



UFPB

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**ÁLISSON EMANNUEL FRANCO ALVES**

**SISTEMA PARA DETECÇÃO DE PEÇONHA OFÍDICA A PARTIR DE UM SENSOR  
DE RESSÔNANCIA DE PLASMA DE SUPERFÍCIE**

**JOÃO PESSOA  
2020**

**ÁLISSON EMANNUEL FRANCO ALVES**

**SISTEMA PARA DETECÇÃO DE PEÇONHA OFÍDICA A PARTIR DE UM SENSOR  
DE RESSONÂNCIA DE PLASMA DE SUPERFÍCIE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Biologia Celular e Molecular**.

**Área de concentração:** Biologia Celular e Molecular

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karla Patrícia de Oliveira Luna

**Co-orientador:** Prof. Dr. Antonio Marcus Nogueira Lima

**JOÃO PESSOA  
2020**

ÁLISSON EMANNUEL FRANCO ALVES

SISTEMA PARA DETECÇÃO DE PEÇONHA OFÍDICA A PARTIR DE UM SENSOR  
DE RESSONÂNCIA DE PLASMA DE SUPERFÍCIE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Biologia Celular e Molecular**.

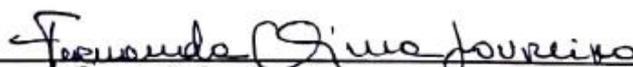
**Área de concentração:** Biologia Celular e Molecular

Aprovada em: 20/02/2020.

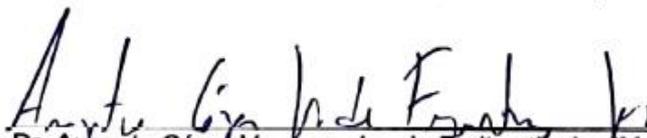
**BANCA EXAMINADORA**



Profª. Drª. Karla Patrícia de Oliveira Luna (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª. Drª. Fernanda Cecília Corrêa Lima Loureiro (Membro externo)  
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



Prof. Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Junior (Membro Interno)  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Ao professor PhD Helmut Neff, *in memoriam*, dedico.

A todas as pessoas acometidas por acidentes ofídicos que, por motivos adversos, não tiveram a chance de um tratamento adequado, dedico.

## AGRADECIMENTOS

Foi difícil, ninguém falou que seria fácil, mas meus amigos e as pessoas que tive a oportunidade de conhecer ao longo do desenvolvimento deste trabalho me deixaram mais confiante para continuar seguindo, quando eu achava que não daria conta. Enfim consegui! A Ele, Deus, que possibilitou, possibilita e possibilitará todas as minhas conquistas acadêmicas, pessoais e profissionais.

Aos meus patrocinadores de vida acadêmica, pessoal, profissional e todas as vidas que puderem serem contadas, meus pais: Ana Maria e Manoel Franco (Nequinho), que, sem pestanejar, sem nem pensar duas vezes, fazem o possível e o impossível para a realização dos meus sonhos. Ao meu irmão, pessoa com quem divido não só o teto, mas os silêncios. Podem sempre contar comigo.

Aos meus primos Gilson e Vinícius e suas respectivas esposas Alane e Rose, que me acolheram em suas casas para que eu pudesse concluir minhas pesquisas, e a todos que direta e indiretamente contribuíram para esta conquista.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Karla Luna, pelas leituras sugeridas ao longo dessa orientação e pela dedicação ao nosso trabalho. Pela pessoa que és, humilde, acolhedora, simpática, uma das melhores pessoas que já tive a oportunidade de conhecer. Te amo! Que nunca lhe falte ímpeto para trilhar nesse caminho acadêmico que tanto nos sufoca, mas nos traz uma retorno gratificante.

Ao meu co-orientador Antonio Marcus, pelas leituras sugeridas, pelas explicações e pelo conhecimento que compartilhou durante esta caminhada.

A Fernanda Cecília e Sunney Borges que estiveram comigo ao longo dessa caminhada, foram dias de fome, no entanto, dias alegres e com diversas conquistas.

Aos professores do curso de pós-graduação que contribuíram de forma singular para meu crescimento acadêmico e pessoal, especialmente para o Professor Doutor Augusto César, que é um professor excepcional e que, quando eu crescer, quero ser um profissional como ele. Espero que ele continue sempre com o brilho no olhar quando estiver dando aula, pois é com este brilho que ele conquista o querer aprender em nós, educandos.

Aos funcionários da UEPB e da UFPB que, de forma direta contribuíram para a realização da minha pesquisa, pois sem eles não teria conseguido fazê-la.

Especialmente Dona Mary, Edilma e Regina Emy, as levarei para sempre no meu coração.

Aos colegas de classe pelos momentos de amizade e apoio.

Aos amigos de classe, Anderson Félix, Ellynes Nunes, Taylla Michelle (aqui entre nós, ela não gosta do Michelle), Zhilbelly Mota, Bia Dantas, estes com quem compartilhei todos os sofrimentos desses dois anos, mas também diversos momentos de alegria.

Aos antigos e aos novos amigos que contribuíram para que este momento se tornasse verdade: Glauce Viviane, Carlos Alejandro, Andhré com H, Valdeir Lima (Bahia), Darianny Brito (Pará), Bruna (Sergipe), Vanessa Bettcher (Rio), Mariana Borba (nômade), Mayla Dantas (minha ruiva linda), Rafael Galdino, Italo Andrade.

Às pessoas que o mestrado trouxe para minha vida, as quais tenho imenso prazer de colocá-las, pois somaram imensamente para meu crescimento acadêmico: Ludovico Migliolo, Janaina CRISPR (não é o sobrenome dela, mas é como eu sempre a lembrarei), a Péola e seus amigos que nos 45 do segundo tempo tive a oportunidade de conhecer e todos os professores que participaram do Encontro Regional de Biologia Celular e Molecular.

As pessoinhas que sempre estarão nos meus agradecimentos: Mayara JF e Cassia Simões, mais que amigas **friends!** As conheci na graduação e levarei para a vida. Tenho certeza que sempre estão torcendo pelo meu sucesso e minha felicidade, onde quer que estejam.

Meus comparças de Farmácia com quem divido uma vida inteira: Andreia Barros, Brenda Maria (meu amor), Julliana Santos, Cesar Duarte, Thalita Andrade, Renata Raynan, Gabriella Lima, amo vocês.

O que falar de Anderson Felix? Bom, lembro-me dele sentado atrás de mim no dia da primeira reunião do Mestrado, pensei eu: mas que menino estranho. Dividimos uma orientação babado, depois tomamos rumos diferentes, porém a amizade ficou e agradeço a Deus por tê-lo conhecido. Não caberia em uma folha o quanto admiro esse Habygo, você terá um futuro maravilhoso, quero poder dizer: sou amigo daquele cara! Te amo amigo.

Ellynes? Pessoa com quem compartilhei não só momentos, mas a cama. Kkkk Pessoa excepcional, acolheu-me nos venenos, trouxe-me para esse mundo

da Toxinologia. Agradeço por tudo que passamos juntos, obrigado por reservar um lugarzinho dentro do seu coração e por toda a colaboração. Te amo amiga!

Taylla? Com seu “pôirqueê” chegou toda imigrante aqui na Paraíba, mas conquistou um lugarzinho em nossos corações. Pelas noites mal dormidas, pelas risadas, por nossos rôles, que possamos levar essa felicidade para muitos anos a frente. Que venham mais dias de praia amiga, “pôirqueê” sim!! Te amo amiga!

Às instituições de Fomento CAPES e UFPB, pelas bolsas concedidas para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional. A UFCG e a UEPB pela colaboração e espaços cedidos para a realização dos ensaios necessários para a confecção desta dissertação. Muito obrigado.

“As palavras são nossa inesgotável fonte de magia, capazes de causar grandes sofrimentos e também remediá-los” **Albus Dumbledore**

ALVES, Álisson Emmanuel Franco. **SISTEMA PARA DETECÇÃO DE PEÇONHA OFÍDICA A PARTIR DE UM SENSOR DE RESSONÂNCIA DE PLASMA DE SUPERFÍCIE**. 2020. 99 Folhas. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

## RESUMO

Acidentes ofídicos constituem doença tropical negligenciada que acomete uma quantidade significativa de pessoas a cada ano em todo mundo. A produção de soro antiofídico, rápido diagnóstico, administração e eficácia são etapas fundamentais para a boa evolução dos pacientes diagnosticados com envenenamento por serpentes. No Brasil, os acidentes ofídicos vitimam cerca de 20.000 pessoas anualmente, sendo os acidentes botrópicos os mais comuns em todo o território nacional, seguidos dos acidentes crotálicos. Diversas espécies do gênero *Bothrops* podem ser encontradas no Nordeste, sendo a espécie *B. erythromelas* a mais importante do ponto de vista médico-epidemiológico. Diante disto, este trabalho objetivou um método para desenvolvimento de um biossensor para detecção de envenenamento ofídico, utilizando-se as peçonhas das espécies *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus terrificus*, a partir de um sensor óptico de ressonância de plasma de superfície – SPR. Para isto, foi avaliado o analito e o adsorvato, este, fragmentos  $F(ab')_2$  de IgG proveniente do antiveneno, titulados em diferentes concentrações a fim de avaliar suas interações. Os testes de detecção foram feitos no biossensor SPR seguindo parâmetros de otimização para melhor adsorção no chip de ouro. Os resultados mostraram que o sensor é capaz de diferenciar os venenos das duas espécies de serpentes utilizadas neste estudo. Pode-se concluir que o desenvolvimento de um biossensor para detecção do tipo de peçonha ofídica é possível através deste sensor. Estes dados são de suma importância, uma vez que grande é a necessidade da diferenciação no momento em que o indivíduo envenenado é admitido ao hospital para ser tratado.

**Palavras-Chave:** Biossensor. Doenças Negligenciadas. Ofidismo.

## ABSTRACT

Snakebites are a neglected tropical disease that affects a significant number of people each year worldwide. The production of antiophidic serum, rapid diagnosis, administration and efficacy are fundamental steps for the good evolution of patients diagnosed with snake envenoming. In Brazil, snake accidents victimize about 20,000 people annually, with botropic accidents being the most common across the country, followed by crotalic accidents. Several species of the genus *Bothrops* can be found in the Northeast, with *B. erythromelas* being the most important from a medical-epidemiological point of view. In view of this, this work aimed at a method for the development of a biosensor to detect snakebite poisoning, testing the venoms of the species *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus terrificus*, using an optical surface plasma resonance sensor - SPR. For this, the analyte and the adsorbate were evaluated, the latter, F(ab')<sub>2</sub> fragments of IgG from the antivenom, titrated in different concentrations in order to evaluate their interactions. Detection tests were performed on the SPR biosensor following optimization parameters for better adsorption in the gold chip. The results showed that the sensor is able to differentiate the poisons of the two snake species used in this study. It can be concluded that the development of a biosensor to detect the type of snake venom is possible through this sensor. These data are of paramount importance, since there is a great need for differentiation when the poisoned individual is admitted to the hospital for treatment.

**Keywords:** Biosensor. Neglected Diseases. Ophidism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dentição de serpentes.....	20
Figura 2	Ilustração simplificada das glândulas de veneno de serpentes.....	24
Figura 3	Proporção relativa das diferentes família de proteínas de veneno de 65 serpentes estudadas, da subfamília <i>Crotalinae</i> .....	26
Figura 4	Um esquema simplificado da evolução do venenos de serpentes.....	27
Figura 5	As cinco principais classes de anticorpos.....	32
Figura 6	Tipos de frangmentos de anticorpos.....	32
Figura 7	O copo de Lycurgus.....	35
Figura 8	Respresentação esquemática de um biossensor básico.....	37
Figura 9	Esquema representando um sensor SPR.....	40
Figura 10	Configuração de Kretchmann.....	42
Figura 11	Sistema microfluídico.....	42
Figura 12	Sensograma.....	43
Figura 13	Orientação de anticorpos em uma superfície planar.....	45
Figura 14	Representação esquemática de métodos de imobilização direcionada de anticorpos IgG.....	46
Figura 15	Mapa mostrando as cidades onde se localizam as instituições responsáveis pela pesquisa.....	48
Figura 16	Classificação taxonômica dos espécimes utilizados neste estudo.....	49
Figura 17	Extração de veneno de <i>B. Erythromelas</i> .....	49
Figura 18	Biossensor.....	51
Figura 19	Descrição do método.....	51
Figura 20	Determinação da concentração mínima de soro antiofídico.....	56
Figura 21	Determinação da concentração mínima de veneno antiofídico.....	59
Figura 22	Determinação da concentração mínima de veneno antiofídico.....	60
Figura 23	Detecção do veneno de <i>B. ery</i> à uma concentração de 1:10000.....	61
Figura 24	Detecção do veneno de <i>B. ery</i> à uma concentração de 1:5000.....	62
Figura 25	Detecção do veneno de <i>C. d. terrificus</i> à uma concentração de 1:5000.....	63
Figura 26	Detecção do veneno de <i>C. d. terrificus</i> à uma concentração de 1:2500.....	64

Figura 27	Detecção do veneno de <i>C. d. terrificus</i> à uma concentração de 1:1000.....	66
Figura 28	Ligação cruzada entre SAC (1:100) e veneno Bothrópico na concentração de 1:10000.....	67
Figura 29	Ligação cruzada entre SAC (1:100) e veneno Bothrópico na concentração de 1:5000.....	68
Figura 30	Ligação cruzada entre SAC (1:100) e veneno Bothrópico na concentração de 1:2500.....	70
Figura 31	Ligação cruzada entre SAC (1:100) e veneno Bothrópico na concentração de 1:1000.....	71
Figura 32	Ligação cruzada entre SAB (1:100) e veneno Crotálico na concentração de 1:10000.....	72
Figura 33	Ligação cruzada entre SAC (1:100) e veneno Bothrópico na concentração de 1:10000.....	73
Figura 34	Ligação cruzada entre SAC (1:100) e veneno Bothrópico na concentração de 1:10000.....	74
Figura 35	Ligação cruzada entre SAC (1:100) e veneno Bothrópico na concentração de 1:10000.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Glândulas e veneno de serpentes e suas funções.....	25
Tabela 2	Porcentagem (%) das famílias de proteínas encontrads no veneno das serpentes <i>B. ery</i> e <i>C. d. terrificus</i> .....	26
Tabela 3	Ações predominantes dos venenos.....	29
Tabela 4	Evolução científica para o desenvolvimento de um biossensor.....	36
Tabela 5	Valores obtidos, de índice de refração, para diferentes concentrações do soro antiofídico.....	57
Tabela 6	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:12500.....	59
Tabela 7	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:10000.....	60
Tabela 8	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:10000.....	61
Tabela 9	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:5000.....	62
Tabela 10	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:5000.....	64
Tabela 11	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:2500.....	64
Tabela 12	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:1000.....	66
Tabela 13	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:10000.....	68
Tabela 14	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:5000.....	69
Tabela 15	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:2500.....	70
Tabela 16	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:12500.....	71
Tabela 17	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:1000.....	72

Tabela 18	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:5000.....	73
Tabela 19	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:1000.....	74
Tabela 20	Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:100.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Ano Domini
<i>B. ery</i>	<i>Bothrops erythromelas</i>
<i>C.d. terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
Cys	Cisteína
IgG	Imunoglobulina G
$K_a$	Constante de Adsorção
$K_d$	Constante de Desorção
$K_{on}$	$K_a$
$K_{off}$	$K_d$
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
pH	Potencial Hidrogeniônico
SPR	Superfície de Plasma de Ressonância
SAB	Soro Anti-Bothrópico
SAC	Soro Anti-Crotálico
SINAN	Sistema de Informação e Agravo de Notificação
VCrot	Veneno crotálico
VBery	Veneno botrópico

**LISTA DE SÍMBOLOS**

Au      Ouro

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.</b>	<b>Aspectos biológicos .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.</b>	<b>Epidemiologia dos Acidentes Ofídicos .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.</b>	<b>Composição do veneno.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.</b>	<b>Fisiopatologia e complicações do envenenamento.....</b>	<b>28</b>
1.4.1.	Acidente botrópico.....	29
1.4.2.	Acidente Crotálico.....	30
<b>1.5.</b>	<b>Estrutura dos anticorpos.....</b>	<b>31</b>
<b>1.6</b>	<b>Aplicações de biossensores na clínica.....</b>	<b>33</b>
1.6.1.	Biossensores.....	35
1.6.2.	Biossensores baseados no Fenômeno de Ressonância de Plásmons de Superfície - <i>Surface Plasmon Resonance (SPR)</i> .....	38
1.6.3.	Princípios dos sensores ópticos.....	40
1.6.4.	Célula microfluídica em sensor SPR.....	42
1.6.5.	Imobilização de anticorpos.....	43
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>2.1.</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>47</b>
<b>2.2.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1.</b>	<b>Local de estudo.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.</b>	<b>Amostras.....</b>	<b>48</b>
3.2.1.	Peçonhas – ou venenos.....	48
3.2.2.	Soro Antibotrópico (SAB) e Soro Anticrotálico (SAC).....	49
3.2.3.	Diluição das amostras.....	50
<b>3.3.</b>	<b>Descrição do método proposto.....</b>	<b>50</b>
<b>3.4.</b>	<b>Descrição dos experimentos.....</b>	<b>51</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise dos resultados.....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Análise dos sistemas microfluídicos com adsorção na superfície de detecção.....</b>	<b>54</b>

4.2	Determinação da concentração mínima de soro antiofídico para imobilização na superfície de ouro no sistema SPR.....	55
4.3	Determinação da concentração mínima de veneno ofídico para imobilização na superfície de ouro no sistema SPR.....	58
4.4	Análise do sistema microfluídico com a ligação do veneno de Bothrops ao soro SAB imobilizado na superfície de ouro.....	61
4.5	Análise do sistema microfluídico com a ligação do veneno Crotálico ao soro SAC imobilizado na superfície de ouro.....	63
4.6	Análise da interação cruzada entre o veneno inespecífico para o soro imobilizado - SAC vs VBery.....	67
4.7.	Análise da interação cruzada entre o veneno inespecífico para o soro imobilizado - SAB vs VCrot .....	71
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXO.....	94
	APÊNDICES.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos Biológicos

É de conhecimento comum que, as serpentes fazem parte de um grupo taxonômico bastante diverso, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Isto se dá devido às condições ambientais ótimas para animais ectotérmicos, ou também chamados animais de sangue frio, como no caso das serpentes, manterem seus nichos ecológicos (POUGH et al., 2008).

Segundo Costa e Bernélis (2018) há aproximadamente 76 espécies de serpentes peçonhentas de importância médica catalogadas no Brasil, distribuídas em duas famílias: Viperidae e Elapidae. Atualmente existem no Brasil 28 espécies de *Bothrops* e 02 espécies de *Bothrocopias*; já o gênero *Crotalus* agrupa 06 subespécies pertencentes a espécie *Crotalus durissus*; o gênero *Lachesis* é caracterizado como uniespecífica e representada pela *Lachesis muta*; 36 espécies estão catalogadas para o gênero *Micrurus* e 03 *Leptomicrurus*. Totalizando assim 30 espécies e 06 subespécies de Viperídeos e 30 espécies e 10 subespécies de Elapídeos.

As serpentes podem ser venenosas (ex. as espécies da família Colubridae) e peçonhentas (ex. família Elapidae e Viperidae). Embora espécies da família Colubridae não sejam consideradas peçonhentas por alguns pesquisadores, a Glândula de Duvernoy, encontrada na maxila superior destas serpentes, é homóloga às glândulas de veneno dos Viperidae e Elapidae, podendo ser capaz de produzir uma secreção tóxica que paralisa a presa (POUGH et al, 2008).

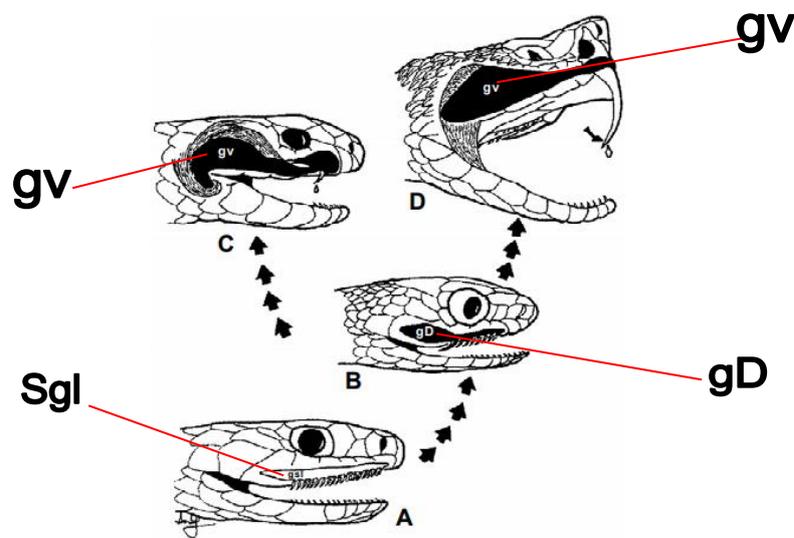
Os membros da família Colubridae (atuais Dipsadidae), embora não sejam considerados peçonhentos, possuem glândula de veneno, produzem um quadro clínico de envenenamento com sintomas semelhantes à ação proteolítica dos venenos botrópicos, apresentando lesões externas (variáveis), equimoses, edema, dor e em alguns casos hemorragias (SILVEIRA e NISHIOKA, 1992; SALOMÃO et al.; 2003; BERNARDE et al., 2014; BRANDEHOFF et al., 2018; MENEGUCCI et al., 2019).

O conceito de peçonhento refere-se a animais que possuem, além do veneno, um mecanismo que possibilite a inoculação da peçonha em outro organismo, logo, estes tipos de serpentes possuem glândulas de veneno desenvolvidas que estão associadas a um aparelho inoculador (dentes); os venenos são produzidos como um complexo enzimático de finalidade principalmente

digestiva, neutralizando e matando a presa durante sua captura, além de efeito defensivo contra predadores (FRANCO, 2003; BRAGA, 2006; BERNARDE, 2009; KERKKAMP et al., 2015).

Em relação a dentição, as serpentes podem ser caracterizadas tradicionalmente da seguinte forma: áglifas, opstóglifas, proteróglifas e solenóglifas (**Figura 1**).

**Figura 1.** Dentição de serpentes. Classificação quanto a presença, localização e estrutura dos dentes inoculadores de veneno de serpentes. A – Serpentes áglifas; B – Serpentes opstóglifas; C – Serpentes Proteóglifas; D – Serpentes solenóglifas. Sgl – Glândula supralabial, gD – Glândula Durvenoy, gv – Glândula venenosa.



Fonte: (Modificado de MELGAREJO, 2002)

De acordo com os estudos de Santos et al. (1995); Melgarejo, (2002); Pough et al. (2008), pode-se afirmar que:

- (i) As **serpentes áglifas (Figura 1a)** possuem todos os dentes parcialmente no mesmo padrão, e não existem presas modificadas para a inoculação de veneno, todas as serpentes não venenosas possuem este tipo de dentição.
- (ii) **Serpentes opstóglifas** (Grego, *opistho*= atrás, *Glyph* = Sulcado) (**Figura 1b**), possuem um ou mais dentes aumentados, próximo a porção caudal do maxilar, com dentes menores na frente.
- (iii) **Serpentes proteróglifas (Figura 1c)** (Grego, *proto* = primeiro): este tipo de dentição só ocorre nas corais verdadeiras incluindo naja,

mamba e serpentes marinhas da família Elapidae. As presas inoculadoras estão localizadas na porção cranial do maxilar.

- (iv) **Serpentes solenóglifas (Figura 1d e Figura 9)** (Grego, *solen* = tubo): nessas serpentes, as presas inoculadoras canaliculadas são os únicos dentes do maxilar, que são articulados de modo a se dobrarem contra a porção anterior da boca quando as maxilas são fechadas.

## 1.2. Epidemiologia dos Acidentes Ofídicos

Foi no início do século XX, por Vital Brazil, que se obteve o primeiro estudo epidemiológico sobre acidentes ofídicos no Brasil (BRAZIL, 1911). A partir de medidas instituídas pelo Ministério da Saúde, os acidentes ofídicos passaram a ser de notificações obrigatórias no país; estes dados são aprimorados e mostram características clínicas e epidemiológicas que possibilitaram o planejamento de ações de controle (LEMOS *et al.*, 2009).

A violação dos direitos humanos é causada quando há negligência de doenças, assim caracterizadas, por serem doenças tropicais endêmicas que acometem pessoas mais pobres da população, ignoradas à saúde pública (HUNT, 2007), a exemplo de acidentes ofídicos (HARISON *et al.*, 2009), malária, doença de chagas, doença do sono (VALVERDE, 2019), e outras permanecem silenciadas e/ou subnotificadas (KASTURIRATNE, 2017).

No Brasil, acidentes por envenenamento ofídico são subnotificados. Os dados clínicos e epidemiológicos que estão disponíveis geralmente são muito pobres e de baixa qualidade (BOCHNER *et al.*, 2014).

Em relação ao número total de répteis existentes no mundo, estamos em terceiro lugar em riqueza de répteis, atrás da Austrália (1.057), e México (942). O Brasil conta com cerca de 795 espécies de répteis (COSTA e BERNELIS, 2018; UETZ e HOSEK, 2018). Atualmente existem no mundo cerca de 3.709 espécies de serpentes catalogadas (UETZ e HOSEK, 2018). O Brasil conta atualmente com 405 espécies; considerando as subespécies, este número sobe para 442 serpentes.

Anualmente, no mundo, há uma ocorrência de mais de 2,5 milhões acidentes ofídicos, dentre os quais são consequência de uma alta taxa de mortalidade e morbidade; as vítimas são, em sua grande maioria, trabalhadores e trabalhadoras rurais, incluindo crianças, de países em desenvolvimento de regiões tropicais e subtropicais do mundo (BRASIL, 2018).

No ano de 2017, no Brasil, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram notificados 28.601 acidentes ofídicos, dos quais 105 evoluíram a óbito (BRASIL, 2018a). No estado da Paraíba, pode-se observar um predomínio maior de acidentes botrópicos, sendo estes 6 vezes maiores que acidentes crotálicos e 16 vezes maior que acidentes elapídicos, entre os anos de 2007 a 2015, variando sua incidência de acordo com a região do Estado (BRASIL, 2018; BERNARDE, 2014).

No ano de 2010, os acidentes ofídicos foram incluídos na Lista de Notificação de Compulsória (LNC) do Brasil, publicada na Portaria Nº 2.472 de 31 de agosto de 2010 (ratificada na Portaria Nº 104, de 25 de janeiro de 2011). Essa importância se dá pelo alto número de notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, sendo acidentes por animais peçonhentos um dos agravos mais notificados (BRASIL, 2019). Em Junho de 2017, os acidentes ofídicos voltaram a ser reconhecidos pela OMS como doença tropical negligenciada. Embora essas doenças distingam-se a depender da região, o que elas possuem em comum é o fato de acometerem as populações mais pobres e de difícil acesso (WARRELL, 2010; BRASIL, 2018).

Só em 2018, mais de 82 mil doses de soros antiofídicos já foram distribuídos para os 26 estados e para o Distrito Federal. Em caso de acidente, o Ministério da Saúde recomenda que seja acionado o serviço médico mais próximo (BRASIL, 2018). Embora seja uma emergência médica frequente, nas regiões rurais de diversos países tropicais, a incidência de envenenamentos é subestimada, porque a maior parte das vítimas é tratada por métodos tradicionais e, com isto, os casos não são notificados (WARRELL, 2012)

Acidentes por animais peçonhentos são recorrentes no Brasil, dentre serpentes, aranhas, escorpiões, lagartas, abelhas e outros animais. Com isto, faz-se necessário a utilização racional de antivenenos para garantir a eficácia da neutralização da peçonha do animal causador do acidente (BRASIL, 2017).

A produção de soro no Brasil é de responsabilidade de quatro laboratórios, os quais estão em processo de adequação às boas Práticas de Fabricação (BPF) da ANVISA (RDC 17/2010), são eles o Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Instituto Butantan (IB) e o Instituto Vital Brazil (IVB).

É fundamental a distribuição e disponibilização adequada desses antivenenos em quantidades suficientes e em locais oportunos, tendo em vista diminuir o tempo decorrente entre o acidente e o atendimento médico adequado (BRAZIL, 2017). Protocolos clínicos de utilização dos soros antivenenos podem ser encontrados no Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (2001) disponibilizados no Site do Ministério da Saúde, bem como para a utilização dos soros antielapídico (SAEla), antiaracnídico (SAA) e antiloxoscélico (SALox) que foram revisados e atualizados (**Anexo I**)

Além disto, é importante que a identificação do animal peçonhento seja feita com acurácia para que não haja nenhuma reação adversa pela utilização errada do antiveneno. Os quadros clínicos os quais acometem pessoas por envenenamento ofídico já são bastante consolidados, no entanto, estudos como os desta pesquisa, o de Isbister et al. (2013) na Austrália, por exemplo, visam melhorar o diagnóstico a partir da implementação de ferramentas capazes de identificar com precisão e rapidez qual o animal causador do acidente evitando a evolução do quadro clínico no paciente acometido pela peçonha do animal. Assim como o estudo de Mohseni et al. (2016), embora não seja especificamente com veneno de serpente, a metodologia pode ser adaptada para estudos com metaloproteinases de veneno de serpente (svMP).

### **1.3. Composição da peçonha de serpentes**

As serpentes peçonhetas fazem parte de um grupo bastante rico em espécimes pertencentes aos répteis, os Squamatas, estes estão amplamente distribuídos tanto em ecossistemas terrestres como também em ecossistemas aquáticos (GREENE, 1997; POUGH et al., 2008). Dentre as serpentes consideradas de interesse médico pela Organização Mundial de Saúde, diversos espécimes estão distribuídos no Brasil; os venenos das serpentes de interesse médico utilizados neste estudo pertencem a uma classificação taxonômica, descrita na **Figura 16**.

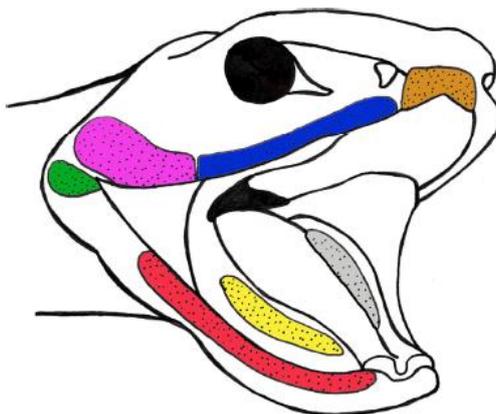
A taxonomia de serpentes venenosas é complicada devido sua natureza complexa, na qual, muitas das quais são espécies importantes na medicina (WARREL, 2012). Baseadas em novas descobertas, as classificações mudam frequentemente. Embora a classificação taxonômica desses grupos seja feita, é um trabalho árduo devido a constante identificação de novas espécies e a variação na composição do veneno entre espécies e subespécies (OKUDA et al., 2001).

Ainda que variações morfológicas possam ser observadas no sistema de injeção do veneno dessas serpentes, e, ainda, levando-se em consideração a estrutura e função das glândulas de veneno (**Figura 2, Tabela 1**), evidências moleculares e evolucionistas sugerem que essas estruturas são homólogas e que o veneno tenha uma origem única em seu ancestral comum e tenha surgido há pelo menos 60 milhões de anos (FRY et al., 2008; VONK et al., 2008; VIDAL et al., 2009; KERKKAMP et al., 2015).

Ao longo de milhões de anos durante o processo evolutivo, essas toxinas ancestrais de veneno se diversificaram subseqüentemente através de eventos de duplicação de genes, dando origem, basicamente, a isoformas de toxinas relacionadas que são codificadas pela mesma família de genes de múltiplos locus, mas, que, frequentemente têm atividades biológicas distintas e/ou complementares (COUSIN et al., 1998; FRY et al., 2008; LYNCH, 2007; CASEWELL et al., 2011; VONK et al., 2013).

A rápida taxa na qual as toxinas do veneno de serpentes evoluíram, seus eventos de duplicação e perda de linhagens específicas de genes, resultam em diferentes espécies de serpentes tendo diferentes toxinas de veneno. Conseqüentemente, a variação na composição do veneno é observada em todos os níveis taxonômicos de serpentes, entre famílias, gêneros, espécies e até mesmo na ontogênese de um mesmo organismo (CHIPPAUX et al., 1991; DURBAN et al., 2013; CASEWELL et al., 2014).

**Figura 2.** Ilustração simplificada das glândulas de veneno em serpentes. As glândulas presentes no maxilar superior incluem as pré-maxilares (marrom), supralabial (azul), de veneno/dental (rosa) e rictal (verde). As glândulas presentes na mandíbula incluem a infralabial (vermelho), sublingual (amarelo) e supralingual (cinza).



Fonte: (JACKSON et al., 2016)

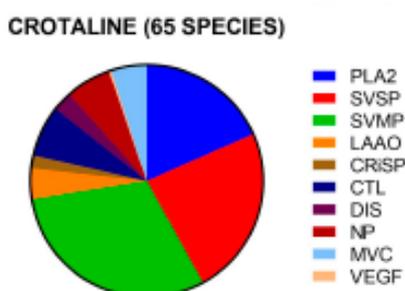
**Tabela 1.** Glândulas de veneno de serpentes e suas funções.

<b>Glândula</b>	<b>Função</b>
<b>Pré-maxilar</b>	Extração de sal ( <i>Cerberus</i> )
<b>Supralabial</b>	Lubrificação
<b>Veneno/dental</b>	Produção de Veneno; anticrobiana
<b>Rictal</b>	Produção de veneno; Antimicrobiana; Lubrificação.
<b>Infralabial</b>	Lubrificação; Produção de veneno em Dipsadidae; controle de muco em Dipsadidae.
<b>Sublingual</b>	Lubrificação; extração de sal ( <i>Elapidae</i> marinha; <i>Achrocordus</i> )
<b>Supralingual</b>	Desconhecida

Fonte: Adaptado de Jackson et al. (2016)

Apesar dessa origem evolucionária comum, encontra-se uma variação considerável nos constituintes tóxicos presentes em diferentes espécies de serpentes venenosas (CHIPPAUX et al., 1991; FRY et al., 2008). Tais venenos são misturas complexas formadas por proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídios e componentes inorgânicos. A composição proteica inclui oxidases de L-aminoácidos (LAAOs), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA A<sub>2</sub>), metaloproteinases, serinoproteases, lectinas e hialuronidases, entre outras (TASOULIS E IBISTER, 2017). Cerca de 90 a 95% do peso seco dos venenos ofídicos é formado por proteínas e peptídeos, estas são as principais responsáveis pela maior parte dos efeitos biológicos (BON, 1997; MOURA DA SILVA et al., 2011; VETTER et al., 2011). A composição do veneno de serpentes da subfamília *Crotalinae* pode ser observada na **figura 3**.

**Figura 3.** Proporção relativa das diferentes família de proteínas de veneno de 65 serpentes estudadas, da subfamília *Crotalinae*. **PLA<sub>2</sub>** – Phospholipase A<sub>2</sub>; **SVSP** – Serino proteasse de veneno de serpente; **SVMP** – Metaloprotease de veneno de serpente; **LAAO** – L-Aminoácido Oxidase; **3Ftx** – Toxina *three-fingers*; **KUN** – peptídeo de Kunitz; **CRiSP** – Proteína secretória rica em cisteína; **CTL** – Lectina tipo C; **DIS** – Desintegrina; **NP** – Peptídeo natriurético; **NGF** – Fator de Crescimento Neural; **CYS** – Cistatina; **VEGF** – Fator de crescimento vascular endotelial; **MVC** – Componentes menores venômicos.



Fonte: (TASOULIS E ISBISTER, 2017)

Tasoulis e Isbister (2017), encontraram as seguintes concentrações para venenos das serpentes *B. erythromellas* e *C. d. terrificus* descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Porcentagem (%) das famílias de proteínas encontradas no veneno das serpentes *B. ery* e *C. d. terrificus*. VT – Veneno Total.

<b>Espécie</b>	<b>PLA<sub>2</sub></b>	<b>SVSP</b>	<b>SVMP</b>	<b>LAAO</b>	<b>CRiSP</b>	<b>CTL</b>	<b>DIS</b>	<b>NP</b>	<b>VT</b>
<b><i>B. erythromellas</i></b>	10,1	4	32,5			8,4	3,4	9,3	
	–	–	–	–	0,4	–	–	–	68+
<b><i>C. d. terrificus</i></b>	15,1	9,7	59,9			21,6	8,9	14,5	
	48,5	25,3	3,9	–	–	–	–	–	77,7

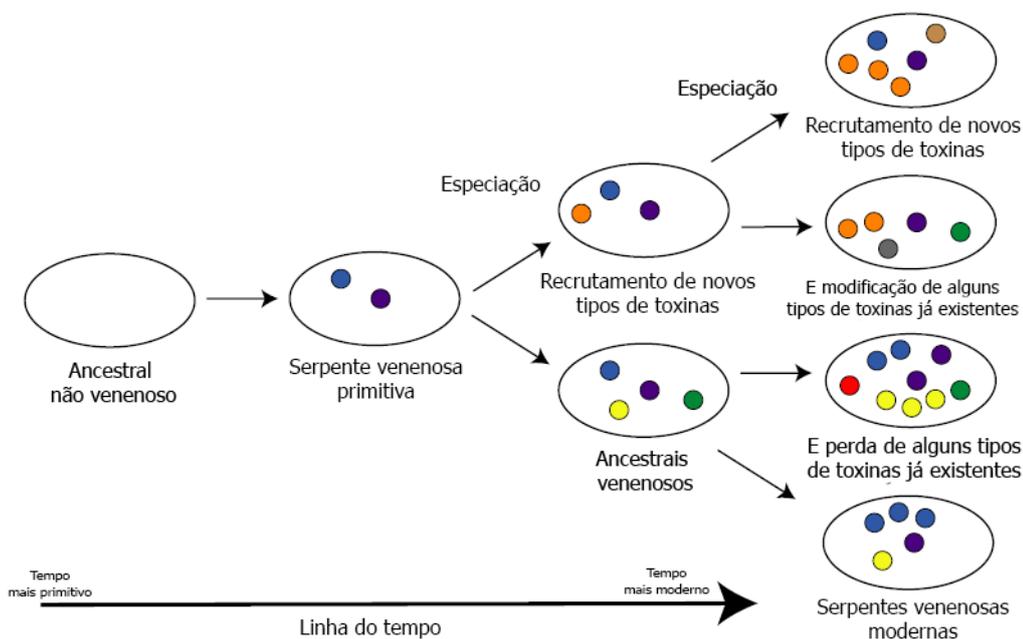
Fonte: Adaptado de Tasoulis e Isbister (2017).

A dieta das serpentes venenosas tem um papel fundamental na radiação adaptativa da diversidade de toxinas que existem hoje; o nicho ecológico, alimentação, clima, são fatores determinantes na caracterização da composição do veneno de serpentes (JORGE et al., 2015; TASOULIS E ISBISTER, 2017).

Como as glândulas de veneno são homólogas, espera-se que algumas famílias de toxinas estejam onipresentes entre as três famílias de serpentes solenóglifas. Esse ancestral proteômico tem se diversificado entre diferentes famílias de serpentes devido a influência de mutações genéticas, *drifts* genéticos, além da seleção natural que molda diferencialmente o veneno de cada espécie para conferir

toxicidade específica a presas distintas (TASOULIS E ISBISTER, 2017). Um esquema de como a composição do veneno de serpente tem variado ao longo do processo evolutivo pode ser observado na **Figura 4**.

**Figura 4.** Um esquema simplificado demonstrando como os venenos de serpentes evoluíram para misturas de toxinas variáveis em escalas de tempo evolucionárias.



Fonte: Adaptado de SLAGBOOM et al. (2017).

As glândulas de veneno em serpentes diferentes (ancestrais hipotéticos ou espécies modernas) e círculos coloridos representam diferentes tipos de toxinas. Os ancestrais não-venenosos não tinham toxinas em suas glândulas de veneno (ou as expressavam em níveis muito baixos), mas ancestrais cobras venenosas recriaram um número de tipos de toxinas em seu veneno. Ao longo do tempo evolutivo, conforme as linhagens divergiram, tipos diferentes de toxinas foram metabolizadas no corpo de certas cobras, e esses tipos de toxinas diversificaram diferencialmente através do processo de duplicação e perda gênica, resultando na variação na composição do veneno observada entre diferentes grupos de serpentes (SLAGBOOM et al., 2017).

Esses componentes variáveis do veneno de serpentes caracterizam os efeitos biológicos de cada veneno. Estes podem ser amplamente caracterizados como hematotóxicos, neurotóxicos e citotóxicos (WHO, 2010). Diversas espécies possuem venenos multifuncionais que contém toxinas capazes de induzir diferentes atividades

biológicas, no entanto já existe um quadro clínico bem padronizado para o envenenamento por serpentes, contudo, também existe diversas exceções. Por exemplo, as famílias de maior importância médica são as Viperidae, que possui ação hemorrágica predominantemente e Elapidae que possui ação neurotóxica. Embora esta afirmação seja verdadeira, existem diversas espécies de víboras que causam danos neurotóxicos nas suas presas (SILVA et al., 2017) e elapídeos causando patologias no tecido sanguíneo (BERLING et al., 2015). Conseqüentemente, a variação intra- e interespecífica que ocorre entre as serpentes é um fator significativo que impacta na sua patologia e no tipo de tratamento que deve ser usado (SLAGBOOM et al., 2017).

#### **1.4. Fisiopatologia e complicações do envenenamento**

Em casos de envenenamento a multiplicidade de toxinas presentes nos venenos resultam em síndromes clínicas complexas e uma variedade de respostas terapêuticas ao tratamento com antiveneno devido às diferenças em antigenicidade, ou seja, a ação do antiveneno é geralmente espécie específica (TAN E TAN, 2015).

Alguns gêneros de serpentes são de interesse médico como, por exemplo, Bothrops (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca), Crotalus (cascavel), Lachesis (surucucu, picode-jaca) e Micrurus (coral verdadeira), no Brasil. Os gêneros Bothrops e Micrurus são encontrados em todo o país, enquanto que Crotalus é mais frequentemente encontrado em campos, áreas abertas e secas. O gênero Lachesis habita somente as áreas mais preservadas das florestas da Amazônia e da Mata Atlântica (RAMALHO, 2014; BRASIL, 2017).

As ações dos venenos são predominantes de acordo com o gênero das serpentes, como demonstrado na **Tabela 3**.

A apresentação clínica de um paciente representa uma síndrome complexa resultante das respostas corporais às ações farmacológicas de diferentes componentes do veneno de serpente. Os efeitos tóxicos do veneno foram frequentemente classificados como neurotóxicos, hemotóxicos, cardiotoxicos, nefrotóxicos, miotóxicos, entre outros; com base no efeito clínico predominante do veneno em particular. As descrições baseadas em órgãos ou sistemas, como tal, recebem críticas, por vezes, de que a classificação simplifica excessivamente a complexidade dos efeitos do veneno e não representa a interação de várias toxinas em tecidos de diferentes órgãos. No entanto, as descrições sugerem a

síndrome clínica proeminente de picada de cobra em particular e, portanto, têm um valor prático no manejo, por exemplo, preparação de equipamento de intubação, hemoderivados para transfusão e instalação de diálise em **antecipação ao provável resultado patológico da picada de espécies particulares**. Por outro lado, caracterizações laboratoriais do veneno não podem nunca serem simplificadas e exigem múltiplas abordagens envolvendo técnicas *in vitro* e *in vivo* (TAN E TAN, 2015).

**Tabela 3.** Ações predominantes dos venenos, de acordo com os gêneros das serpentes.

<b>Gêneros</b>	<b><i>Bothrops</i> (<i>Jararaca</i>)</b>	<b><i>Lachesis</i> (<i>Surucucu</i>)</b>	<b><i>Crotalus</i> (<i>Cascavel</i>)</b>	<b><i>Micrurus</i> (<i>Coral</i>)</b>
<b>Ações dos venenos</b>	Proteolítica Coagulante Hemorrágica	Proteolítica Coagulante Neurotóxica	Neurotóxica Miotóxica Coagulante	Neurotóxica
<b>Após 1 hora</b>	Dor e alterações locais, evidentes e progressivas.		Dor e alterações locais, ausentes ou discretas.	

Fonte: Adaptado de Azevedo-Marques et al. (2003).

#### 1.4.1. Acidente Botrópico

Acidentes botrópicos são predominantes na América Central e América do Sul (GSI, 2019). São responsáveis por 85% dos casos de ofidismo notificados no Brasil, havendo variações de acordo com a região e a distribuição geográfica das serpentes (AMORIM et al., 2018).

Os venenos botrópicos são constituídos quimicamente por macromoléculas de função proteica (i) com atividades enzimática como as fosfolipases (PLA2), metaloproteínas, serinoproteases, L-aminoácido oxidase (LAO) e (ii) sem atividade enzimática como cardiotoxinas, lectinas tipo C, desintegrinas. Ainda, uma porção dessa complexa mistura é formada por componentes que não possuem função proteica como carboidratos, serotonina, histamina, íons orgânicos (DE TONI et al., 2015).

O envenenamento botrópico induz lesões locais proeminentes causadas por ações combinadas de diversas proteases, fatores hemorrágicos, PLA2 e pela liberação de mediadores endógenos (FARSKY et al. 1997; CARNEIRO et al. 2002; LAING et al. 2003; TEIXEIRA et al. 2003).

As fosfolipases isoladas de veneno de serpentes (svPLA2) atuam sobre substratos lipídicos, estando relacionadas a produção de derivados do ácido araquidônico (FERREIRA et al., 2013). Há uma alta taxa de toxicidade pelas

svPLA<sub>2</sub>, em uma única espécie de serpente podem ocorrer várias isoenzimas, de efeitos farmacológicos distintos como ação hemolítica, neurotóxica, agregação de plaquetas, bactericida, miotóxica, pró-inflamatória, relacionadas a mionecrose local levando a sequelas como perda tecidual permanente ou amputação (GHAZARYAN et al., 2014). As serinoproteases atuam nos componentes da cascata de coagulação sanguínea e do sistema fibrino(geno)lítico (ZAQUEO et al., 2014).

Metaloproteinases isoladas de serpentes (svMPs) são endopeptidases, dependentes de cálcio ou zinco, sendo a metzincina a família das quais fazem parte as svMPs de veneno de serpente (DE PAULA et al., 2014). Atuam na proteólise de componentes da matriz extra celular, proteínas plasmáticas e das proteínas da superfície celular; promovendo diversas patologias como hemorragia, coagulopatia, mionecrose, edema, equimose e gerando resposta inflamatória (BERNADONI et al., 2014).

As LAAOs são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de um substrato L-aminoácido a um  $\alpha$ -cetoácido, produzindo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>. Em venenos botrópicos podem chegar a 30% (LEE et al., 2014). Seu mecanismo de ação é desconhecido, no entanto, essa enzima libera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo uma importante participação na toxicidade, pois seus efeitos biológicos são inibidos por catalase (STABELI et al., 2007; NAUMAN et al., 2011; LEE et al., 2014).

#### 1.4.2. Acidente Crotálico

O quadro clínico nesses acidentes apresenta pouca ou nenhuma manifestação local e a dor é quase inexistente ou de pequena intensidade, podendo aparecer um edema sutil ou eritema no local da picada. Contudo, outros sintomas como sudorese, náusea, turvação visual, oftalmoplegia, manifestações neuromusculares são característicos de manifestações sistêmicas (BRASIL, 2017).

As principais atividades de importância clínica conhecidas são: neurotóxica, miotóxica e coagulante (**tabela 3**). O veneno crotálico possui svPLA<sub>2</sub> que formam um complexo da crotóxina, uma neurotoxina responsável pelo maior sintoma clínico de envenenamentos crotálicos na América do Sul (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010). Além da svPLA<sub>2</sub>, a espécie *Crotalus (Rattlesnakes)*, contém outras duas famílias de enzimas hematotóxicas: hialuronidases (svH), metaloproteases (scMP) (BRAUD et al., 2000; XIONG E HUANG, 2018). Embora svH sejam reportadas na literatura, há

pouca informação sobre as mesmas (CEVALLOS et al., 1992; BORDON et al., 2012).

A ação miotóxica causa lesões em fibras musculares esqueléticas, principalmente as do tipo I (rabdomiólise) com liberação de enzimas e mioglobinas para o soro e posteriormente secretadas pela urina. A ação coagulante é causada por enzimas do tipo trombina que convertem fibrinogênio em fibrina, podendo levar a incoagulabilidade sanguínea completa ou parcial (BRASIL, 2017; FERNANDES, 2008).

A fim de minimizar os efeitos clínicos decorrentes dos venenos em pacientes acometidos por acidentes ofídicos, antivenenos são desenvolvidos a partir de anticorpos para neutralizar a toxina desses animais.

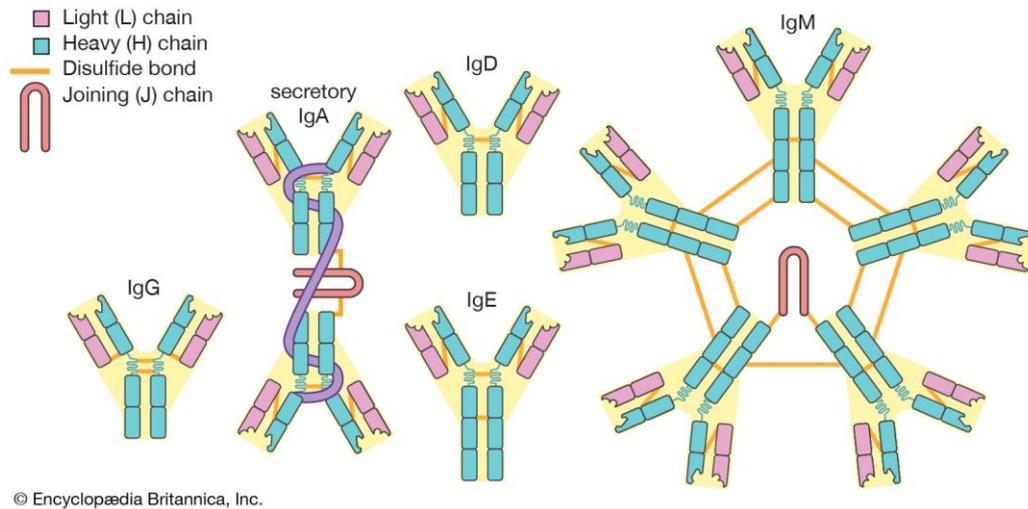
### **1.5. Estrutura dos anticorpos (imunoglobulinas)**

Casos de envenenamentos severos e letais, considerados 6 horas após a mordida, estão, geralmente, associados a atraso no tratamento através da soroterapia (BRASIL, 2017). Mesmo que a peçonha circulante sistêmica seja neutralizada pelo antiveneno, este não se aplica às lesões locais causadas pelo acidente; por isto é importante que haja um prognóstico eficiente, principalmente entre as populações pobres (SPILLER et al., 2010).

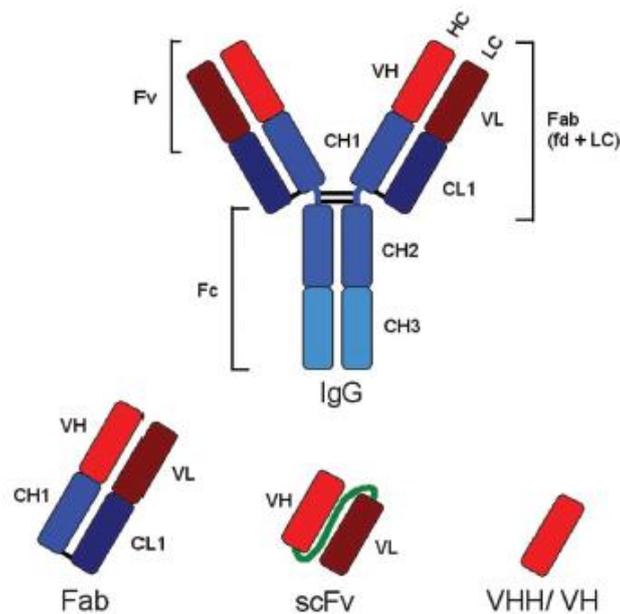
Para que seja eficiente e para que haja o menor risco de reações adversas, a indicação do soro heterólogo, o qual contém anticorpos (imunoglobulinas) (**Figura 5**) capazes de neutralizar o veneno, para tratar acidentes ofídicos deve obedecer princípios básicos. Deve ser considerada as seguintes premissas: a especificidade em relação ao animal agressor; a presteza (rapidez) na administração; a dose suficiente, calculada pela sua capacidade neutralizadora em *mg*; a dosagem única, ou seja, não parcelar o total a ser administrado; doses iguais para adultos e crianças (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003; BRASIL, 2017).

Após estudos com soro separado de sangue de cavalos imunizados, os anticorpos demonstram ser moléculas ativas importantes clinicamente para a ação terapêutica do antiveneno; conseqüentemente, imunoglobulinas ou fragmentos destas (F(ab')<sub>2</sub>) purificadas do soro começaram a serem utilizadas ao invés do soro bruto (POPE, 1939a; 1939b) (**Figura 6**).

**Figura 5.** As cinco principais classes de anticorpos (imunoglobulinas): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.



**Figura 6.** Tipos de fragmentos de anticorpos. Ilustração de um anticorpo IgG completo na parte de cima da figura e os vários tipos de fragmentos que podem ser obtidos a partir dele na parte de baixo da figura. CH – Cadeia pesada constante; CL – Cadeia Leve constante; IgG – Imunoglobulina; Fab – Fragmento de ligação do Antígeno; scFv – Fragmento de cadeia variável; VH – Cadeia pesada variável; VL – Cadeia Leve variável.



Fonte: (NELSON, 2010).

Os métodos de purificação foram introduzidos para reduzir a frequência de reações do soro antiofídico removendo o fragmento Fc da IgG, prevenindo assim a ativação do complemento e talvez reduzindo a intensidade da formação do complexo imunológico responsável pelas reações tardias do soro antiofídico (doença do soro). Por 60-70 anos, os fragmentos de imunoglobulina (F(ab')<sub>2</sub>) têm sido

amplamente utilizados. No entanto, a agregação de proteínas antiveneno, e não a ativação do complemento mediada por Fc, foi cada vez mais identificada como uma das principais causas das reações do antiveneno. Assim, uma questão crítica na segurança do antiveneno provavelmente reside nas características físico-químicas dos antivenenos e não exclusivamente no tipo de moléculas neutralizantes que constituem a substância ativa. Também é importante assegurar que as metodologias atuais para produzir antivenenos forneçam uma margem de segurança suficiente com relação ao risco de transmissão de zoonoses (WHO, 2010).

A rápida eliminação de alguns antivenenos terapêuticos (por exemplo, quando são utilizados fragmentos Fab) levou à recorrência de envenenamento em pacientes. No entanto, a escolha de preparar IgG ou fragmentos específicos parece depender do tamanho e da toxicocinética da(s) principal(es) toxina(s) dos venenos. Os anticorpos bivalentes de grande massa molecular relativa (Mr) (fragmentos IgG e  $(F(ab')_2)$ ) podem ser eficazes para a neutralização completa e prolongada de toxinas intravasculares (por exemplo, enzimas pró-coagulantes) que apresentam uma meia-vida longa em pacientes envenenados. Os fragmentos de IgG monovalente, como Fab, podem ser mais apropriados contra neurotoxinas de baixa massa molecular, que são rapidamente distribuídas aos seus alvos teciduais e são rapidamente eliminadas do corpo do paciente (GUTIÉRREZ et al., 2003).

## **1.6. Aplicações de biossensores na clínica**

Atualmente o uso de metais nobres tem mostrado um grande avanço em diversas pesquisas que utilizam sistemas elétrico-óptico e materiais semicondutores (NIELSEN et al., 2013), materiais catalíticos (SUN e XU, 2012), diferentes formas de administração de medicamentos e agentes biológicos de imagem (KANG et al., 2013) e biossensores (SAGLE et al., 2011).

Os biossensores evoluíram consideravelmente nos últimos 50 anos de pesquisa na área; trazendo grandes contribuições não só no âmbito acadêmico como também para a indústria. Suas diversas aplicações na ciência são capazes de melhorar a qualidade de vida da população (BHALLA et al., 2016). Alguns exemplos são: detecção de biomarcadores para câncer (JOLLY et al., 2015; FORMISANO et al., 2015), qualidade, valor nutricional e segurança em alimentos (SHARMA et al., 2015; VAN et al., 2010), poluição ambiental (VAN et al., 2010, GAVRILESCU et al.,

2015), descobrimento de novas drogas (BHALLA et al., 2015), detecção de agentes biológicos (PADDLE, 1996), saneamento básico, epidemiologia (YANG et al., 2015).

Em relação aos casos de acidentes ofídicos, a maioria dos pacientes picados por serpentes não são acompanhados após serem liberados do hospital, muito mal sabem dos cuidados que devem ser tomados em relação ao acidente ofídico. Embora algumas patologias do envenenamento por serpente desapareçam dentro de poucos dias, alguns outros efeitos patológicos podem se estender por meses ou anos (HERATH, 2012; JAYAWARDANA, 2018). Portanto, devido à falta de acompanhamento clínico desses pacientes, efeitos à longo prazo são pouco conhecidos.

O tratamento adequado depende da habilidade de reverter os quadros clínicos sistêmicos como, por exemplo, coagulopatia, hemorragia, choque hipotensivo, entre outros (CALVETE et al., 2009; NÚÑES et al., 2009). Estudos utilizando modelos animais têm demonstrado que manifestações locais não são neutralizadas efetivamente através da terapia com soro antiofídico (AVILA-AGÜERO et al., 2001; LOMONTE et al., 2009). Estudos recentes, como o de Nunes et al (2019), demonstram que frações do veneno da Jararaca-da-seca (*Bothrops erythromelas*) não são neutralizadas pelo soro antiofídico anti-botrópico (SAB) disponível, haja vista que o veneno desta *Bothrops* não está incluído para a fabricação do SAB.

A fim de tornar esses efeitos menos nocivos aos pacientes acometidos a este tipo de agravo, busca-se, a partir do desenvolvimento de novas tecnologias como, por exemplo, o desenvolvimento de aparelhos diagnósticos de detecção rápida, biossensores, diminuir o erro sobre a administração de soro antiofídico. Novas soluções tecnológicas para a prevenção de doenças e o rápido diagnóstico são exploradas com alta prioridade, devido a uma demanda dos sistemas de saúde em diversos países, a fim de reduzir substancialmente o tempo e os custos com pacientes. É válido ressaltar que também há a necessidade de detecção rápida e efetiva de toxinas em amostras clínicas, alimentos e ambientais.

Testes de diagnósticos para identificação de espécies responsáveis pelo envenenamento são raros ou não existem, e o tratamento depende principalmente da administração de antivenenos que não cobrem todas as serpentes venenosas de regiões específicas (DHANAMMA JAGLI, 2014). Dessa maneira, fica claro que, o

desenvolvimento de testes rápidos de identificação poderá reduzir a taxa de mortalidade e morbidade decorrente dos envenenamentos ofídicos.

### 1.6.1. Biossensores

Nanopartículas de metais nobres, geralmente compostas por ouro, prata, cobre e alumínio, têm-se provado bastante funcionais desde o século 4 A.D., com a invenção do copo de Lycurgus (**Figura 7**); a principal característica que o difere de outras ligas metálicas é a sua composição de Au e Ag, e também sua habilidade de converter a energia de fótons existentes (luz) em uma oscilação de elétrons coletiva (JAIN et al., 2006).

**Figura 7.** O copo de Lycurgus.



**Fonte:** British Museum, disponível em *ancientpages.com*. Acesso Junho de 2019.

O copo de Lycurgus é um artefato Romano antigo, feito com partículas de ouro e prata, a partir de um vidro dicróico que muda de cor quando recebe luz. Quando a luz atravessa o corpo do copo ela se transforma de uma cor verde opaca para um vermelho translúcido. É demonstrado, assim, que o conhecimento sobre nanopartículas metálicas vem sendo usada há muito tempo (BRITISH MUSEUM, 2019)<sup>1</sup>.

Hoje, o uso de metais nobres tem mostrado um grande avanço em diversas pesquisas relacionadas a elétrico-óptico e materiais semicondutores (NIELSEN et al., 2013), materiais catalíticos (SUN E XU, 2012), sistema de entrega de drogas e

<sup>1</sup> Disponível em *ancientpages.com*. Acesso em Junho de 2019.

agentes biológicos de imagem (KANG et al, 2013) e biossensores (SAGLE et al., 2011).

Historicamente, o primeiro biossensor, propriamente dito, foi desenvolvido por Leland C. Clark Jr em 1956 para a detecção de oxigênio, ficando conhecido por “O eletrodo de Clark” (CLARK E LYONS, 1962; HEINEMAN E JENSEN, 2006). Contudo, para que o desenvolvimento daquela ferramenta fosse possível outros cientistas contribuíram cientificamente como demonstrado na **tabela 4**.

Após descobertas como essas, demonstradas na **tabela 4**, outros biossensores foram aprimorados e desenvolvidos como, por exemplo, sensores eletroquímicos (LI et al., 2011; XU et al., 2017; TAO et al., 2019; GHASEMI et al., 2019), ópticos (WANG et al., 2019; THAMM et al., 2018; PAN et al., 2019; PAN et al., 2018), piezoelétricos (YAN et al., 2019; QING et al., 2019).

**Tabela 4.** Evolução científica para a o desenvolvimento de um biossensor efetivo.

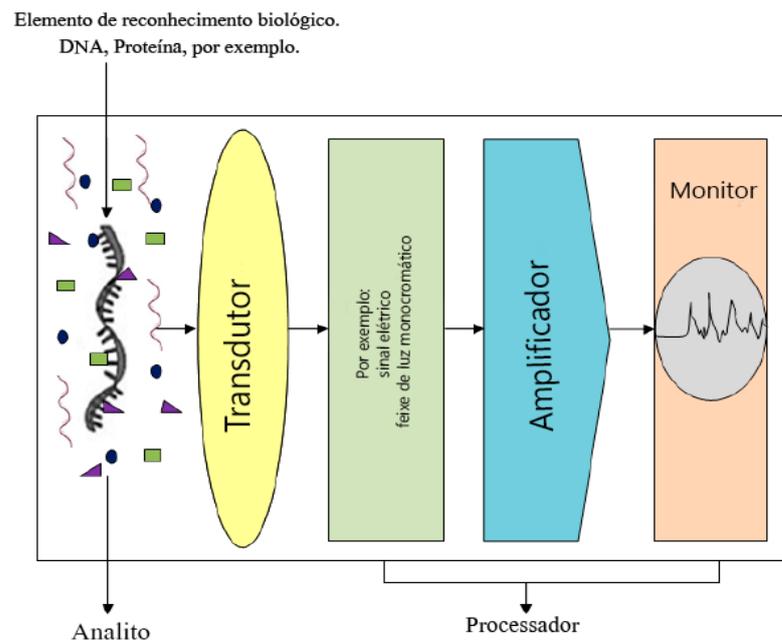
<b>Autor</b>	<b>Contribuição</b>	<b>Ano</b>	<b>Referência</b>
<b>M. Cremer</b>	Demonstrou que a concentração de um ácido em um líquido é proporcional ao potencial elétrico que está entre localizado no lado oposto da membrana de vidro	<b>1906</b>	(CREMER, 1906)
<b>Søren P. L. Sørensen</b>	Introdução do conceito de pH	<b>1909</b>	(HUGHES, 1922)
<b>Griffin e Nelson</b>	Processo de imobilização enzimática através a adsorção da enzima invertase em carvão ativado, com a retenção de sua atividade catalítica.	<b>1916</b>	(GRIFFIN E NELSON, 1916; NELSON E GRIFFIN, 1916)
<b>W.S. Hughes</b>	Eletrodo para medição do pH	<b>1922</b>	(HUGHES, 1922)
<b>Leland C. Clark Jr</b>	Primeiro biossensor	<b>1956</b>	(HEINEMAN E JENSEN, 2006)
<b>Updick e Hicks</b>	Desenvolvimento de um biossensor no qual detecta corrente gerada pela oxidação do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), este um produto gerado quando a glicose oxidase cataliza a reação de glicose e oxigênio.	<b>1967</b>	(UPDICK E HICKS, 1967a; 1967b)
<b>Guilbault e Montalvo</b>	Biossensor potenciométrico para a detecção de ureia	<b>1969</b>	(GUILBAULT E MONTALVO, 1969)
<b>Yellow Spring Instruments</b>	Primeiro biossensor comercial	<b>1975</b>	(YOO E LEE, 2010)

Fonte: Adaptado de Bhalla et al., (2016).

Sensores são aparelhos que respondem a estímulos químicos ou físicos e produzem sinais detectáveis (LIGLER E TAITT, 2002). Para isto, um sensor contém

alguns componentes essenciais: um analito alvo, bioreceptor, transdutor, unidade processadora de sinal e um display (LIU et al., 2010; BHALLA et al., 2016). Podem ser de detecção direta em que a interação biológica é medida, onde há uso de um ligante não catalítico como receptores celulares e anticorpos, ou detecção indireta em que há o uso de anticorpos fluorescentes marcados ou elementos catalíticos, como enzimas (MEHRVAR E ABDI, 2004; PATHAK *et al.*, 2007a). Uma representação esquemática de um biossensor pode ser encontrada na **Figura 8**.

**Figura 8.** Representação esquemática de um biossensor básico contendo um receptor biológico, um transdutor e um processador de dados.



Fonte: (Modificado de ABU-SALAH, 2015).

No sistema de reconhecimento encontra-se a parte que faz contato com o analito de interesse e produz um sinal. Vários são os componentes biológicos que possuem potencial para serem usados em sistemas de biossensores como enzima, anticorpo, ácido nucleico, proteínas entre outros (PATHAK *et al.*, 2007b; LEE *et al.*, 2008). O transdutor age como uma interface medindo a mudança física e química que ocorre na reação com o bioreceptor, transformando essa energia em um produto mensurável, como massa, carga, luz ou calor (PATHAK *et al.*, 2007b; LEE *et al.*, 2008). Por último, a unidade processadora filtra e amplifica o sinal traduzido transferindo para um monitor ou armazenando-o em alguma memória (RAITERI *et al.*, 2002; PATHAK *et al.*, 2007b)

Dependendo da natureza do reconhecimento do analito os biossensores podem ser de dois tipos: i) de bioafinidade, dependentes da ligação seletiva do analito-alvo ao ligante preso a superfície e ii) bioanalíticos, onde uma enzima imobilizada é utilizada para o reconhecimento do substrato alvo (WANG, 2000).

Biossensores têm aperfeiçoado a qualidade de análise de ferramentas convencionais, têm eliminado procedimentos demorados e o uso de reagentes muito caros, além de serem ferramentas analíticas de baixo custo. Como ferramentas portáteis, de baixo custo, fáceis de operar, os biossensores têm uma vantagem quando comparados a certos tipos de instrumentos analíticos utilizados regularmente (YANG et al., 2008; NAYAK et al., 2009). O desempenho de um biossensor é, geralmente, determinado por técnicas de imobilização e possui características básicas que devem ser observadas como seletividade, reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade e linearidade, esta última, é um atributo do biossensor que mostra com acurácia a resposta medida. Otimização dessas propriedades refletem diretamente no desempenho do biossensor (BHALLA et al., 2016).

#### 1.6.2. Biossensores baseados no Fenômeno de Ressonância de Plásmons de Superfície - *Surface Plasmon Resonance* (SPR)

Diversos biossensores estão sendo desenvolvidos e aplicados em várias áreas como em análises biomédicas e ambientais. Sensores de Microbalanço de Cristais de Quartz (QCMB) (SKLÁDAL, 2016) e sensores de Superfície de Plasmóns de Ressonância (SPR) (CAUCHETEUR et al., 2015), por exemplo. Sendo este último uma alternativa interessante na elaboração de equipamentos analíticos portáteis para a detecção de substratos (SCHASFOORT; TUDOS, 2008).

A implementação do método de detecção desenvolvido a partir do sensor SPR é a de medição direta, sem a utilização de marcadores, com o objetivo de detectar ligações específicas de um antígeno com o anticorpo correspondente, através do aumento da espessura da massa da camada de detecção na placa pelo sensor SPR, isto se deve a interação antígeno-anticorpo. Quanto mais sensível e específico for a interação entre o antígeno e o anticorpo mais determinante é a sensibilidade e a seletividade do imunossensor, assim como a possibilidade de regeneração (LOUREIRO, 2014).

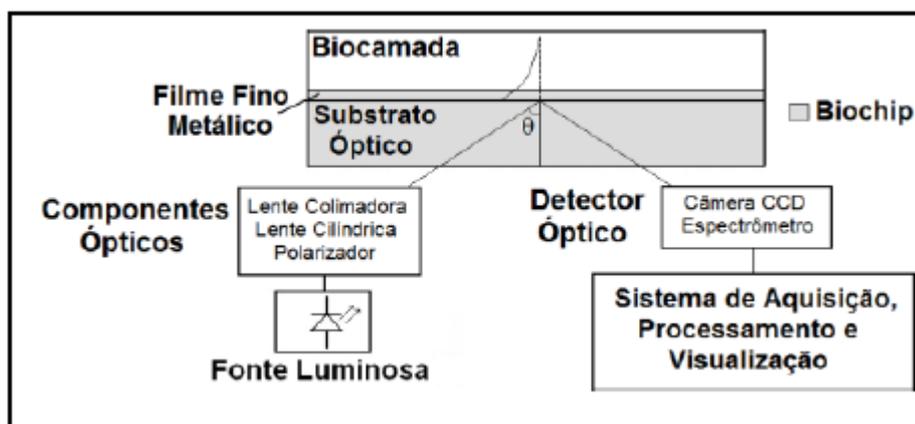
Dentre os diversos sensores, o sensor SPR é bastante reconhecido devido sua alta sensibilidade, ausência de marcadores que possam interferir na conformação da macromolécula utilizada, e, também, a detecção que pode ser feita em tempo real (FARKA et al., 2017; PAN et al., 2019). Neste tipo de biossensor, as variações no índice de refração (RIU) da luz, que incide no sistema de leitura, são utilizadas para detectar substâncias biológicas de interesse. A precisão típica de um sistema óptico é imensamente elevada ( $10^{-7}$  RIU) que, quando associada a seletividade da reação que ocorre entre antígeno-anticorpo, tem-se reconhecido como uma ótima alternativa para o reconhecimento de diversas substâncias biológicas patológicas, ou não, à saúde humana (MCDONNELL, 2001).

O desenvolvimento de uma aplicação prática e uso comercial do fenômeno de ressonância de ondas de plásmom de superfície, deu-se na década de 70 com um trabalho de Kretschmann e Kroger (1975). Neste mesmo ano, estes mesmos autores, descobriam que as SPRs poderiam ser excitadas em cima de uma película de prata depositada sobre um substrato de vidro, por uma luz sendo refletida pela interface no sentido vidro/prata. Este tipo de estudo permitiu a confecção de elementos necessários para a excitação e detecção, a partir do sensoriamento.

De acordo com Barreto-Neto *et al.* (2016), um biossensor SPR (Figura 9) é caracterizado da seguinte forma:

possui uma fonte luminosa (monocromática ou policromática) gera feixes luminosos que são colimados, convergidos, etc., por componentes ópticos adequados. O sinal resultante atinge o biochip SPR, que consiste no substrato óptico e no filme fino metálico. Anexo a essa camada, há a camada de biorreconhecimento ou a biocamada, que corresponde ao material biológico que será imobilizado no filme fino de ouro e também a substância sob análise (analito) que será detectado (ligado ao elemento biológico imobilizado). Há ainda elementos de aquisição, processamento e visualização dos dados provindos do detector óptico (câmera CCD ou espectômetro, para o caso em que o ângulo de incidência  $\theta$  varia e o comprimento de onda é constante – AIM; ou para o caso em que o comprimento de onda varia e o ângulo  $\theta$  é mantido constante – WIM) (BARRETO-NETO *et al.*, 2016)

**Figura 9.** Esquema representando um sensor SPR.



Fonte: (BARRETO-NETO et al., 2016).

Os sensores SPR são sensíveis a mudanças de índice de refração em sua superfície, isto tem sido usado bastante na biomedicina, monitoramento do meio ambiente e diversas áreas industriais, visto que são ferramentas poderosas para especificar e caracterizar parâmetros estáticos de macromoléculas ou nanopartículas, também dinâmicos durante a interação entre macromoléculas, como por exemplo entre proteína/proteína, proteína/DNA, receptor/droga entre outros (NGUYEN *et al.*, 2015). As principais aplicações de sensores SPR estão na identificação de moléculas ou nanopartículas e também na análise física da interação biomolecular, como também na medição de algumas grandezas físicas como, por exemplo, umidade e temperatura (HOMOLA *et al.*, 1999; YAO *et al.*, 2015).

### 1.6.3. Princípios dos sensores ópticos SPR

Para os sensores SPR a realização da quantificação do analito de interesse é dado por medidas do índice de refração, ou seja, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes das moléculas ou a partir de um meio de transdução químico-óptico (BRECHT e GAUGLITZ, 1995). Este efeito de ressonância de plasmões de superfície é uma oscilação da carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é um metal e outro, um dielétrico (PISARCHICK et al., 1992; GREEN et al., 2000).

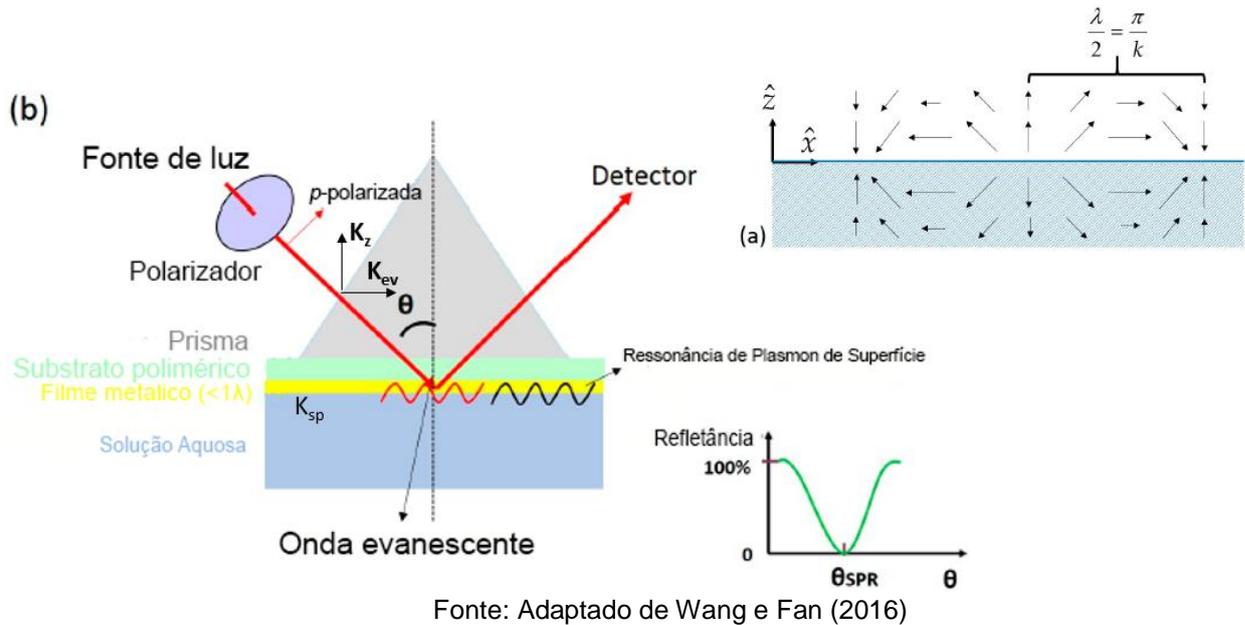
A escolha do metal é crucial, pois este deve exibir comportamento de elétrons livres. Os metais mais adequados são prata, cobre, ouro e alumínio, dentre os quais a prata e o ouro são os mais utilizados (RICH *et al.*, 2000; STEINER *et al.*, 1999).

Para a excitação da superfície de plasma foram desenvolvidos dois sistemas experimentais para acoplamento de prismas, um por Otto, em 1967, e outro por Kretschmann (KRETSCHMANN, 1975). Contudo, a configuração de refletância total atenuada desenvolvida por este último é mais utilizada nos instrumentos de SPR (HOMOLA *et al.*, 1999; GREEN *et al.*, 2000) devido a simplicidade de sua fabricação, baseada na prévia disposição de filme fino de metal sobre o prisma (SÁNCHEZ, 2013).

Segundo Carvalho (2003) a configuração de refletância Kretschmann, demonstrado na **Figura 10**, processa-se quando a luz polarizada atravessa o meio óptico denso e alcança uma interface entre este meio e um meio de densidade óptica menor e é refletida de volta para o meio mais denso. Mesmo que a luz incidente seja totalmente refletida internamente, um componente desta radiação penetra na interface do meio menos denso até a distância de um comprimento de onda,  $1\lambda$ . Em um ângulo de incidência em que o vetor de onda do plasma ( $K_{sp}$ ) é igual ao vetor de onda do campo evanescente ( $K_{ev}$ ), parte da radiação acopla com elétrons livres oscilantes (plasma) no filme metálico, ocorrendo, então, o efeito de ressonância de plasma de superfície. Conseqüentemente, ocorre uma perda da luz incidente para o filme metálico, que resulta na redução da intensidade da luz que é refletida, podendo ser detectada como um arranjo bidimensional de fotodiodos.

Dispositivos SPR geralmente utilizam uma fonte de luz monocromática  $p$ -polarizada e a interface entre os dois meios opticamente densos é coberta por um fio metálico fino de espessura menor que um comprimento de onda da luz (CARVALHO, 2003).

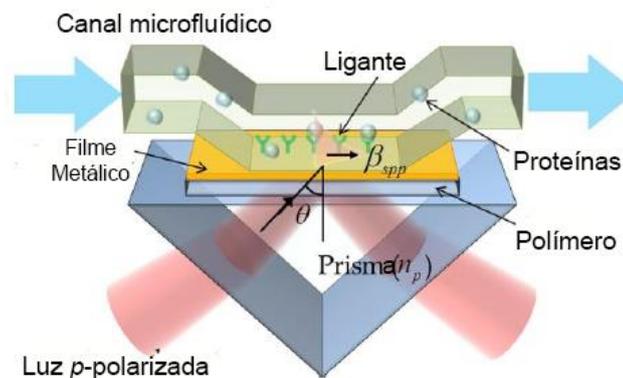
**Figura 10.** Configuração de Kretschmann. (a) Distribuição do campo elétrico em superfície plasmônica na interface plana de um metal dielétrico e (b) visualização da ressonância de um plasma de superfície utilizando um prisma para a produção da onda evanescente.



#### 1.6.4. Célula microfluídica em sensor SPR

O sistema microfluídico (**Figura 11**) é composto pelo canal microfluídico, por onde será passado o analito (proteína), uma fonte de luz polarizada, um prisma, uma superfície formada por uma fina camada metálica (ouro, prata, cobre), acoplado à uma célula polimérica e um sensor óptico para medir a intensidade da luz refletida.

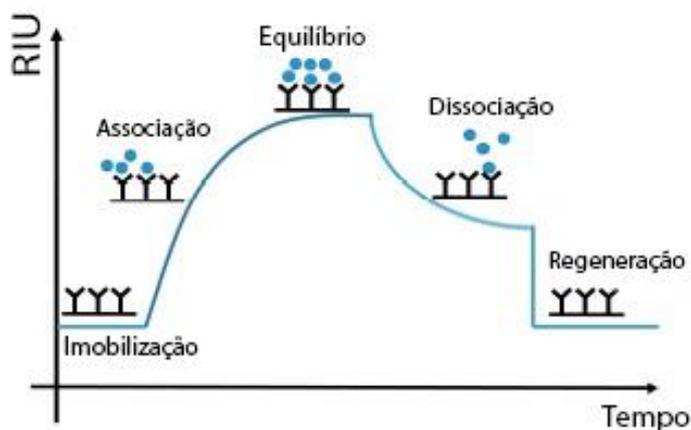
**Figura 11.** Sistema microfluídico.



Fonte: (Roh et al., 2011)

O chipe polimérico é coberto com um filme fino de ouro puro de 50nm de espessura, descrito por Thirstrup et al. (2004). A alteração de massa na superfície sensora altera o ângulo de ressonância, este é monitorado, em tempo real, de forma não invasiva, sendo proporcional à alteração em massa da ligação antígeno-anticorpo pelo sensor óptico. Este sinal obtido é processado e o registro dos dados é feito através de um sensograma, este indica o monitoramento do índice de refração (RIU) pelo tempo, para cada etapa de adsorção de substâncias que ocorrem na célula de fluxo do sensor (WANG E FAN, 2016). Um exemplo pode ser observado descrito na **Figura 12**.

**Figura 12.** Sensograma. Quando há interação, o sistema tende ao equilíbrio, após uma lavagem há dissociação dos não ligantes e, conseqüentemente, o sistema retorna ao estado original.



Fonte: Adaptado de WANG E FAN (2016).

#### 1.6.5. Imobilização de anticorpos

Há uma ampla variedade de estudos envolvendo biosensor SPR que envolvem cinética de adsorção-dessorção, proteína-ligante, receptor-ligante, entre outros (MAKARAVICIUTE E RAMANAVICIENE, 2013). Na utilização da espectrometria de SPR dos biossensores, o analito pode ser imobilizado sobre a superfície do metal por adsorção direta ou por um acoplamento indireto através de uma matriz de carboximetildextrana, hidrogel à base de dextrana sobre o metal (O'SHANNESY et al., 1992; ADAMCZYK, 2000; MOHSENI et al., 2016). A sensibilidade do SPR aumenta com a camada hidrofílica, protegendo o metal da adsorção de proteínas não específicas e permitindo a regeneração da superfície. A interação entre um analito com uma espécie imobilizada altera o índice de refração da interface metal-solução (MAYER E HAFNER, 2011; BINGHAM et al., 2012).

A técnica SPR permite ainda a quantificação de espécies que estão interagindo. Para proteínas de 20 KDa (interleucina, por exemplo), há um limite de detecção que é de  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> (CARVALHO et al., 2003). A análise de fluidos biológicos é restrita para concentrações nesta ordem de grandeza. Contudo, há estudos que visam melhorar o limite de detecção da SPR (UNSER et al., 2015). Há cada vez mais estudos envolvendo a imobilização de proteínas de baixo peso molecular sobre monocamadas auto-organizadas. Estudos nesta área são importantes para que se tenha conhecimento da cinética das ligações bioespecíficas de proteínas em superfície (CARVALHO et al., 2003).

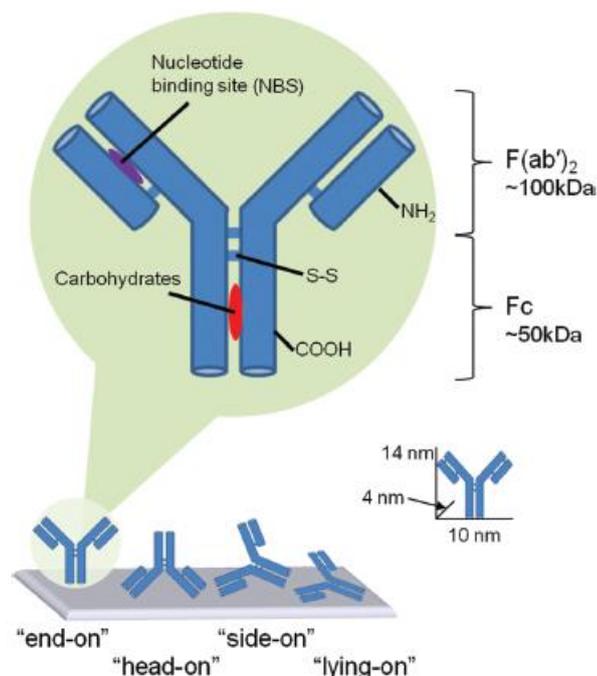
A habilidade de ligação dos anticorpos a alvos específicos em interfaces sólidas é a característica mais importante de diversos ensaios de diagnósticos terapêuticos *in vitro* e *in vivo*. A atividade de anticorpos imobilizados, ou seja, anticorpos capazes de se ligar especificamente a seus alvos a partir do seu fragmento de ligação de anticorpos (Fab), estes são (ou devem ser) **acessíveis**, em relação a sua orientação na superfície, e **biologicamente ativos**, com uma conformação molecular que possua uma baixa constante de dissociação ( $K_d$ ) para a molécula alvo (SAHA et al., 2017).

A atividade do anticorpo imobilizado varia de acordo com as diferentes técnicas de imobilização e que anticorpos que possuem os domínios Fab mais acessíveis exibem uma atividade mais eficaz do que aqueles que são imobilizados aleatoriamente (LIN et al. 2009; SONG et al., 2012; JOSHI et al., 2013).

Dois caminhos podem ser seguidos para a preparação da superfície de um imunossensor: imobilização aleatória e imobilização direcionada (MARQUES, 2013). Este trabalho se baseia na imobilização direcionada de fragmentos de anticorpos (F(ab')<sub>2</sub>) utilizando pontes dissulfídicas proveniente de soro antiotóxico em uma superfície de ouro.

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas a fim de determinar a atividade, acessibilidade e orientação de anticorpos imobilizados em superfícies planares como, por exemplo, microscopia de força atômica (IJJIMA et a., 2012) reflexão de nêutrons (XU et al., 2006a), elipsometria espectroscópica (XU et al, 2006b) e espectrometria de massa (WANG et al., 2004).

**Figura 13.** Orientação de anticorpos em uma superfície planar. Dimensões e espécies químicas alvos importantes na adsorção.



**Fonte:** (WELCH et al. 2017).

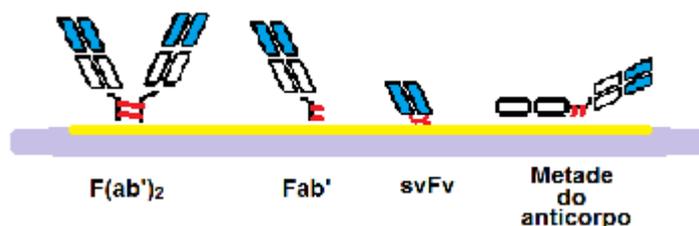
De modo geral, a adsorção de moléculas de anticorpo em um imunossensor é uma técnica de preparação bastante simples, um dos princípios que pode ser usado para este propósito é a determinação de quais domínios são fisicamente acessíveis na superfície de ouro. A adsorção na superfície pode se dar na orientação *end-on* ou *head-on* (*Fab-up* ou *Fab-down*), referindo-se ao IgG que é adsorvido a partir de uma de suas pontas. *Side-on*, quando o anticorpo se liga a superfície deixando apenas uma das duas regiões de ligação ao antígeno acessível e, por último, *flat-on* ou *lying-on*, quando o IgG se "deita" na superfície impossibilitando a ligação de qualquer antígeno (WISEMAN e FRANK, 2012) (**Figura 13**).

A imobilização de fragmentos Fab' foi proposta primeiramente por Jimbo e Saito (1988). Vikholm (2005) propôs um método de imobilização com fragmentos Fab' em uma superfície de ouro denominado *self-assembly* para aplicação em sensores SPR. Há descrito na literatura este mesmo método para diversos outros tipos de sensores como, por exemplo, calorimétrico (WEI et al., 2010) e eletroquímico (GHASEMI et al., 2019).

Para este tipo de imobilização a adsorção é feita a partir de fragmentos de anticorpos, utilizando-se das pontes dissulfídicas presentes no mesmo após uma

digestão enzimática. Essas pontes estão localizadas no ponto de articulação entre as cadeias pesadas do anticorpo e são responsáveis pela manutenção da estrutura do anticorpo, podendo ser clivada em pontos específicos de acordo com a enzima digestiva utilizada, gerando diversos tipos de fragmentos (**Figura 11**).

**Figura 14.** Representação esquemática de métodos de imobilização direcionada de anticorpos IgG.



Fonte: Autor.

Os fragmentos de anticorpos representados acima possuem sua região de ligação ao antígeno representada em azul, as ligações contendo enxofre representadas em vermelho, estas, ligadas a superfície de ouro (amarelo).

Devido sua extrema importância à saúde humana, é necessário mais estudos sobre estrutura e função dos anticorpos do que qualquer outra molécula (DANILOVA E AMEMIYA, 2009). Como mostrado anteriormente, por exemplo, estudos descrevem a digestão enzimática na obtenção de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Fragmento dimérico único), que possuem a capacidade de se ligar com antígenos (MALEKI et al., 2017; NASIRI et al., 2017). F(ab')<sub>2</sub> é preferencialmente escolhido na utilização clínica devido a sua baixa taxa de imunogenicidade e sua rápida atividade biológica (WANG et al., 2010). Esses fragmentos pode ser usados no tratamento de evenenamentos, em imunoterapias para influenza e como agente radio-imunoterapeutico em leucemia (MALEKI et al., 2013; MALEKI et al., 2014; MALEKI et al., 2016; SADEGHI et al., 2018).

A produção desses fragmentos puros é uma etapa fundamental em pesquisas médicas, tratamento e diagnóstico para auto-suficiência do país (VALEDEKARIMI et al., 2018).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Método para o desenvolvimento de um biosensor SPR para detecção de envenenamento ofídico.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar analito, se antígeno ou anticorpo, para a adsorção em sensor de fenômenos de Ressonância de Plásmos de Superfície (do inglês *Surface Plasmon Resonance* – SPR);
- Determinar a detecção em concentração mínima diluída dos venenos;
- Determinar a detecção em concentração mínima diluída do antiveneno;
- Verificar em tempo real as diferenças existentes entre os venenos estudados.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Local de estudo

Os ensaios inerentes a pesquisa foram realizados no Laboratório de Biossensores, localizado no Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), à 136km de distância do Campus I da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), situada em João Pessoa, capital do estado da Paraíba (**Figura 15**).

**Figura 15.** Mapa mostrando as cidades onde se localizam as instituições responsáveis pela pesquisa. Em vermelho a UFCG – Campina Grande e em marrom a UFPB – João Pessoa.



Fonte: Autor

#### 3.2. Amostras

##### 3.2.1. Peçonhas – ou venenos

A classificação taxonômica das serpentes utilizadas neste estudo está descrita na **figura 16**.

Foram utilizadas amostras de veneno bruto da serpente da espécie *Bothrops erythromelas* (VBery), **figura 17**, cedidas pelo Museu Vivo Répteis da Caatinga, localizado no município de Puxinanã, região metropolitana de Campina Grande, Paraíba. Também, foi utilizado veneno bruto liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* (VCrot), cedido pelo Instituto Vital Brazil, localizado no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

**Figura 16.** Classificação taxonômica dos espécimes utilizados neste estudo. A – Representante do gênero *Bothrops*, conhecida popularmente como Jararaca. B – Representante do gênero *Crotalus* conhecida popularmente como Cascavel.

<p>Reino: <i>Animalia</i>            Filo: <i>Chordata</i>            Classe: <i>Reptilia</i>            Ordem: <i>Squamata</i>            Subordem: <i>Ophidia</i>            Superfamília: <i>Colubroidea</i> (revisado por Pyron et al. 2013)                Família: <i>Viperidae</i>                        Subfamília: <i>Crotalinae</i>            Gênero: <i>Bothrops</i>            Espécie: <i>Bothrops erythromelas</i></p>	<b>A</b>
<p>Reino: <i>Animalia</i>            Filo: <i>Chordata</i>            Classe: <i>Reptilia</i>            Ordem: <i>Squamata</i>            Subordem: <i>Ophidia</i>            Superfamília: <i>Colubroidea</i> (revisado por Pyron et al., 2013)                Família: <i>Viperidae</i>                        Subfamília: <i>Crotalinae</i>            Gênero: <i>Crotalus</i>            Espécie: <i>Crotalus durissus terrificus</i></p>	<b>B</b>

**Fonte:** Autor.

**Figura 17.** Extração do veneno de *B. erythromelas*.



**Fonte:** Autor.

### 3.2.2. Soro Antibotrópico (SAB) e Soro Anticrotático (SAC)

SAB - Origem: Doação da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco.  
 Lote: 165110. Fabricação:12/2016.

SAC – Origem: Doação da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco.  
 Lote:170022 Fabricação: 12/2016.

### 3.2.3. Diluição das amostras

Todas as diluições feitas para a realização dos ensaios com os soros antiofídicos (SAB e SAC) e os venenos (Bothrópico e Crotálico) estão discriminadas no **Apêndices I e II** desta dissertação.

### 3.3. Descrição do método proposto

Cada medição se inicia condicionando a superfície do sensor a uma solução tampão adequada, Tampão Fosfato Salino (PBS), a fim de melhorar a qualidade da ligação como também minimizar a perda de ligantes pela mudança de conformação entre o ligante e a superfície do sensor, neste caso a glicoproteína IgG modificada do soro antiofídico.

Para este trabalho, utilizou-se um imunossensor SPR (**Figura 18**), em que, na superfície de ouro (**Figura 10**), podem ser imobilizadas diversas macromoléculas (**Figura 11**). Este tipo de sistema é capaz de detectar eventos de ligações a níveis moleculares com um limite de detecção de  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>, unicamente pelo aumento da espessura da camada, ou cobertura de massa, que se origina a partir da interação entre o componente imobilizado e o analito.

Utilizou-se apenas uma monocamada formada pela interação dos fragmentos de anticorpos IgG com o filme metálico.

Para a limpeza de todo o material e utilização em todos reagentes e amostras utilizadas para os ensaios, foi utilizada água ultra pura do ultrapurificador de água *Milli-Q Direct Water Purification System*<sup>®</sup>.

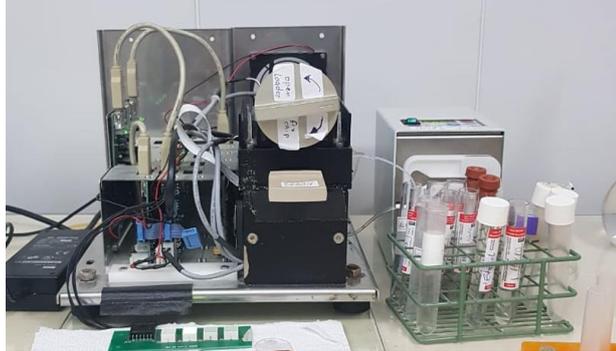
Durante os ensaios a temperatura foi mantida estável, 22 °C, com variação de  $\pm 0,2$  °C.

A taxa de fluxo da admissão do analito foi definida em 160  $\mu$ L/min, e as condições do fluxo laminar foram mantidas constantes. O sistema microfluídico compreendeu um volume de 7  $\mu$ L. O tamanho do sítio de sensoriamento foi de 1 mm<sup>2</sup>, localizado no centro do fluxo laminar. O tempo do sistema de resposta e da resolução temporal foi de 2 segundos, amplamente limitado e definido pela aquisição e processamento de dados a partir de um software (LABORDE et al., 2013).

A limpeza da superfície do chip de ouro é crucial para manter a reprodutibilidade dos resultados. Todas as etapas e ciclos de limpezas foram feitas e as condições da superfície do chip controladas e verificadas pelas características associadas ao sensor SPR, de acordo com Laborde et al. (2013). A leitura em tempo

real, foi feita pelo programa *CobiSoft* da empresa *VIR Biotechnology*<sup>®</sup>, previamente instalado. Os cálculos matemáticos para a construção do modelo utilizado podem ser observados no trabalho de Laborde et al. (2013).

**Figura 18.** Biossensor.

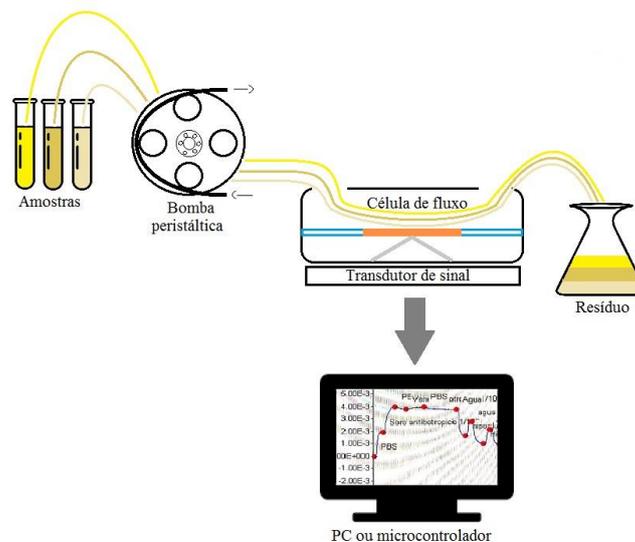


Fonte: Autor

### 3.4. Descrição dos experimentos

A descrição do método pode ser visualizada na **Figura 19**. As amostras já preparadas são adicionadas ao sistema passando por um fluxo gerado por uma bomba peristáltica e então descartadas.

**Figura 19.** Descrição do método



Fonte: Autor

Os experimentos foram realizados seguindo os seguintes critérios básicos de limpeza, como:

1. Após a limpeza adequada, utilizando-se de água ultrapura, etanol (p.a.), hipoclorito (0,5%), na superfície do sensor, a água é bombeada através do

sistema microfluídico e o sinal é gravado pelo medido acoplado ao sistema SPR;

2. Em seguida, o fluxo é interrompido;
3. É selecionada, então, a solução contendo PBS e o fluxo é retomado, a fim de preparar a superfície para a etapa seguinte, o tempo de saturação máxima do PSB no ouro, onde, este atinge o equilíbrio, como demonstrado na figura 15, é de aproximadamente 30 segundos;
4. Novamente, o fluxo é interrompido;
5. Escolhe-se, então, o ligante que será adicionado (neste caso, anticorpos F(ab')<sub>2</sub> purificados do soro). O fluxo é retomando, agora, fez-se como que os ligantes atinjam o equilíbrio, este pode ser alcançado em aproximadamente 280 segundos;
6. O fluxo é novamente interrompido. Escolhe-se o tampão PBS, retorna-se o fluxo, para que haja uma lavagem em que as macromoléculas excedentes sejam lavadas e fique apenas as que estão imobilizadas no chipe;
7. O fluxo é interrompido, o analito é selecionado e adicionado retomando o fluxo; a partir daí pode-se observar, em tempo real, a interação entre o analito e o ligante. Mais uma vez o fluxo é interrompido, adiciona-se PBS retomando o fluxo para lavar as moléculas excedentes de analito, ou seja, as que por alguma eventualidade não se ligaram aos anticorpos, para que fiquem no sistema apenas as que interagiram;
8. Os ensaios são repetidos, com diferentes concentrações, das amostras, para a obtenção dos resultados e seguinte análise dos mesmos.

### 3.5. Análise dos resultados

A análise dos resultados obtidos se deu através da visualização em tempo real da adsorção dos componentes no imunossensor, bem como a análise dos valores do índice de refração fornecidos, em tempo real, pelo biossensor.

Todos os dados foram lidos pelo programa *CobiSoft VIR Biotechnology*<sup>®</sup>.

Para todas as análises dos ensaios foram considerados os valores descritos como sendo os referentes a média aritmética dos ensaios, feitos em triplicata, para a detecção do índice de refração gerado pela imobilização dos anticorpos no sensor, a interação entre os anticorpos já imobilizados e o analito, este, introduzido no sistema a partir do sistema micro-fluídico descrito no tópico **1.6.3** desta dissertação. Os

valores obtidos são referentes a diferença entre o índice de refração medido após a lavagem (remoção do material biológico não adsorvido ou não ligado) que é feita com PBS para remover o excesso de não ligantes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise dos sistemas microfluídicos com adsorção na superfície de detecção

Há possibilidade de interação entre o analito e o imobilizado com os diversos tipos de adsorção já demonstrados nas **Figuras 13 e 14** na superfície do sensor; os resultados encontrados sugerem que os fragmentos de IgG utilizados para imobilização no imunossensor ( $F(ab')_2$ ), mostraram, qualitativamente, um arranjo de maior parte das moléculas imobilizadas com uma orientação onde o impedimento estérico não é significativo, ou seja, maior parte dos anticorpos provavelmente se imobilizaram com seus domínios de ligação expostos, isto se deve aos resultados de associação observados ao longo dos ensaios; já que, para a orientação *lying-on* e *fab-down* a ligação entre antígeno e anticorpo é impedida devido a um bloqueio estérico das moléculas, corroborando estudos como o de Joshi et al. (2013) e Ruiz et al. (2019), por exemplo.

Os ensaios possuem um desempenho analítico que é conduzido, principalmente, a partir da densidade depositada e orientação dos anticorpos imobilizados, estudos demonstraram que a capacidade de ligação antígeno-anticorpo está correlacionada à quantidade de domínios Fab acessíveis (JOSHI et al., 2013; SAHA et al., 2014; SAHA et al., 2017), conseqüentemente há uma constante busca a fim de se encontrar um método de imobilização otimizado (PAROLO et al., 2013; VAN DER HEIDE E RUSSELL, 2016; MUSTAFAOGLU et al., 2017)

Diversos grupos de estudos descreveram a capacidade de ligação de antígeno a fragmentos de  $\beta$ -hCG IgG. Xu et al. (2006) descreveram que a taxa de ligação do antígeno diminuía com o aumento da cobertura na superfície, após uma etapa de bloqueamento com BSA, ou seja, há no processo de interação entre as moléculas um impedimento estérico quando a superfície está totalmente coberta. Resultados similares foram descritos por Wang et al (2008), sugeriram que para uma baixa cobertura a orientação de  $\beta$ -hCG IgG é, em algum ponto, *end-on* ou *side-on* já que uma cobertura formada com orientação *flat-on* não permitiria a interação do antígeno após a etapa de bloqueio com BSA (WISEMAN E FRANK, 2012).

A metodologia de adsorção direta utilizada para a realização deste trabalho corrobora com um estudo realizado por Siriwardana et al. (2013), que demonstrou a possibilidade de múltiplas ligações Cys-Au para IgGs. Isto leva a uma alta afinidade

e interação, e, ainda, a um conjugado mais estável do que o que é permitido por ligações covalentes que contam com *linkers* que se ligam através de uma única porção tiol (SIRIWARDANA et al., 2013).

Uma outra característica importante a ser considerada é a utilização de um pH que garanta um impacto maior na correta orientação na hora da imobilização dos anticorpos na placa de ouro. Segundo Ruiz et al. (2019), o pH tem um impacto na orientação de um anticorpo adsorvido, tendo o pH 7,5 demonstrado uma melhor capacidade de ligação do antígeno e, neste mesmo pH, formado uma melhor cobertura no ouro. Nosso trabalho utilizou no sistema a solução tampão PBS com pH de 7,3, que se aproxima das condições ótimas para a formação da monocamada e ligação do antígeno, mostrando-se eficaz nos ensaios.

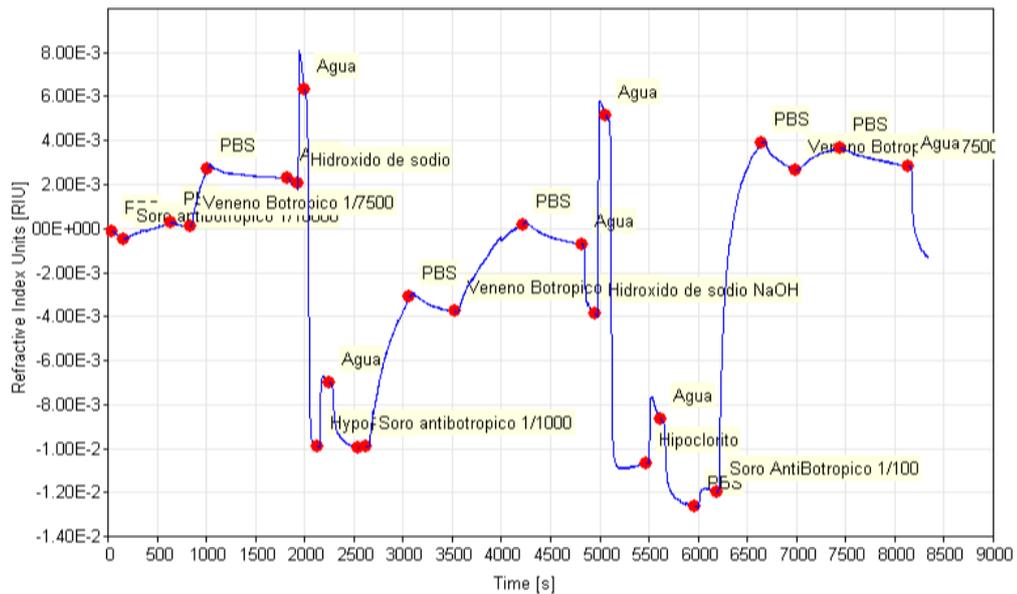
Além do pH, interferências físicas também devem ser levadas em consideração para que haja uma acurácia nos resultados observados. De acordo com Bart et al. (2009), a temperatura ambiente em que os ensaios estão sendo realizados possui influência na formação de camadas que são sintetizadas a partir de sistemas microfluídicos. Com isto em mente, este trabalho foi realizado com a preocupação na manutenção e estabilidade da temperatura e pH no momento da realização dos ensaios, que se manteve constante em todos os ensaios realizados.

A manutenção da temperatura é feita a partir do acondicionamento do biossensor em uma sala com o ar condicionado mantido sempre ligado, o pH é mantido a partir da aplicação da solução tampão através do sistema microfluidico sempre antes de iniciar as etapas de adsorção dos anticorpos no chipe de ouro.

#### **4.2. Determinação da concentração mínima de soro antiofídico para imobilização na superfície de ouro no sistema SPR**

Para este ensaio (**Figura 20**), considerou-se a concentração diluída do veneno de Bothrops a 1:7500 como sendo uma concentração ideal em que haveria uma leitura ótima para a análise da interação entre do soro e o analito no sensor. Levando-se em consideração a concentração mínima já pré-estabelecida, descrita no tópico **4.3** desta dissertação.

**Figura 20.** Determinação da concentração mínima de soro antiofídico. Diferentes concentrações de soro para uma mesma concentração de veneno. A concentração de veneno escolhida e considerada ideal para detecção de sinal pelo sensor SPR para a realização deste ensaio foi de **1:7500**. Foram utilizadas três concentrações de soro, sendo elas **1:10000**, **1:1000**, **1:100**.



Fonte: Autor.

Uma determinada proteína, ou outra molécula, é capaz de se ligar ao ouro a partir de diversas interações molécula-superfície (OZBOYACI et al., 2016a; 2016b), logo, para a análise da interação entre o soro e a superfície metálica levou-se em consideração esta capacidade que as proteínas possuem de se ligar ao ouro por porções com enxofre, carboidratos, por exemplo.

Testou-se, então, uma mesma concentração de veneno para diferentes concentrações de soro; com isto, observou-se que na concentração de soro 1:10000 o índice de refração para a ligação do veneno nos anticorpos imobilizados foi de  $5,2 \times 10^{-3}$ , por outro lado, para imobilização do soro no chip foi feita uma detecção de  $0,8 \times 10^{-3}$ . Para as seguintes concentrações de 1:1000 e 1:100 se seguiu o mesmo critério de observação, mostrado na **Tabela 5**. No entanto, a medida em que é observado um aumento na concentração do soro, a curva que indica a ligação do soro na placa aumenta, aumentando 6 vezes da primeira concentração (1:100) para a segunda (1:1000), e, 9 vezes da segunda para a terceira concentração (1:100). Além do aumento da curva do soro, observa-se um efeito oposto sobre a curva do veneno, em que há diminuição na leitura do RIU.

**Tabela 5.** Valores obtidos, de índice de refração, para diferentes concentrações do soro antiofídico à uma concentração fixa de veneno ofídico. SAB – Soro Anti Botrópico; VenB – Veneno Botrópico.

<b>Reagente/Concentração</b>	<b>1:10000</b>	<b>1:1000</b>	<b>1:100</b>	<b>Unidade</b>
<b>SAB</b>	<b><math>0,8 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>6,8 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>15,4 \times 10^{-3}</math></b>	<b>RIU</b>
<b>VBery</b>	<b><math>5,2 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>4,5 \times 10^{-3}</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^{-3}</math></b>	<b>RIU</b>

Fonte: Autor

Pode-se afirmar que, para as concentrações de 1:10000, 1:1000, 1:100 de SAB, observou-se uma detecção decrescente de  $5,2 \times 10^{-3}$ ,  $4,5 \times 10^{-3}$  e  $1,0 \times 10^{-3}$  do veneno pelo biossensor, respectivamente. Entende-se que para uma baixa concentração de soro, não há formação de uma monocamada completa no chipe; quando se adiciona o veneno, este, além de se ligar a pequena quantidade de anticorpos que foram imobilizados na camada do metal, na condição de ser um complexo proteico e também possuir grupos químicos capazes de se ligar na placa de ouro, o veneno também se liga nos espaços que não foram preenchidos pelos anticorpos do soro, fazendo com que haja uma detecção maior para a mesma concentração do veneno.

A capacidade de ligação do sensor depende da densidade do material que está sendo adsorvido na superfície de ouro, estudos com proteínas G (KIM et al., 2012) demonstraram que a densidade na superfície do sensor deve ser suficientemente alta para se obter uma ótima capacidade de ligação do sensor, no entanto, ao mesmo tempo, não tão alta, a fim de evitar a redução da sensibilidade do sensor causada por efeitos estéricos.

Levando-se em consideração o estudo feito por Kim e colaboradores, para este estudo considerou-se a diluição do soro de 1:100 como sendo a concentração ótima para que as leituras fossem realizadas. Os possíveis efeitos estéricos que podem ser considerados, são reduzidos na etapa de lavagem, em que há remoção dos componentes que não são adsorvidos.

A partir da determinação da concentração mínima e ótima de soro para a adsorção na placa de ouro, todos os ensaios subsequentes foram feitos seguindo o mesmo padrão, incluindo os ensaios feitos com SAC.

### 4.3. Determinação da concentração mínima de veneno ofídico para imobilização na superfície de ouro no sistema SPR

Para a determinação da concentração mínima foi levado em consideração estudos como o de Young et al. (2002) que levantaram questões sobre a mensuração de veneno por serpentes, e Schandel et al. (2019) que afirma que, a regulação, ou modulação, da quantidade ou composição do veneno secretado é feita de acordo com o contexto ecológico no qual vive o animal. Essa regulação da quantidade de veneno injetado é referida na literatura como *venom metering* (MORGESTERN; KING, 2013). Para Hayes (2008), na mensuração, deve-se levar em consideração, a capacidade cognitiva de tomada de decisões das serpentes. Em alguns casos ocorre também “picadas secas”, ou *dry bites* do inglês, que são muito comuns em casos de animais peçonhentos como serpentes, escorpiões, aranhas (SILVEIRA E NISHIOKA, 1995; NISANI E HAYES, 2011; NELSEN et al., 2014).

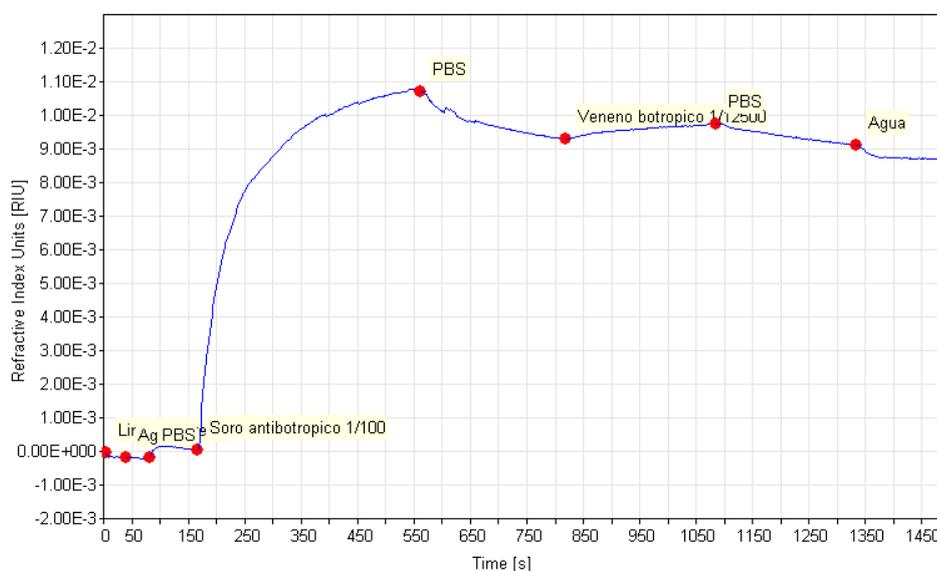
Mensurar a quantidade de veneno presente no sangue do paciente é raramente avaliado clinicamente, no entanto, isto tem sido observado em alguns estudos de acidentes ofídicos. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para a detecção de veneno de serpentes e antígenos em amostras biológicas, entre elas destaca-se *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* e *RadiolImunoAssays (RIA)* (SANHAJARIYA et al., 2018). Estes testes, são testes caros e que utilizam marcadores fluorescentes. Os testes realizados com o imunossensor de Ressonância de Plásmons de Superfície (SPR), apresentados nesta pesquisa, poderão fornecer aos hospitais e pacientes um diagnóstico rápido, seguro, *label free* e em tempo real.

Conquanto o teste ELISA mostre bons resultados, alguns casos de reação cruzada podem ocorrer em espécies de serpentes filogeneticamente próximas (THEAKSTON, 1983; SELVANAYAGAM; GOPALAKRISHNAKONE, 1999). O limite de detecção para veneno de serpente com ELISA é reportado na literatura com valores entre 0.1 µg/L e 20 µg/L (ALLEN et al., 2012; AUDEBERT et al., 1993; GUO et al., 1993; HANVIVATVONG et al., 1997; KHIN et al., 1984; SANO-MARTINS et al., 2001; BARRAL-NETTO et al., 1991; KULAWICKRAMA et al., 2010; O'LEARY et al., 2006; SJOSTROM et al., 1996). Em nosso trabalho o limite de detecção é de até 10<sup>-7</sup> RIU; para 5 µg/L de veneno diluído em PBS, a partir desta concentração, foram feitas diluições seriadas de 1:100 até 1:12500, os resultados demonstram a

sensibilidade do sensor de detectar o veneno de *Bothrops erythromellas* diluído em até 1:10000 partes do valor inicial, ou seja, valores que variam de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  RIU; garantindo assim um diagnóstico mais efetivo.

Como observado na **Figura 21** e **Tabela 6**, para uma concentração de 1:12500 de veneno não houve leitura significativa no biossensor. Inicialmente uma leitura de  $0,27 \times 10^{-3}$  para o veneno, contudo após lavagem com PBS a diferença entre o adsorvido e o lavado é zero. Logo, embora haja uma resposta mínima detectada inicialmente, quando há a etapa da lavagem, todo o conteúdo do veneno que aparentemente interage com o soro, é removido.

**Figura 21.** Determinação da concentração mínima de veneno ofídico. A diluição de veneno utilizada foi de 1:12500, a fim de verificar a detecção na adsorção.



Fonte: Autor.

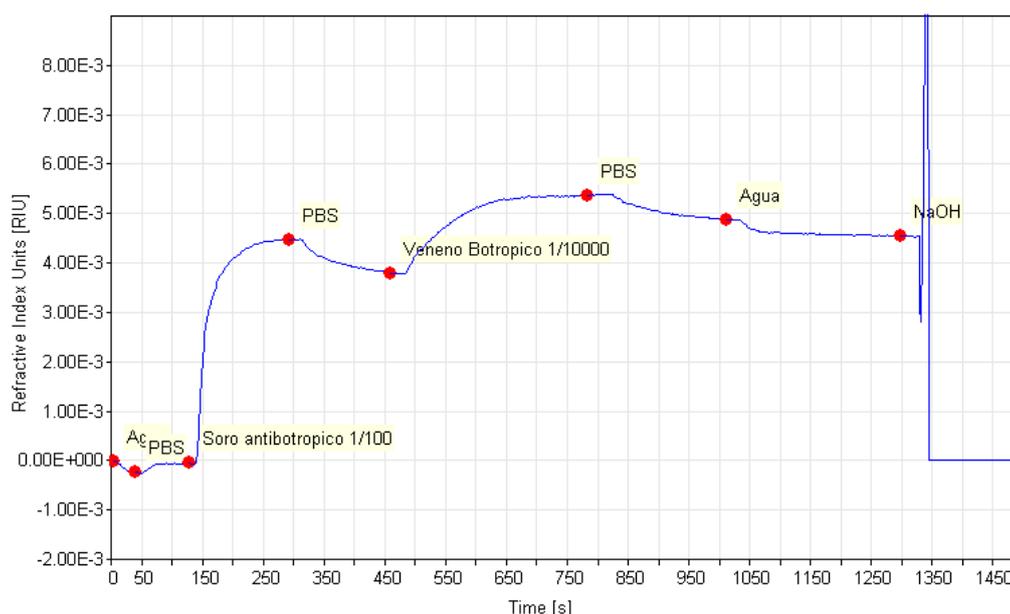
**Tabela 6.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:12500. A média “zero” significa que embora haja uma detecção inicial, após a lavagem com PBS todo o veneno foi removido. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

<b>Reagente</b>	<b>Deslocamento<sup>o</sup></b>	<b>Média do Deslocamento</b>	<b>Unidade</b>
<b>SAB</b>	----	$10,25 \times 10^{-3}$	RIU
<b>VBery</b>	$0,27 \times 10^{-3}$	Zero	RIU

Fonte: Autor.

A **Figura 22**, traz consigo a concentração mínima necessária para que haja detecção pelo biossensor, esta, uma concentração no valor de 1:10000, é minimamente capaz de ser adsorvida no chipe e, então, detectada. A interação entre o veneno diluído e o soro resultou em uma detecção, após a lavagem, de  $1,19 \times 10^{-3}$  RIU, demonstrado na **Tabela 7**.

**Figura 22.** Determinação da concentração mínima de veneno ofídico. A diluição de veneno utilizada foi de **1:10000**, a fim de verificar a detecção na adsorção.



Fonte: Autor.

**Tabela 7.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:10000. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAB	----	$1,33 \times 10^{-3}$	RIU
VBery	$1,08 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	RIU

Fonte: Autor.

Levando-se em consideração as condições fisiológicas e ecológicas nas quais a serpente pode se encontrar na hora em que for deflagrado o acidente ofídico, quanto maior o limite de detecção para menores concentrações do veneno circulante no organismo o sistema de detecção possa oferecer, melhor e mais preciso será o diagnóstico para a administração correta do antiveneno.

Por conseguinte, para os ensaios com veneno crotálico e soro anti-crotálico, os mesmos valores padrões foram adotados e determinados para o veneno

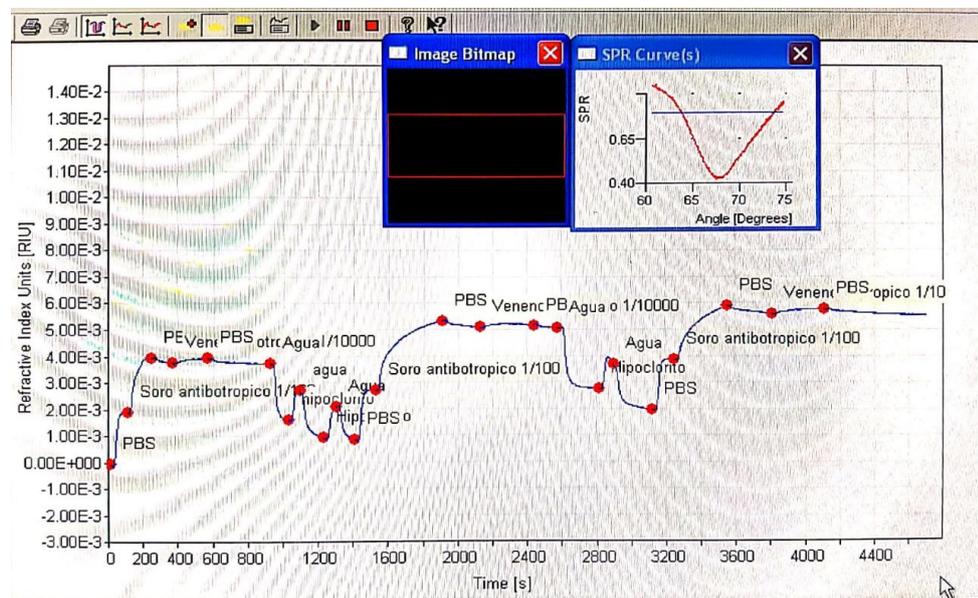
botrópico e soro anti-botrópico. Considerou-se que as duas serpentes pertencem a mesma subfamília e que a análise do veneno poderia ser feita seguindo os mesmos parâmetros. Os resultados obtidos corroboram com esta afirmação.

#### 4.4. Análise do sistema microfluídico com a ligação do veneno de *Bothrops* ao soro SAB imobilizado na superfície de ouro

*Análise do veneno da serpente Bothrops erythromelas, diluído à uma concentração de 1:10000 diante ao soro SAB imobilizado no chip de ouro.*

Assim como demonstrado na **Figura 22**, a **Figura 23**, juntamente com a **Tabela 8**, demonstram que, para uma concentração de 1:10000 de veneno diluído é possível haver uma detecção significativa a partir do sensor SPR. Para este ensaio, observou-se uma detecção de  $0,06 \times 10^{-3}$  RIU de veneno diluído.

**Figura 23.** Detecção do veneno de *Bothrops erythromelas* à uma concentração de 1:10000.



Fonte: Autor.

**Tabela 8.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:10000.

**Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial.

Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAB	$2.23 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	RIU
VBerry	$1.18 \times 10^{-3}$	$0,06 \times 10^{-3}$	RIU

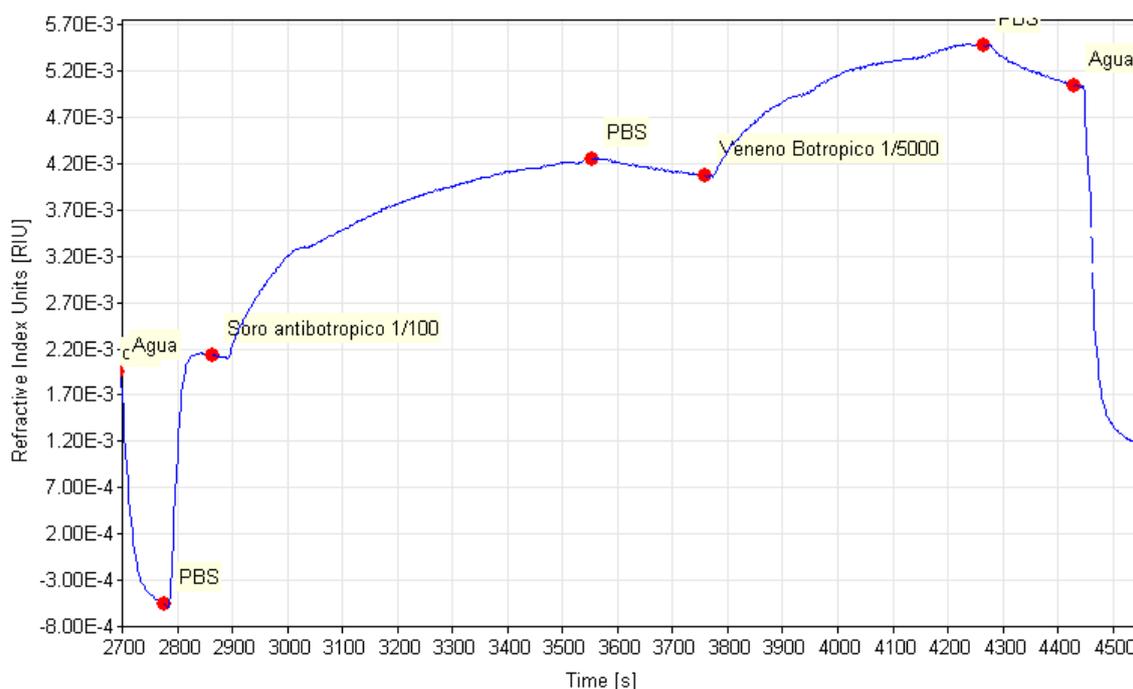
Fonte: Autor

*Análise do veneno da serpente Bothrops erythromelas, diluído à uma concentração de 1:5000 diante ao soro SAB imobilizado no chipe de ouro.*

Em concentração de 1:5000 o veneno mostrou uma leitura, também, significativa para o sensor óptico. Neste ensaio, o índice de refração obtido após a lavagem foi de  $0,93 \times 10^{-3}$  RIU (**Figura 24, Tabela 9**).

Também foram feitas análises para as concentrações de 1:7500, 1:2500 e 1:1000, todas estas mostram-se efetivas na a detecção a partir do biossensor SPR.

**Figura 24.** Detecção do veneno de *Bothrops erythromelas* à uma concentração de 1:5000.



Fonte: Autor.

**Tabela 9.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:5000.

**Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

<b>Reagente</b>	<b>Deslocamento<sup>o</sup></b>	<b>Média do Deslocamento</b>	<b>Unidade</b>
<b>SAB</b>	----	$1,33 \times 10^{-3}$	RIU
<b>VBery</b>	$1,43 \times 10^{-3}$	$0,93 \times 10^{-3}$	RIU

Fonte: Autor.

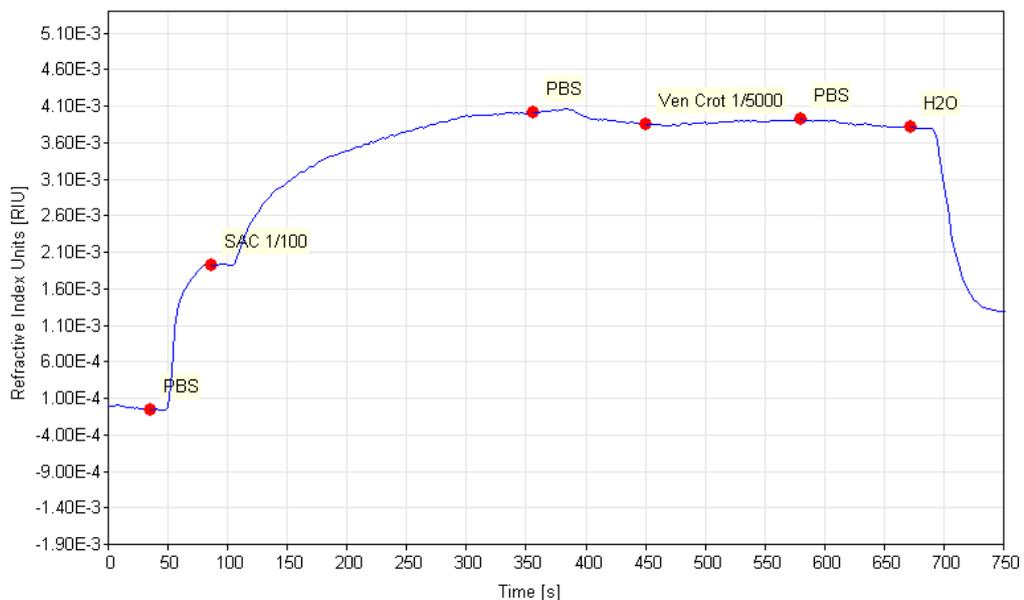
#### 4.5. Análise do sistema microfluídico com a ligação do veneno Crotálico ao soro SAC immobilizado na superfície de ouro

Análise do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, diluído à uma concentração de 1:5000 diante ao soro SAC immobilizado no chipe de ouro.

Diferente do que é observado para o veneno de *B. erythromelas*, para a concentração de 1:5000 de veneno de *C. d. terrificus* não houve leitura significativa pelo sensograma (**Figura 25**). Inicialmente há uma leitura de  $0,8 \times 10^{-3}$  para o veneno, contudo após lavagem com PBS a diferença entre o adsorvido e o lavado é zero (**Tabela 10**). Logo, embora haja uma resposta mínima detectada inicialmente, quando há a etapa da lavagem, todo o conteúdo do veneno que aparentemente interage com o soro, é removido.

Logo, pode-se afirmar que a concentração mínima de veneno crotálico detectável para o biossensor não é a mesma para o veneno botrópico. Foram feitos testes com concentrações menores que 1:5000 a fim de confirmar a detecção mínima.

**Figura 25.** Detecção do veneno de *Crotalus durissus terrificus* à uma concentração de 1:5000.



Fonte: Autor.

**Tabela 10.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:5000. A média “zero” significa que embora haja uma detecção inicial, após a lavagem com PBS todo o veneno foi removido. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

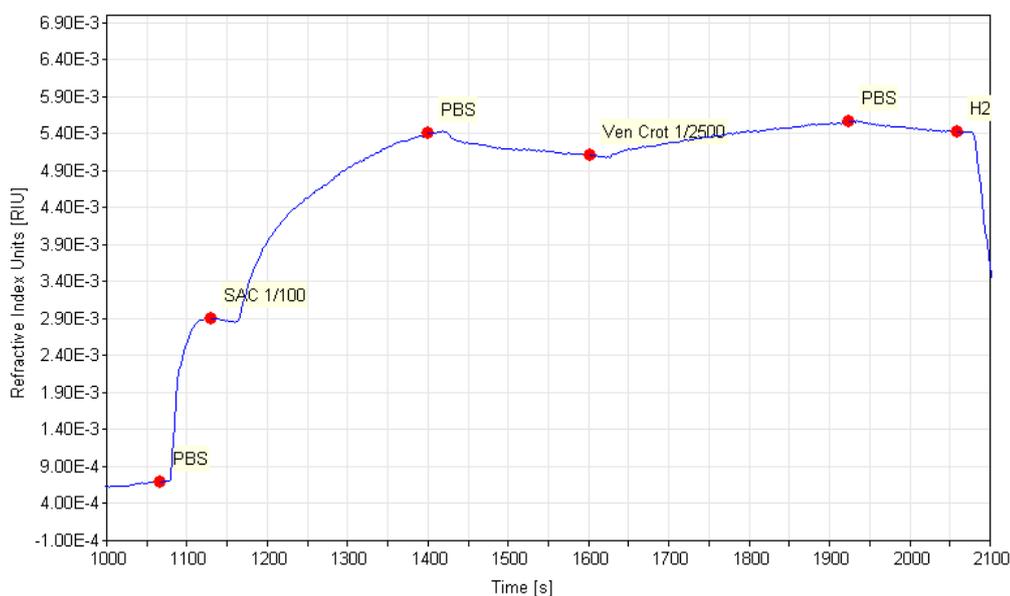
Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAC	----	$1,91 \times 10^{-3}$	RIU
VCrot	$0,08 \times 10^{-3}$	Zero	RIU

Fonte: Autor.

*Análise do veneno da serpente Crotalus durissus terrificus, diluído à uma concentração de 1:2500 diante ao soro SAC imobilizado no chipe de ouro.*

Em concentração de 1:2500 o veneno mostrou uma leitura significativa para o sensor óptico. Neste ensaio, o índice de refração obtido após a lavagem foi de  $0,34 \times 10^{-3}$  RIU (**Figura 26, Tabela 11**).

**Figura 26.** Detecção do veneno de Crotalus durissus terrificus à uma concentração de 1:2500.



Fonte: Autor.

**Tabela 11.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:2500. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAC	----	$2,22 \times 10^{-3}$	RIU
VCrot	$0,5 \times 10^{-3}$	$0,34 \times 10^{-3}$	RIU

Fonte: Autor.

Das concentrações analisadas, apenas a de 1:2500 mostrou-se detectável ao biosensor. Esta diferença na concentração mínima detectável entres os dois venenos analisados, pode ser devido as diferenças específicas do veneno de cada espécie e à sua interação molecular com o SAB. Embora todas as condições necessárias para a formação da monocamada e ligação do analito ao anticorpo imobilizado tenham sido seguidas de maneira precisa, deve ser levado em consideração que o veneno aqui utilizado foi um veneno liofilizado, quando comparado como veneno de Bothrops em que foi utilizado um veneno bruto.

No processo de liofilização há um dano térmico mínimo para as proteínas, já que todo processo é feito a temperatura abaixo de 30°C (MOSHARRAF et al., 2007; WANG, 2000a). Contudo, o processo envolve desestabilização de forças inerentes a proteína que pode desnaturá-las (KADOYA et al., 2010; TANG e PIKAL, 2005) levando-as a diferentes níveis de estresse (ABDUL-FATTAH et al. 2007a; 2007b). Sabe-se que o processo de liofilização faz com que o produto liofilizado perca toda água em sua estrutura; sugere-se, então, que a utilização de veneno liofilizado possa de alguma forma interferir na interação entre o sítio de ligação do anticorpo e o antígeno, muito provavelmente devido a uma mudança estereo-química do veneno crotálico liofilizado.

Mecanismos de estabilização de proteínas em estado sólido e os efeitos da liofilização têm sido mostrado em estudo como os de Chang e Pikal (2009) e Iyer et al. (2016).

Embora a concentração de veneno a ser detectado seja um pouco maior do que para o veneno botrópico, o sensor é capaz de manter seu padrão de leitura e acurácia.

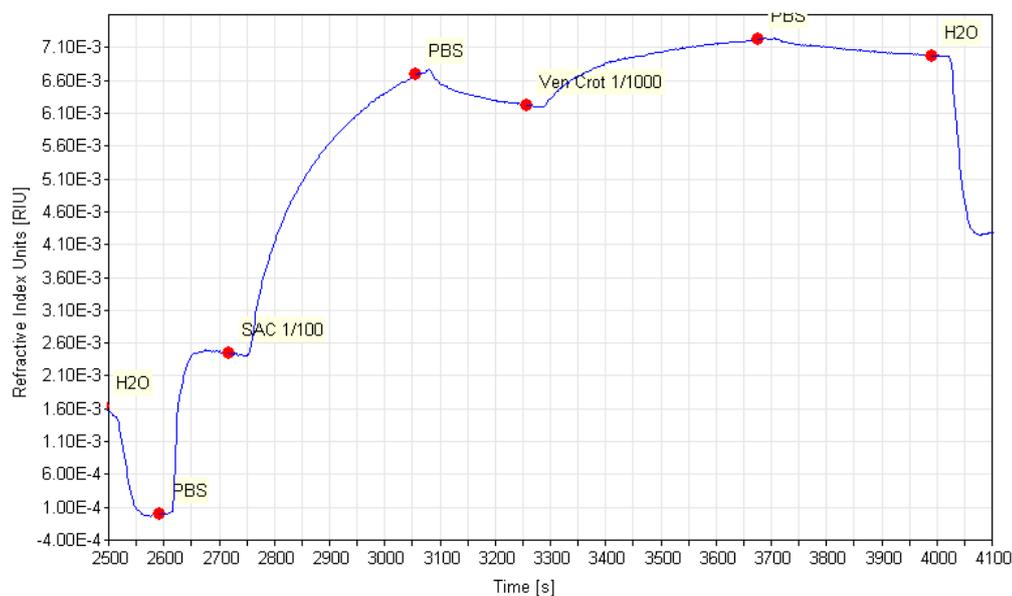
São necessários mais estudos com a imobilização desta peçonha para determinar, de fato, a concentração mínima necessária a ser detectada por um sensor SPR e, também, sua interação com a imunoglobulina adsorvida. Ainda, sugere-se que para estudos futuros seja utilizada peçonha bruta não liofilizada a fim de haver uma melhor resposta do imunossensor SPR.

*Análise do veneno da serpente Crotalus durissus terrificus, diluído à uma concentração de 1:1000 diante ao soro SAC immobilizado no chipe de ouro.*

Na concentração de 1:1000 o veneno mostrou uma leitura significativa para o sensor óptico. Neste ensaio, o índice de refração obtido após a lavagem foi de  $0,78 \times 10^{-3}$  RIU (**Figura 27, Tabela 12**).

Concentrações maiores também foram testadas para visualizar a dinâmica da interação entre o adsorvente, adsorbato e analito. Conseqüentemente, quanto maior a concentração, melhor e maior é a caracterização da ligação em tempo real pelo sensor.

**Figura 27.** Detecção do veneno de *Crotalus durissus terrificus* à uma concentração de 1:1000.



Fonte: Autor.

**Tabela 12.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:1000.

**Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAC	----	$3,0 \times 10^{-3}$	RIU
VCrot	$1,05 \times 10^{-3}$	$0,78 \times 10^{-3}$	RIU

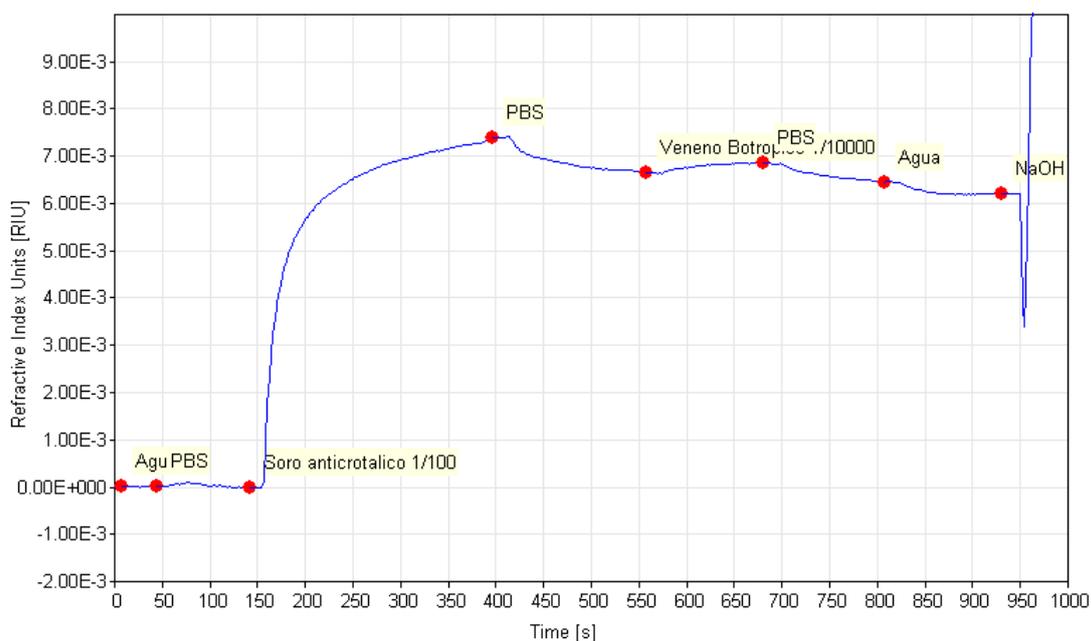
Fonte: Autor.

#### 4.6. Análise da interação cruzada entre o veneno inespecífico para o soro imobilizado - SAC vs VBery

Análise do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*, diluído a uma concentração de 1:10000 diante ao Soro AntiCrotálico (SAC) imobilizado no chipe de ouro.

Embora sejam espécies da mesma família, pode-se observar que há diferença significativa na interação entre as moléculas dos venenos e o soro correspondente, uma vez que, construtivamente, estes dois venenos especificamente são bastante diversos. O veneno botrópico se liga especificamente, ao SAB, com uma boa detecção pelo sensor a uma concentração mínima de 1:10000 (Figuras 20 e 21), enquanto que o mesmo veneno quando interage com o soro inespecífico não há leitura significativa; após a lavagem todo o veneno é removido (Figura 28, Tabela 13).

**Figura 28.** Ligação cruzada entre soro anticrotálico (1:100) e veneno botrópico na concentração de 1:10000.



Fonte: Autor.

**Tabela 13.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:10000. A média “zero” significa que embora haja uma detecção inicial, após a lavagem com PBS todo o veneno foi removido. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

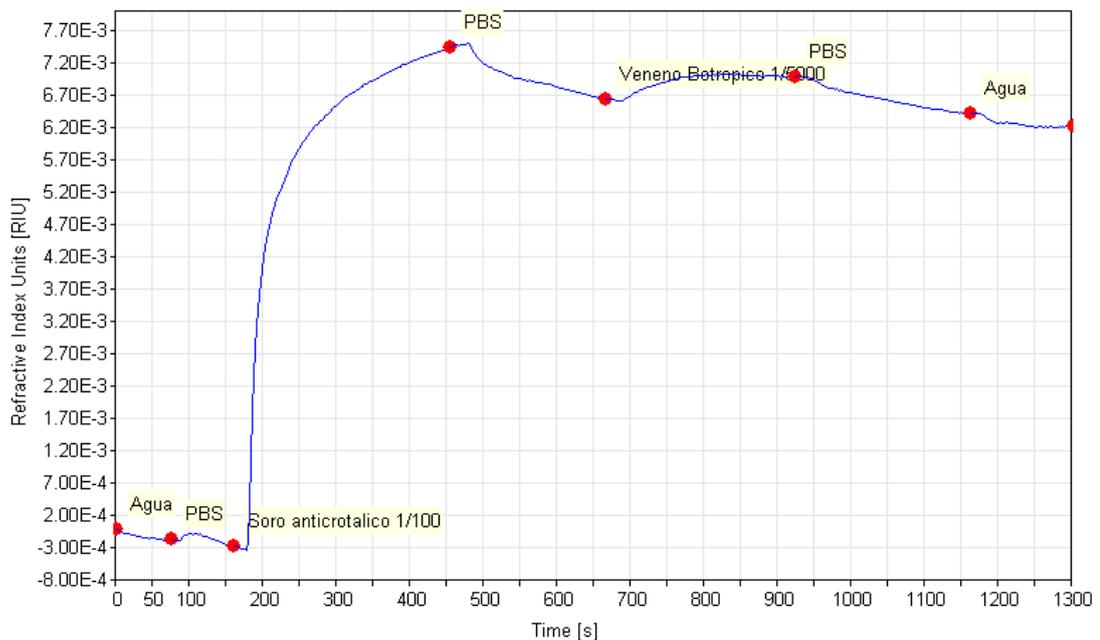
Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAC	----	$6,60 \times 10^{-3}$	RIU
VBery	$0,24 \times 10^{-3}$	Zero	RIU

Fonte: Autor.

*Análise do veneno da serpente Bothrops erythromelas, diluído à uma concentração de 1:5000 diante ao Soro AntiCrotálico (SAC) imobilizado no chip de ouro.*

Assim como demonstrado para a concentração de 1:10000, os valores obtidos na diluição de 1:5000 não mostraram leitura significativa após a lavagem com PBS (**Figura 29, Tabela 14**). Mais uma vez, houve uma detecção inicial da interação do veneno com o soro, porém, seus componentes foram removidos após a lavagem.

**Figura 29.** Ligação cruzada entre soro anticrotálico (1:100) e veneno botrópico na concentração de 1:5000.



Fonte: Autor.

**Tabela 14.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:5000. A média “zero” significa que embora haja uma detecção inicial, após a lavagem com PBS todo o veneno foi removido. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

<b>Reagente</b>	<b>Deslocamento<sup>o</sup></b>	<b>Média do Deslocamento</b>	<b>Unidade</b>
<b>SAC</b>	----	$6,26 \times 10^{-3}$	RIU
<b>VBery</b>	$0,24 \times 10^{-3}$	Zero	RIU

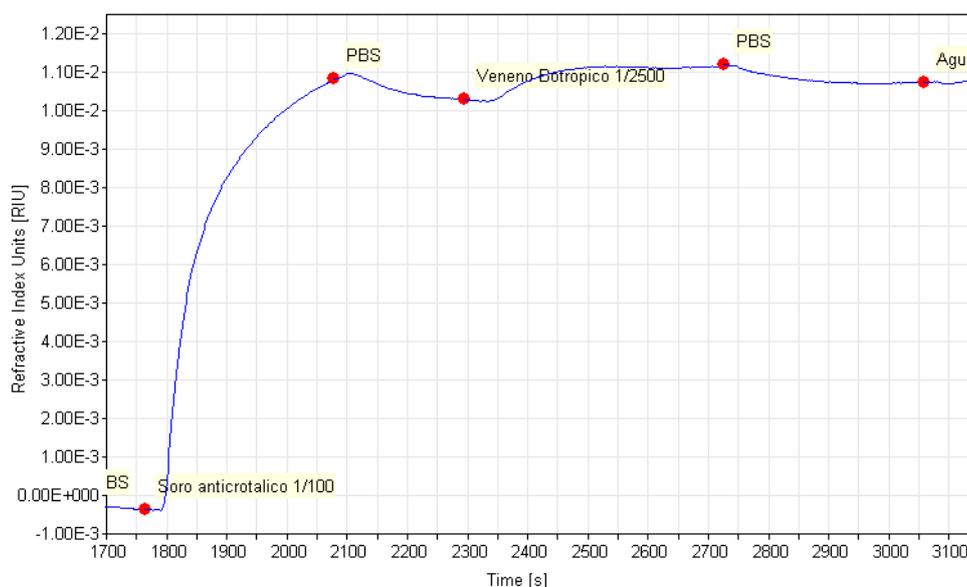
**Fonte:** Autor.

Há componentes específicos no veneno de Bothrops que não são neutralizados na presença do soro anticrotálico, isso faz com que haja um comportamento diferente deste veneno quando colocado frente a um antiveneno inespecífico; esta diferença é fundamental no momento da diferenciação entre os dois venenos pelo biosensor.

*Análise do veneno da serpente Bothrops erythromelas, diluído à uma concentração de 1:2500 diante ao Soro AntiCrotálico (SAC) imobilizado no chip de ouro.*

A partir da diluição de 1:2500, percebeu-se uma detecção do veneno pelo biossensor (**Figura 30**). A detecção do biossensor a partir desta concentração se dá pelo fato da similaridade filogenética entre os espécimes estudados. Ao longo do processo evolutivo, as serpentes, a partir de processos caracterizados pela evolução como cladogênese, anagênese, mutação, devira genética, desenvolveram e evoluíram suas toxinas, logo, caracteres apomórficos e plesiomórficos foram desenvolvidos, com isso as toxinas passaram a se divergir em suas classes, e apresentar ações fisiológicas específicas e/ou compartilhadas. Essa leitura obteve um valor de índice de refração de  $0,5 \times 10^{-3}$  RIU após a lavagem (**Tabela 15**). Contudo, pode-se concluir que a diluição mínima necessária para que haja detecção do veneno botrópico frente ao SAC imobilizado é de 1:2500.

**Figura 30.** Ligação cruzada entre soro anticrotálico (1:100) e veneno botrópico na concentração de 1:2500



Fonte: Autor.

**Tabela 15.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:2500. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial referente aos valores em RIU da figura em destaque.

Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAC	----	$9,81 \times 10^{-3}$	RIU
VBery	$1,0 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-3}$	RIU

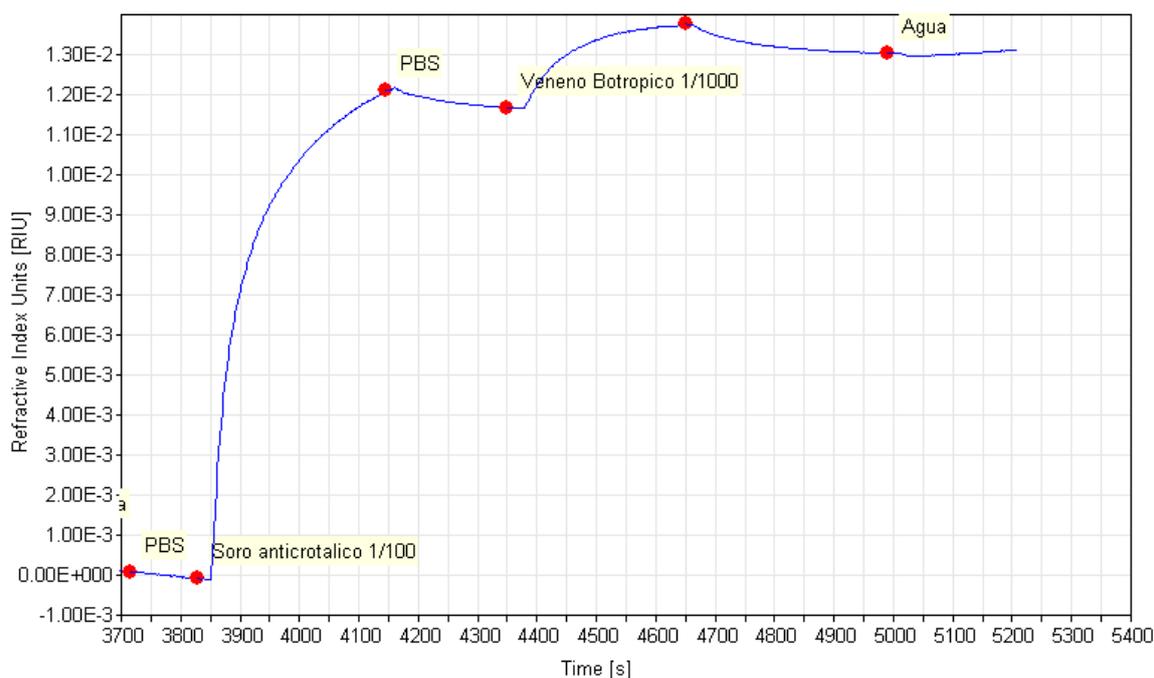
Fonte: Autor.

*Análise do veneno da serpente Bothrops erythromelas, diluído à uma concentração de 1:1000 diante ao Soro AntiCrotálico (SAC) immobilizado no chip de ouro.*

É importante ressaltar que a detecção observada, mesmo sendo um antiveneno inespecífico para o veneno, é fundamentada, como mostra a **Figura 16**, pela filogenia dos espécimes em estudo.

Na concentração de 1:1000 o veneno mostrou uma leitura significativa para o sensor óptico. Neste ensaio, o índice de refração obtido após a lavagem foi de  $1,3 \times 10^{-3}$  RIU (**Figura 31, Tabela 16**).

**Figura 31.** Ligação cruzada entre soro anticrotálico (1:100) e veneno botrópico na concentração de 1:1000



**Tabela 16.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:1000. Deslocamento<sup>o</sup> - Deslocamento inicial.

Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAC	----	$11,29 \times 10^{-3}$	RIU
VBery	$2,1 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$	RIU

Fonte: Autor.

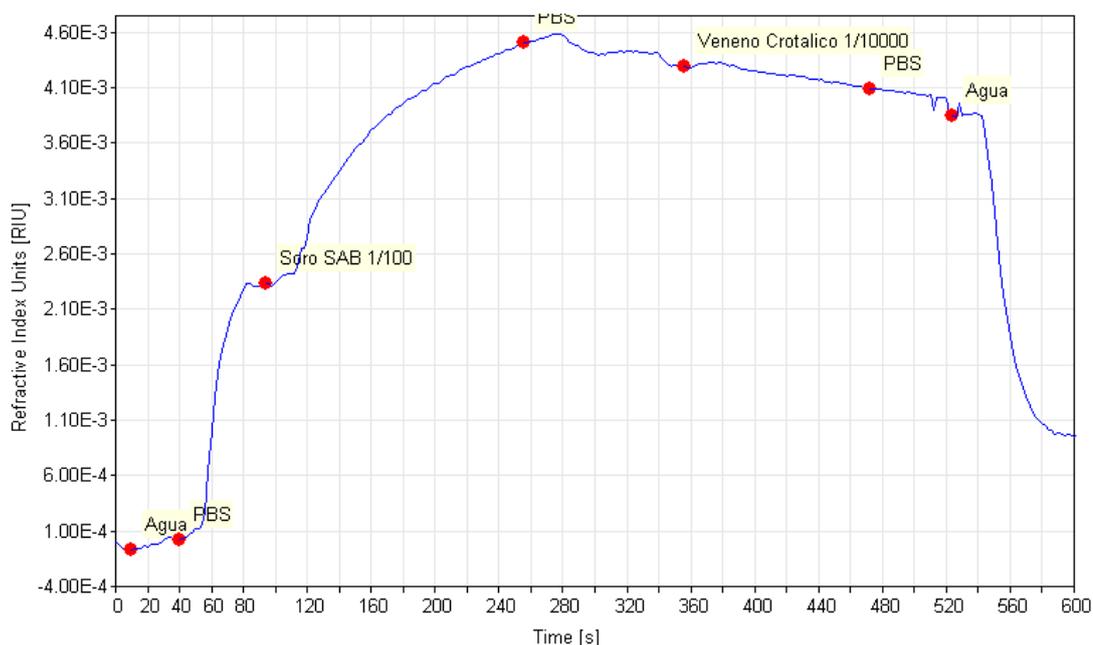
#### 4.7. Análise da interação cruzada entre o veneno inespecífico para o soro imobilizado - SAB vs VCrot (Veneno Crotálico)

*Análise do veneno da serpente Crotalus durissus terrificus, diluído à uma concentração de 1:10000 diante ao Soro AntiBotrópico (SAB) imobilizado no chip de ouro.*

Após a estabilização do PBS (pós lavagem do SAB), o índice de refração foi de  $4,27 \times 10^{-3}$  RIU, ponto no qual foi adicionado o veneno, a partir deste ponto houve apenas decaimento dos valores subsequentes do RIU, seguidos de  $4,10 \times 10^{-3}$  (o ponto considerável de estabilidade da curva do veneno) e pós lavagem do veneno com PBS a curva caiu para  $3,87 \times 10^{-3}$ . Logo, de acordo com a leitura do biossensor,

pode-se afirmar que os valores decresceram, caracterizando, assim, a não interação do veneno com o soro (**Figura 32, Tabela 17**).

**Figura 32.** Ligação cruzada entre soro antibotrópico (1:100) e veneno crotálico na concentração de 1:10000



Fonte: Autor.

**Tabela 17.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:10000. Neste caso, a média “zero” significa que não houve detecção. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial.

Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAB	----	$1,96 \times 10^{-3}$	RIU
VCrot	Zero	Zero	RIU

Fonte: Autor.

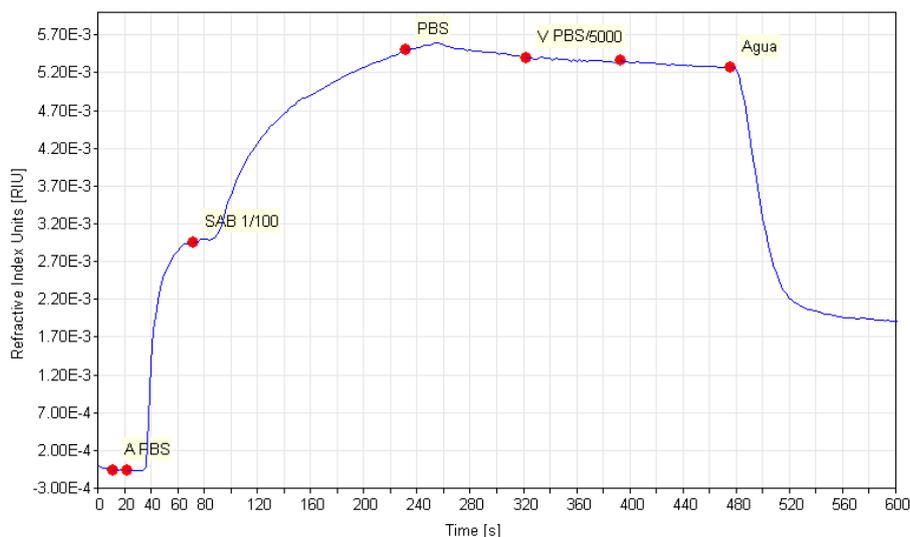
Este resultado é relevante porque isto mostra que, embora filogeneticamente similares, a interação antígeno-anticorpo, neste caso o fragmento F(ab')<sub>2</sub> do SAB, não é forte o suficiente para manter sua ligação, podendo ser caracterizado.

*Análise do veneno da serpente Crotalus durissus terrificus, diluído à uma concentração de 1:5000 diante ao Soro AntiBotrópico (SAB) immobilizado no chip de ouro.*

Quando comparados aos resultados do VCrot frente ao seu soro específico, estes resultados mostram-se semelhantes. Enquanto que para o soro específico não há detecção à uma concentração de 1:5000, o mesmo pode ser observado para o soro inespecífico. Neste caso, haveria dificuldade para determinar o gênero da espécie pelos resultados obtidos pelo sensor.

Neste ensaio não foi observada detecção em tempo real (**Figura 33**), após a lavagem com PBS, a curva continuou a decrescer não havendo leitura significativa em RIU (**Tabela 18**).

**Figura 33.** Ligação cruzada entre soro antibotrópico (1:100) e veneno crotálico na concentração de 1:5000



Fonte: Autor.

**Tabela 18.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:5000. Neste caso, a média “zero” significa que embora haja uma detecção inicial, após a lavagem com PBS todo o veneno foi removido. **Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial.

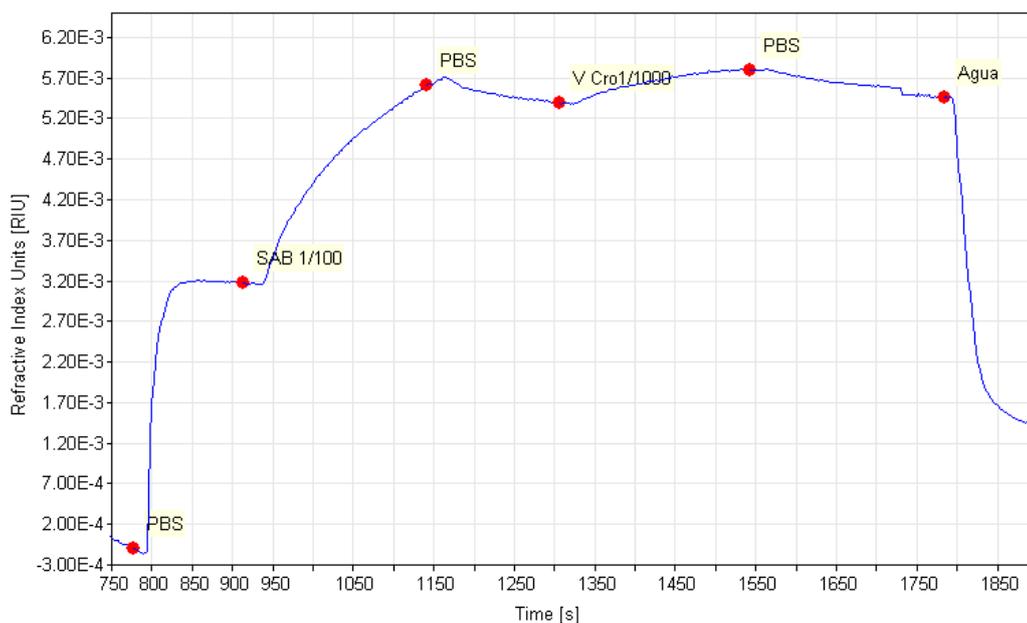
Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAB	----	$1,96 \times 10^{-3}$	RIU
VCrot	$0,02 \times 10^{-3}$	Zero	RIU

Fonte: Autor.

*Análise do veneno da serpente Crotalus durissus terrificus, diluído à uma concentração de 1:1000 diante ao Soro AntiBotrópico (SAB) imobilizado no chip de ouro.*

Neste ensaio foi observada detecção em tempo real (**Figura 34**), após a lavagem com PBS, a média em RIU foi de  $0,05 \times 10^{-3}$  (**Tabela 19**).

**Figura 34.** Ligação cruzada entre soro antibotrópico (1:100) e veneno crotálico na concentração de 1:1000



Fonte: Autor.

**Tabela 19.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:1000.

**Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial.

<i>Reagente</i>	<i>Deslocamento<sup>o</sup></i>	<i>Média do Deslocamento</i>	<i>Unidade</i>
<b>SAB</b>	----	$2,25 \times 10^{-3}$	RIU
<b>VCrot</b>	$0,41 \times 10^{-3}$	$0,05 \times 10^{-3}$	RIU

Fonte: Autor.

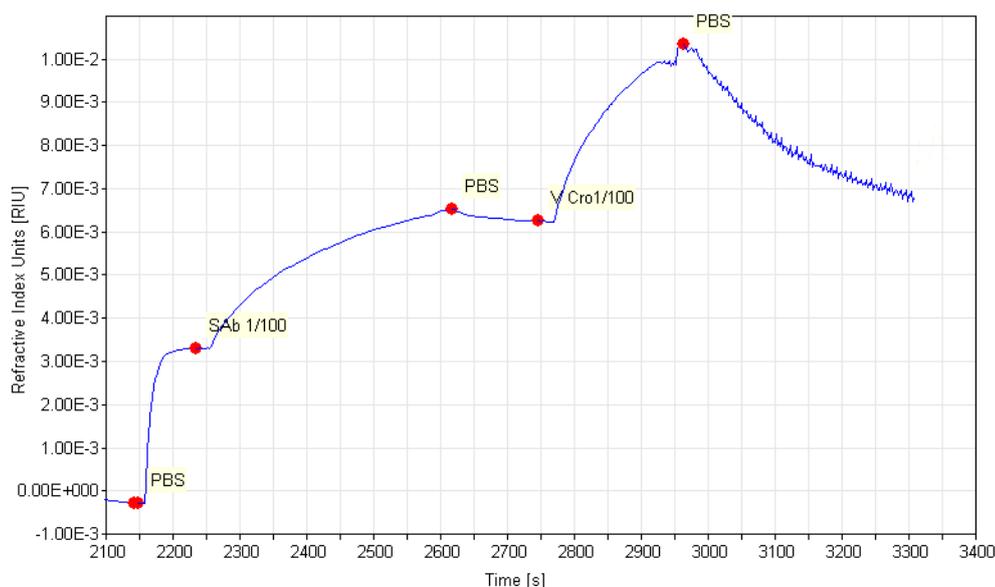
Ainda, pensando no diagnóstico do paciente através desse método, mesmo que, inicialmente, houvesse uma dificuldade na hora de identificar em tempo real a diferença entre os venenos, o índice de refração detectado pode ser levado em consideração. Para SAB x VCrot na concentração de 1:1000, obteve-se  $0,78 \times 10^{-3}$  RIU, enquanto que SAB x VCrot na mesma concentração obteve-se  $0,05 \times 10^{-3}$ .

Vale ressaltar a possibilidade de haver algum efeito estero-químico devido a hidrólise do veneno bruto que é feita a fim do melhor acondicionamento da amostra de veneno.

*Análise do veneno da serpente C. d. terrificus, diluído a uma concentração de 1:100 diante ao Soro AntiBotrópico (SAB) imobilizado no chip de ouro.*

Para este ensaio foi observada detecção em tempo real (**Figura 35**), após a lavagem com PBS, a média em RIU foi de  $0,48 \times 10^{-3}$  (**Tabela 20**). Mesmo para uma amostra com uma concentração consideravelmente elevada de veneno (1:100), a quantidade de veneno que se liga ao antiveneno imobilizado na placa de ouro é de  $0,48 \times 10^{-3}$ , valor não tão alto quando comparado ao SAC x VCrot 1:1000 que é de  $0,78 \times 10^{-3}$  e SAB x VCrot  $0,05 \times 10^{-3}$  na concentração de 1:1000.

**Figura 35.** Ligação cruzada entre soro antibotrópico (1:100) e veneno crotálico na concentração de 1:100



Fonte: Autor.

**Tabela 20.** Valores obtidos, de índice de refração, para o veneno à uma concentração de 1:100.

**Deslocamento<sup>o</sup>** - Deslocamento inicial.

Reagente	Deslocamento <sup>o</sup>	Média do Deslocamento	Unidade
SAB	----	$2,93 \times 10^{-3}$	RIU
VCrot	$4,17 \times 10^{-3}$	$0,48 \times 10^{-3}$	RIU

Fonte: Autor.

Buscar formas mais rápidas para o tratamento é fundamental, devido a incapacidade do antiveneno de neutralizar a peçonha já ligada aos tecidos no organismo, o soro só é eficaz se for administrado com bastante antecedência a fim de neutralizar a peçonha circulante antes que esta se ligue aos seus alvos no organismo afetado (RANAWAKA et al., 2013).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do sensor óptico de ressonância de plasmões de superfície, é possível desenvolver um aparelho que seja capaz de discriminar no organismo os diferentes tipos de venenos de serpentes. As diferenças observadas nos ensaios em laboratório foram capazes de fornecer informações a respeito de qual veneno está sendo observado na amostra em análise. Desta forma, o analito, complexo proteico presente na peçonha, poderá ser analisado e definido à qual gênero pertence, o que é de suma importância para o direcionamento do tratamento a ser aplicado no indivíduo evenenado.

A partir das análises observadas, pode-se concluir que houve anticorpos suficientes adsorvidos no filme de ouro, sendo assim detectáveis e capazes de interagir com o analito.

A partir da análise em tempo real e dos valores obtidos dos ensaios foi possível determinar a detecção em concentração mínima diluída dos venenos e do antiveneno para o estudo em questão.

Em tempo real foi possível observar diferenças entre as peçonhas dos animais estudados.

Este estudo se mostrou com um grande potencial para a clínica, uma vez que com os resultados obtidos, há possibilidade de aplicação para o diagnóstico de pessoas acometidas por acidentes ofídicos. Estudos com outras peçonhas podem e devem ser feitos a fim de melhorar a qualidade dos resultados. Estudos envolvendo anticorpos monoclonais para proteínas específicas de cada veneno podem garantir ainda mais a eficácia no diagnóstico.

## REFERÊNCIAS

- ABU-SALAH *et al.* DNA-Based Nanobiosensors as an Emerging Platform for Detection of Disease. Switzerland. **Sensors**. 2015.
- ABDUL-FATTAH, A.M.; KALONIA, D.S.; PIKAL, M.J. The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: Product quality implications. **J Pharm Sci** 96:1886–1916. 2007a.
- ABDUL-FATTAH, A.M. *et al.* Drying induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): Stability of a monoclonal antibody. **J Pharm Sci**. 96:1983–2008. 2007b.
- ADAMCZYK, M.; MOORE, J. A.; YU, Z. Application of Surface Plasmon Resonance toward Studies of Low-Molecular-Weight Antigen–Antibody Binding Interactions. v. 20. **Methods**. Issue 3, Pgs 319-328, 2000, ISSN 1046-2023, <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0925>.
- ALLEN, G.E.; Clinical effects and antivenom dosing in brown snake (*pseudonaja* spp.) envenoming—Australian snakebite project (asp-14). **PLoS ONE**, 7. 2012.
- AMORIM, F. G. *et al* Proteo-peptidomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of Bothrops moojeni Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. 10, 177. **Toxins**. 2018
- ÁVILA-AGUERO, M. L. *et al.* Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. Costa Rica. **Pediatr Emerg Care**. 17:425–429. 2001.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. Ribeirão Preto. **Medicina**, 36: 480-489, abr./dez. 2003
- AUDEBERT, F.; GROSSELET, O.; SABOURAUD, A.; BON, C. Quantitation of venom antigens from european vipers in human serum or urine by elisa. **J. Anal. Toxicol**. 17, 236–240. 1993.
- BARRETO-NETO, A. G. *et al.* S. Projeto e desenvolvimento de microbomba peristáltica, adicionada com atuador piezoelétrico, aplicada a biosensores SPR. Campina Grande. 2016. **Anais** do IX CONEM – Congresso Nacional de Engenharia Mecânica. Disponível em: <http://www.sbai2013.ufc.br/pdfs/6396.pdf>. Acesso em: Fev 2018.
- BARRAL-NETTO, M. *et al.* Serum levels of bothropic venom in patients without antivenom intervention. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 45, 751–754. 1991.
- BART, J. *et al.* Room-Temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. Netherlands. **Labo on chip**. 9: 3481-3488, 2009.
- BERNARDE, P. S. **Serpentes Peçonhentas e Acidentes Ofídicos no Brasil**. 1ª ed. São Paulo: Anolis Books, 2014. v. 1. 223p. Disponível em:

[https://issuu.com/nipanga/docs/serpentes\\_pe\\_\\_onhentas\\_isuu3](https://issuu.com/nipanga/docs/serpentes_pe__onhentas_isuu3). Acesso em: 20/03/2018

BERNARDE, P.S. **Acidentes ofídicos**. Universidade Federal do Acre, 26p, 2009. Disponível em: <http://www.herpetofauna.com.br/OfidismoBernarde.pdf>. Acesso em: Março 2019.

BERNADONE, J. L. et al. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.

BERLING, I. et al. Intracranial haemorrhages associated with venom induced consumption coagulopathy in Australian snakebites (ASP-21). **Toxicon**, 102, 8–13. 2015.

BHALLA, N. et al. Introduction to Biosensors. **Essays in Biotech**. 60 1-8. 2016.

BHALLA, N. et al. Plasmonic ruler on field-effect devices for kinase drug discovery applications. **Biosens. Bioelectron**. 71, 121–128. 2015.

BINGHAM, J.M.; PAIGE HALL, W.; VAN DUYN, R.P. Exploring the Unique Characteristics of LSPR Biosensing. In **Nanoplasmonic Sensors**; Dmitriev, A., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2012.

BOCHNER, R.; FISZON, J.T.; MACHADO, C. A profile of snake bites in Brazil, 2001 to 2012. **J Clin Toxicol**. 4(3):1–7. 2014.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **J. Proteome** 73, 1758–1776. 2010.

BON, C. Snake venom & pharmacopoeia. In: Bauchot, R. (edit) Snake in natural history. New York: **Sterling publishing Co**. 1997.

BORDON, K.C.F. et al. Enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, 94, 2740–2748. 2012.

BRAGA, M.D.M. **Avaliação dos efeitos vasculares e renais do veneno de *Bothrops isularis* e frações isoladas**. Tese (Doutorado em farmacologia) – Pós-graduação em farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BRANDEHOFF, N. et al. First reported case of thrombocytopenia from a *Heterodon nasicus* envenomation. **Denver**. 157:12-17. **Toxicon**.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Animais peçonhentos – Utilização racional de antivenenos**. Brasília. 2017. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/component/content/article/42012-animais-peconhentos-utilizacao-racional-de-antivenenos>. Acesso em: Julho 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª ed. Brasília. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. 2ª ed. Brasília. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Brasil copatrocinou para o problema dos acidentes ofídicos no mundo**. Brasília. 2018a. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/svs/43413-brasil-copatrocinou-resolucao-para-o-problema-dos-acidentes-ofidicos-no-mundo>. Acesso em: Julho 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológicas – Dados**. Brasília. 2018b. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13712-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: Julho de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos**. Brasília. 2019. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>. Acesso em: Julho 2019.

BRAZIL, V. A defesa contra o ophidismo. **Pocai and Weiss**, São Paulo, 1911.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, 82, 851–859. 2000.

BRECHT, A.; GAUGLITZ, G. Optical probes and transducers. **Biosens. Bioelectron.** 10, 923. 1995.

CALVETE, J.J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Lett.** 583:1736–1743. 2009.

CARNEIRO, A.S. et al. Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**. 40:1571–1579. 2002.

CASEWELL, N.R. et al. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. **Molecular Biology and Evolution**, 28, 2637–2649. 2011.

CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR – Uma nova ferramenta para biossensores. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 1, 97-104, 2003

CASEWELL, N.R. et al. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 9205–9210. 2014.

- CAUCHETEUR, C.; GUO, T.; ALBERT, J. Review of plasmonic fiber optic biochemical sensors: improving the limit of detection. **Anal Bioanal Chem.** 407(14):3883–97. 2015.
- CGD – Center for Global Development. Technology and Development. 2019. Disponível em: <https://www.cgdev.org/>. Acesso em: Outubro de 2019.
- CHANG, L.; PIKAL, M. J. Mechanism of protein stabilization in the solid state. **J Pharm Sci.** v. 98. No. 9. 2009.
- CEVALLOS, M.A. et al. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Toxicon**, 30, 925–930. 1992.
- CHIPPAUX, J.P., WILLIAMS, V. & WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29, 1279–1303. 1991.
- CLARK, L.C.; LYONS, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring Cardiovascular Surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 102, 29-45. 1962.
- COSTA, H. C.; BERNELIS, R. S. **Répteis do Brasil e suas unidades federativas: lista de espécies.** 2018. Disponível em: [www.sbherpetologia.org.br/](http://www.sbherpetologia.org.br/). Acesso em: Junho de 2019.
- COUSIN, X. et al. Identification of a novel type of alternatively spliced exon from the acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. Molecular forms of acetylcholinesterase in the snake liver and muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, 273, 9812–9820. 1998.
- CREMER, M. Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von den polyphasischen Elektrolytketten. **Z. Biol.** (Munich) 47, 562–608. 1906.
- DANILOVA, N.; AMEMIYA, C. T. Going adaptive. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1168(1) 130–155. 2009.
- DE PAULA, FF et al. Molecular characterization of metalloproteases from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.** v. 12. 2014
- DE TONI, L. G. et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n.1, 2015.
- DHANAMMA JAGLI et al, Venom Detector: A Smart approach to detect Snake Venom. **International Journal of Computer Science and Information Technologies (IJCSIT)**, Vol. 5 (1), 35-37. 2014.

DURBAN, J. et al. Integrated 'omics' profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. **BMC Genomics**, 14, 234. 2013.

Encyclopaedia Britannica. **Classes of Immunoglobulins**. 2019. Disponível em: <https://www.britannica.com/science/immune-system>. Acesso em: Julho de 2019.

FARKA, Z. et al. Nanoparticle based immunochemical biosensors and assays: recent advances and challenges. **Chem Rev.**;117(15):9973–10042. 2017

FARSKY, S.H. et al. Leukocyte response induced by Bothrops jararaca crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**. 35:185–193. 1997.

FERREIRA, B. F. et al. Molecular cloning and pharmacological properties of an acid PLA2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxins**, v. 5. 2013.

FERNANDES, T. A.; AGUIAR, C. N.; DAHER, E. F. Envenenamento crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2008

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (Orgs). **Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1ª ed. São Paulo: Sarvier, cap. 3, p. 13-32. 2003.

FRY, B.G. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Molecular & Cellular Proteomics**, 7, 215–246. 2008.

GHASEMI, S et al. Amperometric hydrazine sensor based on the use of Pt-Pd nanoparticles placed on reduced graphene oxide nanosheets. **Mikrochim Acta**. Aug 3;186(9):601. 2019.

GHAZARIAN, N.A. et al. Phospholipase A2 from viperidae snakes: differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. **Biochim Biophys Acta**. v. 1848, 2015.

GRIFFIN, E.G. AND NELSON, J.M. The influence of certain substances on the activity of invertase. **J. Am. Chem. Soc.** 38, 722–730. 1916.

GREEN, R. J. et al. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. **Biomaterials**. 21, 1823. 2000.

GREENE, H.W. **Snakes: The Evolution of Mystery in Nature**. University of California Press, Berkeley. 1997.

GSI – Global Snakebite Initiative. **Snakebite in the Americas**. Disponível em: <[http://www.snakebiteinitiative.org/?page\\_id=699](http://www.snakebiteinitiative.org/?page_id=699)>. Acesso em: Julho de 2019.

GUILBAULT, G.G.; MONTALVO JR, J.G. Urea-specific enzyme electrode. **J. Am. Chem. Soc.** 91, 2164–2165. 1969.

GUO, M.P.; WANG, Q.C.; LIU, G.F. Pharmacokinetics of cytotoxin from chinese cobra (*naja naja atra*) venom. **Toxicon**, 31, 339–343. 1993.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. **Clinical Pharmacokinetics**, 42:721–741. 2003.

HANVIVATVONG, O.; MAHASANDANA, S.; KARNCHANACHETANEE, C. Kinetic study of russell's viper venom in envenomed patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 57, 605–609. 1997.

HARRISON, R.A. Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 3, e569. 2009.

HEINEMAN, W.R.; JENSEN, W.B. Leland C. Clark Jr. (1918-2005). **Biosensors and Bioelectronics**, 21(8), 1403-1404. 2006. doi:10.1016/j.bios.2005.12.005

HERATH, H.M.N.J. et al. Chronic kidney disease in snake envenomed patients with acute kidney injury in Sri Lanka: A descriptive study. **Postgrad. Med. J.** 2012.

HOMOLA, J.; YEE, S.S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 54(1–2):3 – 15, 1999.

HUGHES, W.S. The potential difference between glass and electrolytes in contact with the glass. **J. Am. Chem. Soc.** 1922. 44, 2860–2867

HUNT, P. Neglected diseases: a human right analysis. n.6. Social, economic and behavioural (SEB) research. **WHO**. 2007.

IJJIMA, M. et al. Nano-Visualization of Oriented-Immobilized IgGs on Immunosensors by High-Speed Atomic Force Microscopy, **Sci. Rep.**, 2012, 2, 790.

ISBISTER, G.K. Snakebite in Australia: a practical approach to diagnosis and treatment. **MJA**. 2013.

IYER, L. K. et al. Process of formulation effects on protein structure in lyophilized solids using mass spectrometric methods. **J Pharm Sci.** 105(5): 1684-1692. 2016.

JACKSON, T. N. W. et al. Endless forms most beautiful: the evolution of ophidian oral glands, including the venom system, and the use of appropriate terminology for homologous structures. Berlin. **Springer Zoomorphology**. 2016.

JAYAWARDANA, S.; ARAMBEPOLA, C.; CHANG, T.; GNANATHASAN, A. Long-term health complications following snake envenoming. **J. Multidiscip. Healthc.** 2018, 11, 279–285.

JAIN, P.K.; LEE, K.S.; EL-SAYED, I.H.; EL-SAYED, M.A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape and

Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. **J. Phys. Chem. B** 2006, 110, 7238–7248

JORGE R.J.B., et al. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **J Proteomics**. v. 30(114):93-114. 2015.

JOSHI, P. P.; YOON, S. J.; HARDIN, W. G.; EMELIANOV, S.; SOKOLOV, K. V. Conjugation of Antibodies to Gold Nanorods through Fc Portion: Synthesis and Molecular Specific Imaging, **Bioconjugate Chem**. 2013, 24, 878–888.

KADOYA, S. et al. Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharidederived sugar alcohols. **Int J Pharm**. 389:107-13. 2010.

KANG, B.; AFIFI, M.M.; AUSTIN, L.A.; EI-SAYED, M.A. Exploiting the Nanoparticle Plasmon Effect: Observing Drug Delivery Dynamics in Single Cells via Raman/Fluorescence Imaging Spectroscopy. **ACS Nano**. 7, 7420–7427. 2013.

KASTURURATNE, A.; PATHMESWARAN, A. WICKREMASINGHE, A.R. et al. The sócio-economic burden of snakebite envenoming in Sri Lanka. **PLoS Negl Trop Dis**. 2017.

KERKKAMP, H.M.I.; CASEWELL, N.R.; VONK, F.J. Evolution of the Snake Venom Delivery System. In: **Evolution of Venomous Animals and Their Toxins**, (ed. by P. Gopalkrishnakone & A. Malhotra), pp. 1–11. Living Reference Work, Springer, Dordrecht. 2015.

KHIN, O. et al. Russell's viper venom levels in serum of snake bite victims in burma. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**. 1984, 78, 165–168. 1984.

KIM, E. S. Synergetic effect of orientation and lateral spacing of protein G on an on-chip immunoassay. Korea. **Anlayst**. 137: 2421-2430. 2012.

KRETSCHMANN, E.; KROGER, E. Reflection and Transmission of light by a rough surface, including results for surface-plasmon effects. **Journal of Optical Society of America**, 65, n.2, 1975.

KULAWICKRAMA, S. et al. Development of a sensitive enzyme immunoassay for measuring taipan venom in serum. **Toxicon**. 55, 1510–1518. 2010.

LABORDE, H.M.; LIMA, A.M.N.; LOUREIRO, F.C.C.L.; THIRSTRUP, C.; NEFF, H. Adsorption, kinetics and biochemical interactions of biotina at the gold-water interface. **Thin solids Films**, 540, 2013.

Laing GD, Clissa PB, Theakston RDG, Moura-da-Silva AM, Taylor MJ. 2003. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase induced skin necrosis. **Eur J Immunol**. 33:3458–3463.

LE MOS, J. C.; ALMEIDA, T. D.; FOOK, S. M. L.; PAIVA, A. A.; SIMÕES, M. O. S. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e

Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 50-59, 2009.

LEE, M. L. et al. King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses PC-3 solid tumor growth in a tumor xenograft mouse model. **Int J Med Sci**, v.6, 2014.

LEE, Jeong-O et al. Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. **Anal Bioanal Chem**, v.390, p.1023-1032, 2008.

LI, D. et al. Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of Escherichia coli O157:H7. **Analytica Chimica Acta** 687 (2011) 89–96

LIN, P. C. et al. Fabrication of Oriented Antibody-Conjugated Magnetic Nanoprobes and Their Immunoaffinity Application, **Anal. Chem**, 2009, 81, 8774–8782.

LIGLER, F. S.; TAITT, C.A.R. Optical Biosensors: Present and Future. **Elsevier Science B.V**; Amsterdam: 2002.

LIU, J.; CAO, Z.; LU, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. **Chem Rev**, v.109, n.5, p.1948-1998, 2010.

LOMONTE, B. et al. Neutralization of Bothrops asper venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**. 54:1012–1028. 2009.

LOUREIRO, F.C.C. L. **Uso de biossensor óptico no estudo de sistemas microfluídicos com, e sem, adsorção biomolecular**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências no Domínio da Engenharia Elétrica) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2014.

LYNCH, V.J. Inventing an arsenal: adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A2 genes. **BMC Evolutionary Biology**, 7, 2. 2007.

MALEKI, L. A. et al. Future prospects of monoclonal antibodies as magic bullets in immunotherapy, **Human Antibodies** 22(1–2) 9–13. 2013.

MALEKI, L. A. et al. Generation and characterization of anti-CD34 monoclonal antibodies that react with hematopoietic stem cells, **Cell Journal** 16(3) 361–366. 2014.

MALEKI, L. A. et al. Phage display as a promising approach for vaccine development, **Journal of Biomedical Sciences** 23(1) 66. 2016.

MALEKI, L. A. et al. Isolation and characterization of anti ROR1 single chain fragment variable antibodies using phage display technique, **Human Antibodies** 25 (1-2) 57–63. 2017.

MARQUES, R. C. B. **Imunossensores eletroquímicos para diagnóstico precoce e descentralizado do cancro de mama**. 2013. (Dissertação de Mestrado) Instituto Superior de Engenharia do Porto – ISEP, 2013.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. Lithuania. **Biosensors and bioelectronics**. 50: 460-471. 2013.

MAYER, K.M.; HAFNER, J.H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. **Chem. Rev**, 111, 3828–3857. 2011.

MCDONNELL, J. M. Surface Plasmon Resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. **Current opinion in Chemical Biology**. 5: 572-577. 2001. Disponível em: [http://ibid.uchicago.edu/undergrad\\_programs/pdf/issraRashed.pdf](http://ibid.uchicago.edu/undergrad_programs/pdf/issraRashed.pdf). Acesso em: Julho de 2019.

MELGAREJO, A. R. Criação e manejo de serpentes. Ed. FioCruz. **SciELO Books**. 2002.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v.20, p.1113-1126, ago 2004.

MENEGUCCI, R.C. et al. Envenomation by an opisthoglyphous snake, *Erythrolamprus aesculapii* (Dipsosidae) in southeastern Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**. Vol. 52:e20190055: 2019.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, characteristics, and potential applications of electrochemical Biosensors. v. 20, n. **Anal. Sci**. August, 2004.

MOHSENI, S. et al. Development of a label-free SPR sensor for detection of matrix metalloproteinase-9 by antibody immobilization on carboxymethyl dextran chip. **Biosens Bioelectron**. 81:510-516. 2016.

MORGENSTERN, D.; KING, G. F. The venom optimization hypothesis revisited. **Toxicon**, 2013.

MOSHARRAF, M.; MALMBERG, M.; FRANSSON, J. Formulation, lyophilization and solid state properties of a pegylated protein. **Int J Pharm**. 336:215-32. 2007.

MOURA-DA-SILVA, A.M. et al. Diversity of metalloproteinases in Bothrops neuwiedi snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. **BMC Genetics**, 12, 94. 2011 .

MIWA, A.C.P. **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para a determinação de proteínas em lagoas de estabilização**. (Dissertação apresentada para aquisição de título de mestrado). 2003. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-17042006-142148/publico/Miwa.pdf>. Acesso em: junho de 2019.

MUSTAFAOGLU, N., KIZILTEPE, T., AND BILGICER, B. Site-specific conjugation of an antibody on a gold nanoparticle surface for one-step diagnosis of prostate specific antigen with dynamic light scattering. **Nanoscale** 9, 8684-8694. 2017.

NAUMAN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by a LAAO from *Bothrops leucurus* venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, 2011.

NASIRI, Z. H. et al. Production and purification of polyclonal antibody against F(ab')<sub>2</sub> fragment of human immunoglobulin G. **Veterinary Research Forum** 8(4) 307–312. 2017.

NAYAK, M.; KOTIAN, A.; MARATHE, S.; CHAKRAVORTTY, D. Detection of microorganisms using biosensors—a smarter way towards detection techniques. **Biosens. Bioelectron.** 2009.

NELSEN, D.R.; KELLN, W.; HAYES, W.K. Poke but don't pinch: Risk assessment and venom metering in the western black widow spider, *Latrodectus hesperus*. **Anim. Behav.** 89, 107–114. 2014.

NELSON, J.M. AND GRIFFIN, E.G. Adsorption of invertase. **J. Am. Chem. Soc.** 38, 1109–1115. 1916.

NGUYEN, H. H.; PARL, J.; KANG, S.; KIM, M. Surface Plasmon Resonance: a versatile technique for biosensors applications. Korea. **Sensors.** 2015.

NIELSEN, M.P.; ASHFAR, A.; CADIEN, K.; ELEZZABI, A.Y. Plasmonic materials for metal-insulator-semiconductor-insulator-metal nanoplasmonic waveguides on silicon-on-insulator platform. **Opt. Mater.** 36, 294–298. 2013.

NISANI, Z.; HAYES, W.K. Defensive stinging by *Parabuthus transvaalicus* scorpions: risk assessment and venom metering. **Anim. Behav.** 2011, 81, 627–633.

NUNES, E. A. C. et al. Estudo da Neutralização dos componentes do veneno da serpente *Bothrops erythromelas*. In: **Prospecção de Moléculas Bioativas em animais e plantas: uma visão biotecnológica**. Gonçalves, R. M.; Frihling, B. E. F. Migliolo, L (Org.). Capítulo de livro. Atena Editora, p. 79-93 2019.

NÚÑEZ, V. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **J Proteomics.** 73:57–78. 2009.

OKUDA et al. Comparative Biochemistry of Disintegrins Isolated from Snake Venom: Consideration of the Taxonomy and Geographical Distribution of Snakes in the Genus *Echis*. Tokyo. **J. Biochem**, 129. 615-620. 2001.

O'LEARY, M.A. et al. Enzyme immunoassays in brown snake (*pseudonaja* spp.) envenoming: Detecting venom, antivenom and venom-antivenom complexes. **Toxicon.** 48, 4–11. 2006.

O'SHANNESY, D J.; BRIGHAM-BURKE, M.; PECK, K. Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. **Anal Biochem.** Aug 15;205(1):132-6. 1992.

OZBOYACI, M.; KOKH, D. B.; CORNI, S. WADE, R. C. Modeling and simulation of protein-surface interaction: achievements and challenges. **Quarterly Reviews of Biophysics.** 49, e4, pg 1-45. 2016a.

OZBOYACI, M.; CORNI, S. WADE, R. C. Three steps to gold: mechanism of protein adsorption revealed by Brownian and molecular dynamics simulations. **Phys. Chem. Chem. Phys.** 2016b.

PADDLE, B.M. Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. **Biosens. Bioelectron.** 11, 1079–1113. 1996.

PAN, M. Y. et al. Resonant position tracking method for smartphone-based surface plasmon sensor. **Anal Chim Acta.** Nov 22;1032:99-106. 2018.

PAN, M. Y. et al. Spectral contrast imaging method for mapping transmission surface plasmon images in metallic nanostructures. **Biosensors and Bioelectronics.** 2019.

PAROLO, C.; DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; POLO, E.; GRAZÚ, V.; DE LA FUENTE, J. M.; MERKOÇI, A. Design, Preparation, and Evaluation of a Fixed-Orientation Antibody/Gold-Nanoparticle Conjugate as an Immunosensing Label. **ACS Appl. Mater. Inter.** 5, 10753-10759. 2013.

PATHAK, P.; KATIYAR, V.K. Multi-Functional Nanoparticles and Their Role in Cancer Drug Delivery – A Review, 3, 1-17, 2007a. Disponível em: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1903>. Acesso em: Julho de 2019.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **AZojono Journal of Nanotechnology Online**, v.3, set 2007b.

PISARCHICK, M. L.; GESTY, D.; THOMPSON, N. L.; Binding kinetics of an anti-dinitrophenyl monoclonal Fab on supported phospholipid monolayers measured by total internal reflection with fluorescence photobleaching recovery. **Biophys. J.** 63, 215, 1992.

POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the proteins. *British Journal of Experimental Pathology*, 1939a, 20:132–149.

POPE, C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *British Journal of Experimental Pathology*, 1939b, 20:201–212.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados.** Atheneu editora. São Paulo. 4 ed. 2008.

QING, X. et al. Piezoelectric Transducer-Based Structural Health Monitoring for Aircraft Applications. **Sensors** (Basel). Jan 28;19(3). 2019.

RAITERI, R.; GRATTAROLA, M.; BERGER, R. Micromechanics Senses Biomolecules. **Materials Today**, p.22-29, jan 2002.

RAMALHO, M. G. Acidentes com animais peçonhentos e assistência em saúde. Centro Universitário de Brasília. Brasília, 2014.

RICH, L. R.; MYSZKA, D. G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. **Curr. Opin. Biotechnol.**11, 54. 2000.

RUIZ, G. et al. pH impacts the orientation of antibody adsorbed onto gold nanoparticles. Illinois. **Bioconjugate chemistry**. 2019.

SAGLE, L.B.; RUVUNA, L.K.; RUEMMELE, J.A.; VAN DUYNE, R.P. Advances in localized surface plasmon resonance spectroscopy biosensing. **Nanomedicine**. 6, 1447–1462. 2011.

SANHAJARIYA, S.; DUFFULL, S. B.; ISBISTER, G. Pharmacokinetics of Snake venom. Australia. **Toxins**. 10: 73. 2018.

SADEGHI, S.; AGHEBATI-MALEKI, L.; NOZARI, S.; MAJIDI, J. A methodological approach for production and purification of polyclonal antibody against dog IgG, **Veterinary Research Forum**. January 2018.

SÁNCHEZ, J. E. H. **Assembly of a surface plasmon resonance (spr) spectrometer for the characterization of thin organic films**. Master's thesis, Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2013

SCHENDEL, V. et al. The Diversity of Venom: The Importance of Behavior and Venom System Morphology in Understanding Its Ecology and Evolution. **Toxins**, v. 11, n. 11, 2019.

SELVANAYAGAM, Z. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: Review on recent trends (1987–1997). **Toxicon** 37, 565–586. 1999.

SAHA, B.; EVERS, T. H.; PRINS, M. W. J. How Antibody Surface Coverage on Nanoparticles Determines the Activity and Kinetics of Antigen Capturing for Biosensing. **Anal. Chem.** 86, 8158-8166. 2014.

SAHA, B.; SONGE, P.; EVERS, T. H.; PRINS, M. W. J. The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles. **Analyst**. 142, 4247. 2017.

SALOMÃO, MG, ALBOLEA, ABP, ALMEIDA-SANTOS, SM. Colubrid snakebite: a public health problem in Brazil. **Herpetol Rev.** 34(3):307-312. 2003.

SALOMÃO, M.G.; LUNA, K.P.O.; MACHADO, C. Epidemiologia por animais peçonhentos e a distribuição de soros: estado da arte e a situação mundial. **Ver. Salud Publica**. 20 (4): 523-529, 2018.

SANO-MARTINS, I.S. et al. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the south american rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. **QJM** 94, 551–559. 2001.

SANTOS et al. **Serpentes de interesse médico da Amazônia: biologia, venenos e tratamento de acidentes**. Manaus: UA/SESU, 1995. Disponível em: <http://eco.ib.usp.br/labvert/Serpentes-de-Interesse-Medico-da-Amazonia.pdf>. Acesso em: Julho de 2019.

SAGLE, L.B.; RUVUNA, L.K.; RUEMMELE, J.A.; VAN DUYN, R.P. Advances in localized surface plasmon resonance spectroscopy biosensing. **Nanomedicine**. 6, 1447–1462. 2011.

SCHASFOORT, R. B. M.; TUDOS, A. J. Handbook of surface plasmon resonance. **RCS Publishing**, 2008

SELVANAYAGAM, Z.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: Review on recent trends (1987–1997). **Toxicon**, 37, 565–586. 1999.

SHARMA, T.K. et al. Moving forward in plant food safety and security through nanobiosensors: adopt or adapt biomedical technologies? **Proteomics**. 15, 1680–1692. 2015.

SILVA, A. et al. Neurotoxicity in Sri Lankan Russell's Viper (*Daboia russelii*) Envenoming is Primarily due to U1- viperitoxin-Dr1a, a Pre-Synaptic Neurotoxin. **Neurotoxicity Research**. 31, 11–19. 2017.

SILVEIRA, P.V. P.; NISHIOKA, S. A. Non-venomous snake bite and snake bite without envenoming in a Brazilian teaching hospital, analysis of 91 cases. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo. 34(6):499-503. 1992.

SILVEIRA, P.V.; NISHIOKA, S.D.A. Venomous snake bite without clinical envenoming ('dry-bite'). A neglected problem in Brazil. **Trop. Geogr. Med**. 47, 83–85. 1995.

SIRIWARDANA, K. et al. Probing the Effects of Cysteine Residues on Protein Adsorption onto Gold Nanoparticles Using Wild Type and Mutated GB3 Proteins. **Langmuir** 29, 10990-10996. 2013.

SJOSTROM, L. et al. Development and clinical application of immunoassays for European adder (*Vipera berus berus*) venom and antivenom. **Toxicon**. 34, 91–98. 1996.

SKLÁDAL, P. Piezoelectric biosensors. **Trends Anal Chem**. 79: 127–33. 2016.

SLAGBOOM, J. et al. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **BJH**. 2017.

- SONG, H. Y.; ZHOU, X.; HOBLEY, J.; SU, X. Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization as Measured by Dual Polarization Interferometry and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, **Langmuir**. 28, 997–1004. 2012.
- SPILLER, H.A.; BOSSE, G.M.; RYAN, M.L. Use of antivenom for snakebites reported to United States poison centers. **Am J Emerg Med**. 28. 2010.
- STABELI, R. G. et al. Cytotoxic LAAO from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int J. Biol. Macromol**, v. 41, 2007.
- STEINER, G.; SABLINSKAS, V.; HÜBNER, A.; KUHNE, C.; SALZER, R. Surface plasmon resonance imaging of microstructured monolayers. **J Mol. Struct.** 509, 265. 1999.
- SUN, M.T.; XU, H.X. A Novel Application of Plasmonics: Plasmon-Driven Surface-Catalyzed Reactions. **Small**. 8, 2777–2786. 2012.
- TAN, C. H.; TAN, N. H. Toxinology of Snake Venom: The malaysian contexto. Malaysia. Springer Science, **Snake Venoms**. 2015.
- TANG X, PIKAL MJ. The effect of stabilizers and denaturants on the cold denaturation temperatures of proteins and implications for freeze-drying. *Pharm Res*. 22:1167-75. 2005.
- TAO, Y et al. A nickel foam modified with electrodeposited cobalt and phosphor for amperometric determination of dopamine. **Mikrochim Acta**. Aug 4;186(9):602. 2019.
- TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. Australia. 9, 290. MDPI. **Toxins**. 2017.
- THAMM, S.; CSÁKI, A.; FRITZSCHE, W. LSPR detection of nucleic acids on nanoparticle monolayers. **Methods Mol Biol**. 1811:163-171. 2018.
- THEAKSTON, R.D.G. The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (elisa), to snake venom research. **Toxicon**, 21, 341–352. 1983.
- THIRSTRUP, C. et al. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. Denmark. **Sensor and Actuators B**. 100: 298-308. 2004.
- TEIXEIRA, C. F. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**. 42:947–962. 2003.
- UETZ, P.; HOŠEK, J. **The Reptile Database**. 2018. Disponível em: [www.reptile-database.org](http://www.reptile-database.org). Acesso em: março de 2019.
- UPDICK, S. J.; & HICKS, G. P. The Enzyme Electrode. **Nature**, 214(5092), 986-988. 1967a.

UPDICK, S. J.; & HICKS, G. P. Reagentless Substrate Analysis with immobilized Enzyme. **Science**, v. 158. p. 270-272. 1967b.

VALEDEKARIMI, Z. et al. Production and characterization of anti-human IgG F(ab')<sub>2</sub> antibody fragment. Iran. **Human Antibodies**. 1: 1-6. 2018.

VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>. Acesso em: Jun 2019.

VAN DORST, B. et al. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: a review. **Biosens. Bioelectron**. 26, 1178–1194. 2010.

VAN DER HEIDE, S., AND RUSSELL, D. A. Optimisation of immuno-gold nanoparticle complexes for antigen detection. **J. Colloid Interface Sci**. 471, 127-135. 2016.

VIDAL, N.; RAGE, J. C.; COULOUX, A.; HEDGES, S.B. Snakes (Serpentes). In: **The Timetree of Life** (eds. by S.B. Hedges & S. Kumar), pp. 390–397. Oxford University Press, New York. 2009.

VETTER, I. et al. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. **Amino Acids** 40, 15e28. 2011.

VONK, F.J. et al. Evolutionary origin and development of snake fangs. **Nature**, 454, 630–633. 2008.

VONK, F.J. et al. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 20651–20656. 2013.

XIONG, S.; HUANG, C. Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms. **Toxicol. Lett**. 287, 142–154. 2018.

XU, M.; WANG, R.; LI, Y. Electrochemical bisensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Talanta**.v.162. p. 511-522. 2017.

XU, H. et al. Orientation of a Monoclonal Antibody Adsorbed at the Solid/solution Interface: A Combined Study Using Atomic Force Microscopy and Neutron Reflectivity, **Langmuir**, 22, 6313–6320. 2006a.

XU, H.; LU, J. R.; WILLIAMS, D. E. Effect of Surface Packing Density of Interfacially Adsorbed Monoclonal Antibody on the Binding of Hormonal Antigen Human Chorionic Gonadotrophin, **J. Phys. Chem. B**, 110, 1907–1914. 2006b.

WANG, D. et al. Recent advances in Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors. **J Sensors**. 2019.

WANG, D-SHIN; FAN, SHIH-KANG. Microfluidic surface plasmon resonance sensors: from principles to point-care applications. **Sensors**, 16, 1175, 2016.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm.*203:1-60. 2000a.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.16, p.3011-3016, 2000.

WANG, H.; CASTNER, D. G.; RATNER, B. D.; JIANG, S. Probing the Orientation of Surface-Immobilized Immunoglobulin G by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. **Langmuir**, 20, 1877–1887. 2004.

WANG, L.; KHAN, T.; MOHANTY, K.; GHOSH, R. Cascade ultrafiltration bioreactor-separator system for continuous production of F (ab')<sub>2</sub> fragment from immunoglobulin G. **Journal of Membrane Science**. 351(1) 96–103. 2010.

WARRELL, D. A. Snake bite. Seminar. **The Lancet**. 375: 77-88. 2010.

WARREL, D. A. Venomous bite, stings, and poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 207-223, 2012.

WEI, X. et al. A calorimetric sensor for determination of cysteine by carboxymethyl cellulose-functionalized gold nanoparticules. China. **Analytica Chimica Acta**. 671: 80-84. 2010.

WELCH, N. G.; SCOBLE, J. A.; MUIR, B. W.; PIGRAM, P. J. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). **Biointerphases** 12, 02D301. 2017. Doi: 10.1116/6.4978435

WHO - World Health Organization. **Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa**. 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204458/1/9789290231684.pdf?ua=1>. Acesso em: December 2018.

WHO - World Health Organization. **Global snakebite burden**. Seventy-First World Health Assembly, World Health Organization. 2018.

WISEMAN, M. E.; FRANK, C. W. Antibody adsorption and orientation on hydrophobic surfaces. Stanford. **Langmuir**. 28:1765-1774. 2012.

YAN, J. et al. Active Monitoring of Fatigue Crack in the Weld Zone of Bogie Frames Using Ultrasonic Guided Waves. **Sensors** (Basel). Jul 31;19(15). 2019.

YANG, L.; BASHIR, R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. **Biotechnol Adv.** Mar-Apr;26(2):135-50. 2008

YANG, Z., Kasprzyk-Hordern, B., Frost, C.G., Estrela, P. and Thomas, K.V. Community sewage sensors for monitoring public health. **Environ. Sci.Technol.** 49, 5845–5846. 2015.

YAO, G.-H. et al. Target-triggering multiple-cycle amplification strategy for ultrasensitive detection of adenosine based on surface plasma resonance techniques. **Anal. Chem.** 87, 929-936, 2015.

YOO, E.H.; LEE, S.Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. **Sensors**. 10, 4558–4576. 2010.

YOUNG, B.A.; LEE, C. E.; DALEY, K. M. Do snakes meter venom? **Bioscience** 52:1121-1126. 2002.

ZAQUEO, K. D. Isolation and biochemical characterization of a new throbinlike serine protease from *bothrops pirajai* snake venom. **Biomed Res Int**. v. 2014, 2014.

# ANEXO

## ANEXO I

### Protocolos clínicos revisados:

O protocolo clínico para acidente por serpente da família Elapidae, gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* “Coral Verdadeira” está disponível em: <

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/13/Protocolo-cl-nico---Acidente-por-serpente-da-fam--lia-Elapidae.pdf>>; acesso em: Julho de 2019.

O protocolo clínico para acidente por aranha do gênero *Phoneutria* - “Aranha Armadeira” está disponível em: <

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/13/Protocolo-cl-nico---Acidente-por-aranha-do-g--nero-Phoneutria.pdf>>; acesso em: Julho de 2019.

O protocolo clínico para acidente por aranha do gênero *Loxosceles* - “Aranha Marrom” está disponível em: <

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/13/Protocolo-cl-nico---Acidente-por-aranha-do-g--nero-Loxosceles.pdf>>; acesso em: Julho de 2019.

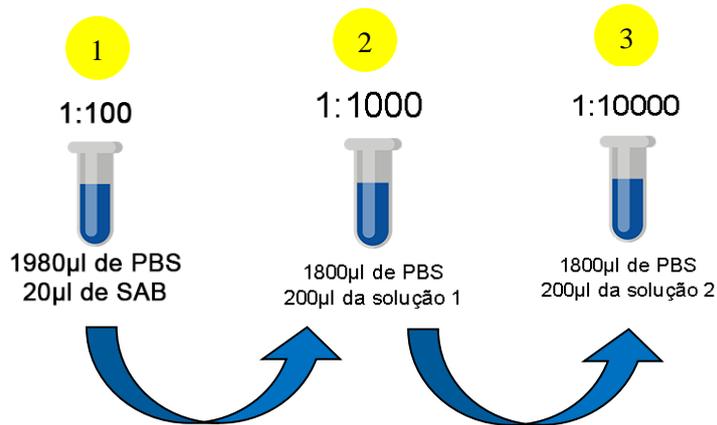
**Todos os demais protocolos clínicos podem ser encontrados no seguinte link:**

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/14/Manual-de-Diagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf>>; acesso em: Julho de 2019.

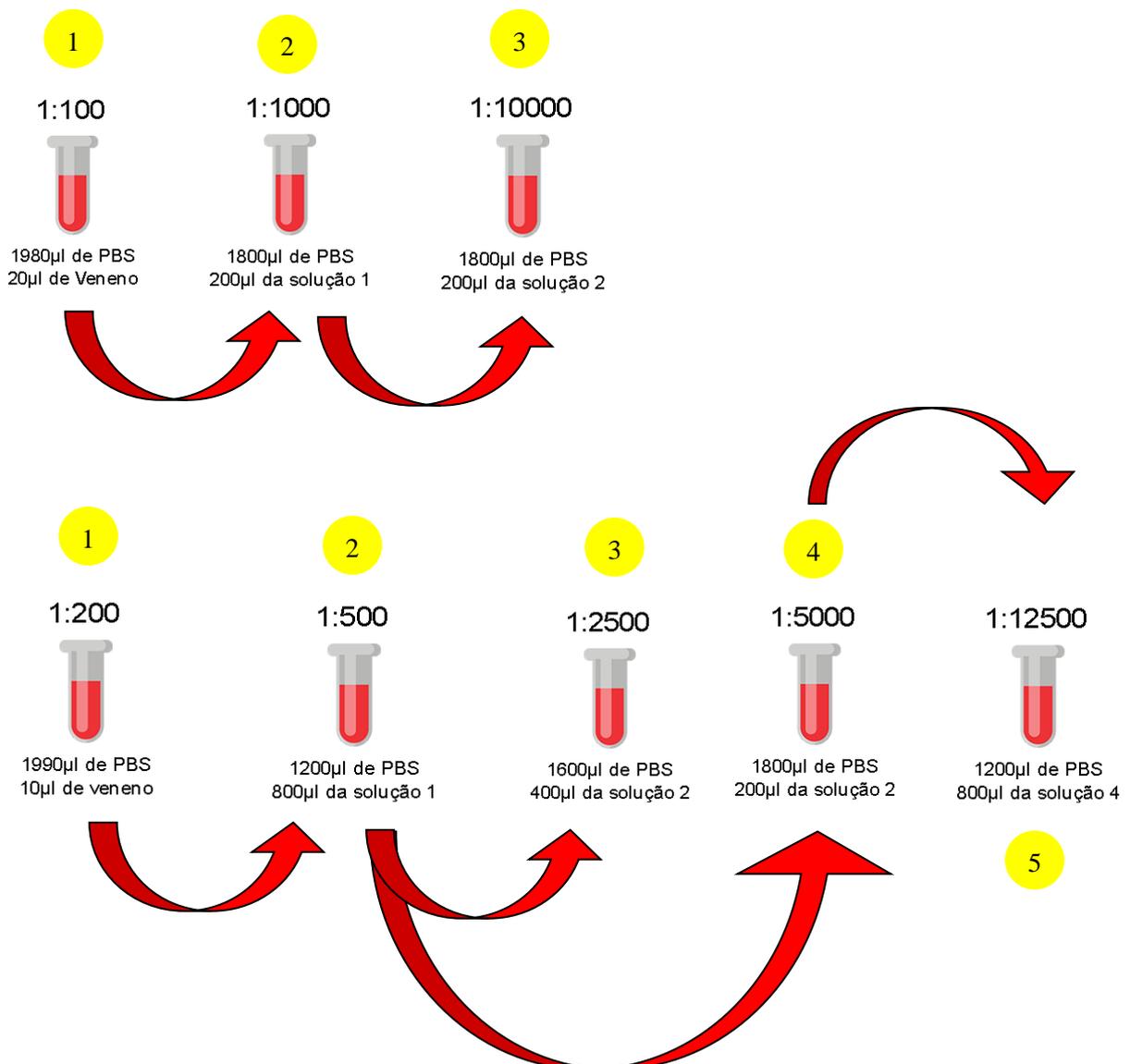
# APÊNDICES

## APÊNDICE I

**Diluição do soro anti-bothrópico (SAB), para um volume final de 2000µl.**



**Diluição dos Venenos, para um volume final de 2000µl.**



**Cálculos:**

$$1/200 \times 800/2000 (2/5) = 2/1000 (1/500)$$

$$1/500 \times 200/2000 (1/10) = 1/5000$$

$$1/500 \times 400/2000 (1/5) = 1/2500$$

$$1/5000 \times 800/2000 (2/5) = 2/25000 (1/12500)$$

## APÊNDICE II

### **Diluição da amostra liofilizada de veneno crotálico**

Para 100mg de veneno crotálico, utilizou-se 1ml de Água Ultra Pura.

