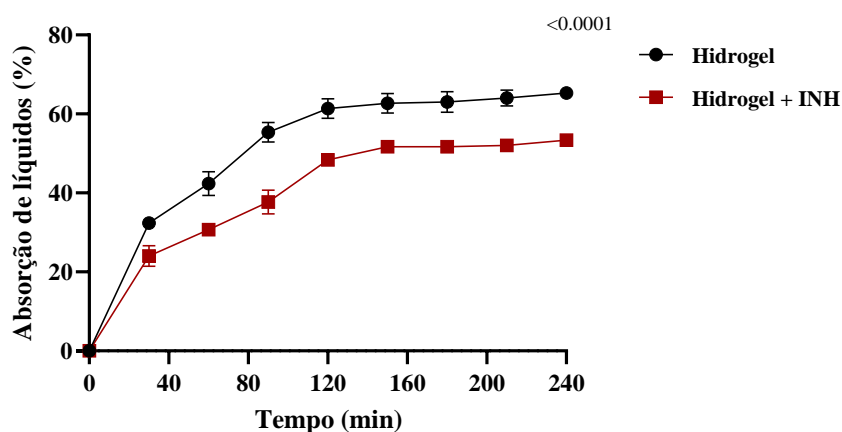


Figura 25. Análise da absorção de fluidos pelos hidrogéis. Hidrogéis formulados com CMC/AHA (10 % / 10 %) e CMC/AHA/INH (10 % / 10 %) foram incubados em 100 mM PBS a 37 °C. As variações no peso úmido foram registradas ao longo de 4 horas. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes \pm desvio padrão (DP).

Os perfis de liberação dos inibidores foram estudados sob condições fisiológicas ao longo de diferentes períodos. A liberação, assim como a gelificação e degradação, depende da densidade das ligações formadas entre os polímeros (Wang et al., 2024; Kowalski et al., 2024). Nas primeiras 6 horas, 8,73 % do conteúdo foi liberado dos hidrogéis CMC/AHA (10 % / 10 %), alcançando 37,6 % de liberação após 24 horas. Em comparação, os hidrogéis com menor densidade de ligações (CMC/AHA (5 % / 5 %)) liberaram 60 % dos inibidores em 24 horas (Figura 26).

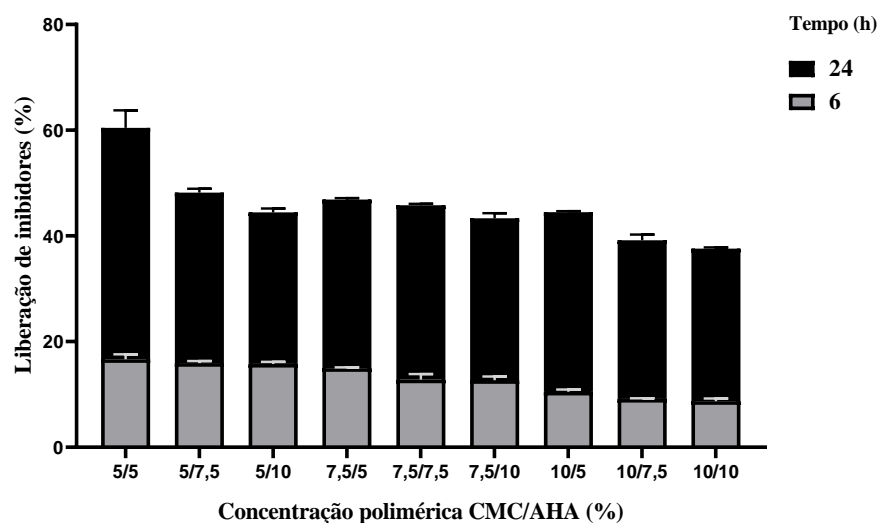


Figura 26. Liberação de inibidores pelos hidrogéis. Hidrogéis formulados com diferentes concentrações de CMC/AHA suplementados com inibidores foram incubados em PBS 100 mM a 37 °C. Os inibidores liberados no PBS após 6 e 24 horas de incubação foram quantificados com base em uma curva de calibração feita com concentrações conhecidas de TA/EGCG. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes \pm desvio padrão (DP).

Quando os hidrogéis foram usados para captura *in vitro* de TsV, semelhante ao que foi feito com Hyal, a presença de polifenóis inibiu a atividade da hialuronidase de TsV aprisionada dentro do hidrogel. Essa inibição foi refletida na menor quantidade de neurotoxinas e, consequentemente, de TsV detectada na solução (**Figura 27**). Os hidrogéis CMC/AHA demonstraram uma liberação dependente do tempo, que está relacionada à degradação enzimática do hidrogel. Os hidrogéis CMC/AHA/INH reduziram a liberação do veneno na solução ao inibir a hialuronidase. Além disso, a redução na liberação é provavelmente devido às interações dos inibidores com outros componentes do veneno.

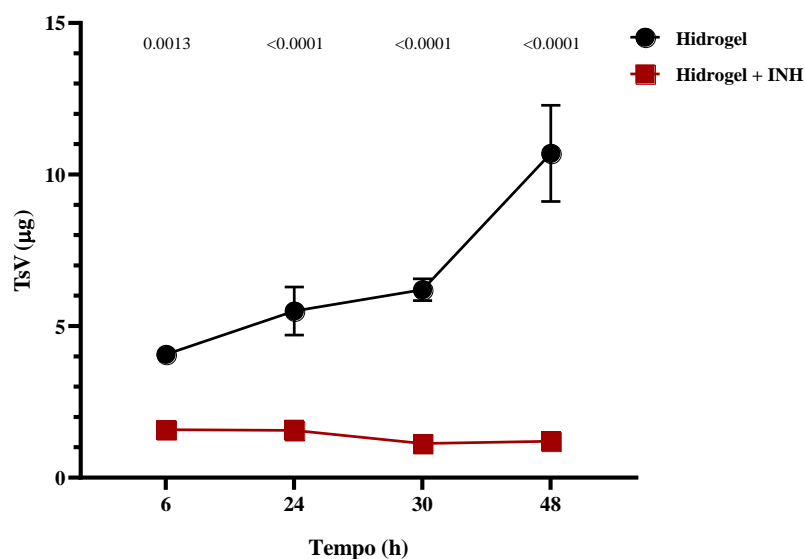


Figura 27. Liberação do TsV capturado no hidrogel. Hidrogéis formulados com CMC/AHA (10 % / 10 %) ou CMC/AHA/INH (10 % / 10 %) contendo 18,5 µg de TsV foram incubados em PBS 100 mM a 37 °C. O TsV liberado no PBS em diferentes tempos foi quantificado por ELISA sanduíche utilizando IgG-F(ab')₂-anti-TsFG₅₀ para quantificar o veneno liberado dos hidrogéis. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes ± desvio padrão (DP).

O hidrogel desenvolvido neste estudo demonstra a capacidade de interagir com os tecidos circundantes. Suas propriedades de absorção de água, medidas pela razão do inchaço, indicam que, ao ser aplicado na área da picada, ele pode absorver efetivamente os depósitos de veneno na pele (Wang et al., 2024). À medida que a água entra no hidrogel, ela inicia a liberação dos polifenóis. Esses polifenóis têm o potencial de interagir com os componentes do veneno não capturados durante o processo de gelificação do hidrogel e com as moléculas que se difundem para fora dele. Essa interação cria um ambiente inibidor na área ao redor da picada, auxiliando na neutralização dos componentes do veneno e contribuindo para um efeito terapêutico (Kim et al., 2021; Li *et al.*, 2023 e Zhang^a *et al.*, 2024).

Para ser utilizado como um dispositivo de primeiros socorros, a combinação de hidrogel e inibidores não deve apresentar nenhum inconveniente ou dano ao paciente. Com esse princípio em mente, a toxicidade do dispositivo foi testada em células de linhagens de

mamífero. Os estudos *in vitro* demonstraram que o hidrogel desenvolvido neste estudo não apresenta citotoxicidade contra as células HaCat e L929 nas condições testadas (**Figura 28**).

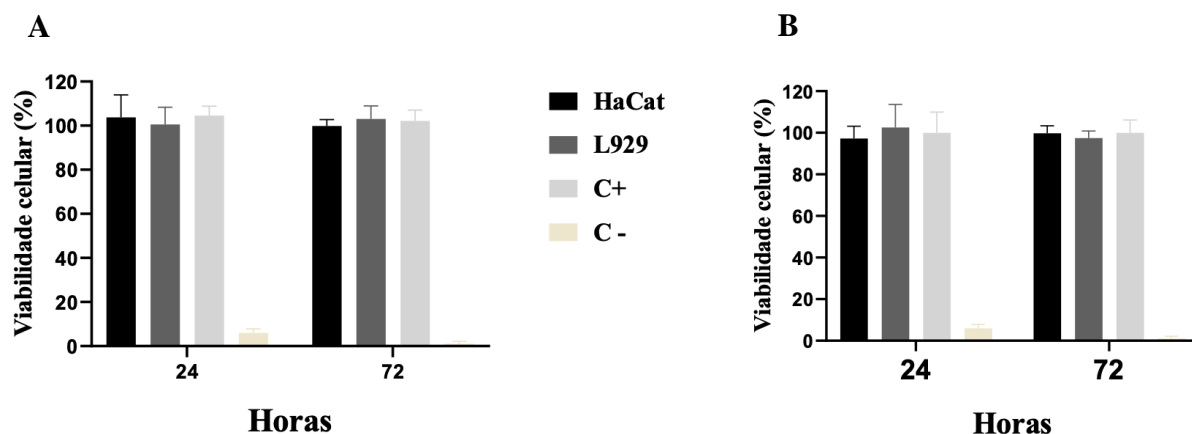


Figura 28. Ensaio de citotoxicidade em células tratadas com hidrogéis CMC/AHA/INH. (A) Células L929 ou HaCat cultivadas em meio contendo extrato de hidrogéis CMC/AHA/INH (10 % / 10 %) por 24 ou 72 horas. (B) Células L929 ou HaCat cultivadas em contato com hidrogéis CMC/AHA/INH (10 % / 10 %) de 5 x 2 mm por 24 ou 72 horas. Os resultados representam a média de três replicatas, obtidas a partir de três experimentos independentes \pm desvio padrão (DP).

Além disso, quando avaliado quanto à toxicidade *in vivo* em um modelo murino, não foram observados sinais de toxicidade, conforme indicado pelo peso dos animais e pela análise dos tecidos após injeção do hidrogel (**Figuras 29 e 30**). Esses achados estão de acordo com a biocompatibilidade bem documentada do CMC, AHA, TA e EGCG, que já são amplamente utilizados em novas terapias promissoras para diversas doenças (Song et al., 2016; Qiu et al., 2023; Zhang et al., 2023; Mo et al., 2024; Zhang^b et al., 2024; Zhang^c et al., 2024).

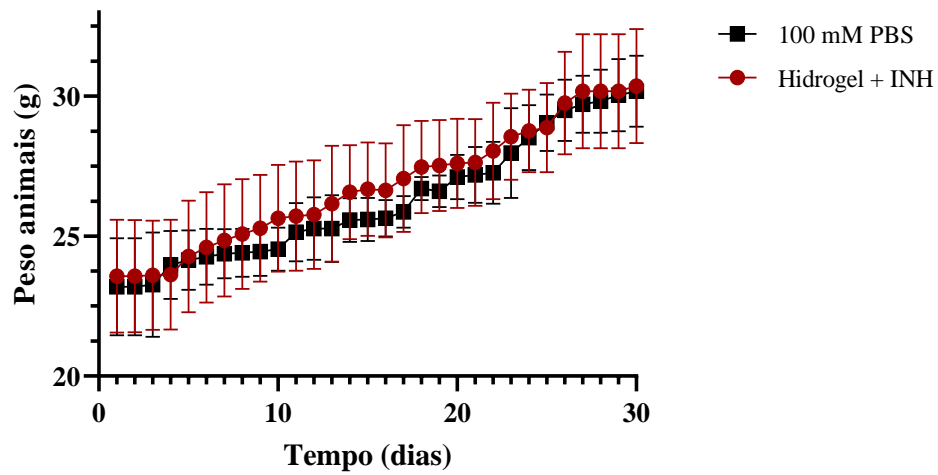


Figura 29. Avaliação da variação do peso corporal dos animais durante o estudo de toxicidade *in vivo* do hidrogel CMC/AHA/INH. Os animais foram injetados por via subcutânea com 300 μ L do hidrogel CMC/AHA/INH ou PBS 100 mM (controle +). Os resultados representam a média de 10 replicatas \pm desvio padrão (DP).

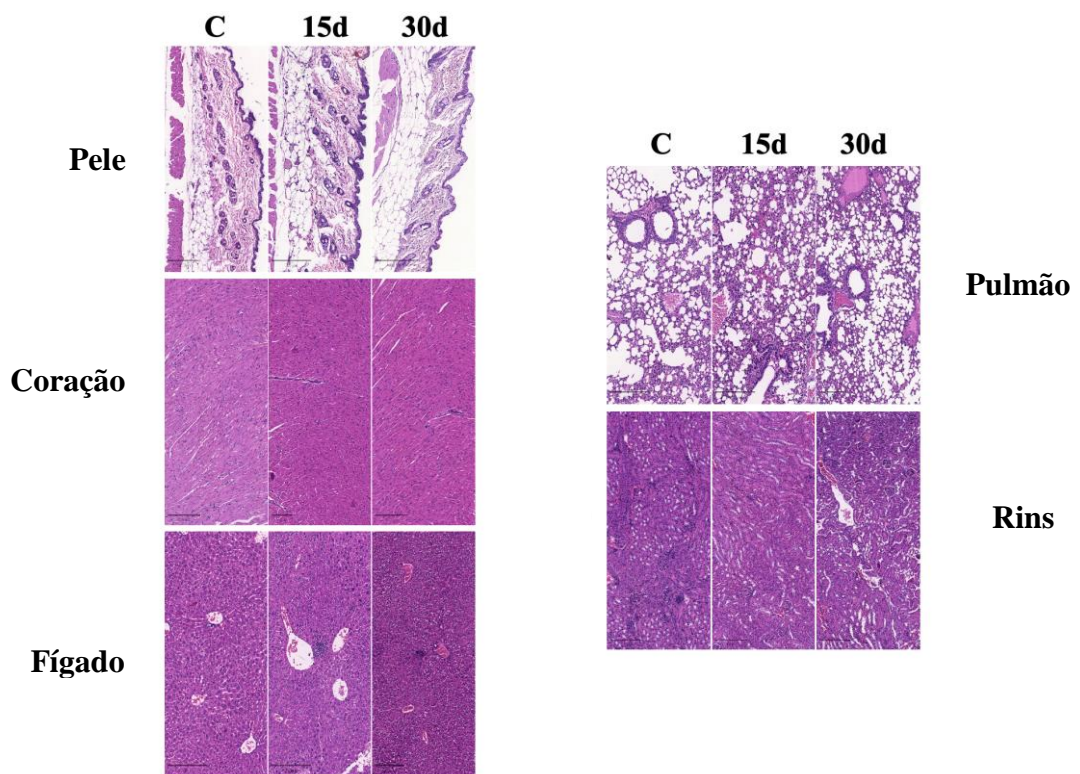


Figura 30. Avaliação da toxicidade sistêmica dos hidrogéis CMC/AHA/INH. Imagens de H&E dos principais órgãos dos grupos Controle (C, PBS 100 mM) e Hidrogel aos 15 dias (15 d) e 30 dias (30 d) após a injeção do hidrogel. Barra de escala = 100 μ m.

Como foi comprovado *in vitro*, é de suma importância que as soluções poliméricas, ao serem misturadas, formem um gel *in situ* dentro do organismo. Para verificar essa gelificação *in vivo*, as soluções poliméricas (CMC e AHA/INH) foram misturadas e injetadas na região dorsal de camundongos SWISS (n = 3), observando-se a formação de uma protuberância globular na pele (**Figura 31 A**).

Dez minutos após a injeção, os animais foram eutanasiados e a pele foi removida, confirmando a completa polimerização do hidrogel (**Figura 31 B**). Esse resultado demonstra que a mistura polimérica pode ser injetada no local da picada e formar rapidamente um hidrogel *in situ* (Deng et al., 2017; Hao et al., 2022; Liu et al., 2022; Han et al., 2023; Zhou et al., 2023 e Wang et al., 2025), com potencial para bloquear a biodistribuição do veneno.

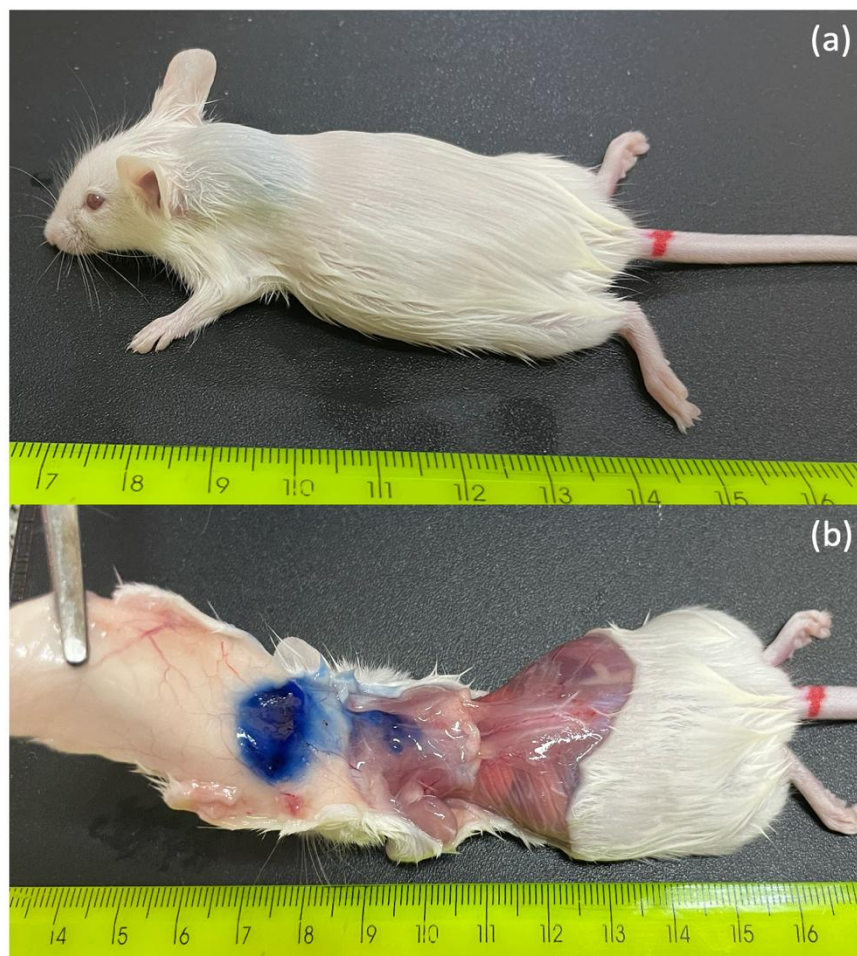


Figura 31. Gelificação *in situ* do hidrogel CMC/AHA/INH. Camundongos (n=3) da linhagem SWISS foram injetados via subcutânea com o hidrogel. (A) Gelificação do hidrogel observada na pele. (B) Hidrogel gelificado

na região subcutânea do camundongo. O hidrogel foi diluído com 0,001% de Azul de Tripán para facilitar o contraste.

Após a caracterização das propriedades físico-químicas, avaliação da biossegurança *in vitro* e *in vivo* e análise da injetabilidade, foi realizada a validação funcional *in vivo* do hidrogel. Como um primeiro passo exploratório, utilizamos imunoenaios para detectar neurotoxinas, o que nos permitiu avaliar preliminarmente a viabilidade do hidrogel como uma estratégia de primeiros socorros para bloquear a biodistribuição do TsV. Paralelamente, testamos a administração de inibidores em solução líquida, sem a combinação com o hidrogel.

Após a injeção, o TsV se distribuiu rapidamente do local de aplicação para a circulação e órgãos-alvo, permanecendo no organismo do animal por até 120 minutos (**Figura 32**). Amostras de soro foram analisadas para quantificar o TsV circulante, enquanto os pulmões foram examinados como o principal órgão-alvo e os rins como a via de excreção. Quando os inibidores foram administrados, a biodistribuição do TsV não foi completamente bloqueada; no entanto, os níveis de neurotoxinas circulantes e nos tecidos foram reduzidos em mais de 50%. Isso sugere que o aumento do volume da solução inibidora injetada poderia melhorar sua distribuição, ampliando a interação com o TsV e intensificando o bloqueio da biodistribuição do veneno.

Com a aplicação do hidrogel, os níveis de neurotoxinas na circulação foram reduzidos em mais de 80%. Como o hidrogel foi administrado 10 minutos após a injeção do TsV, a hipótese é de que o veneno detectado nos imunoenaios corresponda às moléculas que já haviam atingido a circulação e/ou os órgãos-alvo antes da aplicação do hidrogel (**Figura 32**).

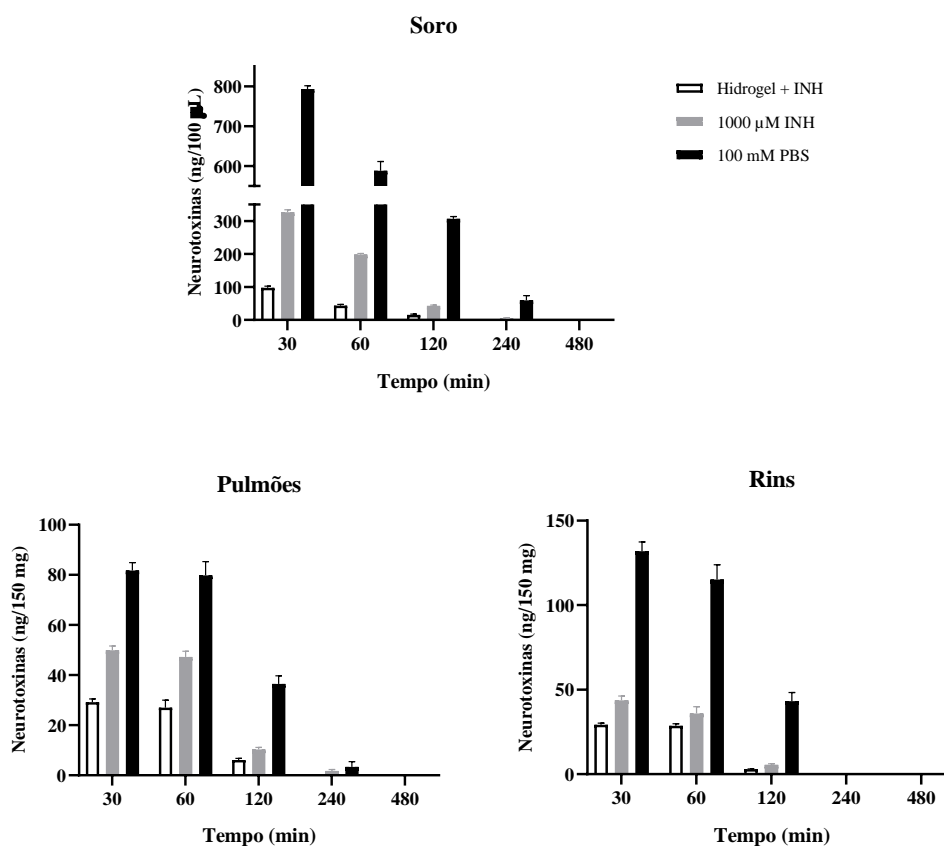
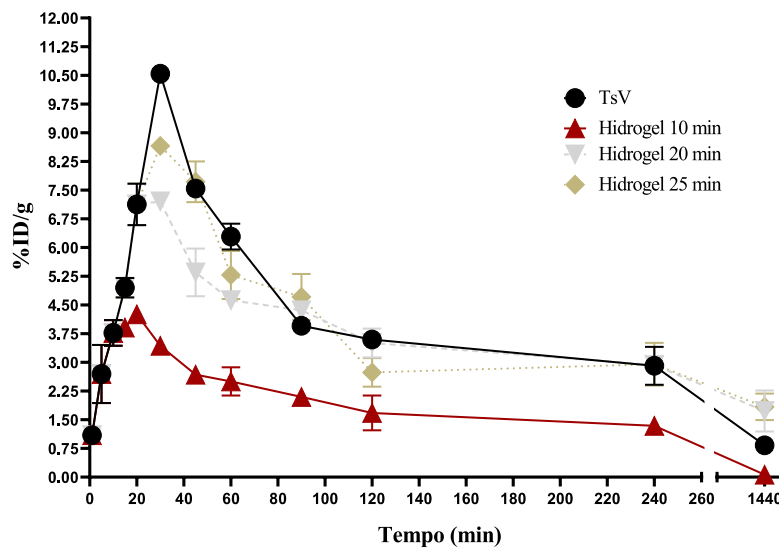


Figura 32. Concentração sistêmica de neurotoxinas do TsV. A quantidade de neurotoxinas circulantes (soro) ou neurotoxinas ligadas aos tecidos (órgãos) foi quantificada por meio de um ELISA sanduíche. Dez minutos após a injeção subcutânea de 10 µg de TsV, foram injetados 200 µL do hidrogel ou de inibidores (1000 µM) no mesmo local da injeção do veneno. Os resultados representam a média de triplicatas de três experimentos independentes, ± DP.

Após testar a capacidade de bloqueio da biodistribuição, foi realizada uma análise mais aprofundada dos efeitos do bloqueio do TsV dentro do hidrogel. Para isso, o TsV foi marcado com tecnécio-99m, alcançando uma eficiência de $98,6 \pm 1,1$ % (depuração sanguínea) e $90 \pm 2,3$ % (biodistribuição), tornando-o adequado para aplicações *in vivo* (*United States Pharmacopieial Convention, 2012*). Junto a estabilidade da marcação radioativa, demonstrou alta estabilidade tanto no plasma quanto em solução salina 0,9% por longos períodos (> 97 %), indicando sua adequação para os ensaios de bloqueio da biodistribuição em camundongos. Além disso, o TsV marcado com tecnécio-99m manteve a atividade Hialuronidásica em 85 % comparando como TsV não marcado.

Após a injeção subcutânea de TsV – Tc – 99m, observou-se uma rápida absorção, atingindo os níveis mais altos na corrente sanguínea por volta de **30 min**, conforme esperado (Revello *et al.*, 1996; Oliveira-Mendes *et al.*, 2019). Esse tempo foi estabelecido como limite para a aplicação do hidrogel, considerando que, após esse período, o TsV já se dispersou do local da picada para o organismo (**Figura 33**).

A)



B)

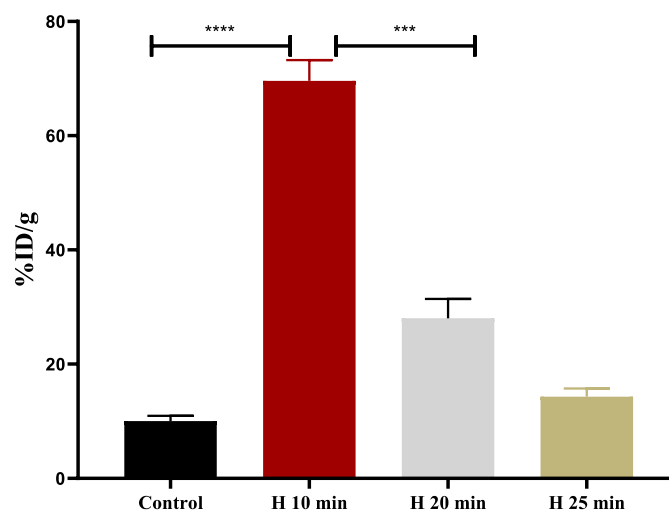


Figura 33. Depuração sanguínea do TsV – Tc – 99m. TsV – Tc – 99m foi injetado s.c. em camundongos SWISS (6–8 semanas de idade, 22–24 g; n = 3 por grupo). Em seguida, o hidrogel + INH foi injetado no mesmo local da

injeção do TsV – Tc – 99m, após 10 (vermelho), 20 (cinza), 25 (bege) minutos após a primeira injeção. O grupo controle (TsV) não recebeu nenhuma injeção posterior. (A) Os níveis de radioatividade na corrente sanguínea foram medidos em 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 240 minutos após a injeção do TsV – Tc – 99m. (B) Após 24 horas, o local da injeção (pele e/ou hidrogel) foram retirados e a radioatividade medida. Todos os dados são expressos como a média da porcentagem da dose injetada de TsV – Tc – 99m por grama de sangue (% ID/g) \pm E.M.M. da média. Os valores representam duplicatas de dois experimentos independentes.

A aplicação do hidrogel resultou em menores níveis séricos de **TsV – Tc – 99m**, de maneira dependente do tempo de administração. Quanto mais cedo o hidrogel foi injetado, menor a quantidade de **TsV – Tc – 99m** detectada na circulação. A injeção do hidrogel **10 min** após o veneno demonstrou o maior efeito no bloqueio da biodistribuição, com uma redução significativa em comparação à administração após **20 min**. Além disso, ambas condições apresentaram diferenças significativas em relação aos camundongos do grupo controle.

Ao quantificar **TsV – Tc – 99m** no local da injeção, observou-se que os camundongos que receberam o hidrogel aos **10 min** preservaram mais de **60 % da ID/g**, seguidos por aqueles que receberam a aplicação aos **20 min**, que retiveram **30 % da ID/g**. No entanto, a injeção do hidrogel em tempos mais tardios, como **25 min**, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (**15 % da ID/g** no local da injeção).

As imagens cintilográficas dos camundongos corroboraram os resultados de depuração sanguínea, mostrando a dispersão do TsV – Tc – 99m desde coxa direita para o restante do corpo, especialmente para a bexiga, desde os 30 min até **240 min (Figura 34)**. Por outro lado, quando o hidrogel foi aplicado, a dispersão do TsV – Tc – 99m foi comprometida, sendo retida no hidrogel e no próprio local da injeção

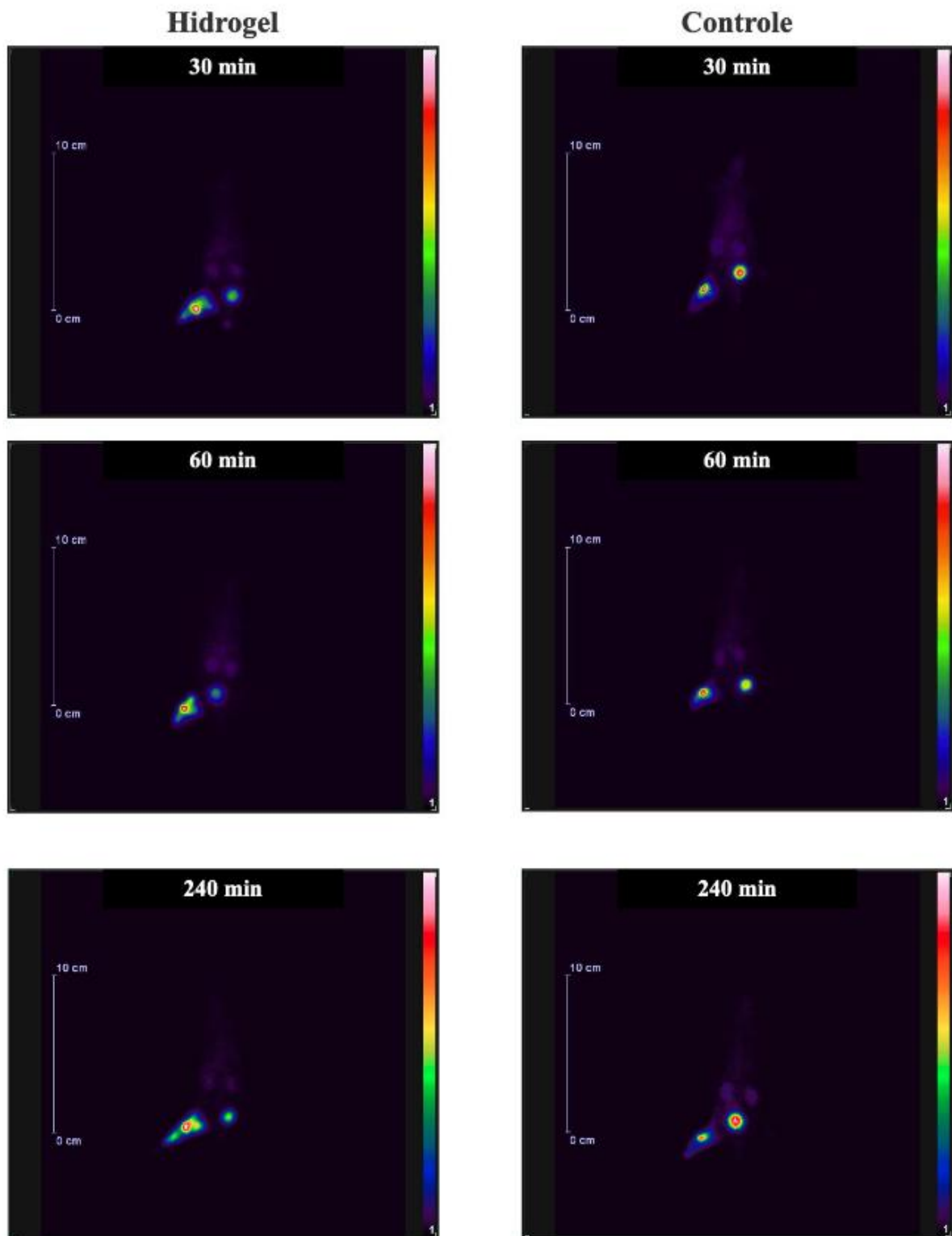


Figura 34. Retenção do TsV – Tc – 99m dentro do hidrogel em camundongos ao longo do tempo. Imagens cintilográficas representativas de camundongos injetados com 3,7 MBq de TsV – Tc – 99m diluído em solução salina a 0,9 %. O veneno foi injetado por via subcutânea na coxa direita dos animais. Dez minutos após a injeção, os animais do grupo hidrogel receberam 200 µL de hidrogel + INH, enquanto o grupo controle não recebeu nenhuma injeção adicional. Os níveis de radioatividade foram medidos 30, 60 e 240 minutos após a injeção. As imagens estão pseudocoloridas de acordo com a escala de cores.

Diversos estudos apontam que o número de órgãos nos quais o veneno se acumula pode variar. Concentrações elevadas de veneno nos rins refletem a excreção das toxinas, processo que pode persistir por até 24 horas após a picada. Órgãos altamente vascularizados, como pulmões e coração, são afetados precocemente após a injeção do veneno; no entanto, mais estudos são necessários para esclarecer esses mecanismos (Nunan et al., 2003; Revelo et al., 1996 e Barros Reis et al., 2019).

A análise dos tecidos 30 minutos após a injeção do veneno revelou altas concentrações de TsV – Tc – 99m no grupo controle, especialmente nos rins e bexiga, refletindo a eliminação renal do TsV (**Figura 35 A**). Esse achado indica que, nesse curto intervalo de tempo, o veneno já atingiu os tecidos (Revelo et al., 1996; Murugesan et al., 1999; Noura et al., 2015; Oliveira-Mendes et al., 2019). Quando o hidrogel foi aplicado 10 minutos após a injeção, os níveis de TsV – Tc – 99m nesses órgãos foram significativamente reduzidos.

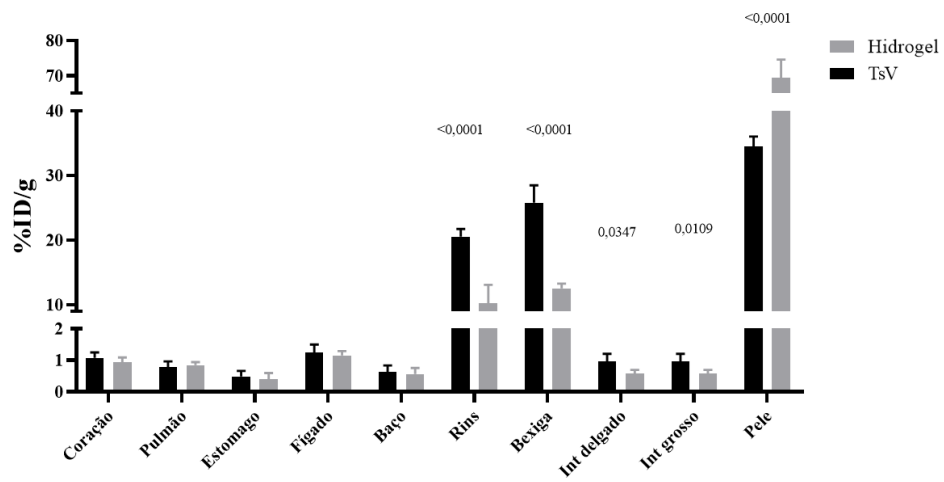
Após 60 minutos, observou-se no grupo controle um aumento na captação de TsV – Tc – 99m no coração e nos pulmões (Figura 35 B), sendo no pulmão até os 240 minutos (Figura 35 C), o qual esteja possivelmente relacionado aos efeitos clínicos do escorpionismo (Hering et al., 1993; Bucharetti et al., 1996; Davila et al., 2002; Cupo et al., 2002; Matos et al., 2024).

Após 240 minutos, observou-se uma redução nos níveis de TsV – Tc – 99m nos rins e na bexiga no grupo controle; no entanto, esses níveis ainda permaneceram significativamente mais elevados em comparação ao grupo que recebeu o hidrogel. Isso reforça a eficácia do hidrogel na contenção da disseminação do TsV pelo organismo.

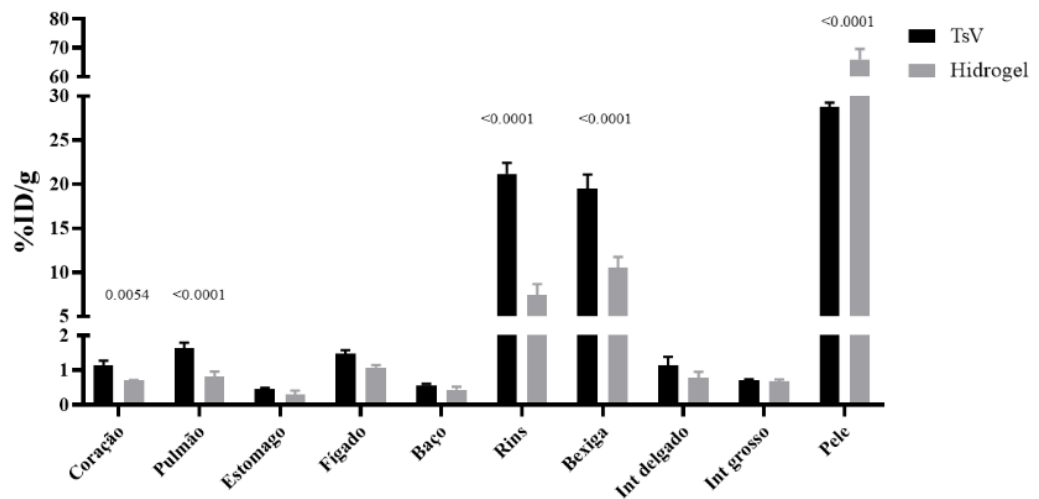
A maior concentração de TsV – Tc – 99m no baço e no fígado dos camundongos que receberam hidrogel pode estar relacionada à degradação *in vivo* do material ou também pode desempenhar um papel na oxidação e detoxificação de diversos compostos do veneno de escorpião. Estudos anteriores demonstraram que, **cerca de 4 horas após a aplicação de**

hidrogéis à base de quitosana, a depuração do material injetado ocorre predominantemente no fígado e no baço (Ye et al., 2019; Mei et al., 2023).

A) 30 minutos

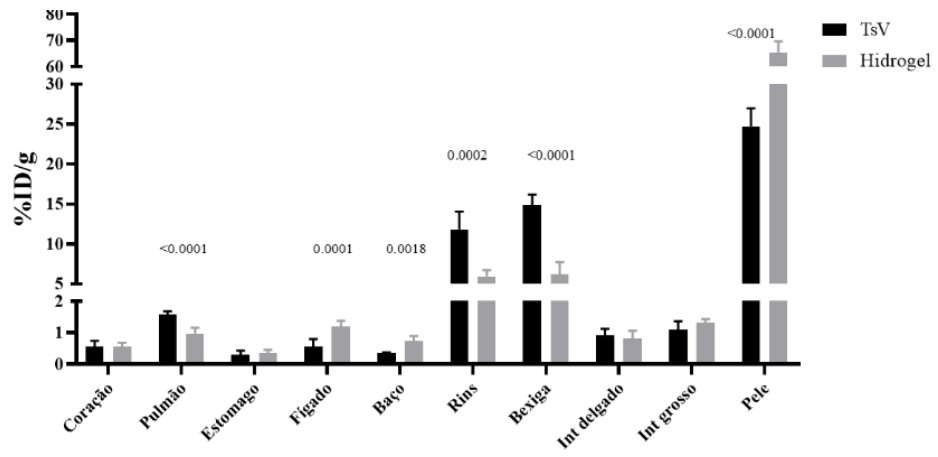


B) 60 minutos

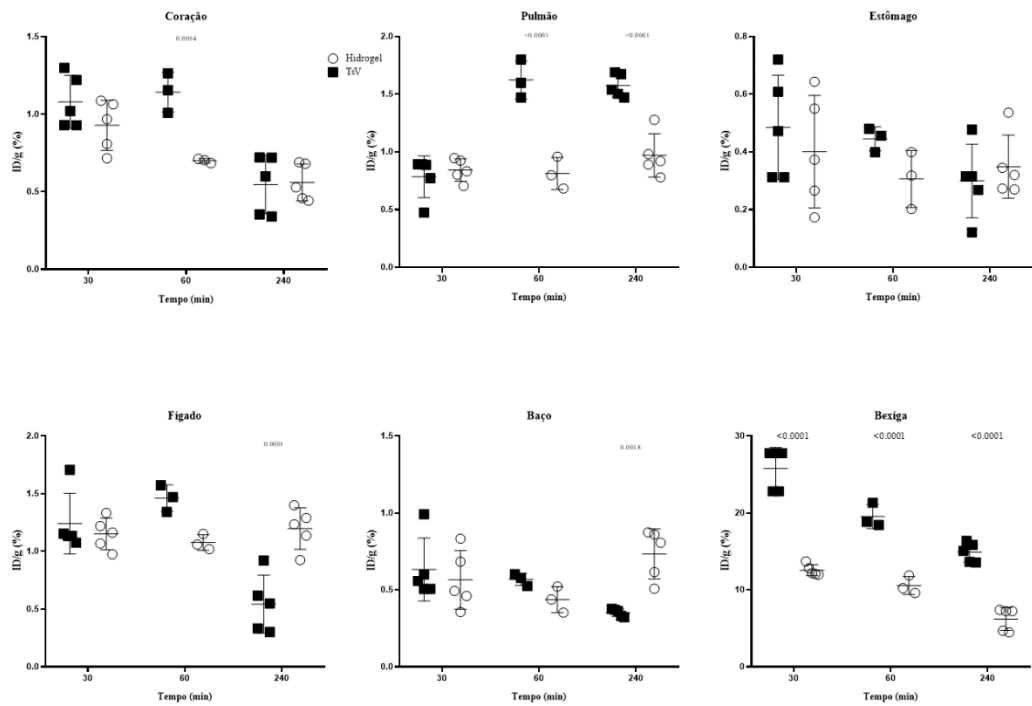


C)

240 minutos



D)



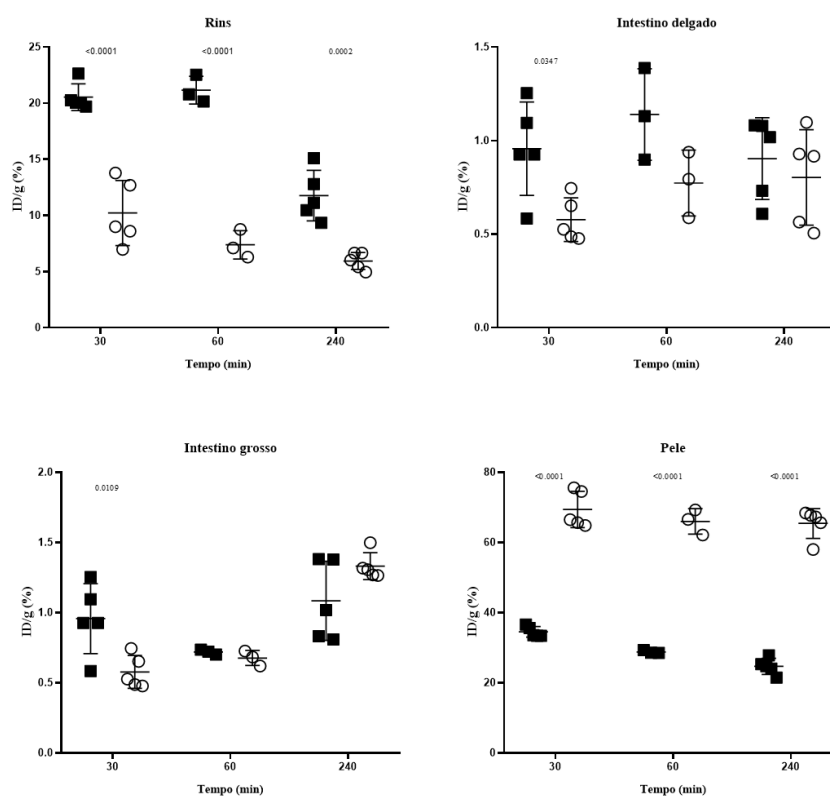


Figura 35. Biodistribuição de TsV – Tc – 99m. TsV – Tc – 99m foi injetado s.c. em camundongos SWISS. Em seguida, o hidrogel + INH foi injetado no mesmo local da injeção de ^{99m}Tc -TsV 10 minutos após a primeira injeção. O grupo controle (TsV) não recebeu nenhuma injeção posterior. Níveis de radioatividade foram medidos no coração, fígado, estômago, rins, bexiga, pulmões, baço, intestinos e pele após A) 30, B) 60 e C) 240 minutos pós injeção. D) Valores dos órgãos comparados individualmente de cordo ao tempo e ao tratamento aplicado. Todos os dados são expressos como a média da porcentagem da dose injetada de TsV – Tc – 99m por grama de tecido (% ID/g) \pm E.M.M. da média. Os valores representam duplicatas de dois experimentos independentes.

Com base na premissa de que a redução da proporção de TsV que alcança a circulação pode minimizar as manifestações do envenenamento escorpionico, desenvolvemos um teste de inibição da letalidade para simular as condições de um incidente real de envenenamento. Dez minutos após a exposição dos camundongos a 2 DL₅₀ de TsV, o hidrogel foi aplicado na região da picada, resultando em uma inibição eficaz da letalidade e proporcionando 100 % de proteção aos animais desafiados (**Tabela 2**)

Tabela 2. Inibição da letalidade de TsV

<i>TsV dose (DL₅₀/20g)</i>	<i>Grupo</i>	<i>Sobreviventes/Desafiados (%)</i>
2	Hidrogel + INH	7/7 (100)
	PBS	0/7 (0)

Dois grupos de sete animais foram desafiados com doses s.c. de 35,38 µg/ 20g animal (2DL₅₀) de TsV. Dez minutos após a injeção do TsV, Hidrogel + INH (200 µL) ou 100 mM PBS foram injetados na mesma área da injeção do veneno. Os animais sobreviventes foram contabilizados até 72 h após o desafio.

Em comparação com os antivenenos baseados em imunoglobulinas de origem animal, o hidrogel desenvolvido neste estudo apresenta as vantagens de ser mais simples de sintetizar e armazenar (Leo et al., 2018). Num segundo ponto, como os antivenenos podem induzir reações adversas, sua aplicação deve ser realizada exclusivamente por profissionais treinados em hospitais ou clínicas (Bittenbinder et al., 2024; Gutiérrez, 2017; Harrisson et al., 2011; Williams et al., 2011). Nesse contexto, o intervalo entre a picada e a administração do antiveneno torna-se um fator determinante para a eficácia do tratamento — um desafio particularmente crítico em áreas rurais ou periurbanas, onde o acesso a hospitais é dificultado pela distância e pela falta de transporte adequado (Feitosa et al., 2015).

Como alternativas aos anticorpos, moléculas de origem vegetal têm sido investigadas por sua capacidade de inibir toxinas de venenos. Polifenóis obtidos por extração etanólica demonstraram, em diversos estudos, a capacidade de inibir a toxicidade de diferentes venenos de serpentes, quando são previamente incubados com o veneno, conforme os protocolos da OMS (Pithayanuku et al., 2005; Srimathi & Gurunatham, 2020; Rodrigues et al., 2019; De Paula et al., 2010; Zhang & Li, 2017; Simas Pereira Júnior et al., 2025). No entanto, tais protocolos não refletem a realidade prática do envenenamento, que é um processo contínuo e no qual não há uma pré-incubação capaz de neutralizar a letalidade do veneno.

Considerando que os polifenóis, especialmente os taninos, possuem a capacidade de formar complexos com proteínas (Haslam et al., 1989), vários estudos avaliaram a aplicação local de ácido tânico no mesmo local da injeção do veneno (seja misturado ou aplicado algum tempo após) como estratégia para reduzir a letalidade. Por exemplo, Kuppusamy & Nagaratnam observaram uma proteção de 33 % contra 2 LD₅₀ de *Crotalus adamanteus* quando o ácido tânico foi injetado localmente 10 minutos após o envenenamento. Resultados semelhantes foram relatados para *Crotalus durissus terrificus* (Oliveira et al., 2021). Outro estudo, conduzido por Leanpolchareanchai et al. com *Naja naja*, também reportou proteção de 33 % contra 2 LD₅₀ quando 600 µg de ácido tânico foram aplicados localmente entre 5 e 10 minutos após a injeção do veneno. Nossos resultados reforçam a utilidade dos polifenóis, já no contexto de um envenenamento escorpionico, de poder ser aplicados *in situ* no area do ingresso do veneno no corpo e poder inibir os danos sistemiscos o locais do envenenamento (**Figuras 33, 35 e Tabela 2**).

Outras alternativas também foram empleadas com o objetivo de retardar a absorção sistêmica das toxinas em situações de primeiros socorros, o ácido etilenodiaminotetracético foi explorado para neutralizar *in vivo* a toxicidade das metaloproteinases dependentes de zinco (Ainsworth et al., 2018). Além disso, O'Brien et al. sintetizaram nanopartículas poliméricas capazes de se ligar especificamente à fosfolipase A₂ presente nos venenos, demonstrando potencial neutralizante *in vitro* e redução de necrose subcutânea *in vivo*. Inspirado pelo crescente uso de *metal-organic frameworks* (MOFs) como materiais adsorventes, Li et al. desenvolveram um protótipo para primeiros socorros baseado na injeção intravenosa (acima do local da picada) de MOFs para capturar e bloquear as toxinas, que seriam então absorvidas por um hidrogel de alginato de sódio. Quando aplicado até 5 minutos após a injeção de venenos de *Bungarus fasciatus* e *Protobothrops mucrosquamatus*, esse sistema aumentou o tempo de sobrevivência dos animais em até 10 horas em comparação ao grupo controle. No entanto, assim

como ocorre com a administração de antivenenos, esse sistema combinado requer habilidades técnicas especializadas para sua aplicação prática. Além disso, questões relevantes, como a segurança do uso prolongado dos MOFs no organismo humano, ainda precisam ser abordadas em estudos futuros.

Os resultados obtidos em nosso estudo reforçam o potencial do uso de um hidrogel funcionalizado com polifenóis para inibir a letalidade induzida por venenos. Com base nos dados de depuração sanguínea (**Figura 33**), identificamos que o intervalo ideal para aplicação do hidrogel é de até 10 minutos após o envenenamento, garantindo a sobrevivência total (100 %) dos camundongos testados. Comparativamente, o hidrogel desenvolvido neste projeto apresenta vantagens notáveis em termos de aplicabilidade prática, somando-se à já reconhecida segurança dos polifenóis, e representa uma estratégia promissora para intervenções rápidas em campo. Ainda assim, outros materiais podem ser explorados futuramente para aprimorar a seletividade, a eficácia e a segurança dessa abordagem

Esses resultados reforçam a ideia de que, em uma situação real de envenenamento, a inibição da hialuronidase (Girish et al., 2005; Horta et al., 2014; Sivaramakrishnan et al., 2017) e o bloqueio da biodistribuição do veneno podem compensar o tempo necessário para que as vítimas da picada busquem atendimento médico e recebam o soro anti-escorpionico.

Essa estratégia é particularmente crucial não apenas em áreas remotas com difícil acesso a hospitais, mas também em regiões periféricas de grandes cidades. Nesses locais, o deslocamento até centros de referência, frequentemente situados nas áreas centrais, pode ser prolongado devido ao trânsito intenso e à deficiência no transporte público (Ogunfowokan et al., 2012; Rabay et al., 2021). Portanto, essa abordagem pode representar um avanço significativo no tratamento do envenenamento sistêmico por animais peçonhentos, uma

condição que a Organização Mundial da Saúde considera negligenciada devido à falta de acesso adequado à soroterapia onde ela é mais necessária (Gutiérrez *et al.*, 2021).

5. Conclusões

Neste trabalho, foram apresentadas duas estratégias biotecnológicas como alternativas para o tratamento de acidentes escorpiônicos. A primeira baseia-se na utilização de uma proteína recombinante multiepitópica do veneno de *Tityus serrulatus* (TsMEP), com o objetivo de desenvolver um antígeno atóxico cuja produção não dependa do uso de animais para a obtenção de soro anti-escorpiônico, o único tratamento específico para o escorpionismo. Os resultados demonstram que a utilização de epítomos lineares de células B para a criação de um imunógeno quimérico recombinante multi-epitópico (TsMEP) é uma estratégia viável para produzir anticorpos neutralizantes do veneno. Essa abordagem pode representar um avanço significativo no desenvolvimento de uma nova geração de antivenenos contra *Tityus* spp., reduzindo ou até eliminando a necessidade de antígenos altamente tóxicos provenientes do veneno bruto. Além disso, a proteína recombinante multi-epitópica é uma molécula não tóxica, tornando-se uma alternativa mais segura no que diz respeito ao bem-estar animal na produção de antivenenos.

A segunda estratégia apresentada consiste no uso de um hidrogel à base de dois biopolímeros, carboximetil quitosana (CMC) e aldeído de ácido hialurônico (AHA), funcionalizado com inibidores de origem vegetal, como ácido tânico e EGCG. Para ser empregado como uma estratégia de primeiros socorros, a formulação do hidrogel é baseada em três pilares: 1) injetabilidade e polimerização *in situ* em ambiente fisiológico; 2) inibição da atividade da hialuronidase escorpiônica; e 3) capacidade de captura de toxinas. Os resultados obtidos validam a continuidade dos estudos para o desenvolvimento dessa terapia, que pode ser aplicada *in situ* para impedir a disseminação do veneno a partir do local da picada. Isso proporcionaria aos pacientes tempo adicional para chegarem aos centros de saúde e receberem o tratamento médico adequado, aumentando as chances de sobrevivência, reduzindo os sintomas associados e, conseqüentemente, minimizando o sofrimento dos acidentados.

6. Perspectivas

- Testar a capacidade dos anticorpos anti – TsMEP de neutralizar a toxicidade *in vitro* de outras espécies escorpionicas de interesse clínico.
- Testar novos adjuvantes e outros esquemas de imunização que permitam aumentar a capacidade neutralizante dos anticorpos anti – TsMEP e reduzam o número de doses aplicadas.
- Utilizar a TsMEP como imunógeno na produção de anticorpos monoclonais que possam ser utilizados como alternativa mais eficiente e segura para o soro terapêutico atual.
- Avaliar as condições de armazenamento e estabilidade ao longo prazo dos componentes do hidrogel (polímeros e inibidores).
- Caracterizar a degradação *in vivo* do hidrogel.
- Testar a capacidade protetora do hidrogel como primeiro socorro frente a venenos de aranhas e serpentes de interesse clínico.

7. Referências

- Ainsworth, S., Slagboom, J., Alomran, N., Pla, D., Alhamdi, Y., King, S. I., Bolton, F. M. S., Gutiérrez, J. M., Vonk, F. J., Toh, C. H., Calvete, J. J., Kool, J., Harrison, R. A., & Casewell, N. R. (2018). The paraspecific neutralisation of snake venom induced coagulopathy by antivenoms. *Communications biology*, *1*, 34. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0039-1>
- Akache, B., Stark, F. C., Agbayani, G., Renner, T. M., & McCluskie, M. J. (2022). Adjuvants: Engineering Protective Immune Responses in Human and Veterinary Vaccines. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *2412*, 179–231. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1892-9_9.
- Alberts, M. B., Shalit, M., & LoGalbo, F. (2004). Suction for venomous snakebite: a study of "mock venom" extraction in a human model. *Annals of emergency medicine*, *43*(2), 181–186. <https://doi.org/10.1016/S0196064403008138>
- Albuquerque PLMM, Magalhaes KDN, Sales TC, Paiva JHHGL, Daher EF, Silva Junior GBD. Acute kidney injury and pancreatitis due to scorpion sting: case report and literature review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018. 60: e30
- Alvarenga E, Mendes T, Magalhaes B, Siqueira F, Dantas, et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. *Open Journal of Genetics*. 2012 ; 2:210-220. 10.4236/ojgen.2012.24027.
- Alvarenga, L. M., Diniz, C. R., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2002). Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *40*(1), 89–95. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00197-0](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00197-0).
- Alvarenga, L. M., Martins, M. S., Moura, J. F., Kalapothakis, E., Oliveira, J. C., Mangili, O. C., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2003). Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *42*(7), 725–731. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.09.006>
- Andrade Filho, A., Campolina, D., & Dias, M. B. (2013). Ofidismo. In *Toxicologia na prática clínica* (2nd ed., pp. 491-510). Belo Horizonte: Folium.
- Apostólico, J.deS., Lunardelli, V. A., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of immunology research*, *2016*, 1459394. <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>.
- Aucouturier, J., Ganne, V., & Laval, A. (2000). Efficacy and safety of new adjuvants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *916*, 600–604. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05343.x>.
- Baldini AF, Cupo P, Pintya AO et al. Assessment of myocardial perfusion and function in victims of scorpion envenomation using gated-SPECT. *Arq Bras Cardiol*. 2010. 94(4):418-25
- Bandyopadhyay, P., Ghosh, A. K., & Ghosh, C. (2012). Recent developments on polyphenol–protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food & function*, *3*(6), 592–605. <https://doi.org/10.1039/c2fo00006g>.

- Barhanin J, Giglio JR, Léopold P, Schmid A, Sampaio SV, Lazdunski M. Tityus serrulatus venom contains two classes of toxins. Tityus gamma toxin is a new tool with a very high affinity for studying the Na⁺ channel. *J Biol Chem*. 1982. 257(21):12553-8.
- Batista, C. V. F., Román-González, S. A., Salas-Castillo, S. P., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., & Possani, L. D. (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 146(1-2), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.12.004>.
- Bertani R, Giupponi APL, Moreno-González JA. Escorpiões do Brasil - lista dos gêneros e espécies de escorpiões registrados para o Brasil (Arachnida, Scorpiones). 2022. Versão 1.1. <http://www.ecoevo.com.br/escorpioes.php>
- Bittenbinder MA, van Thiel J, Cardoso FC, Casewell NR, Gutiérrez JM, Kool J, Vonk FJ. Tissue damaging toxins in snake venoms: mechanisms of action, pathophysiology and treatment strategies. *Commun Biol*. 2024 Mar 22;7(1):358. doi: 10.1038/s42003-024-06019-6. PMID: 38519650; PMCID: PMC10960010.
- Bordon KCF, Cologna CT, Arantes EC. Scorpion venom research around the world: *Tityus serrulatus*. *Scorpion Venoms*. Dordrecht: Springer. 2015. 411–437.
- Borges, A., Lomonte, B., Angulo, Y., Acosta de Patiño, H., Pascale, J. M., Otero, R., Miranda, R. J., De Sousa, L., Graham, M. R., Gómez, A., Pardal, P. P. O., Ishikawa, E., Bonilla, F., Castillo, A., de Avila, R. A. M., Gómez, J. P., & Caro-López, J. A. (2020). Venom diversity in the Neotropical scorpion genus *Tityus*: Implications for antivenom design emerging from molecular and immunochemical analyses across endemic areas of scorpionism. *Acta tropica*, 204, 105346. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105346>
- Borowic, M., Gorzkiewicz, M., Grzesik, J., Walczak-Drzewiecka, A., Salkowska, A., Rodakowska, E., Steczkiewicz, K., Rychlewski, L., Dastyk, J., & Ginalski, K. (2016). Towards Engineering Novel PE-Based Immunotoxins by Targeting Them to the Nucleus. *Toxins*, 8(11), 321. <https://doi.org/10.3390/toxins8110321>.
- Bouhadir, K. H., Kruger, G. M., Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2000). Sustained and controlled release of daunomycin from cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. *Journal of pharmaceutical sciences*, 89(7), 910–919. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200007\)89:7<910::AID-JPS8>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200007)89:7<910::AID-JPS8>3.0.CO;2-#).
- Bucarechi, F., Baracat, E. C., Nogueira, R. J., Chaves, A., Zambrone, F. A., Fonseca, M. R., & Tourinho, F. S. (1995). A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 37(4), 331-336. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651995000400008>
- Buitimea-Cantúa NE, Gutiérrez-Uribe JA, Serna-Saldívar SO. Phenolic-Protein Interactions: Effects on Food Properties and Health Benefits. *J Med Food*. 2018 Feb;21(2):188-198. doi: 10.1089/jmf.2017.0057. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29022834.
- Bush S. P. (2004). Snakebite suction devices don't remove venom: they just suck. *Annals of emergency medicine*, 43(2), 187–188. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2003.10.031>.
- Bush, S. P., Hegewald, K. G., Green, S. M., Cardwell, M. D., & Hayes, W. K. (2000). Effects of a negative pressure venom extraction device (Extractor) on local tissue injury after artificial rattlesnake envenomation in a porcine model. *Wilderness & environmental medicine*, 11(3), 180–188. [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2000\)011\[0180:eoanpy\]2.3.co;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2000)011[0180:eoanpy]2.3.co;2).

- Butler M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141–2153. <https://doi.org/10.1021/np040106y>
- Cai, L., Dewi, R. E., & Heilshorn, S. C. (2015). Injectable Hydrogels with In Situ Double Network Formation Enhance Retention of Transplanted Stem Cells. *Advanced functional materials*, 25(9), 1344–1351. <https://doi.org/10.1002/adfm.201403631>
- Canon, F., Ballivian, R., Chirot, F., Antoine, R., Sarni-Manchado, P., Lemoine, J., & Dugourd, P. (2011). Folding of a salivary intrinsically disordered protein upon binding to tannins. *Journal of the American Chemical Society*, 133(20), 7847–7852. <https://doi.org/10.1021/ja200534f>.
- Cardoso, F. F., Gomes, A. A. S., Dreyer, T. R., Cavalcante, W. L. G., Dal Pai, M., Gallacci, M., & Fontes, M. R. M. (2020). Neutralization of a bothropic PLA2-like protein by caftaric acid, a novel potent inhibitor of ophidian myotoxicity. *Biochimie*, 170, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.01.010>
- Cardoso, J.L.C.; França, F.O.D.S.; Wen F.H. et al. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. 2 ed: Sarvier. 2009.
- Carmo AO, Oliveira-Mendes BB, Horta CC, Magalhães BF, Dantas AE, Chaves LM, et al. Molecular and functional characterization of metallo-serrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. *Toxicon*. 2014. 90:45-55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.07.014>
- Cesar, P. H. S., Cardoso Trento, M. V., Sales, T. A., Marques, T. R., Braga, M. A., Ramalho, T. C., & Marcussi, S. (2019). Molecular interactions between p-coumaric acid and snake venom toxins. *Journal of cellular biochemistry*, 120(9), 14594–14603. <https://doi.org/10.1002/jcb.28721>
- Chavez-Olortegui, C., Amara, D. A., Roachat, H., Diniz, C., & Granier, C. (1991). In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine*, 9(12), 907–910. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(91\)90012-u](https://doi.org/10.1016/0264-410x(91)90012-u)
- Chávez-Olortegui, C., Fonseca, S. C., Campolina, D., Amaral, C. F., & Diniz, C. R. (1994). ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 32(12), 1649–1656. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90323-9).
- Chen C, Yang H, Yang X, Ma Q. Tannic acid: a crosslinker leading to versatile functional polymeric networks: a review. *RSC Adv*. 2022 Mar 10;12(13):7689-7711. doi: 10.1039/d1ra07657d. PMID: 35424749; PMCID: PMC8982347.
- Chu AJ. Quarter-Century Explorations of Bioactive Polyphenols: Diverse Health Benefits. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022 Apr 20;27(4):134. doi: 10.31083/j.fbl2704134. PMID: 35468693.
- Cioncada, R., Maddaluno, M., Vo, H. T. M., Woodruff, M., Tavarini, S., Sammiceli, C., Tortoli, M., Pezzicoli, A., De Gregorio, E., Carroll, M. C., D'Oro, U., & Piccioli, D. (2017). Vaccine adjuvant MF59 promotes the intranodal differentiation of antigen-loaded and activated monocyte-derived dendritic cells. *PLoS one*, 12(10), e0185843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185843>.
- Clairfeuille T., Cloake A., Infield D. T., Llongueras J. P., Arthur C. P., Li Z. R., et al. Structural Basis of α -scorpion Toxin Action on Nav Channels. 2019. *Science*. 10.1126/science.aav8573
- Cologna CT, Marcussi S, Giglio JR, Soares AM, Arantes EC. *Tityus serrulatus* Scorpion Venom and Toxins: An Overview. *Protein Pept Lett*. 2009; 16:920–932. <https://doi.org/10.2174/092986609788923329> PMID: 19689419
- Cologna, C. T., Marcussi, S., Giglio, J. R., Soares, A. M., & Arantes, E. C. (2009). *Tityus*

serrulatus scorpion venom and toxins: an overview. *Protein and peptide letters*, 16(8), 920–932. <https://doi.org/10.2174/092986609788923329>.

- Cupo, P., & Hering, S. E. (2002). Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*, 40(6), 823–830. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00080-6)
- Davis, K. A., & Anseth, K. S. (2002). Controlled release from crosslinked degradable networks. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 19(4-5), 385–423. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v19.i45.30>.
- de Jesus Reis Rosa, L., Silva, G. A., Filho, J. A., Silva, M. G., Cogo, J. C., Groppo, F. C., & Oshima-Franco, Y. (2010). The inhibitory effect of *Camellia sinensis* extracts against the neuromuscular blockade of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Journal of venom research*, 1, 1–7.
- de la Vega RC & Possani LD. Novel paradigms on scorpion toxins that affects the activating mechanism of sodium channels. 2007. *Toxicon*. 49:171–180. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.016>
- de Moura VM, da Silva WCR, Raposo JDA, Freitas-de-Sousa LA, Dos-Santos MC, de Oliveira RB, Veras Mourão RH. The inhibitory potential of the condensed-tannin-rich fraction of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) against *Bothrops atrox* envenomation. *J Ethnopharmacol*. 2016 May 13;183:136-142. doi: 10.1016/j.jep.2016.02.047. Epub 2016 Mar 3. PMID: 26940901.
- De Paula, R., Sanchez, E., Costa, T., Martins, C., Pereira, P., Lourenço, M., Soares, A., & Fuly, A. (2010). Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16(2), 311–323. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000200012>
- Deng, Y., Ren, J., Chen, G., Li, G., Wu, X., Wang, G., Gu, G., & Li, J. (2017). Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration. *Scientific reports*, 7(1), 2699. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02962-z>
- Dias Assis, B. R., Gomes, I. P., de Castro, J. T., Rivelli, G. G., de Castro, N. S., Gomez-Mendoza, D. P., Bagno, F. F., Hojo-Souza, N. S., Chaves Maia, A. L., Lages, E. B., da Fonseca, F. G., Ribeiro Teixeira, S. M., Fernandes, A. P., Gazzinelli, R. T., & Castro Goulart, G. A. (2023). Quality attributes of CTVad1, a nanoemulsified adjuvant for phase I clinical trial of SpiN COVID-19 vaccine. *Nanomedicine (London, England)*, 18(18), 1175–1194. <https://doi.org/10.2217/nmm-2023-0122>.
- Dimatteo, R., Darling, N. J., & Segura, T. (2018). In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. *Advanced drug delivery reviews*, 127, 167–184. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.007>
- Espino-Solis GP, Riaño-Umbarila L, Becerril B, Possani LD. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. *J Proteomics*. 2009. 72(2):183-99. 10.1016/j.jprot.2009.01.020
- Feitosa, E. L., Sampaio, V. S., Salinas, J. L., Queiroz, A. M., Silva, I. M., Gomes, A. A., et al. (2015). Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: A case-control study. *PLOS ONE*, 10(7), e0132237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132237>
- Feng Y, Jin C, Lv S, Zhang H, Ren F, Wang J. Molecular Mechanisms and Applications of Polyphenol-Protein Complexes with Antioxidant Properties: A Review. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Aug 8;12(8):1577. doi: 10.3390/antiox12081577. PMID: 37627572; PMCID: PMC10451665.

- Fernandes-Barbosa PA, Rodrigues RR, Campos GP, Miranda-Gomes AC, Lima Rodrigues BSS, Melo-Braga MN, et al. Scorpion envenomation in Brazil: an update. *Infectio*. 2022. 26(2):172-180. <https://doi.org/10.22354/in.v26i2.1018>
- Ferreira LA, Alves EW, Henriques OB. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. 1993;31:941–947
- Fox, C. B., Khandhar, A. P., Khuu, L., Phan, T., Kinsey, R., Cordero, D., Gutiérrez, J. M., & León, G. (2023). Physicochemical and immunological effects of adjuvant formulations with snake venom antigens for immunization of horses for antivenom production. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 232, 107229. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107229>.
- Gale, E. C., Powell, A. E., Roth, G. A., Meany, E. L., Yan, J., Ou, B. S., Grosskopf, A. K., Adamska, J., Picece, V. C. T. M., d'Aquino, A. I., Pulendran, B., Kim, P. S., & Appel, E. A. (2021). Hydrogel-Based Slow Release of a Receptor-Binding Domain Subunit Vaccine Elicits Neutralizing Antibody Responses Against SARS-CoV-2. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 33(51), e2104362. <https://doi.org/10.1002/adma.202104362>.
- Garcia y Perez, G., Martin, M. F., & RoCHAT, H. (1988). Preparation of a polyvalent antivenom against various Mexican scorpion *Centruroides* species. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 26(11), 1102–1106. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90211-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90211-5).
- Geng, Y., Xue, H., Zhang, Z., Panayi, A. C., Knoedler, S., Zhou, W., Mi, B., & Liu, G. (2023). Recent advances in carboxymethyl chitosan-based materials for biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 305, 120555. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120555>.
- Girish, K. S., & Kemparaju, K. (2005). Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70(8), 948–952. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0207-z>
- Gómez-Betancur, I., Pereañez, J. A., Patiño, A. C., & Benjumea, D. (2016). Inhibitory effect of pinostrobin from *Renealmia alpinia*, on the enzymatic and biological activities of a PLA2. *International journal of biological macromolecules*, 89, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.042>
- Griffin, D. R., & Kasko, A. M. (2012). Photo-selective delivery of model therapeutics from hydrogels. *ACS macro letters*, 1(11), 1330–1334. <https://doi.org/10.1021/mz300366s>
- Grosso G, Godos J, Currenti W, Micek A, Falzone L, Libra M, Giampieri F, Forbes Hernández TY, Quiles JL, Battino M, La Vignera S, Galvano F. The Effect of Dietary Polyphenols on Vascular Health and Hypertension: Current Evidence and Mechanisms of Action. *Nutrients*. 2022 Jan 27;14(3):545. doi: 10.3390/nu14030545. PMID: 35276904; PMCID: PMC8840535.
- Guatimosim, S. C., Kalapothakis, E., Diniz, C. R., & Chávez-Olórtegui, C. (2000). Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant nontoxic protein. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 38(1), 113–121. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(99\)00138-5](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00138-5).
- Guerra-Duarte, C., Rebelo Horta, C. C., Ribeiro Oliveira-Mendes, B. B., de Freitas Magalhães, B., Costal-Oliveira, F., Stransky, S., Fonseca de Freitas, C., Campolina, D., Pereira de Oliveira Pardal, P., Lira-da-Silva, R., Machado de Ávila, R. A., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2019). Determination of hyaluronidase activity in *Tityus* spp. Scorpion venoms and its inhibition by Brazilian antivenoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 167, 134–143.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.019>.

- Guerra-Duarte, C., Saavedra-Langer, R., Matavel, A., Oliveira-Mendes, B. B. R., Chavez-Olortegui, C., & Paiva, A. L. B. (2023). Scorpion envenomation in Brazil: Current scenario and perspectives for containing an increasing health problem. *PLoS neglected tropical diseases*, *17*(2), e0011069. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011069>.
- Gurevitz, M., Gordon, D., Ben-Natan, S., Turkov, M., & Froy, O. (2001). Diversification of neurotoxins by C-tail 'wiggling': a scorpion recipe for survival. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(7), 1201–1205. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0571hyp>.
- Gurunathan J. Metabolites from the citrus extracts inhibit the activity of selected proteins in Indian Cobra (*Naja naja*) venom. *J Ethnopharmacol*. 2020 Apr 24;252:112575. doi: 10.1016/j.jep.2020.112575. Epub 2020 Jan 15. PMID: 31953201.
- Gutiérrez JM, Albuлесcu LO, Clare RH, Casewell NR, Abd El-Aziz TM, Escalante T, Rucavado A. The Search for Natural and Synthetic Inhibitors That Would Complement Antivenoms as Therapeutics for Snakebite Envenoming. *Toxins (Basel)*. 2021 Jun 29;13(7):451. doi: 10.3390/toxins13070451. PMID: 34209691; PMCID: PMC8309910.
- Gutiérrez JM, et al. Snakebite envenoming. *Nat. Rev. Dis. Prim*. 2017;3:17063. doi: 10.1038/nrdp.2017.63.
- Gutiérrez, J. M., Chippaux, J. P., & Isbister, G. K. (2021). PLOS Neglected Tropical Diseases broadens its coverage of envenomings caused by animal bites and stings. *PLoS neglected tropical diseases*, *15*(6), e0009481. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009481>
- Han W, Chen C, Yang K, Wang H, Xia H, Zhao Y, Teng Y, Feng G, Chen YM. Hyaluronic acid and chitosan-based injectable and self-healing hydrogel with inherent antibacterial and antioxidant bioactivities. *Int J Biol Macromol*. 2023 Feb 1;227:373-383. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.12.037. Epub 2022 Dec 12. PMID: 36521711
- Han Y, Lin Z, Zhou J, Yun G, Guo R, Richardson JJ, Caruso F. Polyphenol-Mediated Assembly of Proteins for Engineering Functional Materials. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2020 Sep 1;59(36):15618-15625. doi: 10.1002/anie.202002089. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32115863.
- Hao, Y., Zhao, W., Zhang, H., Zheng, W., & Zhou, Q. (2022). Carboxymethyl chitosan-based hydrogels containing fibroblast growth factors for triggering diabetic wound healing. *Carbohydrate polymers*, *287*, 119336. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119336>
- Harrison RA, et al. Research strategies to improve snakebite treatment: Challenges and progress. *J. Proteom*. 2011;74:1768–1780. doi: 10.1016/j.jprot.2011.06.019
- Heneine, L. G., Cardoso, V. N., Daniel, J. P., & Heneine, I. F. (1986). Detoxification of the T2 fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of the derivatives. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *24*(5), 501–505. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90082-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90082-6).
- Hering, S. E., Jurca, M., Vichi, F. L., Azevedo-Marques, M. M., & Cupo, P. (1993). 'Reversible cardiomyopathy' in patients with severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*: Evolution of enzymatic, electrocardiographic, and echocardiographic alterations. *Annals of Tropical Paediatrics*, *13*(2), 173-182.
- Hoffmann, F., & Rinas, U. (2004). Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, *89*, 73–92. <https://doi.org/10.1007/b93994>.

- Hong, F., Qiu, P., Wang, Y., Ren, P., Liu, J., Zhao, J., & Gou, D. (2023). Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review. *Food chemistry*: X, 21, 101095. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101095>
- Horta, C. C., Magalhães, B.deF., Oliveira-Mendes, B. B., do Carmo, A. O., Duarte, C. G., Felicori, L. F., Machado-de-Ávila, R. A., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2014). Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(2), e2693. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002693>
- Hou, S., Wang, X., Park, S., Jin, X., & Ma, P. X. (2015). Rapid Self-Integrating, Injectable Hydrogel for Tissue Complex Regeneration. *Advanced healthcare materials*, 4(10), 1491–1423. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500093>
- Iqbal I, Wilairatana P, Saqib F, Nasir B, Wahid M, Latif MF, Iqbal A, Naz R, Mubarak MS. Plant Polyphenols and Their Potential Benefits on Cardiovascular Health: A Review. *Molecules*. 2023 Sep 1;28(17):6403. doi: 10.3390/molecules28176403. PMID: 37687232; PMCID: PMC10490098.
- ISO 10993-5 :2009. 2009. Biological evaluation of medical devices – part 5: test for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization.
- Jahdasani, R., Jamnani, F. R., Behdani, M., Habibi-Anbouhi, M., Yardehnavi, N., Shahbazzadeh, D., & Kazemi-Lomedasht, F. (2016). Identification of the immunogenic epitopes of the whole venom component of the *Hemiscorpius lepturus* scorpion using the phage display peptide library. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 124, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.247>.
- Jaikumar, D., Sajesh, K. M., Soumya, S., Nimal, T. R., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2015). Injectable alginate-O-carboxymethyl chitosan/nano fibrin composite hydrogels for adipose tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 74, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.037>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Kashkooli, S., Khomehchian, S., Dabaghian, M., Namvarpour, M., & Tebianian, M. (2023). Effects of Adjuvant and Immunization Route on Antibody Responses against *Naja Naja oxiana* Venom. *Archives of Razi Institute*, 78(4), 1177–1184. <https://doi.org/10.32592/ARI.2023.78.4.1177>.
- Khattabi, A., Soulaymani-Bencheikh, R., Achour, S., Salmi, L. R., & Scorpion Consensus Expert Group (2011). Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(7), 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.03.007>
- Kim MH, Park JH, Nguyen DT, Kim S, Jeong DI, Cho HJ, Kim DD. Hyaluronidase Inhibitor-Incorporated Cross-Linked Hyaluronic Acid Hydrogels for Subcutaneous Injection. *Pharmaceutics*. 2021 Jan 27;13(2):170. doi: 10.3390/pharmaceutics13020170. PMID: 33513991; PMCID: PMC7910999.
- King, A., & Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213–218. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(99\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(99)00051-6)
- Knox, C., Wilson, M., Klinger, C. M., Franklin, M., Oler, E., Wilson, A., Pon, A., Cox, J., Chin, N. E. L., Strawbridge, S. A., Garcia-Patino, M., Kruger, R., Sivakumaran, A., Sanford, S., Doshi, R., Khetarpal, N., Fatokun, O., Doucet, D., Zubkowski, A., Rayat, D.

- Y., ... Wishart, D. S. (2024). DrugBank 6.0: the DrugBank Knowledgebase for 2024. *Nucleic acids research*, 52(D1), D1265–D1275. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad976>
- Kowalski, G., Witzczak, M., & Kuterasiński, Ł. (2024). Structure Effects on Swelling Properties of Hydrogels Based on Sodium Alginate and Acrylic Polymers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(9), 1937. <https://doi.org/10.3390/molecules29091937>.
 - Kularatne, S. A., Dinamithra, N. P., Sivansuthan, S., Weerakoon, K. G., Thillaimpalam, B., Kalyanasundram, V., & Ranawana, K. B. (2015). Clinico-epidemiology of stings and envenoming of Hottentotta tamulus (Scorpiones: Buthidae), the Indian red scorpion from Jaffna Peninsula in northern Sri Lanka. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 93, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.225>
 - Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 24, e00370. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
 - Kuppusamy, U. R., & Das, N. P. (1993). Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. *Pharmacology & toxicology*, 72(4-5), 290–295. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1993.tb01652.x>
 - Kuppusamy, U. R., & Das, N. P. (1993). Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. *Pharmacology & toxicology*, 72(4-5), 290–295. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1993.tb01652.x>
 - Kuppusamy, U. R., & Das, N. P. (1993). Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. *Pharmacology & toxicology*, 72(4-5), 290–295. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1993.tb01652.x>
 - Laune, D., Molina, F., Ferrières, G., Villard, S., Bès, C., Rieunier, F., Chardès, T., & Granier, C. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of immunological methods*, 267(1), 53–70. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(02\)00140-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(02)00140-0).
 - Laustsen AH, Solà M, Jappe EC, Oscoz S, Lauridsen LP, Engmark M. Biotechnological Trends in Spider and Scorpion Antivenom Development. *Toxins (Basel)*. 2016a. 8(8):226. [10.3390/toxins8080226](https://doi.org/10.3390/toxins8080226).
 - Laustsen AH. Snakebites: costing recombinant antivenoms. *Nature*. 2016b. 538(7623):41. [10.1038/538041e](https://doi.org/10.1038/538041e)
 - Leanpolchareanchai, J., Pithayanukul, P., & Bavovada, R. (2009). Anti-necrosis potential of polyphenols against snake venoms. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 31(4), 556–562. <https://doi.org/10.3109/08923970902821702>
 - Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Lee, J. W., Lee, S. Y., Ha, T. Y., Oh, K. W., Yun, Y. P., & Hong, J. T. (2009). (-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency. *Brain research*, 1250, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.012>
 - Leon, G.; Vargas, M.; Segura, A.; Herrera, M.; Villalta, M.; Sanchez, A.; Solano, G.; Gomez, A.; Sanchez, M.; Estrada, R.; Gutierrez, J. M. Current Technology for the Industrial Manufacture of Snake Antivenoms. *Toxicon* 2018, 151, 63–73
 - Li M, Ritzoulis C, Du Q, Liu Y, Ding Y, Liu W, Liu J. Recent Progress on Protein-Polyphenol Complexes: Effect on Stability and Nutrients Delivery of Oil-in-Water

- Emulsion System. *Front Nutr.* 2021 Nov 2;8:765589. doi: 10.3389/fnut.2021.765589. PMID: 34796195; PMCID: PMC8594825.
- Li M, Ritzoulis C, Du Q, Liu Y, Ding Y, Liu W, Liu J. Recent Progress on Protein-Polyphenol Complexes: Effect on Stability and Nutrients Delivery of Oil-in-Water Emulsion System. *Front Nutr.* 2021 Nov 2;8:765589. doi: 10.3389/fnut.2021.765589. PMID: 34796195; PMCID: PMC8594825.
 - Li X, Xu X, Xu M, Geng Z, Ji P, Liu Y. Hydrogel systems for targeted cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023 Feb 16;11:1140436. doi: 10.3389/fbioe.2023.1140436. PMID: 36873346; PMCID: PMC9977812.
 - Li, R., Cao, F., Chen, Y., Zhang, P., Huang, C., Xin, H., Wang, J., & Wang, X. (2019). Metal-Organic Framework and Hydrogel Based Strategy as a Universal First-Aid Treatment of Three Different Typical Snake Bites. *ACS biomaterials science & engineering*, 5(11), 6265–6273. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01388>
 - Li, Z., Chen, Z., Chen, H., Chen, K., Tao, W., Ouyang, X. K., Mei, L., & Zeng, X. (2022). Polyphenol-based hydrogels: Pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design. *Bioactive materials*, 17, 49–70. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.038>.
 - Lima, S. A., Guerra-Duarte, C., Costal-Oliveira, F., Mendes, T. M., Figueiredo, L. F. M., Oliveira, D., Machado de Avila, R. A., Ferrer, V. P., Trevisan-Silva, D., Veiga, S. S., Minozzo, J. C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2018). Recombinant Protein Containing B-Cell Epitopes of Different *Loxosceles* Spider Toxins Generates Neutralizing Antibodies in Immunized Rabbits. *Frontiers in immunology*, 9, 653. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00653>.
 - Lindahl, M., & Tagesson, C. (1997). Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation*, 21(3), 347–356. <https://doi.org/10.1023/a:1027306118026>
 - Lopes-de-Souza, L., Costal-Oliveira, F., Stransky, S., Fonseca de Freitas, C., Guerra-Duarte, C., Braga, V. M. M., & Chávez-Olórtegui, C. (2019). Development of a cell-based in vitro assay as a possible alternative for determining bothropic antivenom potency. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 170, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.010>.
 - Lourenço WR. Parthenogenesis in scorpions: some history—new data. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2008; 14:20. <https://doi.org/10.1590/S1678-9199200800010003>
 - Lourenço WR. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2018; 24:1–12 <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0138-3>
 - Lourenço WR. The scorpion families and their geographical distribution. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2001; 7:03–23. <https://doi.org/10.1590/S0104-79302001000100002>
 - LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.
 - Lucas S. O Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan e os aracnídeos peçonhentos. *Hist cienc saude-Manguinhos* [Internet]. 2003. 10(3):1025–35. 10.1590/S0104-59702003000300011`
 - Machado de Avila, R. A., Alvarenga, L. M., Tavares, C. A., Molina, F., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2004). Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum

- albumin. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 44(3), 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.04.015>.
- Machado de Avila, R. A., Alvarenga, L. M., Tavares, C. A., Molina, F., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2004). Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 44(3), 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.04.015>
 - Maduwage, K., Kodagoda Gamage, S., & Gutiérrez, J. M. (2024). First aid and pre-hospital practices in snakebite victims: The persistent use of harmful interventions. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 238, 107582. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107582>.
 - Mandal, B., & Ray, S. K. (2013). Synthesis of interpenetrating network hydrogel from poly(acrylic acid-co-hydroxyethyl methacrylate) and sodium alginate: modeling and kinetics study for removal of synthetic dyes from water. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.093>
 - Maria, W. S., Velarde, D. T., Alvarenga, L. M., Nguyen, C., Villard, S., Granier, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2005). Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 46(2), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.024>
 - Martin-Eauclaire, M. F., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., & Bougis, P. E. (2019). Serotherapy against Voltage-Gated Sodium Channel-Targeting α Toxins from *Androctonus* Scorpion Venom. *Toxins*, 11(2), 63. <https://doi.org/10.3390/toxins11020063>
 - Matos, I. M. de, Santos, F. F., Marçal, F. L., Silva, L. D., & Silva, M. (2024). Clinical manifestations and management of *Tityus* species envenoming: A systematic review. *Research, Society and Development*, 13(2), e1302345161. <https://doi.org/10.33448/rsd-v13i2.45161>
 - Maurano HR. Do escorpionismo. PhD Thesis. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina; 1915:267.
 - Mazzei de Dávila, C. A., Dávila, D. F., Donis, J. H., de Bellabarba, G. A., Villarreal, V., & Barboza, J. S. (2002). Sympathetic nervous system activation, antivenin administration, and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon*, 40(9), 1339-1346. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00145-9](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00145-9)
 - Mei, X., Li, J., Wang, Z., Zhu, D., Huang, K., Hu, S., Popowski, K. D., & Cheng, K. (2023). An inhaled bioadhesive hydrogel to shield non-human primates from SARS-CoV-2 infection. *Nature materials*, 22(7), 903–912. <https://doi.org/10.1038/s41563-023-01475-7>
 - Meng, E. C., Goddard, T. D., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Pearson, Z. J., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2023). UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 32(11), e4792. <https://doi.org/10.1002/pro.4792>.
 - Ministério da Saúde S de V em SD de VE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação–Sinan: normas e rotinas. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006
 - Mo, Z., Ma, Y., Chen, W., You, L., Liu, W., Zhou, Q., Zeng, Z., Chen, T., Li, H., & Tang, S. (2024). Protamine-grafted carboxymethyl chitosan based hydrogel with adhesive and long-term antibacterial properties for hemostasis and skin wound healing. *Carbohydrate*.
 - Molina Molina, D. A., Guerra-Duarte, C., Costal-Oliveira, F., Almeida Rocha, E., Rego Rodrigues, C., Machado-de-Ávila, R. A., Soccol, V. T., & Chávez-Olórtegui, C. (2020).

Engineered protein containing crotoxin epitopes induces neutralizing antibodies in immunized rabbits. *Molecular immunology*, 119, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.012>.

- Monteiro WM, Gomes J, Fe´ N, Mendonca da Silva I, Lacerda M, Alencar A, et al. Perspectives and recommendations towards evidence-based health care for scorpion sting envenoming in the Brazilian Amazon: A comprehensive review. *Toxicon*. 2019;169:68–80. [10.1016/j.toxicon.2019.09.003](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.09.003)
- Moosavy, M. H., de la Guardia, M., Mokhtarzadeh, A., Khatibi, S. A., Hosseinzadeh, N., & Hajipour, N. (2023). Green synthesis, characterization, and biological evaluation of gold and silver nanoparticles using *Mentha spicata* essential oil. *Scientific reports*, 13(1), 7230. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33632-y>
- Murugesan, S., Murthy, K. R., & Noronha, O. P. D. (1999). 99mTc-scorpion venom: Labeling, biodistribution, and scintimaging. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 5, 35-46.
- Nakayama, G. R., Caton, M. C., Nova, M. P., & Parandoosh, Z. (1997). Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of immunological methods*, 204(2), 205–208. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00043-4](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00043-4).
- Nayak AG, Kumar N, Shenoy S, Roche M. Evaluation of the merit of the methanolic extract of *Andrographis paniculata* to supplement anti-snake venom in reversing secondary hemostatic abnormalities induced by *Naja naja* venom. *3 Biotech*. 2021 May;11(5):228. doi: 10.1007/s13205-021-02766-z. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33959471; PMCID: PMC8060375.
- Nazato, V. S., Rubem-Mauro, L., Vieira, N. A., Rocha-Junior, D.dosS., Silva, M. G., Lopes, P. S., Dal-Belo, C. A., Cogo, J. C., dos Santos, M. G., da Cruz-Höfling, M. A., & Oshima-Franco, Y. (2010). In vitro antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. *Molecules* (Basel, Switzerland), 15(9), 5956–5970. <https://doi.org/10.3390/molecules15095956>
- Nencioni ALA, Neto EB, de Freitas LA, Dorce VAC. Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2018; 24:3. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0139-x>
- Nkanga, C. I., Ortega-Rivera, O. A., Shin, M. D., Moreno-Gonzalez, M. A., & Steinmetz, N. F. (2022). Injectable Slow-Release Hydrogel Formulation of a Plant Virus-Based COVID-19 Vaccine Candidate. *Biomacromolecules*, 23(4), 1812–1825. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00112>.
- Noura, S., Elatrous, S., Besbes, L., Boukef, R., Devaux, C., Aubrey, N., Elayeb, M., & Abroug, F. (2005). Neurohormonal activation in severe scorpion envenomation: correlation with hemodynamics and circulating toxin. *Toxicology and applied pharmacology*, 208(2), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.017>
- Nouri, A., & Laraba-Djebari, F. (2015). Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against *Androctonus australis* hector envenomation using safe antigens: Comparative role of MF59 and Alum adjuvants. *Vaccine*, 33(43), 5756–5763. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.045>.
- Nunan, E. A., Moraes, M. F., Cardoso, V. N., & Moraes-Santos, T. (2003). Effect of age on body distribution of Tityustoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Life sciences*, 73(3), 319–325. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00264-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00264-9)
- O'Brien, J., Lee, S. H., Gutiérrez, J. M., & Shea, K. J. (2018). Engineered nanoparticles bind elapid snake venom toxins and inhibit venom-induced dermonecrosis. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(10), e0006736. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006736>

- O'Brien, J., Lee, S. H., Onogi, S., & Shea, K. J. (2016). Engineering the Protein Corona of a Synthetic Polymer Nanoparticle for Broad-Spectrum Sequestration and Neutralization of Venomous Biomacromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 138(51), 16604–16607. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10950>
- O'Hagan, D. T., Ott, G. S., De Gregorio, E., & Seubert, A. (2012). The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*, 30(29), 4341–4348. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.061>.
- Ogunfowokan O. Bite-to-hospital time and morbidity in victims of viper bite in a rural hospital in Nigeria. *Afr J Prim Health Care Fam Med*. 2012 Jun 13;4(1):371. doi: 10.4102/phcfm.v4i1.371. PMID: PMC4565144.
- Oliveira-Mendes, B. B. R., Miranda, S. E. M., Sales-Medina, D. F., Magalhães, B. F., Kalapothakis, Y., Souza, R. P., Cardoso, V. N., de Barros, A. L. B., Guerra-Duarte, C., Kalapothakis, E., & Horta, C. C. R. (2019). Inhibition of Tityus serrulatus venom hyaluronidase affects venom biodistribution. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(4), e0007048. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007048>.
- Oliveira, I. C. F., Yoshida, E. H., Dini, M. M. J., Paschoal, A. B. O., Cogo, J. C., da Cruz-Höfling, M. A., Hyslop, S., & Oshima-Franco, Y. (2021). Evaluation of Protection by Caffeic Acid, Chlorogenic Acid, Quercetin and Tannic Acid against the In Vitro Neurotoxicity and In Vivo Lethality of *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) Venom. *Toxins*, 13(11), 801. <https://doi.org/10.3390/toxins13110801>
- Oliveira, I. C. F., Yoshida, E. H., Dini, M. M. J., Paschoal, A. B. O., Cogo, J. C., da Cruz-Höfling, M. A., Hyslop, S., & Oshima-Franco, Y. (2021). Evaluation of Protection by Caffeic Acid, Chlorogenic Acid, Quercetin and Tannic Acid against the In Vitro Neurotoxicity and In Vivo Lethality of *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) Venom. *Toxins*, 13(11), 801. <https://doi.org/10.3390/toxins13110801>
- Oršolić, N., Kunšić, M., Kukulj, M., Odeh, D., & Ančić, D. (2020). Natural Phenolic Acid, Product of the Honey Bee, for the Control of Oxidative Stress, Peritoneal Angiogenesis, and Tumor Growth in Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), 5583. <https://doi.org/10.3390/molecules25235583>
- Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*. 2015 Jan;93:125-35. 10.1016/j.toxicon.2014.11.233.
- Ou, B. S., Saouaf, O. M., Yan, J., Bruun, T. U. J., Baillet, J., Zhou, X., King, N. P., & Appel, E. A. (2023). Broad and Durable Humoral Responses Following Single Hydrogel Immunization of SARS-CoV-2 Subunit Vaccine. *Advanced healthcare materials*, 12(28), e2301495. <https://doi.org/10.1002/adhm.202301495>.
- Ozkan, O., Adigüzel, S., Ates, C., Bozyigit, I., & Filazi, A.. (2006). Optimization of antiscorpion venom production. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 12(3), 390–399. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992006000300004>.
- Paulo, N. M., de Brito e Silva, M. S., Moraes, A. M., Rodrigues, A. P., de Menezes, L. B., Miguel, M. P., de Lima, F. G., de Moraes Faria, A., & Lima, L. M. (2009). Use of chitosan membrane associated with polypropylene mesh to prevent peritoneal adhesion in rats. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 91(1), 221–227. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31393>
- Pérez-Torres, I., Castrejón-Téllez, V., Soto, M. E., Rubio-Ruiz, M. E., Manzano-Pech, L., & Guarner-Lans, V. (2021). Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1786. <https://doi.org/10.3390/ijms22041786>
- Pessini, A. C., Takao, T. T., Cavalheiro, E. C., Vichnewski, W., Sampaio, S. V., Giglio,

- J. R., & Arantes, E. C. (2001). A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 39(10), 1495–1504. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00122-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00122-2).
- Pithayanukul P, Ruenraroengsak P, Bavovada R, Pakmanee N, Suttisri R, Saen-oon S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. *J Ethnopharmacol*. 2005 Mar 21;97(3):527-33. doi: 10.1016/j.jep.2004.12.013. PMID: 15740891.
 - Pithayanukul P., Ruenraroengsak P., Bavovada R., Pakmanee N., Suttisri R. In vitro investigation of the protective effects of tannic acid against the activities of *Naja kaouthia* venom. *Pharm. Biol.* 2007;45:94–97. doi: 10.1080/13880200601112885
 - Pithayanukul, P., Ruenraroengsak, P., Bavovada, R., Pakmanee, N., Suttisri, R., & Saen-oon, S. (2005). Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plant polyphenols. *Journal of ethnopharmacology*, 97(3), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.013>
 - Polikarpov, I., Junior, M. S., Marangoni, S., Toyama, M. H., & Teplyakov, A. (1999). Crystal structure of neurotoxin Ts1 from *Tityus serrulatus* provides insights into the specificity and toxicity of scorpion toxins. *Journal of molecular biology*, 290(1), 175–184. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2868>.
 - Pontes, M. C. N. D., Torres-Rêgo, M., Aquino N. C., Teles, Y. C. F., Ximenes, H. S. A., Monteiro, E., Silveira R. M., Araújo, R. F. (2021). *Harpalyce brasiliensis* Benth: a prolific source of bioactive flavonoids with antiophidic potential *Phytochemistry Letters*, 41 , pp. 158-167
 - Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. *Eur J Biochem*. 1999. 264(2):287-300. 10.1046/j.1432-1327.1999.00625.x.
 - Pucca, M. B., Cerni, F. A., Pinheiro Junior, E. L., Bordon, K.deC., Amorim, F. G., Cordeiro, F. A., Longhim, H. T., Cremonez, C. M., Oliveira, G. H., & Arantes, E. C. (2015). *Tityus serrulatus* venom--A lethal cocktail. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 108, 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.015>.
 - Pucca, M.B., Bertolini, T.B., Barbosa, J.E., Galina, S.V.R., Porto, G.S. Therapeutic monoclonal antibodies: ScFv patents as a marker of a new class of potential biopharmaceuticals. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011. 47(1):31-39.
 - Qiu, H., Deng, J., Wei, R., Wu, X., Chen, S., Yang, Y., Gong, C., Cui, L., Si, Z., Zhu, Y., Wang, R., & Xiong, D. (2023). A lubricant and adhesive hydrogel cross-linked from hyaluronic acid and chitosan for articular cartilage regeneration. *International journal of biological macromolecules*, 243, 125249. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125249>
 - Quispe, R. L., Jaramillo, M. L., Torres-Huaco, F., Bonilla, C., Isasi, J., Guerra-Duarte, C., & Chávez-Olórtegui, C. (2022). Partial in vivo protection against Peruvian spider *Loxosceles laeta* venom by immunization with a multiepitopic protein (rMEPLox). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 215, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.05.044>.
 - R, S., & Gurunathan, J. (2020). Metabolites from the citrus extracts inhibit the activity of selected proteins in Indian Cobra (*Naja naja*) venom. *Journal of ethnopharmacology*, 252, 112575. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112575>
 - Rabay L, Meira LH, Oliveira de Andrade M, de Oliveira LK, A portrait of the crisis in the Brazilian urban bus system: An analysis of factors influencing the reduction in usage, *Case Studies on Transport Policy*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cstp.2021.10.009>.

- Randhawa M. A. (2009). Calculation of LD50 values from the method of Miller and Tainter, 1944. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*, 21(3), 184–185.
- Rashmi, H. B., & Negi, P. S. (2020). Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 136, 109298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>
- Reis, M. B., Zoccal, K. F., Gardinassi, L. G., & Faccioli, L. H. (2019). Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 167, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.219>
- Revelo, M. P., Bambirra, E. A., Ferreira, A. P., Diniz, C. R., & Chávez-Olórtegui, C. (1996). Body distribution of Tityus serrulatus scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 34(10), 1119–1125. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00074-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00074-8)
- Rodrigues CFB, Ferreira MJP, Belchor MN, Costa CRC, Novaes DP, Dos Santos Junior AB, Tamayose CI, Pinho MVT, de Oliveira MA, Toyama MH. Evaluation of the Inhibitory Potential of Casuarictin, an Ellagitannin Isolated from White Mangrove (*Laguncularia racemosa*) Leaves, on Snake Venom Secretory Phospholipase A2. *Mar Drugs*. 2019 Jul 8;17(7):403. doi: 10.3390/md17070403. PMID: 31288445; PMCID: PMC6669752.
- Rodrigues, C. F. B., Ferreira, M. J. P., Belchor, M. N., Costa, C. R. C., Novaes, D. P., Dos Santos Junior, A. B., Tamayose, C. I., Pinho, M. V. T., de Oliveira, M. A., & Toyama, M. H. (2019). Evaluation of the Inhibitory Potential of Casuarictin, an Ellagitannin Isolated from White Mangrove (*Laguncularia racemosa*) Leaves, on Snake Venom Secretory Phospholipase A2. *Marine drugs*, 17(7), 403. <https://doi.org/10.3390/md17070403>
- Rodríguez C, Estrada R, Herrera M, Gómez A, Segura Á, Vargas M, et al. Bothrops asper envenoming in cattle: Clinical features and management using equine-derived whole IgG antivenom. *Vet J*. 2016. 207:160-3. 10.1016/j.tvjl.2015.08.008.
- Rozkov, A., & Enfors, S. O. (2004). Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 89, 163–195. <https://doi.org/10.1007/b95567>.
- Saavedra-Langer, R., Costa, T. G. F., Lima, S. A., Costal-Oliveira, F., Martins, C. A., Machado-de-Ávila, R. A., Minozzo, J. C., Soccol, V. T., Guerra-Duarte, C., Kalapothakis, E., & Chávez-Olórtegui, C. (2021). A prokaryote system optimization for rMEPLox expression: A promising non-toxic antigen for *Loxosceles* antivenom production. *International journal of biological macromolecules*, 187, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.042>.
- Salama, R., Sattayasai, J., Gande, A. K., Sattayasai, N., Davis, M., & Lattmann, E. (2012). Identification and evaluation of agents isolated from traditionally used herbs against *Ophiophagus hannah* venom. *Drug discoveries & therapeutics*, 6(1), 18–23.
- Salvador, G. H. M., Cardoso, F. F., Gomes, A. A., Cavalcante, W. L. G., Gallacci, M., & Fontes, M. R. M. (2019). Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A2-like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches. *Scientific reports*, 9(1), 510. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36839-6>
- Sandoval MR & Lebrun I. TSII toxin isolated from Tityus serrulatus scorpion venom: behavioral, electroencephalographic, and histopathologic studies. *Brain Res Bull*. 2003.62(2):165-72. 10.1016/j.brainresbull.2003.09.006.
- Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*. 2013. 76:328-42. 10.1016/j.toxicon.2013.07.012

- Seelert, H., & Krause, F. (2008). Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 29(12), 2617–2636. <https://doi.org/10.1002/elps.200800061>.
- Shahidi, F., Dissanayaka, C.S. Phenolic-protein interactions: insight from in-silico analyses – a review. *Food Prod Process and Nutr* 5, 2 (2023). <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00121-0>.
- Sia F.Y., Vejayan J., Jamuna A., Ambu S. Efficacy of tannins from *Mimosa pudica* and tannic acid in neutralizing cobra (*Naja kaouthia*) venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2011;17:42–48. doi: 10.1590/S1678-91992011000100006
- Simas Pereira Júnior, L. C., Coriolano de Oliveira, E., Sanchez, E. F., & Fuly, A. L. (2025). Use of commercial tannic acid against the toxic effects of Bothrops jararacussu venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 258, 108325. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2025.108325>
- Siqueira-Batista R, Albuquerque AKAC, Esperidião Antonio V, Gomes AP, Quintas LEM. O sistema nervoso autônomo. *Rev Bras Clín Terap.* 2004. 30(5): 206-212.
- Sivaramakrishnan, V., Ilamathi, M., Girish, K. S., Kemparaju, K., Rangappa, K. S., & Dhananjaya, B. L. (2017). Viper venom hyaluronidase and its potential inhibitor analysis: a multipronged computational investigation. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 35(9), 1979–1989. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1203820>
- Song, L., Li, L., He, T., Wang, N., Yang, S., Yang, X., Zeng, Y., Zhang, W., Yang, L., Wu, Q., & Gong, C. (2016). Peritoneal adhesion prevention with a biodegradable and injectable N,O-carboxymethyl chitosan-aldehyde hyaluronic acid hydrogel in a rat repeated-injury model. *Scientific reports*, 6, 37600. <https://doi.org/10.1038/srep37600>
- Stelzner, J. J., Behrens, M., Behrens, S. E., & Mäder, K. (2018). Squalene containing solid lipid nanoparticles, a promising adjuvant system for yeast vaccines. *Vaccine*, 36(17), 2314–2320. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.019>.
- Stephenson, I., Bugarini, R., Nicholson, K. G., Podda, A., Wood, J. M., Zambon, M. C., & Katz, J. M. (2005). Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *The Journal of infectious diseases*, 191(8), 1210–1215. <https://doi.org/10.1086/428948>.
- Theakston, R.D., Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* 2003. 41(5):541-57. 10.1016/s0041-0101(02)00393-8.
- Vander Dos Santos, R., Villalta-Romero, F., Stanisic, D., Borro, L., Neshich, G., & Tasic, L. (2018). Citrus bioflavonoid, hesperetin, as inhibitor of two thrombin-like snake venom serine proteases isolated from *Crotalus simus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 143, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.01.005>
- Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., Tsenkov, M., Nair, S., Mirdita, M., Yeo, J., Kovalevskiy, O., Tunyasuvunakool, K., Laydon, A., Židek, A., Tomlinson, H., Hariharan, D., Abrahamson, J., Green, T., Jumper, J., Birney, E., ... Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic acids research*, 52(D1), D368–D375. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>.
- Vasconcelos, F., Lanchote, V. L., Bendhack, L. M., Giglio, J. R., Sampaio, S. V., & Arantes, E. C. (2005). Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 141(1), 85–92.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.05.012>.

- Vaucel, J., Mutricy, R., Hoarau, M., Pujo, J. M., Elenga, N., Labadie, M., & Kallel, H. (2020). Pediatric scorpionism in northern Amazonia: a 16-year study on epidemiological, environmental and clinical aspects. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 26, e202000038. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0038>
- Vázquez-Iglesias, L., Estefanell-Ucha, B., Barcia-Castro, L., Páez de la Cadena, M., Álvarez-Chaver, P., Ayude-Vázquez, D., & Rodríguez-Berrocal, F. J. (2017). A simple electroelution method for rapid protein purification: isolation and antibody production of alpha toxin from *Clostridium septicum*. *PeerJ*, 5, e3407. <https://doi.org/10.7717/peerj.3407>.
- Venancio, E. J., Portaro, F. C., Kuniyoshi, A. K., Carvalho, D. C., Pidde-Queiroz, G., & Tambourgi, D. V. (2013). Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of Tityus genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 69, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.012>.
- Vera-Palacios AL, Sacoto-Torres JD, Hernández-Altamirano JA, Moreno A, Peñuela-Mora MC, Salazar-Valenzuela D, Mogollón NGS, Almeida JR. A First Look at the Inhibitory Potential of *Urospatha sagittifolia* (Araceae) Ethanolic Extract for *Bothrops atrox* Snakebite Envenomation. *Toxins* (Basel). 2022 Jul 17;14(7):496. doi: 10.3390/toxins14070496. PMID: 35878234; PMCID: PMC9315696.
- Verano-Braga T, Rocha-Resende C, Silva DM, Ianzer D, Martin-Eauclaire MF, et al. Tityus serrulatus hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008 ; 371:515-520. 10.1016/j.bbrc.2008.04.104
- Vilela E. Soroterapia anti-escorpionica. *Brasil Medico*. 1917. 31(46):47-52
- Wang Y, Guo Y, Zhang L, Yuan M, Zhao L, Bai C, McClements DJ. Impacts of hesperidin on whey protein functionality: Interacting mechanism, antioxidant capacity, and emulsion stabilizing effects. *Front Nutr*. 2023 Jan 4;9:1043095. doi: 10.3389/fnut.2022.1043095. PMID: 36687727; PMCID: PMC9846557.
- Wang, R., Cheng, C., Wang, H., & Wang, D. (2024). Swollen hydrogel nanotechnology: Advanced applications of the rudimentary swelling properties of hydrogels. *Chinese Physics B*, XX(XX), Article 07.006. <https://doi.org/10.1016/j.chphma.2024.07.006>
- Wang, W., Narain, R., Zeng, H. (2020). Chapter 10 – Hydrogels. Editor(s): Ravin Narain, Polymer Science and Nanotechnology, Elsevier, Pages 203-244, ISBN 9780128168066, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00010-8>.
- Wang, Y., Meng, D., Shi, X., Hou, Y., Zang, S., Chen, L., Spanos, M., Li, G., Cretoiu, D., Zhou, Q., & Xiao, J. (2025). Injectable hydrogel with miR-222-engineered extracellular vesicles ameliorates myocardial ischemic reperfusion injury via mechanotransduction. *Cell reports. Medicine*, 101987. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2025.101987>
- Wei, Q., Chen, K., Zhang, X., Ma, G., Zhang, W., & Hu, Z. (2022). Facile preparation of polysaccharides-based adhesive hydrogel with antibacterial and antioxidant properties for promoting wound healing. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 209(Pt 1), 112208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112208>
- Welch, E.B. , & Gales, B. J. (2001). Use of stun guns for venomous bites and stings: a review. *Wilderness & environmental medicine*, 12(2), 111–117. [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2001\)012\[0111:uosgfv\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2001)012[0111:uosgfv]2.0.co;2).

- Williams DJ, et al. Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. *J. Proteom.* 2011;74:1735–1767. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.027.
- Ye, S., Boeter, J. W. B., Penning, L. C., Spee, B., & Schneeberger, K. (2019). Hydrogels for Liver Tissue Engineering. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 6(3), 59. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6030059>
- Yoshino M, Murakami K. Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types. Springerplus. 2015 Jun 24;4:292. doi: 10.1186/s40064-015-1082-8. PMID: 26120509; PMCID: PMC4478191.
- Zang, C., Tian, Y., Tang, Y., Tang, M., Yang, D., Chen, F., Ghaffarlou, M., Tu, Y., Ashrafizadeh, M., & Li, Y. (2024). Hydrogel-based platforms for site-specific doxorubicin release in cancer therapy. *Journal of translational medicine*, 22(1), 879. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05490-3>
- Zhang, F., Zhang, S., Lin, R., Cui, S., Jing, X., & Coseri, S. (2023). Injectable multifunctional carboxymethyl chitosan/hyaluronic acid hydrogel for drug delivery systems. *International journal of biological macromolecules*, 249, 125801. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125801>
- Zhang, J., Li, X., Guo, L., Gao, M., Wang, Y., Xiong, H., Xu, T., & Xu, R. (2024). 3D hydrogel microfibers promote the differentiation of encapsulated neural stem cells and facilitate neuron protection and axon regrowth after complete transactional spinal cord injury. *Biofabrication*, 16(3), 10.1088/1758-5090/ad39a7. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ad39a7>
- Zhang, L., Guan, Q., Zhang, H., & Tang, L. (2023). Effect of Metal Ions on the Interaction of Condensed Tannins with Protein. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(4), 829. <https://doi.org/10.3390/foods12040829>.
- Zhang, Y., & Li, C. M. (2017). The detoxifying effects of structural elements of persimmon tannin on Chinese cobra phospholipase A₂ correlated with their structural disturbing effects well. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 731–740. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.08.005>
- Zhang, Y., Shi, D., Wang, W., Li, W., Li, W., Zhao, L., Ma, L., Peng, Z., Sun, X., & Yang, C. (2024). Injectable hydrogels embedded with chitosan nanoparticles coated with hyaluronic acid for sequential release of dual drugs. *International journal of biological macromolecules*, 256(Pt 2), 128527. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128527>
- Zhao, T., Cai, Y., Jiang, Y., He, X., Wei, Y., Yu, Y., & Tian, X. (2023). Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 283. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01557-7>.
- Zhou, X., Zhou, Q., Chen, Q., Ma, Y., Wang, Z., Luo, L., Ding, Q., Li, H., & Tang, S. (2023). Carboxymethyl Chitosan/Tannic Acid Hydrogel with Antibacterial, Hemostasis, and Antioxidant Properties Promoting Skin Wound Repair. *ACS biomaterials science & engineering*, 9(1), 437–448. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00997>
- Zoccal KF, Bitencourt Cda S, Secatto A, Sorgi CA, Bordon Kde C, Sampaio SV, et al. Tityus serrulatus venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. *Toxicon.* 2011. 57(7-8):1101-8. 10.1016/j.toxicon.2011.04.017.
- Zoccal KF, Bitencourt Cda S, Sorgi CA, Bordon Kde C, Sampaio SV, Arantes EC, et al. Ts6 and Ts2 from Tityus serrulatus venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. *Toxicon.* 2013. 61:1-10. 10.1016/j.toxicon.2012.10.002.

8. Anexos

Alinhamento das sequências maduras de toxinas escorpionicas. O alinhamento foi feito no *software* Benchling (Biology Software, 2024). Sequências positivas no mapeamento de epitopos da TsMEP estão ressaltadas em laranja ou amarelo. As sequências alinhadas estão identificadas com o nome da toxina e o número de acesso do NCBI entre parêntesis.

Page 1 Tb1 (SCX1_TITBA), Tc11 (AEQ18791), Tf1 (SCX1_TITFA), To11 (SCX11_TITOB), Tst1 (P56612.1), Ttlg (SCX1_TITTR)

```

1                      Ts1 Epi 2                      66
Tst1 (P15226) KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECKIKGGSSGYC-AWPACYCYGLPNVWVDRATNCKGK-
Tb1 (SCX1... KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGSECKIKGGSSGYC-AWPACYCYGLPNVWVDRATNCKGK-
Tc11 (AEQ... KEGYLMDEHGCKLSCFIRPAGYCGRECKIKGGSSGYC-RWPACYCYGLPNWAKVDRATNRCGK-
Tf1 (SCX1... KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECAIKGGSSGYC-AWPACYCYGLPNVWVDRATNRCGK-
To11 (SCX... KEGYLVGNDGCKYNCLTRPSGHYCANECRSVKGKDGICYAWMACYCYMNPVWVDRATNCKGK-
Tst1 (P56... KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECKIKGGSSGYC-AWPACYCYGLPNVWVDRATNCK-
Ttlg (SCX... KEGYLMDEHGCKLSCFIRPSGYCGRECAIKGGSSGYC-AWPACYCYGLPNVWVDRATNRCGK-

```

Page 1 Tb2 (SCXJ_TITBA), Tc12 (AEQ18792), Tf2 (SCX2_TITFA), To12 (SCX12_TITOB), Tst2 (SCX2_TITST)

```

1                      Ts2 Epi 2                      65
Tst2 (SCX2... KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDCGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVDYATNCKG-
Tb2 (SCXJ... KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDCGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVDYATNCK-
Tc12 (AEQ... KEGYAMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECKIKGGSSGYC-RWACYCYGLPNWAKVDRATNRCGK-
Tf2 (SCX2... KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDCGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVDYATNCKG-
To12 (SCX... KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDCGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVDYATNCKG-
Tst2 (SCX... KEGYAMDHEGCKFSCFIRPAGFCDCGYCKTHLKASSGYCAWPACYCYGVPDHIKVDYATNCK-

```

Page 1 AaH2 (SCX2_ANDAU), Tb3 (SCX3_TITBA), Tf3 (SCX3_TITFA), To10 (SCX10_TITOB), Tst3 (SCX3_TITST)

```

1      Ts3 Epi1      Ts3 Epi 2                      70
Tst3 (SCX3... KKDGYPVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVWH---ILCYCYGLPDSEPTKTNGCKSGK-
AaH2 (SCX... VKDGYLVDDVNCYFCG--RNAYCNEECTKLGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHRVTGPGRCHGR--
Tb3 (SCX3... KKDGYPVEADNCAVFCFGYDNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVWH---ILCYCYGLPDSEPTKTNGCK-
Tf3 (SCX3... KKDGYPVEADNCAVFCFGYDNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVWH---ILCYCYGLPDSEPTKTNGCKSGK-
To10 (SCX... KKDGYPVEGS-CAFFC-GYDNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVWH---ILCYCYGLPDNAAIKGYGRCKPCK-
Tst3 (SCX... KKDGYPVEYDNCAYICWNYDNAYCDKLCCKDKKADSGYCYVAH---ILCYCYGLPDSEPTKTNGCKS-

```

Page 1 Q0S80959, WDU65909, WLF82752, XP_023226974

```

1
Hyal Ts (... -----ADFKVYWEVPSFLCSKRFKINVTQVLTSHKILVNQGESFNGDKIVIPYENQLGKYPHIDSNVVEINGGILQVADLAKHLKIAKDN
Hyal Aa (... MTQNIQMTQMIYQIIPFASILAVISAINADFKVYWEVPSFLCSKRFKINVTQVLTSHKILVNQGESFNGDKIVIPYENQLGKYPHIESG-KDINGMQLQISDLANHLKIAKDN
Hyal Tc (... -----MHLISIFSIILSIYAVQADFKVYWEVPSFLCSKRFKINVTQVLTSHKILVNQGESFNGDKIVIPYENQLGKYPHIDSNVVEINGGILQVADLAKHLKIAKDN
Hyal Tm (... -----MNPISIFSIIVSIVCAVQADFKVYWEVPSFLCSKRFKINVTQVLTSHKILVNQGESFNGDKIVIPYENQLGKYPHIDSNVVEINGGILQVADLAKHLKIAKDN
Hyal Css (... -----MHSISIFSIIVSIVCAVQADFKVYWEVPSFLCSKRFKINVTQVLTSHKILVNQGESFNGDKIVIPYENQLGKYPHIDSNVVEINGGILQVADLAKHLKIAKDN

```

```

113 Hyal Epi 2                      224
Hyal Ts (... ITKFPVNPNGVGVIDWEAWRPSWDFNWKLVYKEKSIDLVKSKHPWPSDRVEKVAKEEWEESAKEMWVKTLKLAQEMRPNVAVCYLFPDCYNYFGKDQPSQFSCSSR
Hyal Aa (... ITKFPVNPNGVGVIDWEAWRPLWYVWVWVDRSVDLVAKHPDWSSAEIKVAIQEWENSKEWMLKTLKLAQEMRPNVAVCYLFPDCYNYFGKDQPSQFPCND
Hyal Tc (... ITKFPVNPNGVGVIDWEAWRPNWDFNWKLVYKEKSIDLVKSKHPWPSDRVEKVAKEEWEESAKEMWVKTLKLAQEMRPNVAVCYLFPDCYNYFGKDQPSQFACNPK
Hyal Tm (... ITKFPVNPNGVGVIDWEAWRPSWDFNWKLVYKEKSIDLVKSKHPWPSDRVEKVAKEEWEESAKEMWVKTLKLAQEMRPNVAVCYLFPDCYNYFGKDQPSQFSCSSR
Hyal Css (... ITKFPVNPNGVGVIDWEAWRPSWDFNWKLVYKEKSIDLVKSKHPWPSDRVEKVAKEEWEESAKEMWVKTLKLAQEMRPNVAVCYLFPDCYNYFGKDQPSQFPCNPK

```

```

225                      Hyal Epi 1                      336
Hyal Ts (... IQENRSLWLNQSTALCPSIYQESHVTKYNMSQRTWIDARLREAIRVSEHRPNIPYIPYINYLPGTNE-TVPAMDKFRVLGQIASLGLDGALLWSSYHVLTEGCK
Hyal Aa (... IQENRSLWLNQSTALCPSIYQESHVTKYNMSQRTWIDARLREAIRVSEHRPNIPYIPYINYLPGTNE-TVPAMDKFRVLGQIASLGLDGALLWSSYHVLTEGCK
Hyal Tc (... IQENRSLWLNQSTALCPSIYQESHVTKYNMSQRTWIDARLREAIRVSEHRPNIPYIPYINYLPGTNE-TVPAMDKFRVLGQIASLGLDGALLWSSYHVLTEGCK
Hyal Tm (... IQENRSLWLNQSTALCPSIYQESHVTKYNMSQRTWIDARLREAIRVSEHRPNIPYIPYINYLPGTNE-TVPAMDKFRVLGQIASLGLDGALLWSSYHVLTEGCK
Hyal Css (... VREQNSRLWLNQSTALCPSIYQESHVTKYNMSQRTWIDARLREAIRVSEHRPNIPYIPYINYLPGTNE-TVPAMDKFRVLGQIASLGLDGALLWSSYHVLTEGCK

```

```

337                      414
Hyal Ts (... ITSDYVKSIVAPTAVTLVNTNRCQIICKGRGNCVWPEEPFSSWKYLVDPKMPVFKPTNIHCKCKG-YLGRYCEIIPK
Hyal Aa (... EMDTYVKTIVAPTAVTLVNTNRCQIICKGRGNCVWPEEPFSSWKYLVDPKMPVFKPTNIHCKCKG-YLGRYCEIIPK
Hyal Tc (... ITADYVNDVISPTAVTLVNTNRCQIICKGRGNCVWPEEPFSSWKYLVDPKMPVFKPTNIHCKCKG-YLGRYCEIIPK
Hyal Tm (... ITSDYVKSIVAPTAVTLVNTNRCQIICKGRGNCVWPEEPFSSWKYLVDPKMPVFKPTNIHCKCKG-YLGRYCEIIPK
Hyal Css (... LTATYVKSIVAPTAVTLVNTNRCQIICKGRGNCVWPEEPFSSWKYLVDPKMPVFKPTNIHCKCKG-YLGRYCEIIPK

```

Artigos científicos publicados durante o doutorado.

International Journal of Biological Macromolecules 311 (2025) 143608



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



Development of a neutralizing monoclonal antibody targeting *Bothrops atrox* venom metalloproteinases

Tamara Gabriela Fernandes Costa^{a,1}, Thamyres Caroline Silva de Assis^{a,1},
Julia M. Caetano Costa^a, Rafael Saavedra-Langer^a, Thalita Silverio Santo^a,
César A. Bonilla Ferreira^b, Ricardo A. Machado-de-Ávila^c, Liza Felicori^a, Clara Guerra-Duarte^d,
Leticia Lopes-de-Souza^a, Carlos Chávez-Olórtegui^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Instituto Nacional de Salud, Lima, Peru

^c Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

^d Centro de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brazil

International Journal of Biological Macromolecules 282 (2024) 136880



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



Development and evaluation of a recombinant multi-epitopic protein (TsMEP) as an antigen candidate for *Tityus serrulatus* antivenom production

Rafael Saavedra-Langer^{a,1}, Gladstony de Oliveira-Souza^{a,1}, Isabela Barcelos-Pereira^a,
Paula Lopes^a, Camila Rosa Campos^a, Nicole Helena Guimarães^a, Thalita Silvério-Santo^a,
Clara Guerra-Duarte^b, Leticia Lopes-de-Souza^a, Tamara Gabriela Fernandes Costa^a,
Carlos Chávez-Olórtegui^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP: 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, 30510-010 Belo Horizonte, MG, Brazil



Pinedo-Cancino et al. *Malaria Journal* (2024) 23:209
<https://doi.org/10.1186/s12936-024-05032-8>

Malaria Journal

RESEARCH

Open Access

Unravelling heterogeneous malaria transmission dynamics in the Peruvian Amazon: insights from a cross-sectional survey

Viviana Pinedo-Cancino^{1,2,11,12*}, Katty M. Arista¹, G. Christian Baldeviano^{3,13}, Rafael Saavedra-Langer^{1,4},
Andrei Arana¹, María E. Vásquez-Chasnamote¹, Andree Valle-Campos⁵, Juan C. Castro^{6,7}, Julio A. Ventocilla⁸,
Edward S. Smith⁹, Andres G. Lescano^{3,14} and Lastenia Ruiz-Mesia^{1,10}



REVIEW

Scorpion envenomation in Brazil: Current scenario and perspectives for containing an increasing health problem

Clara Guerra-Duarte¹, Rafael Saavedra-Langer², Alessandra Matavel¹, Barbara B. R. Oliveira-Mendes³, Carlos Chávez-Olortegui², Ana Luiza Bittencourt Paiva^{1*}

1 Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** l'Institut du Thorax, Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291, Nantes, France

* analubpaiva@gmail.com



International Journal of Biological Macromolecules 263 (2024) 130311



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac



Divergence in toxin antigenicity and venom enzymes in *Tityus melici*, a medically important scorpion, despite transcriptomic and phylogenetic affinities with problematic Brazilian species

Yan Kalapothakis^{a,1}, Kelton Miranda^{a,1}, Matheus Aragão^b, Débora Larangote^a, Gracielle Braga-Pereira^c, Marina Noetzold^b, Denis Molina^b, Rafael Langer^b, Izabela Mamede Conceição^b, Clara Guerra-Duarte^d, Carlos Chávez-Olortegui^b, Evanguedes Kalapothakis^a, Adolfo Borges^{c,1}



Patentes depositadas durante o doutorado.

- **“ANTICORPO MONOCLONAL E USO PARA PRODUÇÃO DE COMPOSIÇÕES PARA NEUTRALIZAR A ATIVIDADE HEMORRÁGICA DE VENENOS OFÍDICOS”.**

Data do Depósito: 26/03/2024

Número do Pedido: BR1020250058901

Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Inventor(es): Carlos Delfin Chávez Olórtegui / Tamara Gabriela Fernandes Costa / Thamyres Caroline Silva de Assis / Letícia Lopes de Souza / Júlia Machado Caetano Costa / Thalita Silvério Santo / Malena Vanessa Grados Vasquez / **Rafael Jose Luis Saavedra Langer** / Nicole Helena Guimarães Oliveira

- **PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, DNA E USOS PARA PRODUÇÃO DE SOROS ANTIVENENO DE *TITYUS SERRULATUS*”** foi realizado junto ao INPI.

Data do Depósito: 28/12/2023

Número do Pedido: BR1020230277918

Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS / FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS - FUNED

Inventor(es): Carlos Delfin Chavez Olortegui / **Rafael Jose Luis Saavedra Langer** / Denis Alexis Molina Molina / Isabela Patricia Barcelos Pereira / Paula Souza Lopes / Gladstony De Oliveira Souza / Camila Rosa Campos / Clara Guerra Duarte

- **“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE MULTIEPÍTOPO DE *LOXOSCELES* E USO”**

Data do Depósito: 11/02/2022

Número do Pedido: BR1020220026866

Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Inventor(es): Carlos Delfin Chávez Olórtegui / **Rafael Jose Luis Saavedra Langer** / Sabrina de Almeida Lima / Tamara Gabriela Fernandes Costa / Christina Aparecida Martins