



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br

ELY SUNEY FERREIRA BORGES

**DETECÇÃO DA PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas* PELA INTERAÇÃO
ANTICORPO-ANTÍGENO EM UM BIOSENSOR RPS**

João Pessoa - PB

2024

ELY SUNEY FERREIRA BORGES

**DETECÇÃO DA PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas* PELA INTERAÇÃO
ANTICORPO-ANTÍGENO EM UM BIOSSENSOR SPR**

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 parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientadora: Profa. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna

Coorientador: Prof. Dr. Jomar Sales Vasconcelos

João Pessoa - PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B732d Borges, Ely Suney Ferreira.

Detecção da peçonha de Bothrops erythromelas pela interação anticorpo-antígeno em um biossensor RPS / Ely Suney Ferreira Borges. - João Pessoa, 2024.

46 f. : il.

Orientação: Karla Patrícia de Oliveira Luna.

Coorientação: Jomar Sales Vasconcelos.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Peçonha de serpente. 2. Biossensor. 3. Interação antígeno-anticorpo. 4. RPS - Ressonância de Plasmons de Superfície. 5. Bothrops erythromelas. I. Luna, Karla Patrícia de Oliveira. II. Vasconcelos, Jomar Sales. III. Título.

UFPB/BC

CDU 591.572.5(043)

ELY SUNEY FERREIRA BORGES

Dissertação de Mestrado avaliada em 23/02/2024

BANCA EXAMINADORA



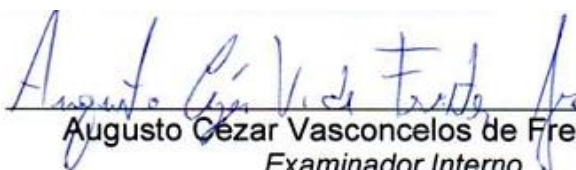
Karla Patrícia de Oliveira Luna
Orientadora

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba



Antonio Marcus Nogueira Lima
Examinador Externo

Departamento de Engenharia Elétrica
Universidade Federal de Campina Grande



Augusto Cezar Vasconcelos de Freitas Júnior
Examinador Interno

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensuravelmente ao Deus Criador e Designer Inteligente, por ter me sustentado em todos os momentos.

À minha querida mãe Maria do Socorro e ao meu pai Eduardo, por me apoiarem.

Às minhas irmãs Elyonara e Elyziane, por sempre estarem comigo, e ao meu cachorrinho Scooby, por me alegrar.

Ao meu doce esposo Ayrton, pelo encorajamento, cumplicidade e amor.

Aos amigos que fazem, e aos que fizeram, parte da minha caminhada acadêmica, de maneira especial à Rayane pela parceria ao longo do mestrado.

À minha orientadora Karla Luna, pela oportunidade que me foi dada desde o início da minha graduação.

Ao meu coorientador Jomar Sales, por toda paciência e disponibilidade.

Ao professor Antonio Marcus, pela contribuição a esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa de estudos.

*Tudo o que fizerem, façam de todo o coração,
como para o Senhor, e não para os homens.*

Colossenses 3:23

RESUMO

Os acidentes ofídicos têm ocorrência global e são considerados como uma doença negligenciada. Entre os países da América do Sul, o Brasil possui o maior índice de envenenamento por serpentes, os quais são ocasionados predominantemente por serpentes do gênero *Bothrops*. A ausência de testes rápidos e seguros capazes de determinar com precisão o tipo de envenenamento ofídico é uma problemática local e também mundial. Diante disso, estudos para o desenvolvimento de sensores que detectam a categoria da serpente causadora do acidente é crucial para que seja realizada uma administração segura do soro antiofídico, tendo em vista que a soroterapia incorreta causa danos à saúde do paciente. Biossensores são aparelhos que possibilitam detectar, medir e amplificar o sinal resultante de interações biológicas. Dentro das classes de biossensores, incluem-se os biossensores ópticos baseados na ressonância de plasmons de superfície, os quais detectam alterações no índice de refração próximo à superfície sensora devido à eventos de ligação específicos, como a interação antígeno-anticorpo. O presente estudo visa desenvolver uma metodologia simples para detecção de peçonha botrópica, através da interação com seus anticorpos correspondentes, utilizando um biossensor óptico de alta sensibilidade; investigando a concentração mínima de peçonha a qual o sensor é capaz de identificar, o tempo final para detecção e a ocorrência ou não ocorrência de reatividade cruzada. Os ensaios compreenderam um arranjo de três camadas sobre uma superfície sensora (formada por uma película de ouro de 50 nm), seguindo a ordem de adição: soro antiofídico, peçonha crotálica e, por último, peçonha botrópica. Foram testadas diferentes concentrações de peçonha bruta de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, iniciando pela concentração de $6,784 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até atingir a concentração mínima detectada pelo biossensor. A capacidade de ligação da peçonha ao soro antiveneno (composto por IgGs) foi investigada em duas concentrações de soro antiofídico: $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Tanto o soro antiofídico quanto as peçonhas ofídicas foram solubilizados em tampão fosfato salino (PBS). Os resultados obtidos evidenciaram uma detecção precisa do antígeno de interesse (a peçonha botrópica), o qual foi testado em diferentes concentrações. O biossensor foi capaz de detectar a peçonha até uma concentração de $0,848 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, não foi detectada interação cruzada entre o soro antibotrópico e a peçonha inespecífica (crotálica). A detecção da peçonha específica (botrópica) ocorreu em tempo satisfatório (até 14 minutos). Os resultados fornecem evidências de que o biossensor e a metodologia empregada podem ser considerados um modelo de diagnóstico em desenvolvimento.

Palavras-chave: biossensor; *Bothrops erythromelas*; interação antígeno-anticorpo; peçonha de serpente; ressonância de plasmons de superfície (RPS)

ABSTRACT

Snakebite accidents have a global occurrence and are considered a neglected disease. Among South American countries, Brazil has the highest rate of snakebite envenomation, predominantly caused by snakes of the *Bothrops* genus. The lack of rapid and reliable tests capable of accurately and quickly determining the type of snakebite envenomation is a local and global issue. Therefore, studies for the development of sensors that detect the category of snake causing the accident are crucial for safe administration of antivenom serum, considering that incorrect serotherapy can harm the patient's health. Biosensors are devices that enable detection, measurement, and amplification of signals resulting from biological interactions. Within the classes of biosensors are optical biosensors based on surface plasmon resonance, which detect changes in the refractive index near the sensing surface due to specific binding events, such as antigen-antibody interactions. This study aims to develop a simple methodology for detecting *Bothrops* venom by interaction with its corresponding antibodies using a highly sensitive optical biosensor; exploring the minimum venom concentration the sensor can identify, the final detection time, and the absence or presence of cross-reactivity. The assays comprise a three-layer arrangement on a sensing surface formed by a 50 nm gold film, following the order of addition: antivenom serum, crotalic venom, and finally, *Bothrops* venom. Different concentrations of crude venom from *Bothrops* and *Crotalus* snake genera were tested, starting from a concentration of 6,784 µg/mL until reaching the minimum concentration detected by the biosensor. The binding capacity of venom to antivenom serum (composed of IgGs) was investigated at two concentrations of antivenom serum: 5 µg/mL and 50 µg/mL. Both the antivenom serum and snake venoms were solubilized in phosphate-buffered saline (PBS). The results obtained demonstrated precise detection of the target antigen, *Bothrops* venom, which was tested at different concentrations. The biosensor was able to detect the venom up to a concentration of 0.848 µg/mL. Furthermore, no cross-reactivity was detected between the antithropic serum and nonspecific venom (crotalic). Specific venom (*Bothrops*) detection occurred within a satisfactory time frame (up to 14 minutes). The results provide evidence that the biosensor and the methodology employed can be considered a developing diagnostic model.

Keywords: biosensor; *Bothrops erythromelas*; antigen-antibody interaction; snake venom; surface plasmon resonance (SPR)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Abundância relativa de espécies de serpentes de importância médica no mundo.....	16
Figura 2 –	Distribuição espacial dos acidentes ofídicos segundo o tipo de serpente, por Município, Brasil, 2022.....	17
Figura 3 –	Proporções relativas das diferentes famílias de proteínas para as peçonhas de Elapidae (esquerda); Viperinae (direita); e Crotalinae (inferior), calculadas em média a partir do número de espécies anotadas entre colchetes.....	19
Figura 4 –	Estrutura de uma molécula de anticorpo. Cadeias leves (amarelo) e cadeias pesadas (verde).....	21
Figura 5 –	Estrutura de uma molécula de anticorpo.....	21
Figura 6 –	Molécula de imunoglobulina clivada por digestão parcial pela papaína, a qual cliva a molécula de imunoglobulina em três partes: dois fragmentos Fab e um fragmento Fc.....	22
Figura 7 –	Gráfico ilustrativo demonstrando as etapas dos ensaios que compõem os resultados.....	30
Figura 8 –	Gráficos da média móvel dos índices de refração do PBS, Soro Antiveneno Botrópico (SAB), Peçonha Crotálica (PC) e da Peçonha Botrópica (PB), em função do tempo. A: SAB 1:100, PC 1:7.500, PB 1:7.500; B: SAB 1:1.000, PC 1:7.500, PB 1:7.500.....	31
Figura 9 –	Gráficos da média móvel dos índices de refração do PBS, Soro Antiveneno Botrópico (SAB), Peçonha Crotálica (PC) e da Peçonha Botrópica (PB), em função do tempo. A: SAB 1:100, PC 1:60.000, PB 1:60.000; B: SAB 1:1.000, PC 1:60.000, PB 1:60.000.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

RPS – Ressonância de Plasmons de Superfície

OMS – Organização Mundial da Saúde

SVDK – Snake Venom Detection Kit

SAB – Soro Antibotrópico

PC – Peçonha Crotálica

PB – Peçonha Botrópica

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sintomatologia dos envenenamentos ofídicos de acordo com o gênero das serpentes.....	20
Tabela 2 –	Pesquisas que desenvolveram técnicas de detecção de peçonha ofídica por diferentes tipos de biossensores.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Epidemiologia dos acidentes ofídicos.....	15
2.2	Serpentes de importância médica.....	16
2.3	Composição da peçonha ofídica.....	17
2.4	Manifestações clínicas dos envenenamentos ofídicos.....	19
2.5	Anticorpos.....	21
2.6	Soro antiofídico.....	22
2.7	Testes de diagnóstico disponíveis.....	23
2.8	Biossensores.....	24
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	Obtenção e armazenamento das peçonhas ofídicas.....	28
4.2	Obtenção e armazenamento do Soro Antiveneno Botrópico (SAB).....	28
4.3	Preparação das amostras.....	28
4.4	Determinação da concentração de estudo da peçonha botrópica e crotálica.....	28
4.5	Biossensor óptico RPS.....	29
4.6	Etapas dos experimentos e exibição dos resultados.....	29
4.7	Local.....	30
5	RESULTADOS.....	31
6	DISCUSSÃO.....	35
7	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Os envenenamentos ocasionados por serpentes são um agravo que pode levar à morte (WHO, 2023), uma vez que as toxinas presentes na peçonha destes animais podem causar danos de diferentes magnitudes aos sistemas fisiológicos (Gutiérrez *et al.*, 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2023), 4,5 a 5,4 milhões de pessoas são picadas por serpentes anualmente. Destes, 1,8 a 2,7 milhões desenvolvem doenças clínicas e 81.000 a 138.000 morrem por complicações. Entretanto, devido à subnotificação, a real extensão e os impactos dos acidentes ofídicos ainda é desconhecido (Silva *et al.*, 2023; Bravo-Vega *et al.*, 2021). No Brasil, as famílias Viperidae (gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias*, *Crotalus* e *Lachesis*) e Elapidae (gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*) compreendem as serpentes peçonhentas de relevância para a saúde pública, e as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pelo maior número dos acidentes (Brasil, 2023).

As peçonhas ofídicas são compostas por até 90% de proteínas; algumas famílias dessas proteínas possuem centenas de isoformas (Oliveira *et al.*, 2022). O envenenamento por serpentes tem o potencial de desencadear paralisia grave (comprometendo a capacidade de respiração), distúrbios hemorrágicos, danos renais permanentes e danificar severamente os tecidos locais, resultando em incapacidades irreversíveis e amputações de membros (WHO, 2023). As manifestações clínicas de envenenamentos ofídicos variam conforme a composição química de cada peçonha; envenenamentos por serpentes da família Elapidae geralmente induzem manifestações neurotóxicas, citotóxicas e cardiotoxícas, enquanto envenenamentos por serpentes da família Viperidae normalmente causam miotoxicidade e hemotoxicidade (Gutiérrez *et al.*, 2017).

Os soros antiofídicos de alta qualidade (que seguem os padrões adequados de produção e são submetidos a uma avaliação rigorosa antes de serem testados em pacientes) representam a abordagem terapêutica mais eficiente para prevenir a maioria dos impactos resultantes do envenenamento ofídico, sendo oficialmente reconhecidos como medicamentos essenciais pela OMS (WHO, 2023). O êxito da terapia antiveneno depende do diagnóstico correto e precoce da serpente envolvida no envenenamento, dessa forma, assegurar acesso a diagnósticos rápidos pode promover melhores resultados (Isbister, 2023). A decisão sobre o soro antiofídico a ser aplicado é baseada nas características clínicas e/ou nas investigações disponíveis no ponto de atendimento, como exames laboratoriais auxiliares (Knudsen *et al.*, 2021). Tendo isso em vista, é crucial o desenvolvimento de testes rápidos, de alta confiabilidade e especificidade com o intuito de detectar o tipo de envenenamento para se obter melhor eficácia no tratamento (Isbister, 2023; Maduwage *et al.*, 2022; de Castañeda *et al.*, 2019).

A produção de biossensores tem contribuído para grandes avanços na área da saúde, dessa forma, há uma crescente necessidade de desenvolver ferramentas de diagnóstico simples, sensíveis e econômicas, como os biossensores, para detectar eficazmente doenças (Haleem *et al.*, 2021). Um interesse progressivo na aplicação de tecnologias de sensores para detecção de serpentes tem sido relatado (Chen *et al.*, 2021). Pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de biossensores capazes de detectar a peçonha ofídica, porém, a aplicação desses ensaios em campo ainda permanece incerta devido a obstáculos como: longo tempo de análise, não reutilização dos chips, equipamentos e reagentes de alto custo, preparação meticulosa do ensaio e necessidade de melhorias na detecção (Teja *et al.*, 2018; Puzari e Mukherjee, 2020; Borges *et al.*, 2020).

Os biossensores são dispositivos analíticos que tornam os sinais biológicos mensuráveis através da medição de alterações geradas pelas interações entre os componentes biológicos, convertendo em sinal elétrico (Haleem *et al.*, 2021). Um biossensor convencional é constituído pelos seguintes elementos: analito, biorreceptor, transdutor, componentes eletrônicos e sistema de interpretação dos resultados (Naresh e Lee, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

Diante da urgente necessidade de desenvolvimento de testes de alta confiabilidade e sensibilidade capazes de determinar com precisão e rapidez a ocorrência de envenenamento ofídico e o tipo de serpente que causou o acidente, a presente pesquisa propõe desenvolver uma metodologia simples e rápida utilizando um biossensor óptico de alta sensibilidade para detecção de peçonha botrópica (serpente *Bothrops*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), o ofidismo é considerado um problema negligenciado de saúde pública. Anualmente, cerca de 4,5 a 5,4 milhões de pessoas são picadas por serpentes, destes, 1,8 a 2,7 milhões sofrem implicações clínicas e até 414.000 são acometidos por lesões graves que resultam na perda de membros e em outras limitações permanentes, além disso, o número de óbitos variam de 81.000 a 138.000 (WHO, 2023). Entretanto, devido à subnotificação, os dados registrados ainda estão longes dos números reais, o que dificulta um parecer mais exato dos impactos dos acidentes ofídicos e prejudica o delineamento de estratégias para amenizar essa problemática (de Moraes *et al.*, 2021). O baixo registro de casos ocorre por fatores como o não comparecimento das vítimas de picada de serpente aos centros de saúde, devido às longas distâncias até estes centros e à preferência por tratamentos da medicina tradicional, falta de infraestrutura e carência de recursos para coletar dados fidedignos (WHO, 2023b; Williams *et al.*, 2019).

Os acidentes ofídicos ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais com escassez de recursos voltados à saúde (Knudsen *et al.*, 2021; Gutiérrez, 2018). Comunidades rurais desfavorecidas sofrem maior vulnerabilidade ao envenenamento por serpentes, pessoas que realizam trabalhos agrícolas, sejam homens, mulheres e crianças, estão mais suscetíveis, além habitantes de países de baixa e média renda que possuem moradias precárias e acesso escasso à educação e saúde (Gutiérrez *et al.*, 2017).

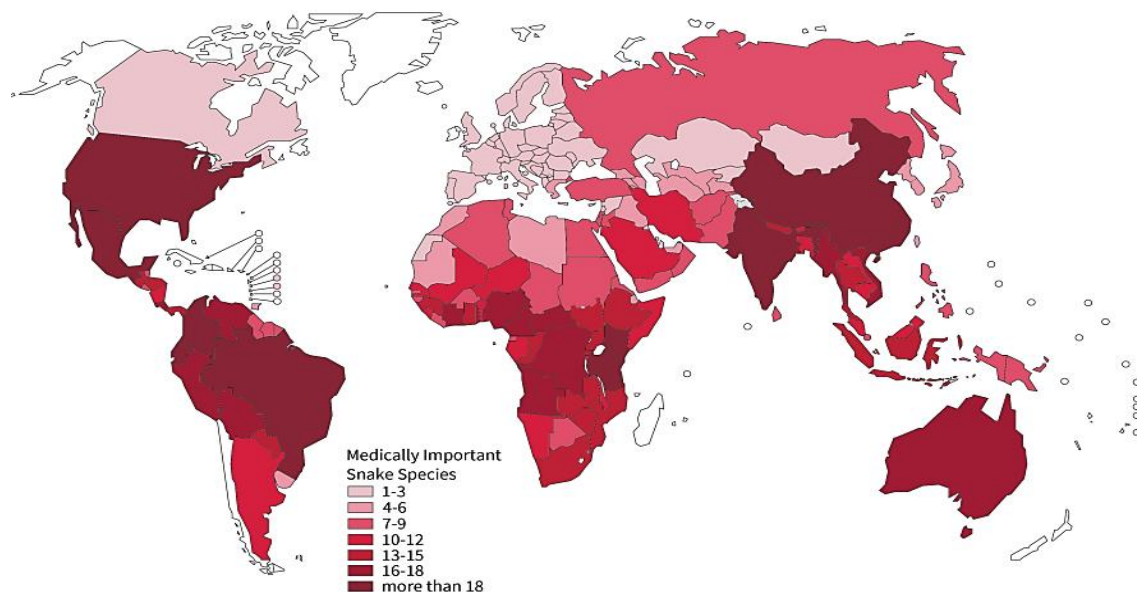
No Brasil, os acidentes ofídicos estão inclusos na lista nacional de doenças de notificação compulsória, e a caracterização do cenário epidemiológico das doenças e agravos presentes nessa lista se dá através das informações fornecidas ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). De acordo com o SINAN, entre 2019 e 2022 foram notificados 121.349 casos de acidentes ofídicos envolvendo humanos, sendo que 964.972 notificações tiveram preenchimentos ignorados ou incompletos (Brasil, 2023).

A população da região Norte é a mais afetada, seguida da região Nordeste (Brasil, 2023). Os acidentes ofídicos acometeram principalmente pessoas do sexo masculino (em média 76% dos casos) e a faixa etária mais atingida por picadas de serpentes foi de 20 a 59 anos (Brasil, 2023), idades estas que compõem a faixa considerada economicamente ativa (Ciarlini, 2021).

2.2 Serpentes de importância médica

Serpentes com o potencial de causar envenenamentos que demandam intervenção clínica são classificadas como de importância médica (Fatima e Fatah, 2014). O mapa apresentado na Figura 1 ilustra a distribuição global das serpentes medicamente relevantes.

Figura 1. Abundância relativa de espécies de serpentes de importância médica no mundo.



Fonte: Organização Mundial da Saúde.

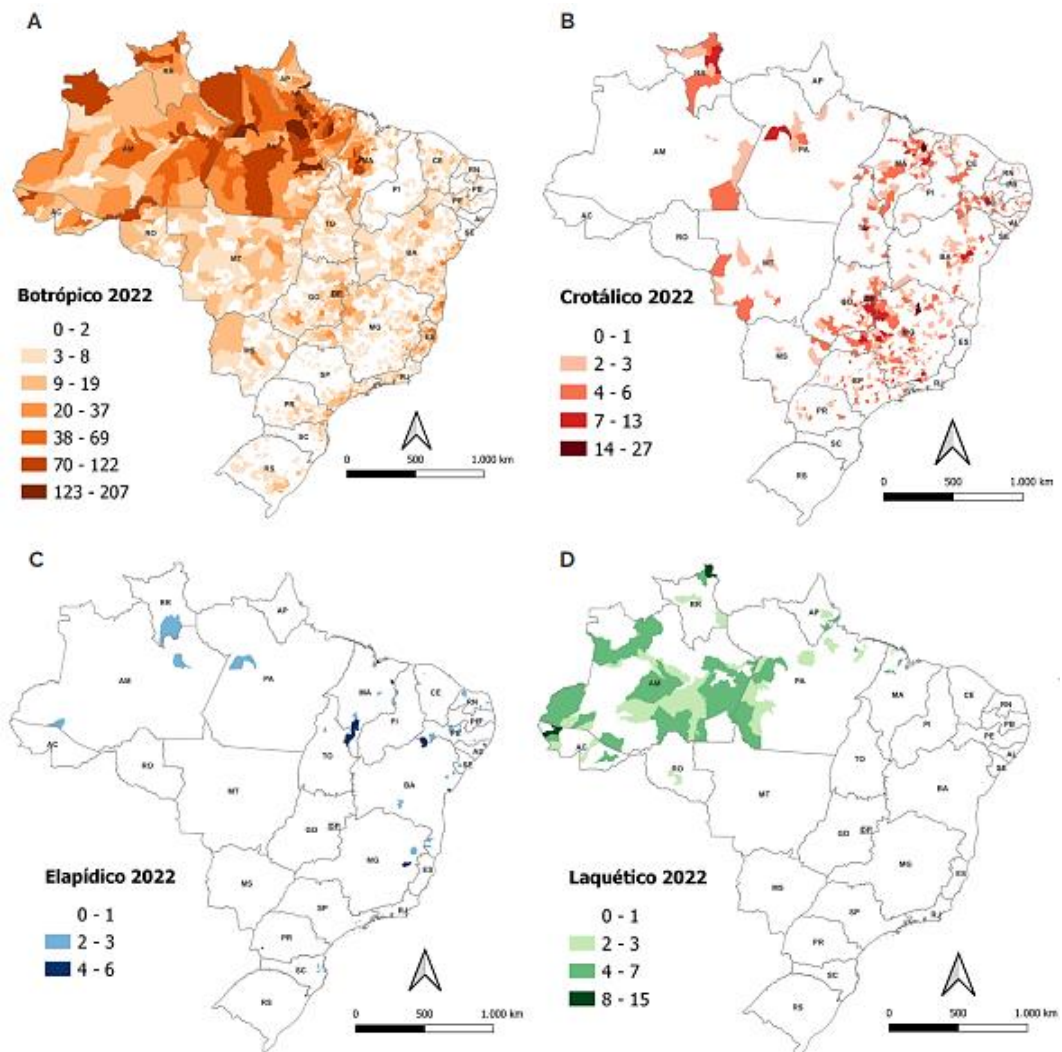
A Organização Mundial da Saúde classifica as espécies de serpentes peçonhentas em diferentes categorias. Na categoria 1, encontram-se as espécies consideradas de extrema relevância médica nos países onde são encontradas, 109 espécies estão incluídas. Na categoria 2, estão inclusas pelo menos outras 142 espécies, as quais também possuem importância médica, porém com certo grau de incerteza, devido à falta de dados epidemiológicos ou clínicos precisos, ou por estarem menos frequentemente associadas a casos de envenenamento (WHO, 2019).

A partir da Figura 1 é possível observar que o Brasil abriga uma diversidade de mais de 18 espécies de serpentes com relevância médica, o que ressalta a necessidade premente de maior atenção e cuidado no manejo e prevenção de acidentes envolvendo estes animais.

As serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* (conhecidas popularmente como jararacas), *Crotalus* (conhecidas popularmente como cascavéis) e *Lachesis* (conhecidas popularmente como surucucus), pertencentes à família Viperidae, bem como as serpentes do gênero *Micrurus* (conhecidas popularmente como cobra-coral), pertencentes à família Elapidae, são responsáveis pelos envenenamentos ofídicos no território brasileiro, dessa forma, são consideradas de importância médica no Brasil (Brasil, 2023).

A Figura 2 mostra a distribuição espacial dos acidentes ofídicos no Brasil de acordo com o gênero das serpentes.

Figura 2. Distribuição espacial dos acidentes ofídicos segundo o tipo de serpente, por Município, Brasil, 2022. A. Número de acidentes botrópicos. B. Número de acidentes crotálicos. C. Número de acidentes elapídicos. D. Número de acidentes laquéuticos.



Fonte: Brasil, 2023.

A partir da Figura 2 é possível observar que os envenenamentos por serpentes registrados no Brasil são causados predominantemente por serpentes do gênero *Bothrops*, e a região Norte é a mais atingida (Brasil, 2023).

2.3 Composição da peçonha ofídica

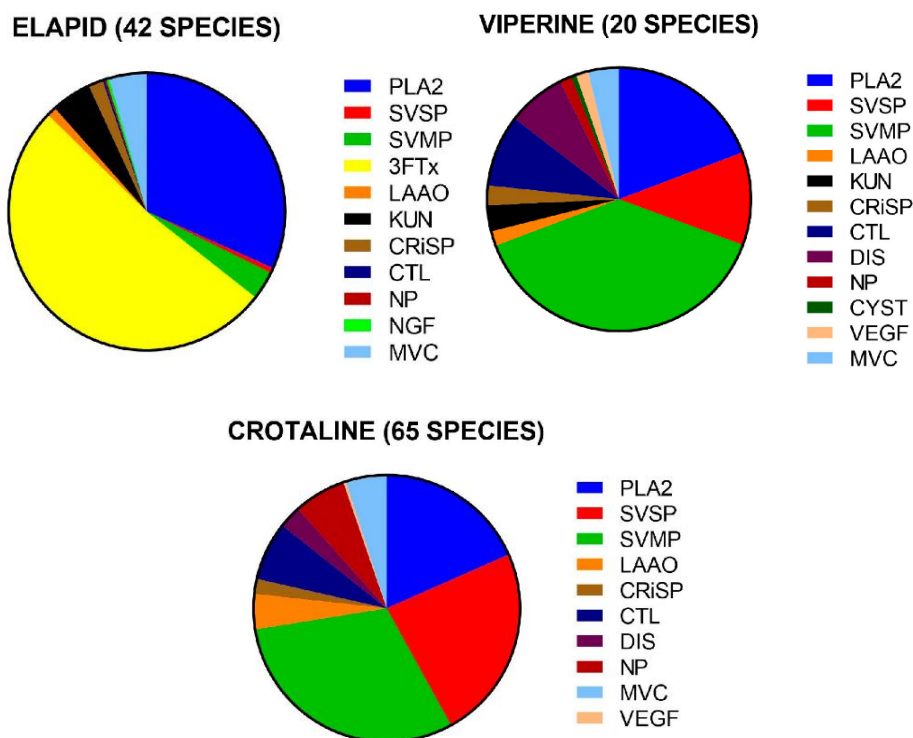
A peçonha ofídica consiste em uma mistura heterogênea de 20 a >100 componentes, dos quais a maior parte (até 90%) são proteínas (Oliveira *et al.*, 2022). Essas proteínas são classificadas dentro de aproximadamente 30 famílias. As principais famílias

são: fosfolipase A₂, metaloproteinase de veneno de cobra, serina protease de veneno de cobra, toxina de três dedos, L-aminoácido oxidase, proteína secretora rica em cisteína, inibidor de serina protease tipo kunitz, peptídeos natriuréticos, lectinas tipo C e desintegrinas, fator de crescimento nervoso, nucleotidase, fator de crescimento endotelial vascular, fosfodiesterase, fosfolipase B, hialuronidase, vespryn/ohanin, inibidor de metaloprotease de veneno de cobra, acetilcolinesterase e cistatina (Tasoulis e Isbister, 2017). Existem famílias de proteínas que abrigam centenas de isoformas, as quais podem apresentar sobreposição funcional ou variações em seus efeitos biológicos; ademais, existem toxinas que agem em conjunto, e suas combinações e proporções definem a fisiopatologia do envenenamento ofídico (Oliveira *et al.*, 2022).

A diversidade na composição da peçonha ofídica é observada tanto entre as espécies quanto entre indivíduos da mesma espécie (Tasoulis e Isbister, 2017). Fatores como idade, sexo, ambiente e disponibilidade de presas podem ocasionar variações na composição da peçonha (Casewell *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2022).

Tendo em vista que as famílias Viperidae e Elapidae são causadoras da maior parte dos acidentes graves em seres humanos no mundo (Gutiérrez *et al.* 2017), a Figura 3 apresenta as famílias de proteínas que compõem as peçonhas das serpentes pertencentes tanto à família Elapidae quanto às subfamílias Viperinae e Crotalinae (que constituem a família Viperidae), destacando a proporção de cada família de proteína. Os efeitos do envenenamento por serpentes da família Elapidae e Viperidae diferem entre si devido à constituição distinta dessas peçonhas (Figura 3).

Figura 3. Proporções relativas das diferentes famílias de proteínas para as peçonhas de Elapidae (esquerda); Viperinae (direita); e Crotalinae (inferior), calculadas em média a partir do número de espécies anotadas entre colchetes. **PLA₂** – fosfolipase A₂; **SVSP** – serina protease de veneno de cobra; **SVMP** – metaloprotease de veneno de cobra; **LAAO** – L-aminoácido oxidase; **3FTx** – toxina de três dedos; **KUN** – peptídeo de Kunitz; **CRiSP** – proteína secretora rica em cisteína; **CTL** – lectina tipo C; **DIS** – desintegrina; **NP** – peptídeo natriurético; **NGF** – fator de crescimento nervoso; **CYS** – cistatina; **VEGF** – fator de crescimento endotelial vascular; **MVC** – componente menor do veneno.



Fonte: Tasoulis e Isbister (2017).

Em relação à concentração de peçonha no plasma de humanos adultos picados por serpentes da família Viperidae, as concentrações de peçonha variam, aproximadamente, de 5 até 1.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após o envenenamento. Enquanto a concentração de peçonha no plasma de humanos adultos picados por serpentes da família Elapidae, variam desde 0,1 até 1.100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após o envenenamento (Sanhajariya *et al.*, 2018).

2.4 Manifestações clínicas dos envenenamentos ofídicos

As toxinas presentes na peçonha de serpentes causam danos de diferentes magnitudes aos processos fisiológicos (Gutiérrez *et al.*, 2017). A Tabela 1 apresenta a sintomatologia resultante do envenenamento ofídico, categorizada segundo o gênero das serpentes de importância médica no Brasil.

Tabela 1. Sintomatologia dos envenenamentos ofídicos de acordo com o gênero das serpentes.

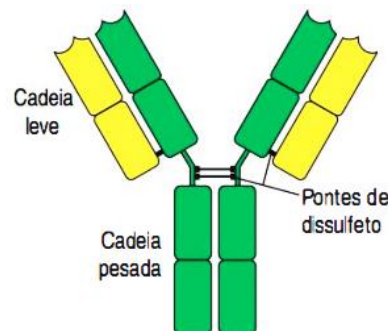
Tipo de acidente/ Gênero	Nome popular	Sintomas
Acidente botrópico (<i>Bothrops</i> e <i>Bothrocophias</i>)	Jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca, comboia, cruzeira	A região da picada apresenta dor e inchaço, às vezes com manchas arroxeadas (edemas e equimose) e sangramento pelos pontos da picada, em gengivas, pele e urina. Pode haver complicações, como grave hemorragia em regiões vitais, infecção e necrose na região da picada, além de insuficiência renal.
Acidente crotálico (<i>Crotalus</i>)	Cascavel, boicininga, marabóia, maracabóia, maracá	O local da picada muitas vezes não apresenta dor ou lesão evidente, apenas uma sensação de formigamento. Pode ocorrer dificuldade de manter os olhos abertos, com aspecto sonolento (fácies miastênica), visão turva ou dupla, mal-estar, náuseas e cefaleia, acompanhadas por dores musculares generalizadas e urina escura nos casos mais graves.
Acidente laquético (<i>Lachesis</i>)	Surucucu- pico-de-jaca	Quadro semelhante ao acidente por jararaca, a picada pela surucucu-pico-de-jaca pode ainda causar dor abdominal, vômitos, diarreia, bradicardia e hipotensão.
Acidente elapídico (<i>Micrurus</i> e <i>Leptomicrurus</i>)	Coral- verdadeira	O acidente por coral-verdadeira não provoca, no local da picada, alteração importante. As manifestações do envenenamento caracterizam-se por dor de intensidade variável, visão borrada ou dupla, pálpebras caídas e aspecto sonolento. Óbitos estão relacionados à paralisia dos músculos respiratórios, muitas vezes decorrentes da demora na busca por socorro médico.

Fonte: Brasil, 2022

2.5 Anticorpos

Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são glicoproteínas que se ligam de forma específica e com grande afinidade a antígenos (moléculas ou substâncias não pertencentes ao corpo ou invasores), neutralizando-os ou desencadeando resposta imune para eliminá-los (Frenzel *et al.*, 2017; Barardi *et. al*, 2009). A estrutura dos anticorpos consiste em quatro cadeias polipeptídicas que formam uma configuração em forma de Y. Essas cadeias incluem duas cadeias pesadas ou H unidas por ligações dissulfeto a duas cadeias leves ou L (Murphy, 2014; Rodrigues, 2022) (Figura 4).

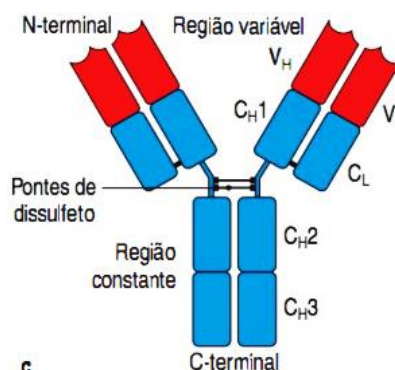
Figura 4. Estrutura de uma molécula de anticorpo. Cadeias leves (amarelo) e cadeias pesadas (verde).



Fonte: Murphy (2014).

As cadeias leves de um anticorpo contêm um domínio variável (VL) e um constante (CL), enquanto as cadeias pesadas possuem um domínio variável (VH) e três constantes (CH1, CH2 e CH3) (Figura 5) (Murphy, 2014). As regiões variáveis são diversificadas e reconhecem especificamente o antígeno. Já as regiões constantes determinam a classe do anticorpo e estão envolvidas em funções efetoras, como a ligação a receptores em células imunológicas (Carvalho, 2019; Murphy, 2014).

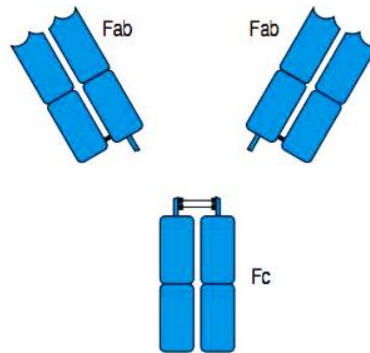
Figura 5. Estrutura de uma molécula de anticorpo. Cadeias leves: VL- domínio variável, CL- domínio constante; Cadeias pesadas: VH- domínio variável e CH1, CH2 e CH3- domínios constantes. Regiões variáveis: vermelho. Regiões constantes: azul.



Fonte: Murphy (2014).

A clivagem da molécula de anticorpo resulta em fragmentos que desempenham papéis específicos na resposta imune. O fragmento Fab (fragmentos de ligação ao antígeno, do inglês *fragment antigen-binding*) é a porção do anticorpo que contém o local de ligação ao antígeno e consiste em uma região variável (V) e uma região constante (C) de cada uma das duas cadeias de polipeptídeos que formam o anticorpo. A região variável é altamente específica para o antígeno que o anticorpo reconhece. Já o fragmento Fc (fragmento cristalizável, do inglês *fragment crystallizable*) é a porção do anticorpo que não se liga diretamente ao antígeno, mas desempenha funções importantes na resposta imune, como sua ligação à receptores dos fagócitos, para iniciar processos de eliminação do antígeno (Tiller e Tessier, 2015; Murphy, 2014).

Figura 6. Molécula de imunoglobulina clivada por digestão parcial pela papaína, a qual cliva a molécula de imunoglobulina em três partes: dois fragmentos Fab e um fragmento Fc.



Fonte: Murphy (2014).

2.6 Soro antiofídico

A imunoterapia realizada com soro antiofídico (medicamento composto por Imunoglobulinas G ou seus produtos de fracionamento $F(ab')_2$ ou Fab) representa o principal tratamento capaz de prevenir ou reverter os efeitos do envenenamento, se aplicados prontamente e de maneira adequada (WHO, 2019). A produção do soro se dá a partir da injeção de quantidades adequadas de peçonha ofídica em cavalos, estimulando seus sistemas imunológicos a produzir anticorpos específicos contra as toxinas presentes na peçonha; o soro é, então, obtido a partir da purificação do plasma desses animais (para remover substâncias indesejadas, restando apenas os anticorpos) e passa por testes de qualidade para garantir sua eficácia e segurança (Rodrigues e Bernardes, 2020; Williams *et al.*, 2019).

Algumas problemáticas podem ser consideradas quanto à soroterapia antiveneno:

- (1) Atrasos na administração do soro antiofídico: A chegada tardia aos estabelecimentos de saúde é um dos fatores principais de atrasos na soroterapia e ocorre principalmente porque a maior parte dos acidentes

acontecem em zonas rurais, dessa forma, o local em que a vítima sofreu o acidente ofídico pode ser distante do centro de saúde que armazena antiveneno (Essafti *et al.*, 2022; Isbister, 2023). Além disso, os atrasos podem ocorrer devido à forma como os pacientes avaliam a gravidade da picada (Schurer *et al.*, 2022), bem como por muitas vítimas procurarem auxílio na medicina tradicional em vez de buscarem diretamente um hospital para receber a soroterapia antiveneno (Margono *et al.*, 2022; Chaaithanya *et al.*, 2021). Atrasos também podem estar relacionados ao tempo necessário para avaliar o paciente envenenado e conduzir investigações para determinar o antiveneno adequado (Silva e Isbister, 2020). Devido à rápida propagação das toxinas e ligação destas aos seus alvos, o soro antiveneno deve ser aplicado nas primeiras horas após o acidente ofídico; essa medida aumenta consideravelmente as chances de preservar o bom estado de saúde do paciente (Mukherjee *et al.*, 2020). Os óbitos por envenenamento ofídico estão associados a atrasos na administração do antiveneno ou no tratamento dos sintomas (Isbister, 2023).

- (2) Administração incerta ou indiscriminada do soro antiveneno: A soroterapia incorreta, como resultado de um diagnóstico errôneo, pode causar complicações graves; cerca de 20% dos pacientes que recebem soroterapias incorretas apresentam reações colaterais de imediato ou dentro de poucas horas (Deshpande *et al.*, 2013).

Diante dessas problemáticas, é notável a importância do procedimento de identificação da serpente causadora do acidente para uma indicação precisa do antiveneno a ser administrado (Brasil, 2001).

2.7 Testes de diagnóstico disponíveis

Até o presente momento, procedimentos genéricos são usualmente realizados para identificar o tipo de serpente que ocasionou o envenenamento em razão da indisponibilidade de testes de diagnóstico específicos; as abordagens comumente adotadas para o reconhecimento do tipo de serpente incluem: observação das manifestações clínicas, avaliação do local da picada, histórico do paciente (contexto da picada, descrição das características da serpente, descrição de intervenções realizadas antes do atendimento médico e histórico médico) e exames laboratoriais complementares como por exemplo testes de coagulação sanguínea e exames de urina (hematúria, proteinúria, níveis de ureia e produção de urina) para o monitoramento da soroterapia e acompanhamento das complicações (Knudsen *et al.*, 2021; Williams *et al.*, 2019; Brasil, 2001).

Até hoje, há apenas um kit de diagnóstico disponível comercialmente para a identificação do tipo de serpente que causou o envenenamento, denominado Snake Venom Detection Kit (SVDK), desenvolvido pela Commonwealth Serum Laboratories (CSL) (Seqirus, 2020). Entretanto, este kit é válido apenas para detectar envenenamento por serpentes clinicamente importantes localizadas estritamente na Austrália e na Papua Nova Guiné, sendo elas: cobra tigre (*Notechis sculatus*), cobra marrom (*Pseudonaja textilis*), cobra marrom real (*Pseudechis australis*), víbora da morte (*Acanthophis antarcticus*) e cobra taipan (*Oxyuranus scutellatus*), essas serpentes não habitam outras regiões do mundo (Williams *et al.*, 2019; Puzari e Mukherjee, 2020; Chen *et al.*, 2021).

O SVDK é um kit de diagnóstico que emprega imunoensaio enzimático que fornece um resultado visual qualitativo em 15 a 25 minutos. Os poços da microplaca do kit são revestidos com anticorpos específicos para a peçonha; amostras de esfregaço do local da picada (considerada a amostra mais segura) ou de fluidos corporais podem ser utilizadas para a realização do teste (Seqirus, 2020). Foram registrados resultados falsos positivos, embora as reações cruzadas tenham sido consideravelmente mais fracas do que as reações específicas (Williams *et al.*, 2019). Na identificação das espécies corretas, a sensibilidade do SVDK é de 83,1% enquanto a especificidade é de 63,5% (Johnston *et al.*, 2017).

No território brasileiro e na maior parte do mundo não há disponíveis testes rápidos que detectem a ocorrência de envenenamento ofídico nem que discriminem o gênero ou a espécie da serpente causadora do acidente. Tendo em vista a falta de testes na maior parte do mundo, o desenvolvimento de kits comerciais de detecção de peçonha ofídica é urgentemente necessário, visando o sucesso do tratamento de envenenamentos.

2.8 Biossensores

Com as vantagens de alta sensibilidade, dimensões reduzidas e resposta ágil, a tecnologia de sensores avançou notavelmente na detecção de peçonha ofídica (Chen *et al.*, 2021). Os biossensores são dispositivos analíticos que tornam os sinais biológicos mensuráveis através da medição de alterações geradas pelas interações entre os componentes biológicos (Haleem *et al.*, 2021). Um biossensor convencional é constituído pelos seguintes elementos: (1) transdutor, que transforma o fenômeno de reconhecimento biológico em um sinal mensurável; (2) substância alvo, denominada analito, a qual será monitorada/detectada; (3) moléculas de bioreconhecimento, também chamadas de biorreceptores, que são responsáveis por reconhecer de forma específica o analito; (4) componentes eletrônicos, responsáveis pelo processamento da transdução do sinal e sua preparação para visualização e/ou análise e (5) display, sistema que interpreta os resultados

e apresenta-os, geralmente composto por hardware e software, permitindo ao usuário compreender os dados obtidos (Naresh e Lee, 2021; Chadha *et al.*, 2022).

Para alcançar resultados efetivos, o biossensor deve contemplar os critérios a seguir. (1) seletividade: capacidade de detectar uma molécula específica presente em uma amostra contendo diferentes substâncias; (2) sensibilidade: capacidade de detectar corretamente uma quantidade mínima de analito; (3) linearidade: proporcionalidade entre resultados e a concentração do analito presente na amostra; (4) tempo de resposta: tempo necessário para obter 95% dos resultados; (5) reprodutibilidade: capacidade de obter os mesmos resultados em medições repetidas; (6) estabilidade: potencial de resistência do biossensor a perturbações ambientais (Bhalla *et al.*, 2020; Naresh e Lee, 2021).

Os biossensores possuem diversas classificações, de acordo com aspectos como: tipo de biorreceptor utilizado, método de fixação dos componentes biológicos e tipo de transdutor empregado.

De acordo com o biorreceptor, os biossensores podem ser classificados como: (1) biossensores enzimáticos, os quais utilizam enzimas como elementos de reconhecimento (Newman e Setford, 2006; Shi *et al.*, 2014); (2) imunossensores, os quais empregam anticorpos ou antígenos como elementos de reconhecimento (a interação altamente seletiva entre os anticorpos e os antígenos permite a detecção precisa e sensível) (Cristea *et al.*, 2015; Karunakaran *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2019); (3) biossensores baseados em ácido nucleico, os quais utilizam sequências de ácidos nucleicos, como DNA ou RNA, como elementos de reconhecimento (Bora *et al.*, 2013; Du e Dong, 2017); (4) biossensores microbianos ou de células inteiras (Gui *et al.*, 2017; Gheorghiu, 2021); (5) Biossensores baseados em nanopartículas (Zamora-Gálvez *et al.*, 2017).

Para criar a parte de reconhecimento biológico de um biossensor, a fixação do biorreceptor no substrato de ouro é uma etapa crucial para a detecção do analito, o qual reconhece seu receptor específico (Zhang *et al.*, 2016). Existem dois métodos principais de fixação dos elementos biológicos, físico (reversível) e químico (irreversível). No método de Adsorção Física (ou reversível) os elementos de reconhecimento biológico são fixados na superfície de um material sólido inerte por forças atrativas fracas (interações não covalentes, principalmente forças eletrostáticas, como ligações iônicas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas) (Zhang *et al.*, 2016; Manaf *et al.*, 2023). Em contrapartida, na Fixação Química (ou irreversível) há a formação de ligações químicas fortes, como ligações covalentes, entre os elementos de reconhecimento biológico e a superfície do transdutor (Jazayeri *et al.*, 2016).

Os biossensores também podem ser classificados com base no transdutor. Os Biossensores Eletroquímicos se baseiam nas reações eletroquímicas entre o biorreceptor e o analito, que geram sinais eletroquímicos detectáveis. Com base na transdução, os

sensores eletroquímicos podem ser classificados como: (1) potenciométricos, os quais medem as diferenças de potencial elétrico geradas por reações redox; (2) amperométricos, os quais mensuram a corrente elétrica resultante de uma reação eletroquímica específica; (3) impedimétricos, os quais quantificam a resistência elétrica entre os eletrodos do sensor; (4) condutométricos, os quais medem mudanças na condutividade elétrica da solução; (5) voltamétricos, os quais mensuram a corrente elétrica resultante da aplicação de um potencial elétrico ao eletrodo do sensor (Grieshaber *et al.*, 2008; Ronkainen *et al.*, 2010).

Os Biossensores Ópticos utilizam princípios ópticos para detecção e quantificação de analitos em uma amostra; as mudanças físicas ou químicas ocasionadas pelas interações do biorreceptor e do analito provocam alterações na forma em que a luz é absorvida, ou refletida, ou refratada, bem como pode ocasionar mudanças na fase, amplitude, frequência e/ou polarização da luz. (Damborský *et al.*, 2016; Chen e Wang, 2020). Os biossensores ópticos mais comuns são os baseados em fluorescência, quimioluminescência, fibra óptica e Ressonância de Plasmons de Superfície (RPS).

Os biossensores com tecnologia RPS (tipo de biossensor utilizado na presente pesquisa) possuem alta sensibilidade e viabilizam o acompanhamento em tempo real de interações entre moléculas (Sing, 2016; Guo, 2012). As interações superfície-biorreceptor e analito-biorreceptor ocasionam mudanças de massa na superfície sensora, provocando uma alteração na propagação dos plasmons de superfície (excitação de oscilações coletivas de elétrons), com isso, o índice de refração próximo à superfície é alterado, gerando o deslocamento do ângulo de SPR (Bhalla *et al.*, 2016; Wijaya *et al.*, 2011). Para medições de RPS, o substrato de filme metálico mais recomendado é o ouro, principalmente devido à sua estabilidade em ambientes aquosos, necessários para o monitoramento de interações biomoleculares (Wijaya *et al.*, 2011).

Nos Biossensores Gravimétricos a mudança de massa induzida pela interação entre o analito e o elemento de bioreconhecimento é medida com alta precisão utilizando um cristal piezoelétrico (Cali *et al.*, 2020; Afzal *et al.*, 2017).

Os Biossensores Térmicos medem a energia térmica absorvida ou liberada durante as reações biológicas, permitindo a avaliação da extensão da reação ou da dinâmica estrutural de biomoléculas em solução (Yao *et al.*, 2014; Vasuki *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para detecção de peçonha botrópica utilizando um biossensor óptico, avaliando o reconhecimento específico e inespecífico entre soro antiofídico e peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a interação da peçonha botrópica com o soro antibotrópico em diferentes concentrações em função do tempo;
- Determinar a concentração mínima de peçonha botrópica que o biossensor é capaz de detectar por meio da metodologia aplicada;
- Avaliar o tempo de detecção das amostras analisadas;
- Avaliar a interação entre o soro antibotrópico e a peçonha crotálica para determinar a ausência ou presença de interação cruzada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e armazenamento das peçonhas ofídicas

A peçonha bruta de serpentes da espécie *Bothrops erythromelas* foi obtida de espécies adultas provenientes do Museu Vivo Répteis da Caatinga, localizado no estado da Paraíba, Brasil. A peçonha foi mantida à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização. A peçonha bruta de serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus* foi cedida pelo Instituto Vital Brazil, localizado no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

4.2 Obtenção e armazenamento do Soro Antiveneno Botrópico (SAB)

O soro antibotrópico foi doado pela Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco e mantido sob refrigeração à temperatura de 4°C. O soro antibotrópico utilizado é produzido a partir de uma combinação das peçonhas de cinco espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) e a sua composição consiste em frações $F(ab')_2$ de imunoglobulinas heterólogas, específicas e purificadas (Bula do Soro Antibotrópico, Instituto Butantan, 2022).

4.3 Preparação das amostras

Tanto o soro antiofídico quanto as peçonhas ofídicas foram solubilizados em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2, imediatamente antes dos experimentos.

4.4 Determinação da concentração de estudo da peçonha botrópica e crotálica

Em relação às peçonhas botrópica e crotálica, foram testadas duas concentrações, consideradas mínima e máxima. A máxima concentração de peçonha utilizada nos testes aqui descritos foi cerca de 6,784 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Partimos desta concentração com base em análises anteriores (Alves, 2020), em que 6,784 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a menor concentração de peçonha testada. Portanto, com o intuito de alcançar detecções de peçonha ofídica em concentrações ainda mais baixas (tendo em vista que nos fluidos corporais a peçonha é encontrada em baixa concentração (Sanhajariya *et al.*, 2018)), optamos por partir desta concentração (6,784 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e conduzir testes de diluições em PBS em série (1:15.000, 1:30.000 e 1:60.000) até alcançar a concentração mínima na qual o biossensor detectou interação, a qual foi 0,848 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Simultaneamente, avaliamos a presença ou ausência de reação cruzada entre o SAB e a peçonha do gênero *Crotalus*.

4.5 Biossensor óptico RPS

No equipamento RPS utilizou-se um biochip polimérico descartável coberto com uma película de ouro de 50 nm, que forma a superfície sensora. A sensibilidade do biossensor é da ordem de 10^{-7} RIU (Refractive Index Unit) (Wijaya *et al.*, 2011; Loureiro *et al.*, 2017).

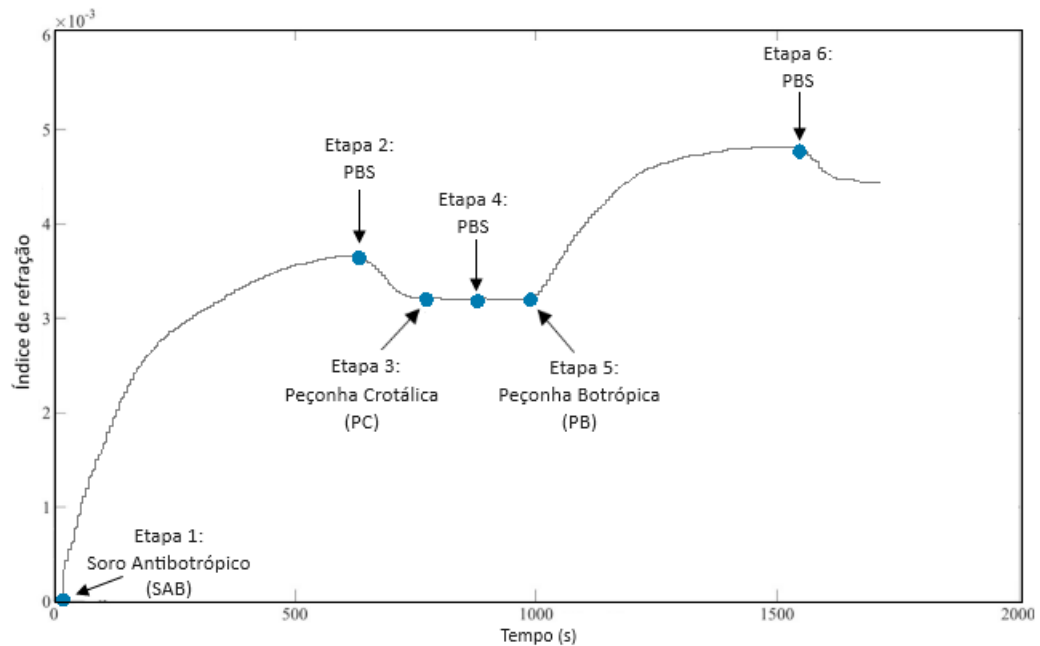
4.6 Etapas dos experimentos e apresentação dos gráficos

Os ensaios compreenderam um arranjo de três camadas sobre a superfície sensora, respeitando a seguinte ordem de adição: soro antiofídico, peçonha ofídica crotálica e peçonha ofídica botrópica. O transporte do fluido contendo cada uma das soluções para o biochip é efetuado por uma bomba peristáltica, o fluxo é fundamental devido à necessidade de medir múltiplos analitos em um único ensaio; a vazão variou entre 5 e 10 μL , valores estes diretamente relacionados ao analito, para a otimização do processo de adsorção e dessorção do analito sobre o filme de ouro.

Inicialmente, a superfície de ouro do biochip foi lavada com água deionizada enquanto o biochip estava fora do sensor, seguida por uma segunda lavagem com água deionizada após o acoplamento do biochip ao sensor para evitar quaisquer possíveis contaminações do ar, como também para que se tivesse uma leitura iniciada em zero, pois a água deionizada foi utilizada como referência. A partir da entrada do fluxo da água, o sinal começou a ser medido e gravado. O fluxo era pausado por alguns segundos para que o canal de entrada fosse transferido manualmente para a solução seguinte.

Os gráficos são gerados no momento em que ocorre as interações sobre a superfície sensora. A Figura 7 mostra uma ilustração de como o resultado é apresentado, seguindo as etapas descritas a seguir. Etapa 1: o soro antibotrópico diluído em PBS era admitido; a adsorção física dos anticorpos no ouro era evidenciada pelo aumento da linha no gráfico, e quando a linha se tornava constante (indicando a cobertura total da película) o fluxo era pausado. Etapa 2: o canal de entrada era transferido para a solução de PBS, a fim de que as moléculas fracamente ligadas fossem removidas (processo de dessorção), evento apontado pelo decaimento da linha do gráfico; o fluxo era pausado. Etapa 3: o canal de entrada era transferido para a solução de peçonha crotálica diluída em PBS, após a linha do gráfico se tornar constante, o fluxo era pausado. Etapa 4: novamente o PBS era admitido, e, após a constância da linha do gráfico, o fluxo era pausado. Etapa 5: o canal de entrada era transferido para a solução de peçonha botrópica diluída em PBS; quando a linha do gráfico se tornava constante, o fluxo era pausado. Etapa 6: o canal de entrada era transferido para a solução de PBS para que as moléculas (presentes na peçonha) fracamente ligadas à camada anterior fossem removidas.

Figura 7. Gráfico ilustrativo demonstrando as etapas dos ensaios que compõe os resultados. Os marcadores azuis do gráfico indicam o instante de tempo da troca do tipo de fluido no reservatório da bomba.



Fonte: Autoria própria.

Ao final de cada experimento realizava-se um ciclo de limpeza para a retirada das substâncias adsorvidas na superfície do sensor, que consistia em fazer fluir sobre a superfície água deionizada, seguida de detergente enzimático (Extran) diluído em água deionizada, e, novamente, água deionizada. Esse procedimento de lavagem não causou danos à película de ouro. Após a etapa de limpeza da superfície, um novo experimento pôde ser realizado utilizando o mesmo chip. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.7 Local

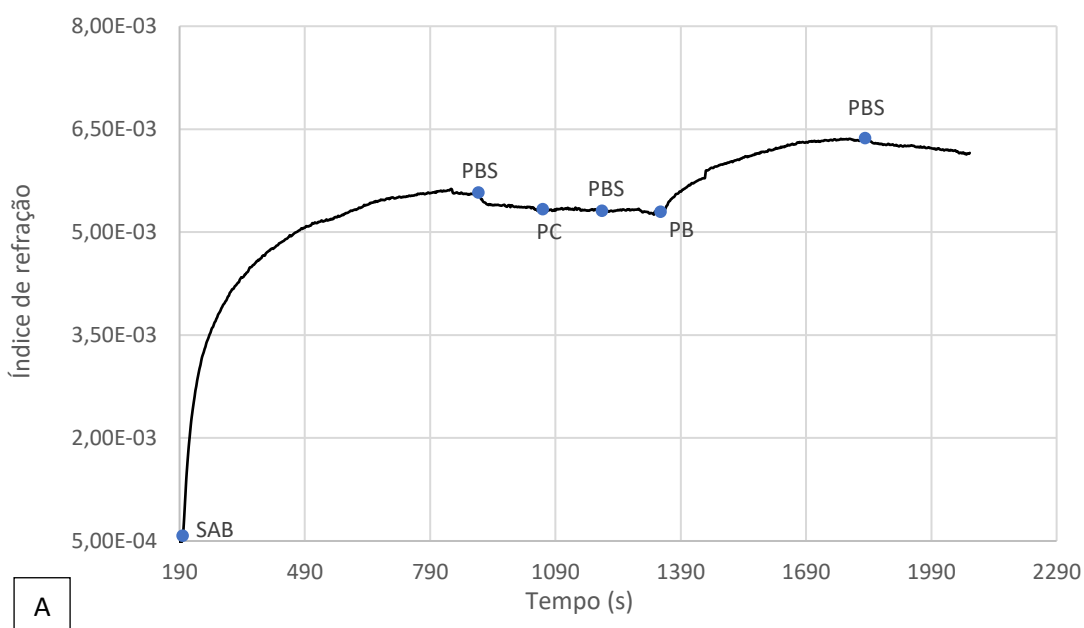
Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biossensores do Departamento de Engenharia Elétrica (DEE) - Centro de Engenharia Elétrica e Informática (CEEI), na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), localizada no estado da Paraíba, Brasil.

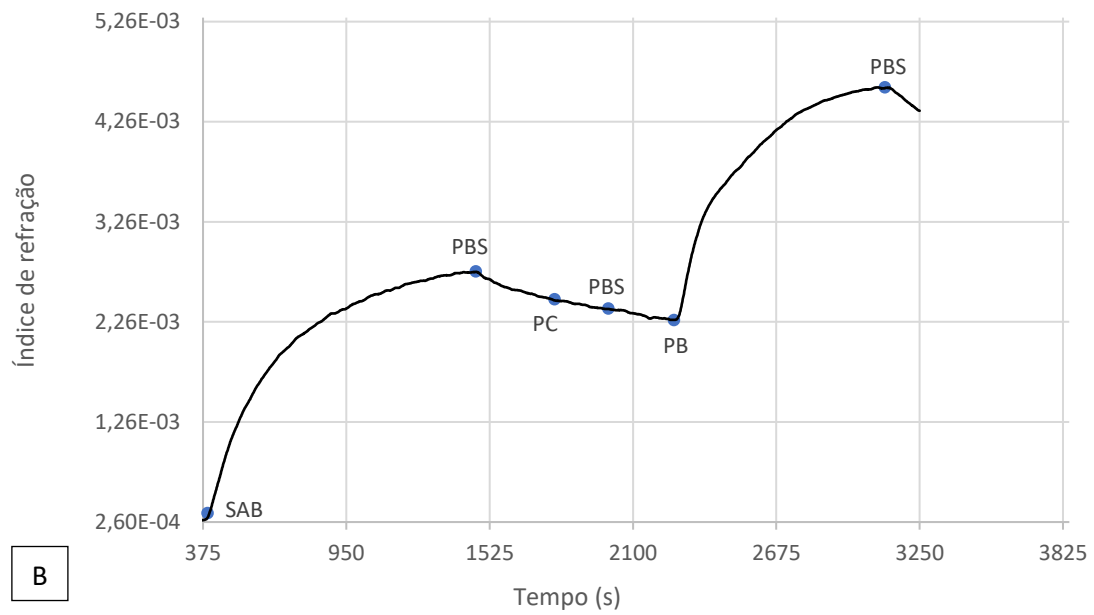
5 RESULTADOS

A interação entre os anticorpos e os antígenos foi avaliada em diferentes concentrações de peçonha e soro antiveneno, pela mudança no índice de refração para cada substância. Nos experimentos, a ligação do SAB à superfície sensora foi avaliada utilizando-se duas proporções de soro diluído em PBS: 1:1000 e 1:100, a fim de identificar a concentração em que a superfície é revestida por IgG sem ocasionar prejuízo à interação com o antígeno. Dessa forma, a capacidade de ligação da peçonha à camada de IgG foi investigada em duas concentrações diferentes de SAB: $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figuras 8 e 9).

Os resultados da interação entre os anticorpos e a peçonha correspondente (botrópica) e não correspondente (crotálica) são mostrados nas Figuras 8 e 9.

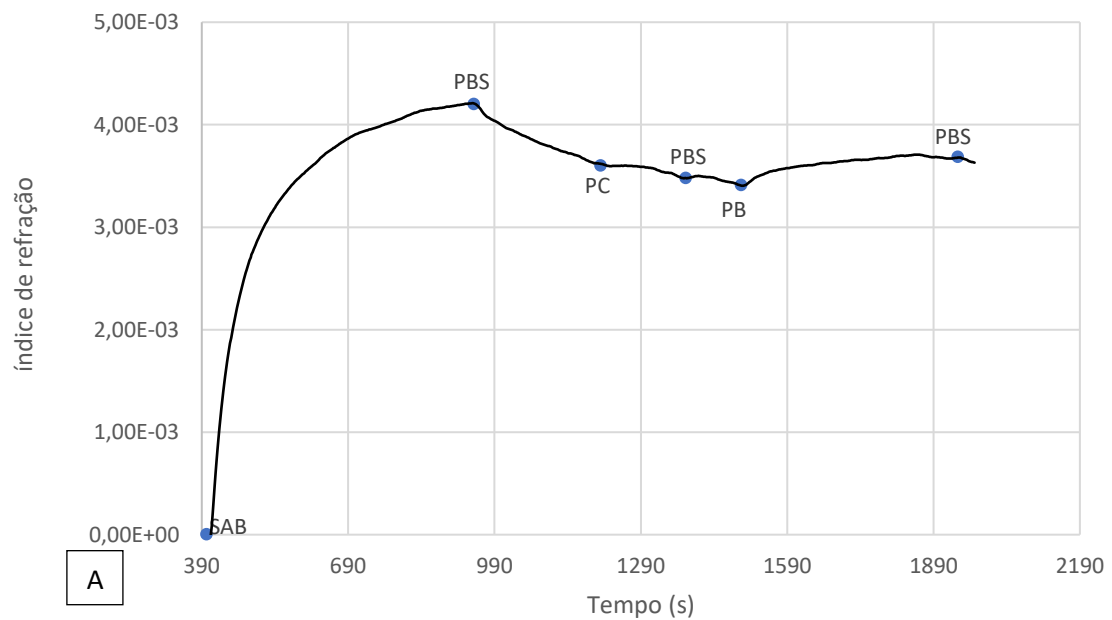
Figura 8. Gráficos da média móvel dos índices de refração do PBS, Soro Antiveneno Botrópico (SAB), Peçonha Crotálica (PC) e da Peçonha Botrópica (PB) em função do tempo. A: SAB 1:100, PC 1:7.500, PB 1:7.500; B: SAB 1:1.000, PC 1:7.500, PB 1:7.500. Os marcadores azuis do gráfico indicam o instante de tempo da troca do tipo de fluido no reservatório da bomba.

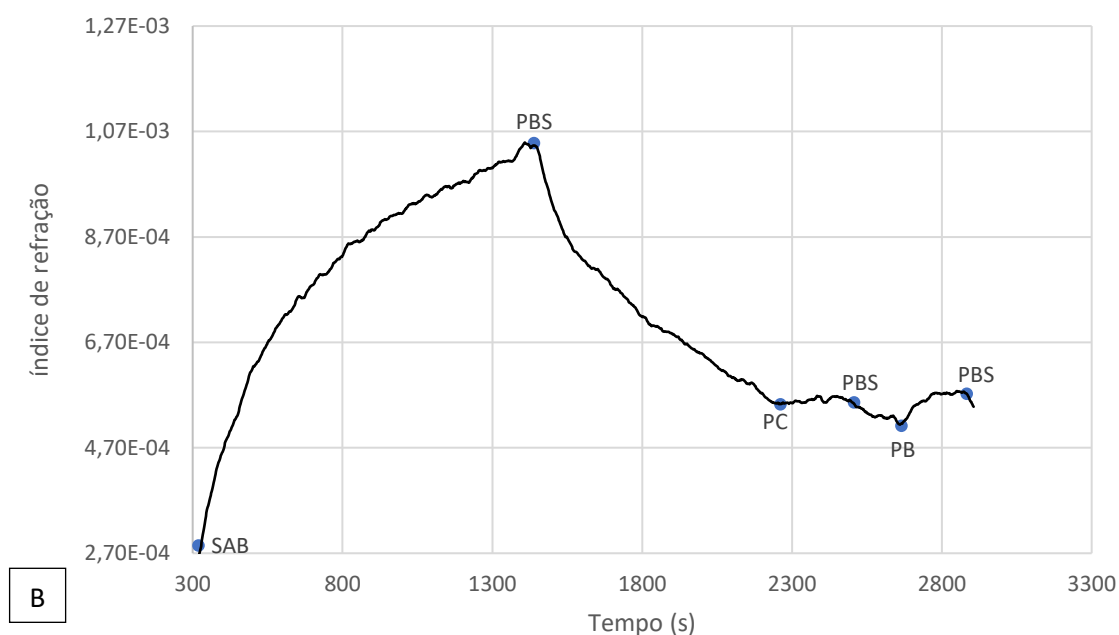




Fonte: Autoria própria.

Figura 9. Gráficos da média móvel dos índices de refração do PBS, Soro Antiveneno Botrópico (SAB), Peçonha Crotálica (PC) e da Peçonha Botrópica (PB) em função do tempo. A: SAB 1:100, PC 1:60.000, PB 1:60.000; B: SAB 1:1.000, PC 1:60.000, PB 1:60.000. Os marcadores azuis do gráfico indicam o instante de tempo da troca do tipo de fluido no reservatório da bomba.





Fonte: Autoria própria.

É possível observar a alteração da resposta do sensor ao passo que os anticorpos e os antígenos estão interagindo, conforme as curvas mostradas nos gráficos das Figuras 8 e 9. Cada curva corresponde à adsorção/dessorção de uma substância específica, mostrando a deposição das camadas na superfície sensora, confirmando a conjugação entre biorreceptor e analito. O sinal do sensor tende a retornar à linha de base quando o fluxo contendo peçonha é interrompido e trocado para o PBS, devido ao processo de dissociação. Ainda que na concentração de 1:60.000 a peçonha botrópica se dissocie mais facilmente dos anticorpos devido à sua baixa concentração, o sensor detectou a adsorção desta peçonha.

A intensidade da resposta da peçonha foi proporcional às concentrações de peçonha e IgG (SAB) utilizadas. A concentração mais alta de peçonha ($6,784 \mu\text{g.mL}^{-1}$) gerou uma resposta mais elevada ao utilizarmos a concentração mais baixa de IgG ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em contrapartida, ao utilizarmos a concentração mais alta de IgG ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o índice de refração da peçonha em alta concentração foi menor. Quando testamos a concentração mais baixa de peçonha ($0,848 \mu\text{g.mL}^{-1}$) junto à concentração mais baixa de IgG, houve um maior índice de refração da peçonha; na alta concentração de IgG o índice de refração da peçonha foi menor.

A partir das Figuras 8A e 9A, é possível observar que à medida em que a concentração da proteína da peçonha aumentou de $0,848 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (venenos na proporção 1:60.000) para $6,784 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (venenos na proporção 1:7.500), o índice de refração aumentou 3,91, sobre as imunoglobulinas na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Da mesma forma, a Figura 8B e 9B mostra que à medida em que a concentração da proteína da peçonha

aumentou de $0,848 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para $6,784 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o índice de refração aumentou 0,75, sobre as imunoglobulinas na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em relação ao tempo de resposta do biossensor, o tempo final dos ensaios variaram entre 25 e 40 minutos.

As Figuras 8 e 9 também revelam a ausência de uma variação do índice de refração da peçonha crotálica sobre os anticorpos botrópicos, confirmando, assim, a não ocorrência de interação cruzada. Para ratificar a seletividade entre os anticorpos botrópicos (SAB) e a peçonha botrópica, adicionamos prontamente a peçonha botrópica após a passagem da peçonha crotálica (ambas peçonhas na mesma concentração). Com a presença da peçonha botrópica, foi observada a ocorrência de interação entre o SAB e a peçonha botrópica, dessa forma, a passagem anterior do fluido contendo a peçonha crotálica não afetou a interação entre os anticorpos e peçonha correspondentes.

A partir dos resultados, determinamos a faixa útil do biossensor para detecção de peçonha botrópica, o tempo hábil de resposta e a ausência de reação cruzada.

6 DISCUSSÃO

Neste artigo, relatamos uma metodologia simples para detecção de peçonha ofídica através de um biossensor SPR, baseada na avaliação da interação antígeno-anticorpo. Com o intuito de reproduzir de forma mais precisa a situação real, utilizamos o soro antiofídico como biorreceptor, uma vez que o soro antiveneno (SAB) é a forma mais comum e acessível de se obter anticorpos nos centros de saúde. Também utilizamos a peçonha bruta das serpentes, considerando que esta é a forma que a peçonha pode ser encontrada em fluidos corporais disponíveis para avaliação, como sangue e urina.

Realizamos dois grupos de ensaios (Figura 8 e 9), em cada grupo foi utilizado uma determinada concentração de anticorpos e variamos a concentração de peçonha. Foi observado que o índice de refração da camada de anticorpo foi diferente para cada ensaio em que foi utilizado a mesma concentração de SAB. Essa diferença de resposta, mesmo utilizando a mesma concentração de SAB, pode ser atribuída ao empacotamento dos anticorpos (Young *et al.*, 2004), que, devido à imobilização por adsorção física, pode ocorrer de diferentes formas, já que nesse tipo de adsorção os anticorpos se ligam espontaneamente à superfície do sensor, ocasionando uma orientação desordenada (Schramm *et al.*, 1993; Jazayeri *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

As Figuras 8 e 9 revelam que a presença de altas concentrações de peçonha resulta em um maior deslocamento do ângulo de ressonância em comparação com os testes em que baixas concentrações de peçonha foram aplicadas (os quais resultaram em um menor deslocamento do ângulo de ressonância). Dessa maneira, demonstra-se a existência de uma relação direta entre a concentração da substância e a intensidade da resposta (Loureiro *et al.*, 2017; de Faria *et al.*, 2020). Foi utilizado duas concentrações diferentes de IgG para avaliar a intensidade de ligação da peçonha, com isso, verificou-se uma relação entre concentração dos anticorpos e amplitude da resposta da peçonha: quando a solução de anticorpos estava menos concentrada, a peçonha em elevada concentração provocou uma resposta mais intensa. Em contraste, nos experimentos em que a solução de anticorpos estava mais concentrada, a peçonha em elevada concentração resultou em uma resposta menos pronunciada. Essa observação é explicada Zhou *et al.* (2014), o qual afirma que se a densidade do revestimento da superfície for excessivamente alta, os anticorpos se bloqueiam, reduzindo a capacidade de ligação da superfície, dessa forma, em uma concentração mais baixa, a capacidade de ligação entre o domínio Fab da IgG e o antígeno é aumentada.

Um importante atributo observado foi a reutilização do chip utilizado: após a finalização de cada teste, o procedimento de limpeza da superfície para a retirada das substâncias que foram adsorvidas se mostrou eficiente, uma vez que o sinal retornava

completamente à sua linha de base (estabelecida pela passagem de um fluxo de água deionizada). Assim, as medições subsequentes não eram prejudicadas pelas medições posteriores.

Quanto à composição das peçonhas ofídicas, é importante destacar que a diversidade de sua constituição está presente em todos os níveis hierárquicos da taxonomia de serpentes; a complexa variabilidade é resultado de mutações genéticas, deriva genética e seleção natural, dessa forma, os componentes da peçonha se ajustaram junto às necessidades específicas de cada grupo de serpentes (Amorim *et al.*, 2018). No entanto, apesar das mudanças evolutivas na constituição genômica e proteômica das peçonhas, algumas famílias de toxinas estão presentes nas três famílias de serpentes que possuem presas frontais, visto que as glândulas de peçonha das serpentes são homólogas (Amorim *et al.*, 2018). A onipresença de determinadas toxinas nas diferentes famílias de serpentes leva à possibilidade de reação cruzada entre o soro antiveneno e a peçonha não correspondente no momento da detecção, contudo, é possível observar nos gráficos das Figuras 8 e 9 que não houve deslocamento de curva indicativa de interação entre os anticorpos botrópicos e a peçonha crotálica. Dessa forma, nossos testes confirmaram a seletividade entre os anticorpos botrópicos e a peçonha botrópica. Semelhantemente, de Faria *et al.* (2020), ao desenvolver imunossensores impedimétricos para diagnóstico de picada de serpente, não encontrou variações significativas que demonstrassem formação do imunocomplexo entre o anticorpo botrópico e a peçonha crotálica, mesmo em concentrações elevadas.

A coexistência de toxinas em espécies distintas possibilitou a produção de soro antiveneno com o potencial de gerar neutralização de peçonhas de diferentes espécies de serpentes, promovendo a produção de antivenenos de amplo espectro, utilizando uma mistura de peçonhas brutas e frações de toxinas (Jorge *et al.*, 2015), como é o caso do soro antibotrópico brasileiro, gerado através da peçonha de cinco espécies (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) (Bula do Soro Antibotrópico, Instituto Butantan, 2022). É possível observar que a peçonha da espécie *B. erythromelas* não está incluída no pool utilizado na produção do soro antiveneno. Ainda assim, nosso biossensor detecta uma nítida interação entre a peçonha e o antiveneno, até em baixa concentração baixa. Isto ocorre em virtude do compartilhamento de certas toxinas entre as espécies do mesmo gênero (Amorim *et al.*, 2018). Porém, a adição da peçonha de *B. erythromelas* na produção do soro antibotrópico brasileiro poderia amplificar a detecção pelo biossensor, considerando que haveria uma resposta mais elevada devido à interação da peçonha de *B. erythromelas* com os anticorpos específicos para toxinas desta espécie. Essa observação é corroborada por estudos que identificaram componentes da *B. erythromelas* não neutralizados pelo soro antibotrópico brasileiro (Luna *et al.*, 2010; Segura *et al.*, 2010; Jorge

et al., 2015; Nunes *et al.*, 2019). É importante ressaltar a necessidade de ampliar a diversidade de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* destinadas à produção do soro antibotrópico, levando em consideração que os acidentes ofídicos no Brasil são causados predominantemente por serpentes deste gênero (Brasil, 2013).

Choudhury *et al.* (2018) construíram um sensor RPS para a detecção da peçonha bruta da serpente indiana *Naja naja* e de antiveneno polivalente. Assim como em nosso trabalho, todas as medições foram realizadas em solução de tampão fosfato-salino e a implicação de outros componentes existentes no sangue não foi avaliada. Após testar diferentes concentrações de anticorpos e diferentes tempos de incubação, todos os sensores foram construídos utilizando a concentração de 2 mg/ml de anticorpo incubados por 8 horas, e a peçonha diluída em PBS foi exposta ao sensor por 12 minutos. O sensor detectou a peçonha em concentrações entre 0,1 mg·mL⁻¹ e 1,0 mg·mL⁻¹. Apesar dos autores utilizarem a mesma classe de biossensores (RPS) e uma metodologia similar à nossa, o biossensor utilizado em nossa pesquisa apresentou uma maior sensibilidade à interação antígeno-anticorpo correspondentes, tendo em vista que detectou a peçonha em uma concentração significativamente menor (0,848 µg. mL⁻¹).

A Tabela 2 apresenta os estudos voltados particularmente à criação e desenvolvimento de biossensores para detecção de peçonha ofídica, incluindo o tipo de biossensor utilizado em cada pesquisa, as espécies de serpentes que tiveram suas peçonhas empregadas, as concentrações de peçonha detectáveis e o tempo de detecção. É importante salientar que as pesquisas apresentadas na Tabela 2 não apenas utilizaram biossensores de diferentes classes, mas também adotaram metodologias diversas. Isso inclui variações nas concentrações dos anticorpos, nos métodos de imobilização dos anticorpos, além da escolha entre o uso de soro comercial, anticorpos purificados ou recombinantes.

Tabela 2. Pesquisas que desenvolveram técnicas de detecção de peçonha ofídica por diferentes tipos de biossensores.

Classe de biossensor	Espécies de serpentes	Limite de concentração de peçonha detectada	Tempo para detecção da peçonha	Referência
Ressonância de plasmons de superfície	<i>Bothrops erythromelas</i>	0,848 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	4 a 14 min	Presente pesquisa
Ressonância de plasmons de superfície	<i>N. naja</i>	0,1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	12 min	(Choudhury et al. 2018)
Sensor colorimétrico	<i>Naja naja</i> , <i>Bungarus caeruleus</i> , <i>Daboia russelli</i> e <i>Echis carinatus</i>	5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para rCTX-7 e 25 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para cobra venom e krait venom	Não informado	(Kaul et al., 2021)
Imunossensor impedimétrico baseado em Crofer 22 APU	Pool botrópico e peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>Micrurus lemniscatus</i>	0,1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	20 min	(de Faria et al., 2020)
Imunossensor impedimétrico baseado em TiO_2	Pool botrópico: <i>B. jararaca</i> , <i>B. alternatus</i> , <i>B. neuwiedi</i> e <i>B. jararacussu</i>	20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}$	41 min	(de Faria et al., 2019)
Imunossensor impedimétrico baseado em Crofer 22 APU	Pool botrópico	0,27 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	20 min	(de Faria et al., 2018)

Fonte: Autoria própria.

Nas primeiras horas após a inoculação de peçonha por serpentes da família Viperidae (à qual o gênero *Bothrops* pertence), as concentrações de peçonha no plasma de adultos humanos variam, aproximadamente, de 5 até 1.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. (Sanhajariya et al., 2018). Portanto, a concentração de peçonha botrópica detectada pelo nosso biossensor encontra-se dentro da faixa de concentração de peçonha presente no corpo de humanos adultos envenenados por serpentes, conforme apresentado no estudo.

7 CONCLUSÃO

A pesquisa aqui descrita comprova a aplicação de uma metodologia simples para detectar a peçonha de serpentes da espécie *Bothrops erythromelas* utilizando um biossensor óptico baseado na ressonância de plasmons de superfície, a partir da interação antígeno-anticorpo, em um curto período de tempo. As mudanças no ângulo de ressonância confirmaram a sensibilidade do dispositivo à presença do analito alvo. Os dados obtidos revelaram que o biossensor foi capaz de detectar a peçonha até uma concentração mínima de $0,848 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A detecção da peçonha específica (botrópica) ocorreu em tempo satisfatório (até 14 minutos). As respostas observadas comprovaram a alta sensibilidade do sensor ao detectar especificamente a peçonha botrópica em baixa concentração sem ocorrência de reação cruzada com a peçonha crotálica.

Os resultados desta pesquisa desempenham um papel importante no avanço do desenvolvimento de métodos de diagnóstico para envenenamento ofídico. Tanto o biossensor RPS quanto a metodologia empregada pode ser considerado um modelo de diagnóstico em desenvolvimento. Diante da significativa importância deste estudo para a saúde pública brasileira, sugere-se a continuidade da pesquisa, com a perspectiva de avaliar a detecção de peçonha em fluidos biológicos, além de conduzir estudos envolvendo anticorpos e peçonhas de outros gêneros e famílias de serpentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZAL, A.; MUJAHID, A.; SCHIRHAGL, R.; BAJWA, S. Z.; LATIF, U.; FERROZ, S. Gravimetric Viral Diagnostics: QCM Based Biosensors for Early Detection of Viruses. **Chemosensors**, v. 5, n. 1, p. 7, 2017. doi: 10.3390/chemosensors5010007
- AHMED, M. U.; ZOUROB, M.; TAMIYA, E. Immunosensors. **Royal Society of Chemistry**, p. 367, 2019
- ALVES, A. E. F. Sistema para detecção de peçonha ofídica a partir de sensor de ressonância de plasma de superfície. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.
- AMORIM, F. G.; COSTA, T. R.; BAIWIR, D.; PAWU, E. D.; QUINTON, L.; SAMPAIO, S. V. Proteopeptidomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of Bothrops moojeni Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 177, 2018. doi: 10.3390/toxins10050177
- BARARDI, C. R. M.; CAROBREZ, S. G.; PINTO, A. R. Imunologia. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2009. ISBN:07.007.007-7
- BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P. Introduction to biosensors. **Essays Biochem.**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2016. doi: 10.1042/ebc20150001
- BHALLA, N.; PAN, Y.; YANG, Z.; PAYAM, A. F. Opportunities and Challenges for Biosensors and Nanoscale Analytical Tools for Pandemics: COVID-19. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 7783-7807, 2020.
- BORA, U.; SETT, A.; SINGH, D. Nucleic acid based biosensors for clinical applications. **Biosens. J**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2090-4967.1000104>
- BORGES, P. A. F.; FIEL, W. A.; VASCONCELLOS, V. A.; de FARIA, R. A. Current Progresses in the Development of Biosensors for the Diagnosis of Neglected Tropical Diseases. **Syst. Bios. and Eng.**, v. 1, n. 1, p. 39-4, 2020. Disponível em: <https://ojs.wiserpub.com/index.php/SBE/article/view/402>
- BRASIL, Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos: Acidentes ofídicos - Sintomas. Gov.br, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/animais-peconhentos/acidentes-ofidicos/sintomas>
- BRASIL. Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net: Animais peçonhentos. **Ministério da Saúde**, 2023. Disponível em:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defptohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 05 dez. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2^a ed., Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, p. 120, 2001.

BRAVO-VEGA, C., RENJIFO-IBAÑEZ, C., SANTOS-VEGA, M., LEON NUÑEZ, L. J., ANGARITA-SIERRA, T., & CORDOVEZ, J. M. Estimating real snakebite incidence in Colombia by using mathematical modelling and statistical inference. **bioRxiv**, p. 2021-12, 2021. doi: 10.1101/2021.12.09.472006

CALI, K.; TUCCORI, E.; PERSAUD, K. C. Gravimetric biosensors. **Methods in Enzymology**, v. 642, p. 435-468, 2020. doi: 10.1016/bs.mie.2020.05.010

CARVALHO, M. B. Desenvolvimento de estratégias de análise de interações antígeno-anticorpo e visualização de anticorpos em larga escala. **Tese** (Doutorado em Bioinformática), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

CASEWELL, N. R.; JACKSON, T. N.; LAUSTSEN, A. H.; SUNAGAR, K. Causes and consequences of snake venom variation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 41, n. 8, p. 570-581, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>

CHAAITHANYA, I. K.; ABNAVE, D.; BAWASKAR, H.; PACHALKAR, U.; TARUKAR, S.; SALVI, N.; BHOYE, P.; YADAV, A.; MAHALE, S. D.; GAJBHIYE, R. K. Perceptions, awareness on snakebite envenoming among the tribal community and health care providers of Dahanu block, Palghar District in Maharashtra, India. **PLoS One**, v. 16, n. 8, p. 1-18, 2021. doi: 10.1371/journal.pone.0255657

CHADHA, U.; BHARDWAJ P.; AGARWAL R.; RAWAT P.; AGARWAL, R.; GUPTA, I.; PANJWANI, M., SINGH, S.; AHUJA, C.; SELVARA, S. K.; BANAVOTH, M.; PRASHANT, S.; BADONI, B.; CHAKRAVORTY, A. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. **Jour. of Ind. and Eng. Chem.**, v. 109, p. 21-51, 2022. doi: 10.1016/j.jiec.2022.02.010

CHEN, F.; QIN, M.; LIU, W.; WANG, F.; REN, W.; XU, H.; LI, F. Snake Venom Identification via Fluorescent Discrimination. **Anal. Chem.**, v. 93, ed. 42, p.14025-14030, 2021. doi: 10.1021/acs.analchem.1c02804

CHOUDHURY, S. N.; KONWAR, B.; KAUR, S.; DOLEY, R.; MONDAL, B. Study on Snake Venom Protein-Antibody Interaction by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. **Photonic Sensors**, v. 8, p. 193–202, 2018. doi: 10.1007/s13320-018-0501-1

CIARLINI, A. C. L. Perfil Epidemiológico dos Acidentes Ofídicos no Brasil: Uma Análise Regional. p. 21. **Monografia** (Trabalho de conclusão de curso), Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2021.

CRISTEA, C.; FLOREA, A.; TERTIS, M.; SANDULESCU, R. Immunosensors. In: Biosensors - Micro and Nanoscale Applications, editor: RINKEN, T. **InTech**, 2015. doi: 10.5772/60524

DAMBORSKÝ, P.; ŠVITEL, J.; KATRLÍK, J. Optical biosensors. **Essays Biochem**, v. 60, n. 1, p. 91–10030, 2016. doi: 10.1042/EBC20150010

de CASTAÑEDA, R. R. de; DURSO, A. M.; RAY, N.; FERNÁNDEZ, J. L.; WILLIAMS, D. J.; ALCOBA, G.; CHAPPUIS, F.; SALATHÉ, M.; BOLON, I. Snakebite and snake identification: empowering neglected communities and health-care providers with AI. **The Lanc. Dig. Hea.**, v. 1, ed. 5, p. 202-203, 2019. doi: [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(19\)30086-X](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(19)30086-X)

de FARIA, R. A. D.; HOUMARD, M.; do ROSARIO, V. A. M.; LINS, V. F. C.; HENEINE, L. G. D.; MATENCIO, T. TiO₂ sol-gel coating as a transducer substrate for impedimetric immunosensors. **Chem. Biochem. Eng. Q.** v. 33, n. 4, p. 437–447, 2019. doi: 10.15255/cabeq.2019.1699

de FARIA, R. A. D.; LINS, V. F. C.; NAPPI GU, MATENCIO T, HENEINE LGD. Development of an impedimetric immunosensor for specific detection of snake venom. **Bio. Nano. Sci.**, v. 8, p. 988-996, 2018. doi: 10.1007/s12668-018-0559-7

de FARIA, R. A. D.; SOUZA, P. H. C.; LINS, V. F. C.; MATENCIO, T.; HENEINE, L. G. D. Label-Free Impedimetric Immunosensors for Detection of Snake Venoms Using Polyaniline as a Transducer Substrate. **Biom. Jour. of Sci. & Tech. Res.** v. 25, n. 3, p. 19083-19091, 2020. doi: 10.26717/bjstr.2020.25.004190

de MORAES, A. R. C. S.; e SILVA, R. C.; SANTOS, E. C. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos na Região Nordeste no período entre 2016-2019. **Rev. Interd. em Saúde**, v. 8, n. 1, p. 226-238, 2021. doi: 10.35621/23587490

DESHPANDE, R. P.; MOTGHARE, V. M.; PADWAL, S. L.; PORE, R. R.; BHAMARE, C. G.; DESHMUKH, V. S.; PISE, H. N. Adverse drug reaction profile of anti-snake venom in a rural tertiary care teaching hospital. **J Young. Pharm**, v. 5, n. 2, p. 41-5, 2013. doi: 10.1016/j.jyp.2013.02.003

DONG, Le V.; ENG, K. H.; QUYEN, Le K.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Optical immunoassay for snake venom detection. **Biosens. Bioelectron.**, v. 19, n. 10, p. 1285-94, 2004. doi: 10.1016/j.bios.2003.11.020

- DU, Y.; DONG, S. Nucleic acid biosensors: recent advances and perspectives. **Analytical chemistry**, v. 89, n. 1, p. 189-215, 2017. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04190>
- ESSAFTI, M.; FAJRI, M.; RAHMANI, C.; ABDELAZIZ, S.; MOUAFFAK, Y.; YOUNOUS, S. Snakebite envenomation in children: an ongoing burden in Morocco. **Annals. of med. and surg.**, vol. 77, p. 1-6, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103574>
- FATIMA, L-D.; FATAH, C. Pathophysiological and Pharmacological Effects of Snake Venom Components: molecular targets. **J. Clin. Toxicol.**, v. 4, n. 190, p. 2161-0495.2190, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495.190>
- FRENZEL, A. et al. Designing Human Antibodies by Phage Display. **Transf. Med. Hemotherapy**, v. 44, n. 5, p. 312–318, 2017.
- GHEORGHIU, M. A short review on cell-based biosensing: challenges and breakthroughs in biomedical analysis. **J. Biomed. Res.**, v. 35, n. 4, p. 255, 2021. doi: <https://doi.org/10.7555%2FJBR.34.20200128>
- GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, n.3, p. 1400-1458, 2008. <https://doi.org/10.3390/s80314000>
- GUI, Q.; LAWSON, T.; SHAN, S.; YAN, L.; LIU, Y. The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics. **Sensors**, v. 17, n. 7, p. 1623, 2017. doi: <https://doi.org/10.3390/s17071623>
- GUO, X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. **J. of Biophotonics**, v. 5, ed. 7, p. 483-501, 2012. doi: <https://doi.org/10.1002/jbio.201200015>
- GUTIÉRREZ, J. M. Global Availability of Antivenoms: The Relevance of Public Manufacturing Laboratories. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 5, 2018. doi: [10.3390/toxins11010005](https://doi.org/10.3390/toxins11010005)
- GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A.; WILLIAMS, D. J.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>
- HALEEM, A.; JAVAID, M.; SINGH, R. P.; SUMANC, R.; RAB, S. Biosensors applications in medical field: A brief review. **Sens. Inter.**, v. 2, ed. 3, p. 2666-3511, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100100>
- ISBISTER, G. K. Antivenom availability, delays and use in Australia. **Toxicon: X**, v.17, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2022.100145>

- JAZAYERI, M. H.; AMANI, H.; POURFATOLLAH, A. A.; PAZOKI-TOROUDI, H.; SEDIGHIMOOGHADDAM, B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. **Sens. and Bio-Sens. Res.**, v. 9, p. 17-22, 2016. doi: 10.1016/j.sbsr.2016.04.002
- JOHNSTON, C. I.; RYAN, N. M.; PAGE, C. B.; BUCKLEY, N. A.; BROWN, S. G.; O'LEARY, M. A.; ISBISTER, G. K. The Australian Snakebite Project, 2005–2015 (ASP-20). **Med. J. Aust.**, v. 207, n. 3, p. 119–25, 2017. doi: <https://doi.org/10.5694/mja17.00094>
- JORGE, R. J.; MONTEIRO, H. S.; GONÇALVES-MACHADO, L.; GUARNIERI, M. C.; XIMENES, R. M.; BORGES-NOJOSA, D. M.; LUNA, K. P.; ZINGALI, R. B.; CORRÊA-NETTO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; PLA, D. Venomics and antivenomics of *Bothrops erythromelas* from five geographic populations within the Caatinga ecoregion of northeastern Brazil. **J Proteomics**, v. 114, p. 93-114, 2015. doi: 10.1016/j.jprot.2014.11.011.
- KARUNAKARAN, C.; PANDIARAJ, M.; SANTHARAMAN, P. Chapter 4- Immunosensors. **Biosens. and Bioelect**, p. 205-245, 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-803100-1.00004-9
- KAUL, S.; SAI KEERTHANA, L.; KUMAR, P.; BIRADER, K.; TAMMINENI, Y.; RAWAT, D.; SUMAN, P. Cytotoxin antibody-based colourimetric sensor for field-level differential detection of elapid among big four snake venom. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 15, n. 10, 2021. doi: 10.1371/journal.pntd.0009841
- KNUDSEN, C.; JÜRGENSEN, J. A.; FØNS, S.; HAACK, A. M.; FRIIS, R. U. W.; DAM, S. H.; BUSH, S. P.; WHITE, J.; LAUSTSEN, A. H. Snakebite Envenoming Diagnosis and Diagnostics. **Front. Immunol.**, v. 12, p. 661457, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.661457
- LOUREIRO, F. C.; NEFF, H.; MELCHER, E. U.; ROQUE, R. A.; de FIGUEIREDO, R. M.; THIRSTRUP, C.; LIMA, A. M. N. Simplified immunoassay for rapid Dengue serotype diagnosis, revealing insensitivity to non-specific binding interference. **Sens. and Bio-Sens. Res.**, v. 13, p. 96-103, 2017. doi:10.1016/J.sbsr.2016.10.002
- LUNA, K. P. O.; XAVIER, E. M.; PASCOAL, V. P. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, V. R. A. Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 6, p. 731-732, 2010. doi: 10.1590/S0037-86822010000600027
- MADUWAGE, K.; KARUNATHILAKE, P.; GUTIÉRREZ, J. M. Web-based snake identification service: A successful model of snake identification in Sri Lanka. **Toxicon**, v. 205, p. 3015-24, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.11.007>

MANAF, B. A. A.; HONG, S. P.; RIZWAN, M.; ARSHAD, F.; GWENIN, C.; AHMED, M. U. Recent advancement in sensitive detection of carcinoembryonic antigen using nanomaterials based immunosensors. **Surfaces and Interfaces**, v. 36, p. 102596, 2023. doi: 10.1016/j.surfin.2022.102596

MARGONO, F.; OUTWATER, A. H.; LOWERY WILSON, M.; HOWELL, K. M.; BÄRNIGHAUSEN, T. Snakebite Treatment in Tanzania: Identifying Gaps in Community Practices and Hospital Resources. **Int. J. Environ. Res. Public. Health**. v. 19, n. 8, p. 4701, 2022. doi: 10.3390/ijerph19084701

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas no Brasil. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes (J. L. C. Cardoso, F. O. S. França, Fan H. W., Málaque, C. M. S. e V. Haddad Jr., org.), p. 33-61, 2003.

MUKHERJEE, A. K.; KALITA, B.; DUTTA, S.; PATRA, A.; MAITI, C. R.; PUNDE, D. Snake Envenomation: Therapy and Challenges in India. In: Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. **CRC Press**, p. 581-592, 2021.

MURPHY, K. Imunobiologia de Janeway [recurso eletrônico]/Kenneth Murphy. Tradução: Machado, D. C., Renard, G., Gualdi L. P. Porto Alegre: **Artmed**, 8. ed., 2014. ISBN 978-85-8271-040-1

NARESH, V.; LEE, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1109, 2021. doi: 10.3390/s21041109

NEWMAN, J. D.; SETFORD, S. J. Enzymatic biosensors. **Mol. Biotechnol.**, v. 32, p. 249–268, 2006. doi: <https://doi.org/10.1385/MB:32:3:249>

NUNES, E. A. C.; LEITE, R. S.; ALVES, A. E. F.; MIGLIOLO, L.; LUNA, K. P. O. Estudo da neutralização dos componentes do veneno da cobra Bothrops erythromelas. Em: Gonçalves RM, Frihling BEF, Migliolo L, editores. Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica. Ponta Grossa: **Atena Editora**, p. 79-93, 2019. doi: 10.22533/at.ed.754190209.

OLIVEIRA, A. L.; VIEGAS, M. F.; da SILVA, S. L.; SOARES, A. M.; RAMOS, M. J.; FERNANDES, P. A. The chemistry of snake venom and it's medicinal potential. **Nat. Rev. Chem.**, v. 6, p. 451-469, jun. 2022.

PUZARI, U.; MUKHERJEE, A. K. Recent developments in diagnostic tools and bioanalytical methods for analysis of snake venom: A critical review. **Anal. Chim. Acta.**, v. 1137, p. 208-224, 2020. doi: 10.1016/j.aca.2020.07.054

RODRIGUES, C.P.F. *Imunologia Básica: Uma revisão aplicada a estudantes*. Minas Gerais, 2022. ISBN: 978-65-84869-05-9

RODRIGUES, R. R.; BERNARDES, N. R. As serpentes e a indústria farmacêutica: medicamentos e soro antiofídico. **Cadernos Camilliani**, v. 17, n. 2, p. 1981-1996, 2020.

RONKAINEN, N. J.; HALSALLB, H. B.; HEINEMANB, W. R. Electrochemical biosensors. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010. doi: <https://doi.org/10.1039/B714449K>

SANHAJARIYA, S.; DUFFULL, S. B.; ISBISTER, G. K. Pharmacokinetics of Snake Venom. **Toxins**, v. 10, n. 2, p. 732018. doi: 10.3390/toxins10020073

SCHRAMM, W.; PAEK, S-H.; VOSS, G. Strategies for the Immobilization of Antibodies. **Immuno Methods**, v. 3, n. 2, p. 93-103, 1993. doi: 10.1006/immu.1993.1043

SCHURER, J. M.; DAM, A.; MUTUYIMANA, M. T.; RUNANIRA, D. M.; NDUWAYEZU, R.; AMUGUNI, J. H. "At the hospital they do not treat venom from snakebites": A qualitative assessment of health seeking perspectives and experiences among snakebite victims in Rwanda. **Toxicon X**, v. 14, p. 100100, 2022. doi: 10.1016/j.toxcx.2022.100100

SEGURA, A.; CASTILLO, M. C.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L. R.; VILLALTA, M.; BONILLA, C.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, M. Y.; ARAÚJO, H. P.; BOLLER, M. A.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANO-MARTINS, I. S.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G. P.; GEOGHEGAN, P.; HIGASHI, H. G.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 980-9, 2010. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.07.001

SEQIRUS: a CSL Company. Snake Venom Detection Kit (SVDK) [Manual de instruções]. Seqirus Pty Ltd. Parkville, Victoria, Australia. p. 1-6, 2020.

SHI, X.; GU, W.; LI, B.; CHEN, N.; ZHAO K.; XIAN, Y. Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles. **Microchim Acta**, v. 181, p. 1–22, 2014. doi: <https://doi.org/10.1007/s00604-013-1069-5>

SILVA, A.; ISBISTER, G.K. Current research into snake antivenoms, their mechanisms of action and applications. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 48, n. 2, p. 537-546, 2020.

SILVA, H. R. dos S.; de CASTRO, T. M. G.; BATISTA NETO, J. B. dos S.; VALE, J. K. L.; BORBA-PINHEIRO, C. J. Caracterização epidemiológica de acidentes com animais peçonhentos entre 2012-2021: revisão sistemática. **Rev. Ciên. Plu.**, v. 9, n. 2, p. 1–28, 2023. doi: <https://doi.org/10.21680/2446-7286.2023v9n2ID29905>

SING, P. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 110-130, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.01.118>

Soro Antibotrópico (penta valente) [bula de medicamento]. São Paulo: Instituto Butantan. p. 1-5, 2022. Disponível em: <https://butantan.gov.br/assets/arquivos/soros-e-vacinas/soros/Soro%20antibotr%C3%B3pico.pdf>

STEUTEN, J.; WINKEL, K.; CARROLL, T.; WILLIAMSON, N. A.; IGNJATOVIC, V.; FUNG, K.; PURCELL, A. W.; FRY, B. G. The molecular basis of cross-reactivity in the Australian snake venom detection kit (SVDK). **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1041-52, 2007. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.07.023

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 290, 2017. doi: 10.3390/toxins9090290

TEJA, G. K. A.; MORE, N.; KAPUSETTI, G. Advanced Biosensor-based Strategy for Specific and Rapid Detection of Snake Venom for Better Treatment. **Explor. Res. Hypothesis Med.**, v. 3, n. 3, p. 61-67, 2018. doi: 10.14218/ERHM.2018.00008

THIRSTRUP, C.; ZONG, W.; BORRE, M.; NEFF, H.; PEDERSEN, H. C.; HOLZHUETER, G. Diffractive optical coupling element for surface plasmon resonance sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 100, n. 3, p. 298-308, 2004. doi: 10.1016/j.snb.2004.01.010

TILLER, K. E.; TESSIER, P. M. Advances in Antibody Design. **Ann. Review Biomed. Eng.**, v. 17, n. 1, p. 191–216, 2015.

VASUKI, S.; VARSHA, V.; MITHRA, R.; DHARSHNI, S.; ABINAYA, R.; DHARSHINI, N.; SIVARAJASEKAR, N. Thermal biosensors and their applications. **Amer. Inter. Jour. Res. Sci., Tec., Eng., Mat.**, p. 262-264, 2019.

WIJAYA, E.; LENAERTS, C.; MARICOT, S.; HASTANIN, J.; HABRAKEN. S.; VILCOT, J-P.; BOUKHERROUB, R.; SZUNERITS, S. Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. **Cur. Opi. Sol. Sta. and Mat. Sci.**, v. 15, ed. 5, p. 208-224, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2011.05.001>

WILLIAMS, H. F.; LAYFIELD, H. J.; VALLANCE, T.; PATEL, K.; BICKNELL, A. B.; TRIM, S. A.; VAIYAPURI, S. The Urgent Need to Develop Novel Strategies for the Diagnosis and Treatment of Snakebites. **Toxins**, v. 11, n. 6, p. 363, 2019b. doi: 10.3390/toxins11060363

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Snakebite envenoming. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>. Acesso em: 10 dez.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515641>

YAO, N.; WANG, J.; ZHOU, Y. Rapid Determination of the Chemical Oxygen Demand of Water Using a Thermal Biosensor. **Sensors**, v. 14, n. 6, p. 9949-9960, 2014. doi: <https://doi.org/10.3390/s140609949>

YOUNG, M. B.; OH, B-K.; LEE, W.; LEE, W. H.; CHOI, J-W. Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer. **Bios. and Bioelect**, v. 21, n. 1, p. 103-110, 2005. doi: 10.1016/j.bios.2004.09.003

ZAMORA-GÁLVEZ, A.; MORALES-NARVÁEZ, E.; MAYORGA-MARTINEZ, C. C.; MERKOCI, A. Nanomaterials connected to antibodies and molecularly imprinted polymers as bio/receptors for bio/sensor applications. **Applied Materials Today**, v. 9, p. 387-401, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.09.006>

ZHANG, P.; CHEN, Y-P.; WANG, W.; SHEN, Y.; GUO, J-S. Surface plasmon resonance for water pollutant detection and water process analysis. **TrAC Trends in Anal. Chem.**, v. 85, p. 153-165, 2016. doi: 10.1016/j.trac.2016.09.003

ZHOU, Y.; HU, W.; PENG, B.; LIU, Y. Biomarker Binding on an Antibody-Functionalized Biosensor Surface: The Influence of Surface Properties, Electric Field, and Coating Density. **J. Phys. Chem. C.**, v. 118, n. 26, p. 14586–14594, 2014. doi: 10.1021/jp501885p