



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ELY SUNEY FERREIRA BORGES

DETECÇÃO DE VENENO OFÍDICO EM SENSOR SPR

**CAMPINA GRANDE
2020**

ELY SUNEY FERREIRA BORGES

DETECÇÃO DE VENENO OFÍDICO EM SENSOR SPR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biossensor.

Orientador: Profa. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna

Coorientador: Profa. Dra. Fernanda Cecília Correia Lima Loureiro

**CAMPINA GRANDE
2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B732d Borges, Ely Suney Ferreira.
Detecção de veneno ofídico em sensor SPR [manuscrito] /
Ely Suney Ferreira Borges. - 2020.
59 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde , 2021.

"Orientação : Profa. Dra. Karla Patrícia de Oliveira Luna ,
Departamento de Biologia - CCBS."

1. Ofidismo. 2. Bothrops. 3. Soro antiveneno. 4. Tecnologia
SPR. I. Título

21. ed. CDD 597.96

ELY SUNEY FERREIRA BORGES

DETECÇÃO DE VENENO OFÍDICO EM SENSOR SPR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biossensor.

Aprovada em: 16 / 12 / 2020 .

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Mathias Weller
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Me. Álisson Emmanuel Franco Alves
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A todos os quais considero família, pela paciência e amor, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensuravelmente o Designer Inteligente, àquele quem criou e rege o universo, possuindo, assim, o conhecimento total da Ciência, Deus, por ter me sustentado em todos os momentos e me dado capacidade e inteligência.

A toda minha família, em especial à minha mãe Maria do Socorro, minha guerreira e heroína, ao meu pai Eduardo, às minhas irmãs Elyonara e Elyziane, as quais tenho um amor profundo, por sempre estarem comigo e me ajudarem neste trabalho de acordo com suas vocações, e ao meu perfeito cachorrinho Scooby por ter transformado minha quarentena e ser meu refúgio nos momentos intranquilos.

Ao meu inestimável namorado Ayrton, a quem tenho grande apreço e carinho, por ter me influenciado, com sua empolgação, a conhecer o mundo dos venenos ofídicos, me encorajando a buscar tal oportunidade, e também por me alegrar, apoiar e estar junto a mim pelos corredores da universidade e mesas da biblioteca, sendo minha principal companhia desde o início da nossa graduação.

A todos amigos que fizeram parte da minha caminhada, em especial às amigas mais graciosas Rayla, Marcilene, Ruthe, Ketylin, Arlayne, Brunna e Abda pelos auxílios, conselhos, força e alegrias em tantos momentos.

À minha querida orientadora Karla Luna, por tudo que aprendi observando-a, pela sua tamanha responsabilidade, por acreditar em mim e por estar comigo desde o início da minha formação.

À minha doce coorientadora Fernanda Cecilia Correia Lima Loureiro por toda amabilidade, paciência e disponibilidade. Ao ilustre professor Hemult Neff (*in memoriam*) por sua dedicação e extrema contribuição ao Laboratório de Biossensores, assim como ao professor Antonio Marcus N. Lima. E ao Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande, em especial ao Laboratório de Biossensores.

Ao companheiro de laboratório Alisson Emmanuel por toda parceria, conhecimento e cansaço compartilhados; e à Stayner por sua disponibilidade e grande gentileza em me ajudar na área matemática.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação e a todos que estudaram comigo, compartilhando momentos e conhecimentos. Jamais esquecerei de cada docente e de cada colega que tive contato nesses anos.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

“Tudo o que fizerem, façam de todo coração, como para o Senhor, e não para os homens. Colossenses 3:23”

RESUMO

Acidentes ocasionados por serpentes ocorrem em todo o mundo e são considerados um agravo à saúde pública. O veneno ofídico é constituído por uma diversidade de substâncias, incluindo diferentes famílias de proteínas as quais carregam muitas toxinas, estas, ao entrarem em contato com o sistema biológico, desencadeiam diferentes atividades fisiopatológicas. No Brasil, o gênero *Bothrops* é distribuído por todo território nacional bem como é responsável pelo maior número de acidentes. Atualmente, não há testes rápidos disponíveis que constatem a ocorrência de envenenamento ofídico assim como discriminem o gênero causador do acidente. Os biossensores SPR são instrumentos ópticos que detectam em tempo real as interações moleculares que acontecem em sua superfície sensora, local onde uma cobertura de reconhecimento biológico interage com moléculas de interesse existentes na amostra fluídica. Esse evento promove uma mudança no ângulo de refração da luz incidente no biochip. Para o desenvolvimento de um biossensor ideal, o estudo da adsorção é um parâmetro indispensável. Esta pesquisa objetivou implementar uma metodologia baseada em um biossensor SPR para (1) avaliação de reconhecimento específico e inespecífico entre soro antiofídico e veneno, analisando a concentração mínima detectável, (2) a presença ou ausência de interações inespecíficas e (3) a aplicabilidade de modelos de adsorção. O instrumento SPR utilizado é denominado Colbi-VIR; os componentes biológicos presentes no fluido são transportados através de uma bomba peristáltica até o biochip coberto com uma película de ouro de 50nm onde ocorre a adsorção; um processador de sinais mensura a refletividade que é apresentada através do Software "CobiSoft". Por meio desse estudo foi possível estabelecer a concentração mínima de veneno detectável pelo biossensor, determinar os índices de refração para as distintas concentrações de veneno botrópico utilizadas sobre o soro antibotrópico, assim como compará-los às respostas da interação entre antígenos e anticorpos inespecíficos, observando que o índice de refração foi bem mais baixo, além disso, foi comprovada a aplicabilidade do Modelo de Aproximação de Langmuir por uma exponencial para altas concentrações. Os resultados demonstraram excelente detecção em tempo real das interações entre antígeno e anticorpo na superfície sensora, sendo assim, esta técnica se mostrou promissora para futura aplicação clínica em acidentes ofídicos.

Palavras-Chave: Ofidismo. *Bothrops*. Soro antiveneno. Tecnologia SPR.

ABSTRACT

Accidents caused by snakes occur worldwide and they are considered as a public health problem. Ophidian venom is composed by a diversity of substances, including different protein families that carry many toxins, which, when in contact with the biological system, result in different pathophysiological activities. In Brazil, the *Bothrops* genus is distributed throughout the national territory and it is responsible for the largest number of accidents. Currently, there are no rapid tests available that verify the occurrence of snakebite envenoming and also that discriminate the genus which caused the accident. SPR biosensors are optical instruments that detect, in real-time, molecular interactions which occur on its sensing surface, the place where a biological recognition cover interacts with molecules of interest in the fluid sample. This event promotes a change in the refraction angle of the incident light on the biochip. In order to the development of an ideal biosensor, the study of adsorption is an indispensable parameter. This research aimed to implement a methodology based on a SPR biosensor to (1) evaluate the specific and nonspecific recognition between antiophidic serum and poison by analyzing the minimum detectable concentration, (2) the presence or absence of nonspecific interactions and (3) the applicability of two adsorption models. The SPR instrument used is called Colbi-VIR. The biological components present in the fluid are transported through a peristaltic pump to the biochip covered with a 50nm gold film where adsorption occurs; a signal processor measures the reflectivity which is shown through the "ColbiSoft" software. Through this study, it was possible to establish the minimum concentration of poison detectable by the biosensor; to determine the refractive indexes for the different concentrations of botropic venom used on antitropic serum, as well as to compare them to the responses of the interaction between nonspecific antigens and antibodies, observing that the refractive index was much lower. Moreover, the Langmuir Approximation Model's applicability was also proven by an exponential for high concentrations. The results showed excellent real-time detection of the interactions between antigen and antibody on the sensor surface, thus, this technique has been shown as promising for future clinical applications in snakebite accidents.

Keywords: Ophidism. *Bothrops*. Antivenom serum. SPR technology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ilustração das características de adsorção e dessorção de imobilização de proteínas.....	27
Figura 2 –	Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:12500).....	29
Figura 3 –	Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:10000).....	30
Figura 4 –	Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:7500).....	30
Figura 5 –	Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:5000).....	31
Figura 6 –	Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:2500).....	32
Figura 7 –	Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:1000).....	32
Figura 8 –	Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:500).....	33
Figura 9 –	Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:100).....	34
Figura 10 –	Curvas da adsorção do VenB sobre o SAB em função do tempo para diferentes concentrações.....	34
Figura 11 –	Isoterma de Langmuir para a adsorção específica.....	41
Figura 12 –	Derivada da cobertura das concentrações de 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:7500, 1:10000 e 1:12500.....	43
Figura 13 –	Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:10000) sobre o soro inespecífico (SAC).....	44
Figura 14 –	Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:7500) sobre o soro inespecífico (SAC).....	45
Figura 15 –	Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:5000) sobre o soro inespecífico (SAC).....	45
Figura 16 –	Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:2500) sobre o soro inespecífico (SAC).....	46

Figura 17 – Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:1000) sobre o soro inespecífico (SAC).....	47
Figura 18 – Curvas da adsorção e dessorção do VenB sobre o SAC em função do tempo para diferentes concentrações.....	47
Figura 19 – Comparação entre os índices de refração do soro e veneno específicos e inespecíficos.....	48
Figura 20 – Isoterma de Langmuir para a adsorção inespecífica.....	49
Figura 21 – Derivada da cobertura da concentração de 1:1000.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela comparativa em relação às concentrações, limite de detecção e tempo de resposta entre autores.....	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AML	Aproximação do Modelo de Langmuir
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
RIU	Unidade do Índice de Refração (do inglês, <i>Refractive Index United</i>)
SAB	Soro Antibotrópico
SAC	Soro Anticrotático
SPR	Superfície de Ressonância de Plasma (do inglês, <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
VenB	Veneno Botrópico
VenC	Veneno Crotático

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1	Veneno ofídico.....	16
2.2	Epidemiologia dos acidentes ofídicos.....	17
2.3	Acidentes botrópicos.....	18
2.4	Soroterapia.....	19
2.5	Biossensores.....	20
2.5.1	<i>Biossensores SPR.....</i>	21
2.6	Modelos de Adsorção.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivo geral.....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	METODOLOGIA.....	25
4.1	Local.....	25
4.2	Obtenção dos Soros.....	25
4.3	Obtenção dos Venenos.....	25
4.4	Preparo das amostras.....	25
4.5	Descrição do método de detecção.....	25
4.6	Análise dos gráficos.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	Análise da interação entre veneno botrópico e soro antibotrópico.....	28
5.2	Estudo da adsorção do veneno de <i>Bothrops</i>	40
5.2.1	<i>Isoterma de Adsorção de Langmuir para a adsorção específica.....</i>	40
5.2.2	<i>Aproximação do Modelo de Langmuir por uma exponencial (AML) para a adsorção específica.....</i>	42
5.3	Análise da interação entre veneno botrópico e soro anticrotálico.....	44
5.3.1	<i>Isoterma de Adsorção de Langmuir para a adsorção inespecífica.....</i>	49
5.3.2	<i>Aproximação do Modelo de Langmuir por uma Exponencial (AML) para a adsorção inespecífica.....</i>	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ocasionados por serpentes acometem de 4,5 a 5,4 milhões de pessoas por ano de acordo com a Organização Mundial da Saúde, apesar disso, está dentro da classe de doenças negligenciadas. O veneno ofídico possui uma diversidade de substâncias, tendo como principal componente proteínas (enzimáticas e não enzimáticas) as quais, ao entrarem em contato com a presa, desencadeiam cascatas biológicas que atingem de forma específica algum local do sistema biológico (CARDOSO, 2003).

No território brasileiro, o gênero *Bothrops* é o causador da maioria dos acidentes, por esse motivo, deve receber uma atenção primordial. A peçonha das serpentes deste gênero possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica (BRASIL, 2001). No Brasil, não há testes rápidos que identifiquem do gênero da serpente que envenenou a vítima, entretanto, é necessário que se tenha tal conhecimento para que o soro antiofídico aplicado seja correspondente ao gênero da serpente, fato este que é decisivo na efetividade do tratamento. Além disso, o tempo para a descoberta do envenenamento é crucial, tendo em vista que quanto mais rápido descobrir-se o gênero da serpente mais rápido será administrado o soro antiofídico, assim, menos complicações ocorrerão ao paciente (VITORETI, 2014).

Os Biossensores ópticos baseados na ressonância de plasmons de superfície são ferramentas que possuem a capacidade de mensurar acontecimentos biológicos, a resposta é apresentada ao passo em que a massa de sua superfície é alterada pela adsorção de substâncias, promovendo uma alteração no ângulo de refração da luz incidente no biochip. Dentro da classe de biossensores estão inseridos os imunossensores, os quais se apoiam na alta capacidade do anticorpo se ligar de forma específica com o antígeno correspondente (LOUREIRO, 2014) promovendo uma resposta indubitável. A área de imunossensores tem sido pouco trilhada por pesquisadores da Toxinologia (LUNA, 2017).

Estudos para quantificar as moléculas adsorvidas sobre superfícies são de extrema importância. Uma das abordagens de quantificação comumente utilizadas consiste na construção de isotermas de adsorção segundo um modelo teórico que represente matematicamente o fenômeno, como por exemplo, a Isoterma de Langmuir, tais isotermas são construídas a partir de dados de equilíbrio obtidos experimentalmente (LOUREIRO, 2014).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Veneno ofídico

A função primordial dos venenos ofídicos é imobilizar a presa interferindo e lesionando seus sistemas vitais, além disso, são utilizados como forma de defesa no momento em que as serpentes se sentem ameaçadas. Os venenos ofídicos compreendem uma diversidade de substâncias bioativas de natureza orgânica, como proteínas, peptídeos e aminoácidos, e de natureza inorgânica, como sais minerais, aminas e alcaloides. O peso seco dos venenos compreende até 90% de proteínas divididas em duas categorias: (1) Proteínas enzimáticas, possuem como função principal a imobilização da presa ao acionarem cascatas de reações químicas, a exemplo, as serino-proteinases, metaloproteases, L-aminoácido oxidase e fosfolipase A2; (2) Proteínas não enzimáticas, como as desintegrinas, lectinas de tipo C e peptídeos natriuréticos. A outra porcentagem do peso seco dos venenos corresponde a ânions e cátions inorgânicos, aminas, peptídeos, aminoácidos, carboidratos e lipídeos (JENNINGS *et al*, 2005; GUTIÉRREZ, 2009; CARDOSO, 2003).

O veneno é composto por diversas famílias de proteínas, cada uma delas carregam muitas toxinas ou isoformas de toxinas diferentes adaptadas através da seleção natural (CALVETE *et al.*, 2009; VON REUMONT *et al*, 2014; WONG; BELOV, 2012; Mc CLEARY). A partir de mutações de genes, deriva genética e seleção natural a mistura proteica primitiva do veneno se tornou cada vez mais variada entre as diferentes famílias, os componentes do veneno de cada espécie foram se ajustando distintamente de acordo com as necessidades específicas a fim de atribuir a toxicidade adequada para predação (AMORIM, 2018). A transcriptômica, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e espectrometria de massa, entre outras técnicas, tornaram conhecidas diversas toxinas presentes nos venenos de serpentes (TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K., 2017). A complexa diversidade na composição dos venenos ofídicos é vista em todos os níveis hierárquicos da taxonomia de serpentes, entretanto, como as glândulas de veneno das serpentes são homólogas algumas famílias de toxinas estão presentes nas três famílias que possuem presas frontais (AMORIM, 2018).

As proteínas que integram os venenos são classificadas de acordo com suas funções homeostáticas, sendo elas: enzimas que coagulam fibrinogênio, enzimas que degradam fibrinogênio, ativadores de plasminogênio, ativadores de protrombina, ativadores de fator V da coagulação, ativadores de fator X da coagulação, enzimas com atividade anticoagulante incluindo inibidores da formação do complexo protrombinase, inibidores de trombina, fosfolipases e ativadores de proteína C, enzimas com atividade hemorrágica, enzimas que degradam inibidores de serinoproteinases plasmáticas, ativadores da agregação plaquetária incluindo enzimas de ação direta, componentes não enzimáticos e agentes que necessitam de cofator, inibidores da agregação plaquetária como alfa-fibrinogenases, 5'-nucleotidases e disintegrinas. Vale ressaltar que tais substâncias não estão reunidas em um só veneno (MARKLAND, 1998).

2.2 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos são considerados um problema relevante de saúde pública devido à sua frequência e gravidade, porém, mesmo tendo grande ocorrência em todo o mundo, é considerado um problema negligenciado. Os dados disponíveis pela Organização Mundial da Saúde mostram que 4,5 a 5,4 milhões de pessoas são picadas por cobras anualmente, destas, 1,8 a 2,7 milhões desenvolvem complicações clínicas, 400.000 ficam incapacitadas ou desfiguradas definitivamente e 81.000 a 138.000 morrem. De acordo com Kasturiratne *et al.* (2008), a Índia possui o maior número de acidentes por ano, apresentando 81.000, seguido pelo Sri Lanka com 33.000, Vietnã com 30.000, Brasil com 30.000, México com 28.000 e Nepal com 20.000 acidentes.

Na América do Sul, o Brasil é o país com maior incidência de acidentes ofídicos, sendo as regiões Norte e Nordeste as mais atingidas (SILVA *et al.*, 2015). A cada ano são registrados cerca de 26.112 casos, com letalidade de 6,95%, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN). As serpentes peçonhentas das famílias Viperidae e Elapidae possuem maior relevância para a saúde pública no Brasil e compreendem em torno de 73 espécies de importância médica. Na família Viperidae encontram-se os gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* (jararaca), *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu), já na família

Elapidae, encontram-se os gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (corais verdadeiras) (COSTA; BÉRNILS 2014). No Brasil, os acidentes ofídicos decorrem predominantemente das serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothrocophias*, compreendendo 87% dos envenenamentos do país (BRASIL, 2016).

O quadro clínico desenvolvido pela vítima depende da quantidade de veneno inoculado, localização da picada, idade e, especialmente, do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico; tais fatos refletem na gravidade do acidente e nas complicações no quadro do paciente (SANTOS *et al.*, 2016a). Os acidentes ofídicos são mais comuns nos países tropicais e subtropicais, em especial nas áreas rurais onde o acesso aos serviços de saúde é limitado. Os grupos mais vulneráveis incluem homens e jovens na fase economicamente ativa que moram ou realizam trabalhos em áreas rurais, como agricultura, pesca e caça. Os verdadeiros impactos dos envenenamentos para a saúde pública é um tanto desconhecidos devido a dois fatores: (1) altos índices de subnotificações; (2) muitas vítimas não procuram atendimento nos centros de saúde, optando por tratamentos alternativos. Assim, a obtenção dos dados reais é impedido, dificultando a potencialização da prevenção e do tratamento (KASTURIRATNE *et al.*, 2008).

2.3 Acidentes botrópicos

O veneno botrópico possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica. A ação proteolítica é gerada por enzimas como proteases, que liberam cininas ao quebrar o cininogênio, gerando óxido nítrico e prostaglandinas; peptídeos vasoativos, disparando a atividade da bradicinina ao inibir a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA); e componentes da cascata do complemento, fosfolipases e hialuronidases. Já a coagulopatia é gerada pelo acionamento isolado ou simultâneo do fator X e a protrombina, o que conseqüentemente ocasiona a destruição do fibrinogênio e da fibrina, refletindo em incoagulabilidade sanguínea. A ação hemorrágica pode ser induzida localmente ou sistemicamente e é proveniente das hemorraginas que provocam lesões na membrana basal dos capilares aumentando a permeabilidade (GUTIÉRREZ, 2009; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989).

A resposta inflamatória local gerada pelas toxinas do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* ocorre pela síntese e/ou liberação de mediadores endógenos como histamina e serotonina, fator ativador de plaquetas (PAF) e pela ativação de receptores adrenérgicos α -1 e α -2 que causa a liberação de proteínas presentes no citoplasma das células (CHAVES; GUTIÉRREZ, 1995). Além disso, estão presentes mediadores lipídicos no local, o que significa que enzimas com atividade de fosfolipase A2 fazem parte da composição do veneno ou são induzidas por eles; os compostos originados a partir do ácido araquidônico são os principais causadores dos edemas que ocorrem neste tipo de envenenamento (FERREIRA *et al.*, 2013; GONÇALVES, L. R., MARIANO, M., 2000).

O veneno botrópico também pode gerar necrose muscular devido à presença de miotoxinas que afetam os canais iônicos das células do músculo alterando a permeabilidade da membrana celular. Assim como as proteases promovem o rompimento dos vasos sanguíneos gerando isquemia da célula muscular (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989).

2.4 Soroterapia

A Soroterapia Antiveneno (SAV) é considerada o tratamento adequado para vítimas de acidentes ofídicos (BRASIL, 2001). O Instituto Butantan, a Fundação Ezequiel Dias e o Instituto Vital Brazil são os produtores de soro para a rede pública do Brasil. Os soros antivenenos possuem em sua composição imunoglobulinas produzidas através da administração de pequenas doses de veneno em animais, principalmente equinos (CUNHA, 2017).

A soroterapia é administrada conforme a magnitude do acidente, sendo assim, o número de ampolas de soro antiveneno para tratamento de acidentes botrópicos considerados leves são de 2 a 4, para os acidentes moderados de 4 a 8 ampolas e 12 ampolas para os graves. Os tipos de soro que podem ser utilizados são: SAB (Soro Antibotrópico), SABL (Soro Antibotrópico e Antilaquéutico) e SABC (Soro Antibotrópico e Anticrotálico). Tanto adultos quanto crianças recebem a mesma quantidade de dose, pois a finalidade é neutralizar a maior quantidade possível dos antígenos circulantes independente de idade ou peso. Quando o soro concentrado é diluído na razão de 1:2 a 1:5 em soro fisiológico ou glicosado 5%

antes de ser administrado os efeitos adversos apresentam aparente diminuição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Alguns testes podem ser realizados para auxiliar o tratamento do envenenamento, tais como: tempo de coagulação (TC), hemograma, exame sumário de urina e imunodiagnósticos, além da anamnese do paciente envenenado. Porém, tais exames não definem o tipo de acidente ofídico, sendo utilizados apenas para auxiliar a definição do diagnóstico e avaliar a evolução clínica dos casos (BRASIL, 2001). Desse modo, 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 efetividade no tratamento (VITORETI, 2014) tendo em vista que no Brasil não há disponíveis para a população testes rápidos que apontem se houve envenenamento ofídico assim como o gênero causador do acidente.

2.5 Biossensores

Os biossensores podem ser usados em distintas áreas, principalmente para mensurações continuadas de acontecimentos biológicos. De maneira geral, a composição do biossensor compreende o material biológico de reconhecimento incorporado intimamente a um transdutor. Ao inserir os componentes biológicos, o sinal da reação é detectado, transduzido e amplificado (SHANTILATHA, 2003; SILVA, 2011).

Um atributo importante dos biossensores é a especificidade e a alta sensibilidade. Para a eficiência na detecção é interessante a utilização de elementos biológicos com alto índice de especificidade, como por exemplo, enzimas ou anticorpos, devido a isso, são os mais utilizados. Dependendo do transdutor, os biossensores podem ser categorizados como eletroquímicos, elétricos, térmicos, ópticos e piezoelétricos. Assim como podem ser classificados de acordo com a forma do reconhecimento do sinal: índice de refração, amperometria, condutividade, luminescência, potenciometria, fluorescência (CALIL, 2011).

2.5.1 Biossensores SPR

Biossensores SPR baseiam-se no Fenômeno de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*). A onda de densidade de carga que ocorre na interface de dois meios com índices de refração distintos, como um metal e um dielétrico, é o que se denomina plasmon de superfície, este fenômeno ocorre quando um raio de luz incide na área de interação. (CHUNG, 2007). A massa da superfície é alterada ao passo que biomoléculas são adicionadas, fenômeno este que ocasiona o deslocamento do ângulo de ressonância em função do tempo. O transdutor transforma a reação química em um sinal de saída passível de quantificação, que é ampliado e mostrado. As variações do índice de refração em função do tempo são mostradas a partir do processamento digital em função do tempo (LOUREIRO, 2014). O sensor SPR reconhece o aumento da espessura da camada ocasionada pelas interações moleculares, podendo ser por ligações específicas como não específicas (ALVES, 2020).

Esta tecnologia óptica identifica interações biomoleculares e se destacam na investigação de interações biomoleculares por proporcionarem uma rápida resposta (poucos minutos e até segundos), por serem altamente sensíveis e seletivas e por não necessitarem de marcadores radioativos ou bioquímicos, como enzimas, radioisótopos e partículas metálicas que podem modificar as propriedades químicas, cinéticas e termodinâmicas (ALTINTAS E TOTHILL, 2013; LOUREIRO, 2014).

O biossensor SPR compreende: (1) uma superfície de acoplamento óptico, que pode ser um prisma, fibra ótica, entre outros; (2) um filme fino, em virtude de sua estabilidade química o ouro é mais adequado, possuindo a importante capacidade de transformar energia de fótons em uma oscilação agrupada de elétrons (JAIN *et al.*, 2006); (3) uma cobertura de reconhecimento biológico imobilizada previamente a qual exerce interação com moléculas de interesse existentes na amostra fluídica; (4) um processador digital que mede tanto a refletividade quanto as demais alterações de interesse, geralmente acoplado a um microcontrolador ou a um computador (NAIMUSHIN, 2003; THIRSTRUP, 2004; MAIER, 2007).

Os biossensores conhecidos como imunossensores possuem como princípio a capacidade do anticorpo se ligar ao antígeno correspondente já que estes elementos biológicos são seletivos, específicos e possuem alta afinidade (LOUREIRO, 2014). Unindo a característica de especificidade e seletividade dos

antígenos e anticorpos com as características peculiares dos biossensores SPR, essa ferramenta se torna um tanto oportuna para detectar compostos biológicos que apresentam nocividade à saúde (MCDONNELL, 2001).

2.6 Modelos de adsorção

Para o desenvolvimento de um biossensor ideal, o estudo da adsorção é um parâmetro indispensável a ser estabelecido, assim, é necessário conhecer e avaliar as constantes de equilíbrio relativas às interações do imunocomplexo antígeno-anticorpo. A partir de tais dados é possível produzir biossensores mais sensíveis, seletivos e, principalmente, mais estáveis, que terão um maior potencial para produção comercial (CARVALHO, 2003).

Isotermas de adsorção são curvas que quantificam as moléculas adsorvidas em um substrato a uma dada temperatura de acordo com a quantidade de soluto adsorvido em função da sua concentração. Mesmo com uma diversidade de procedimentos que buscam interpretar interações moleculares, como cromatografia, eletroforese, radio imunoensaio, cromatografia por imunoafinidade e ELISA, poucas tornam possível determinar diretamente as constantes cinéticas de adsorção e de dessorção ou diferenciar o comportamento da associação e dessorção. Dentre as isotermas comumente utilizadas, destacam-se a isoterma de Langmuir, isoterma de Freundlich e isoterma BET (Brunauer, Emmet e Teller), suas aplicações variam de acordo com o tipo de adsorção (LOUREIRO, 2014).

A Isoterma de Langmuir é um tipo de curva isotérmica elaborada em 1916 por Irving Langmuir com o intuito de analisar, a uma determinada temperatura, a influência da pressão do gás no recobrimento da superfície onde estava sendo adsorvido (SOHN; KIM, 2005). A princípio, tal modelo foi desenvolvido para a análise de adsorção molecular reversível, porém, por ser simples e oportuna, tem sido aplicada com êxito para descrever eventos de ligações irreversíveis como a adsorção de proteínas em diferentes sistemas. Por este motivo, essa isoterma foi utilizada no presente estudo, assim como a forma modificada da Isoterma de Langmuir denominada de Aproximação do Modelo de Langmuir por uma exponencial, a qual a taxa de crescimento decresce exponencialmente com o tempo (LOUREIRO, 2014).

Diante da epidemiologia e negligência aos envenenamentos ofídicos, assim como a inexistência de testes rápidos no território brasileiro, fica clara a necessidade de estudos para o desenvolvimento de um biossensor que detecte o gênero da serpente que ocasionou o acidente para que haja uma diminuição na morbidade e a mortalidade que acomete pessoas envenenadas (SALOMÃO, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Implementar uma metodologia baseada em biossensor SPR para avaliação de reconhecimento específico e inespecífico entre soro antiofídico e veneno.

3.2 Objetivos específicos

- Conhecer os índices de refração de soro antibotrópico e veneno botrópico em diferentes concentrações em função do tempo;
- Conhecer os índices de refração de soro anticrotálico frente ao veneno botrópico em diferentes concentrações em função do tempo;
- Utilizar diferentes modelos de análise da adsorção para verificar suas aplicabilidades.

4 METODOLOGIA

4.1 Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biossensores I, coordenado pelos professores Antonio Marcus Nogueira Lima e Fernanda Cecilia Correia Lima Loureiro, localizado no prédio LARCA (Laboratório de Referência em Controle e Automação), pertencente ao departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no campus I, em Campina Grande, Paraíba, Brasil.

4.2 Obtenção do Veneno

O veneno de serpentes *Bothrops erythromelas* foi obtido através da ordenha de espécimes em cativeiro provenientes do Museu Vivo Répteis da Caatinga, localizado no município de Puxinanã, estado da Paraíba. Foram selecionados apenas animais adultos. O veneno foi mantido à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

4.3 Obtenção dos Soros

Os soros antiveneno comercializados no Brasil foram obtidos por doação da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco.

4.4 Preparação das amostras

Todas as soluções proteicas utilizadas foram diluídas em PBS (tampão fosfato-salino) imediatamente antes das análises.

4.5 Descrição do método de detecção

O biossensor óptico (SPR) utilizado nos testes denomina-se Colbi-VIR, descrito em Thirstrup et al. (2004). Sua sensibilidade é extremamente alta, da ordem de 10^{-7} RIU (do inglês, *Refractive Index Unit*). O sensor tem como princípio a

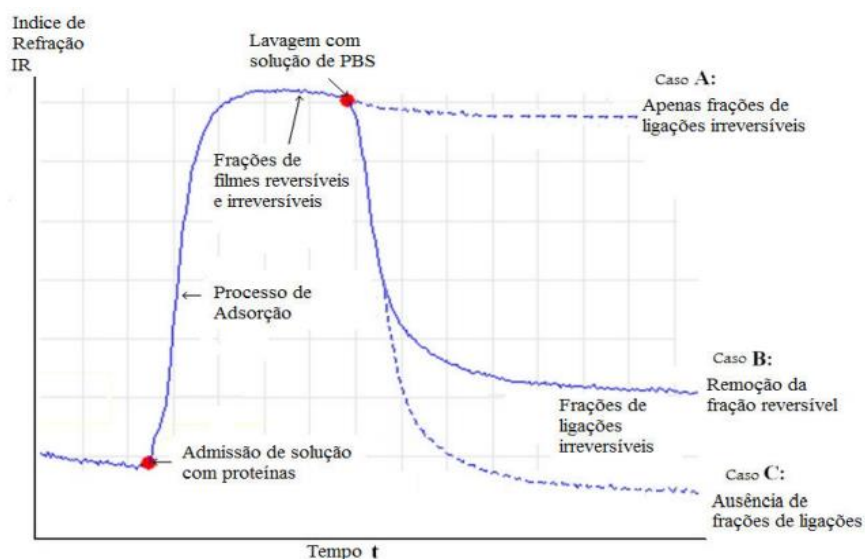
Ressonância de Plasmons de Superfície (do inglês *Surface Plasmon Resonance*, SPR), de forma que a mudança do ângulo de refração da luz incidente ocorre devido à adsorção dos componentes biológicos sobre a superfície sensora, (biochips poliméricos SPR, descartáveis, cobertos com uma película de ouro de 50nm). Um processador de sinais gera cálculo da refletividade, que é apresentada através do Software “CobiSoft” da empresa *VIR Biotechnology*®. O controle do transporte do fluido (que é levado ao chip disposto no interior do sensor) é realizado por uma bomba peristáltica. Durante a circulação do microfluido, as substâncias de interesse presente neste adsorvem-se na película de ouro ocasionando uma deflexão no gráfico gerado pelo software, em que a variação do índice de refração é gravada em função do tempo; quando toda a superfície se encontra coberta a linha do gráfico torna-se constante (o tempo para que a constância ocorra varia de acordo com a substância), a resposta do biossensor se dá em tempo real (LOUREIRO, 2014).

Para a realização dos testes, o primeiro passo é a limpeza da superfície de ouro, em que são realizados breves ciclos de limpeza no chip desacoplado do sensor, lavando-o com água destilada, NaOCl (hipoclorito de sódio), e uma lavagem final com álcool para hidrofilar a superfície. Depois da secagem, o biochip é acoplado ao sensor para uma limpeza interna com água e PBS a fim de evitar qualquer contato e possíveis contaminações do ambiente. Esta circulação de PBS também tem o intuito de simular algum fluido corporal humano, assim, após toda superfície se encontrar coberta pelo PBS (fato este indicado pela constância da curva do gráfico), faz-se circular o soro antiofídico diluído em PBS na proporção 1:100 até se obter cobertura máxima da película. Em seguida, o PBS é novamente admitido para que as moléculas fracamente ligadas sejam removidas (indicado pelo decaimento linha do gráfico), com isso, restam apenas as ligações fortes e específicas no sensor. A seguir, faz-se circular o veneno diluído em diversas proporções para ocorrer a formação do complexo antígeno-anticorpo; após toda superfície sensora se encontrar coberta, lava-se com PBS com o mesmo intuito de remover as proteínas fracamente ligadas, restando apenas as ligações fortes e específicas entre o antígeno e anticorpo. Os resultados, demonstrados pela mudança no índice de refração apresentados pelo software, revelam os níveis de interação do soro com veneno.

4.6 Análise dos gráficos

Os gráficos são gerados no momento em que estão ocorrendo as interações entre as moléculas sobre a superfície de ouro do sensor e são analisados como mostra o modelo representado na **Figura 1**, o qual ilustra a adsorção e dessorção que pode resultar em três casos (A, B e C).

Figura 1- Características de adsorção e dessorção de imobilização de proteínas



Fonte: Loureiro, 2014.

Com este método, baseando-se no modelo de adsorção de Langmuir e em sua forma modificada, foram efetuadas as análises de adsorção do veneno ofídico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados testes utilizando Soro Antibotrópico (SAB) e Veneno Botrópico (VenB) da espécie *Bothrops erythromelas* sobre a superfície de ouro do sensor, o VenB foi diluído em diferentes proporções enquanto o SAB foi diluído numa proporção padronizada para todos os testes. Em trabalho realizado anteriormente por nosso grupo, a concentração ótima de soro foi estudada e determinada em 1:100, pois a concentração ideal para uma adsorção adequada deve promover domínios suficientes para que ocorram as interações, porém não devem reduzir a capacidade máxima de ligação entre o veneno e o soro sobre o sensor por efeitos estéricos (ALVES, 2020).

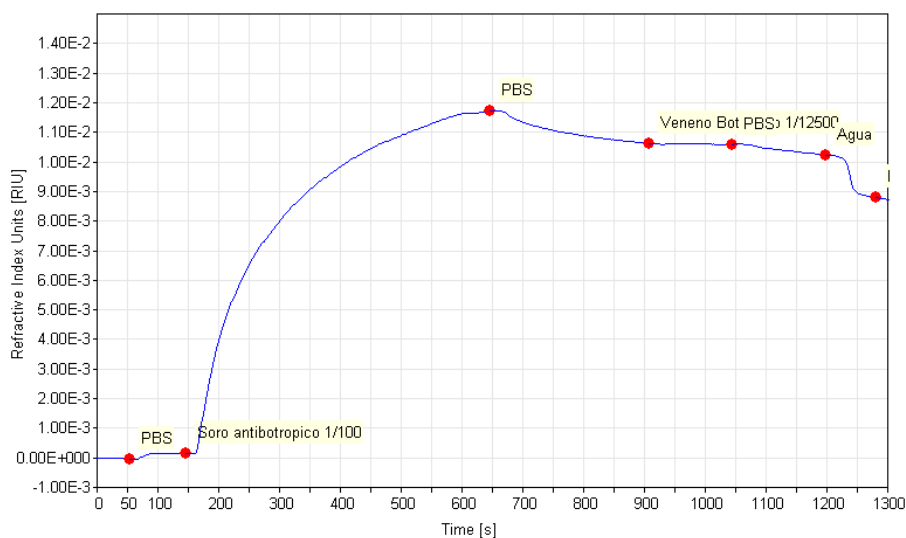
O VenB foi diluído nas proporções 1:12500, 1:10000, 1:7500, 1:5000, 1:2500, 1:1000, 1:500 e 1:100 a fim de tornar conhecido o índice de refração do VenB para cada concentração de veneno. Além disso, foram realizados testes utilizando soro inespecífico (anticrotálico) com VenB em diversas proporções para avaliar a presença ou ausência de interações inespecíficas que indicariam reação cruzada. Para a análise da adsorção foi testada a aplicabilidade de dois modelos matemáticos, sendo eles: a Isoterma de Langmuir e um modelo modificado da Isoterma de Langmuir, a fim de verificar se seriam apropriados ao estudo de adsorção do veneno botrópico.

5.1 Análise da interação entre veneno botrópico e soro antibotrópico

Os gráficos a seguir mostram a evolução da cobertura da superfície de ouro, em função do tempo, através da adsorção e dessorção das moléculas de acordo com a concentração.

Foi observada a adsorção do SAB na proporção de 1:100 (diluição padrão para soro) e do VeB na proporção de 1:12500. A **Figura 2** mostra o gráfico do índice de refração em função do tempo para esta concentração.

Figura 2- Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:12500).



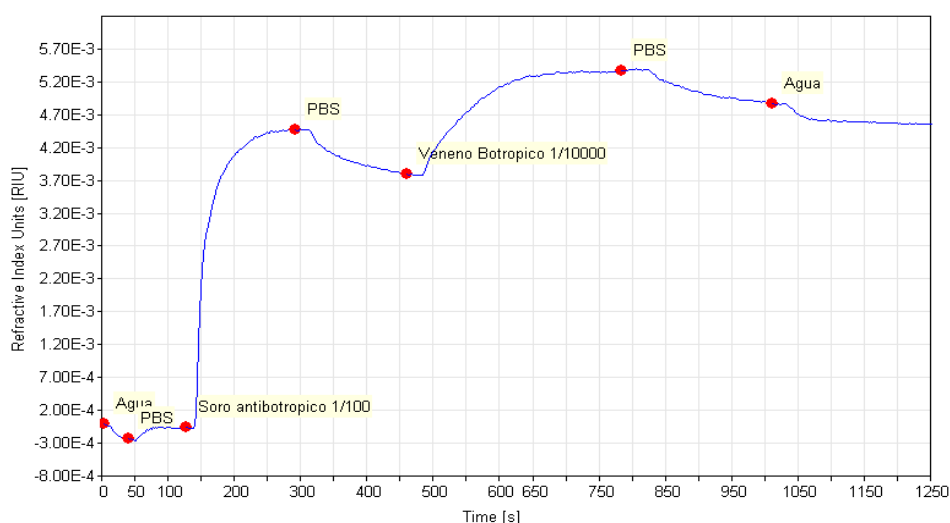
Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A partir do gráfico é possível observar que, para uma concentração de VenB na proporção de 1:12500, o índice de refração do SAB foi de $10,25 \times 10^{-3}$ RIU porém o VenB não refratou (a linha do gráfico não se elevou), indicando que não houve ligação entre antígeno e anticorpo.

Essa diluição de VenB foi a maior testada (1:12500), tendo em vista que não apresentou interação com o SAB. Com isso, continuamos os experimentos utilizando diluições menores de veneno a partir desta diluição para avaliar a maior diluição de veneno em que haveria interação com o SAB após a lavagem com PBS.

Foi acompanhada a interação do SAB (1:100) ao VenB na proporção de 1:10000. A **Figura 3** traz o gráfico que indica o índice de refração para esta proporção.

Figura 3- Gráfico do índice de refração, em função do tempo, da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:10000).

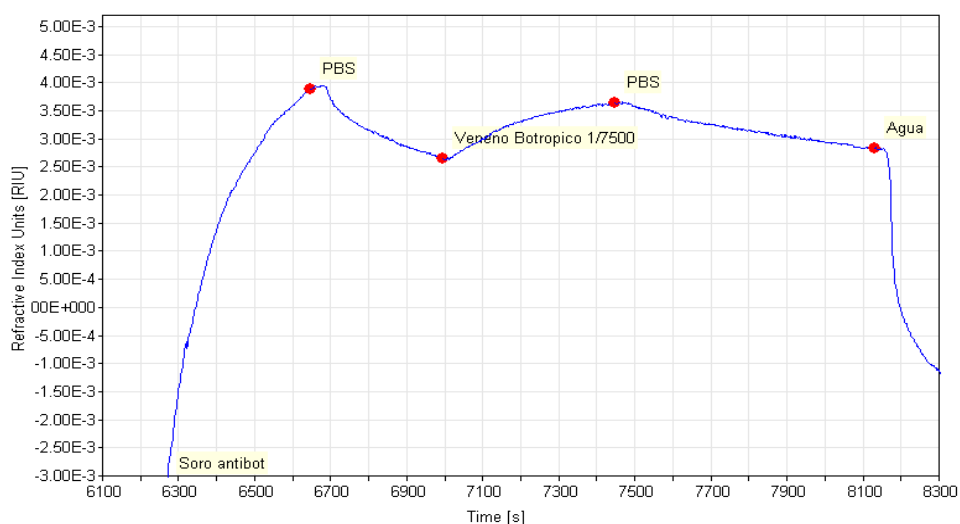


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A partir da concentração de veneno na proporção de 1:10000 (figura 3) foi observada interação entre SAB e VenB. O SAB refratou $1,75 \times 10^{-3}$ RIU enquanto o VenB partiu de $3,79 \times 10^{-3}$ RIU, formou o platô em $5,37 \times 10^{-3}$ RIU, e após a lavagem com PBS, o índice de refração do veneno decresceu para $4,87 \times 10^{-3}$ RIU.

A próxima proporção de VenB analisada foi 1:7500 sobre o SAB (1:100); a **Figura 4** revela o resultado da interação.

Figura 4- Gráfico do índice de refração, em função do tempo, da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:7500).

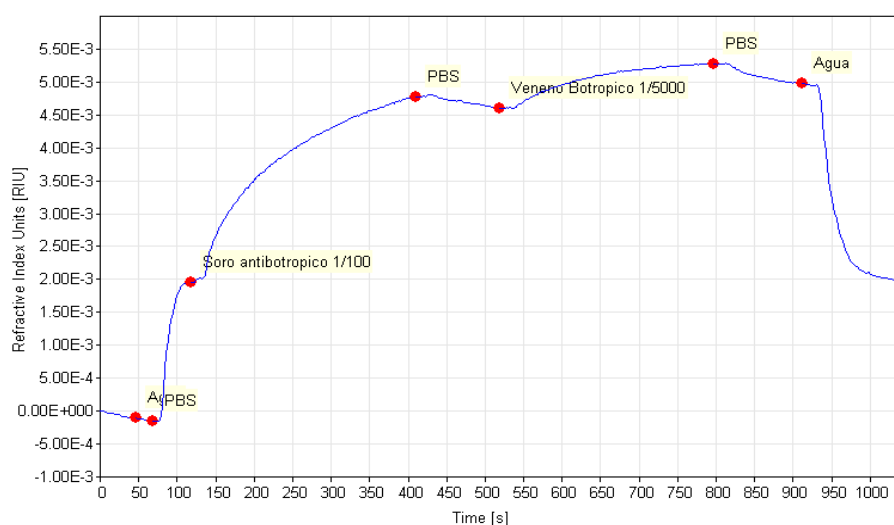


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Nesse ensaio, o VenB partiu de $2,66 \times 10^{-3}$ RIU, subiu até $3,64 \times 10^{-3}$ RIU, e, após a lavagem com PBS teve o índice decrescido para $2,84 \times 10^{-3}$ RIU. Tal leitura demonstra que o sensor continuou respondendo a uma proporção bastante diluída.

Seguindo as análises, o VenB na proporção de 1:5000 foi testado sobre o SAB (1:100); a **Figura 5** apresenta os índices de refração.

Figura 5- Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:5000).

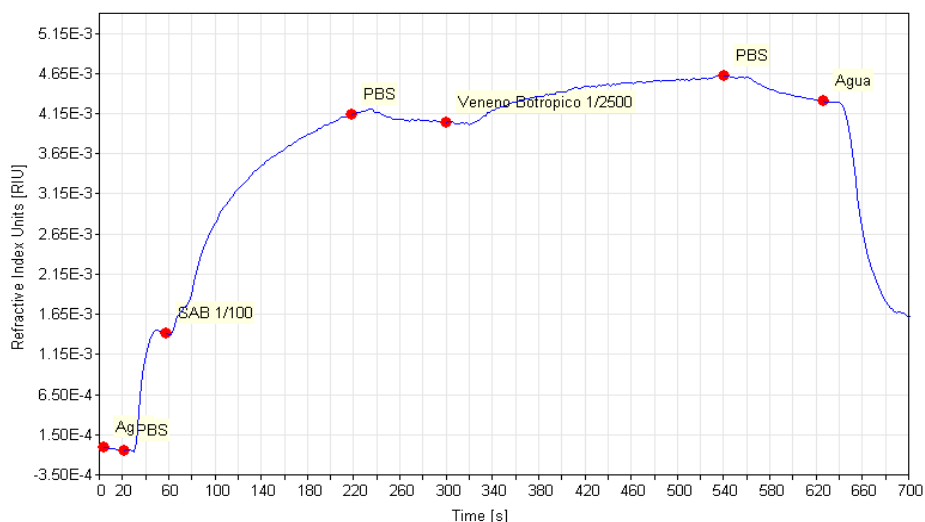


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

O gráfico (figura 5) mostra que o SAB refratou $2,66 \times 10^{-3}$ RIU. Na proporção de 1:5000 o índice de refração do veneno partiu de $4,61 \times 10^{-3}$ RIU, alcançou $5,28 \times 10^{-3}$ RIU, e, após a lavagem com PBS decresceu para $4,98 \times 10^{-3}$ RIU. Esse dado demonstra que, ainda em uma proporção muito diluída, a interação SAB X VenB continuou sendo detectada pelo sensor.

Continuando a sequência de análises, foi observada a interação do SAB (1:100) e do VenB na proporção de 1:2500 (figura 6).

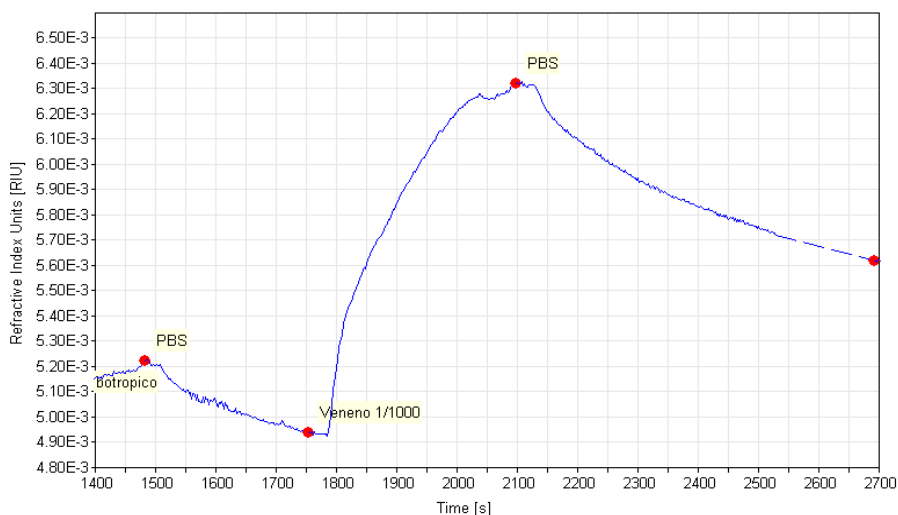
Figura 6- Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:2500).



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Na proporção de 1:2500, o gráfico (figura 6) mostra que o SAB refratou $2,63 \times 10^{-3}$ RIU e o índice de refração do veneno partiu de $4,04 \times 10^{-3}$ RIU, se elevou até $4,62 \times 10^{-3}$ RIU, e após a lavagem com PBS decresceu para $4,30 \times 10^{-3}$ RIU. Dando prosseguimento, testamos maiores concentrações de VenB frente ao SAB. Assim, o VenB na proporção de 1:1000 foi testado sobre o SAB (1:100), a **Figura 7** traz o gráfico que indica o índice de refração para esta proporção.

Figura 7- Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:1000).

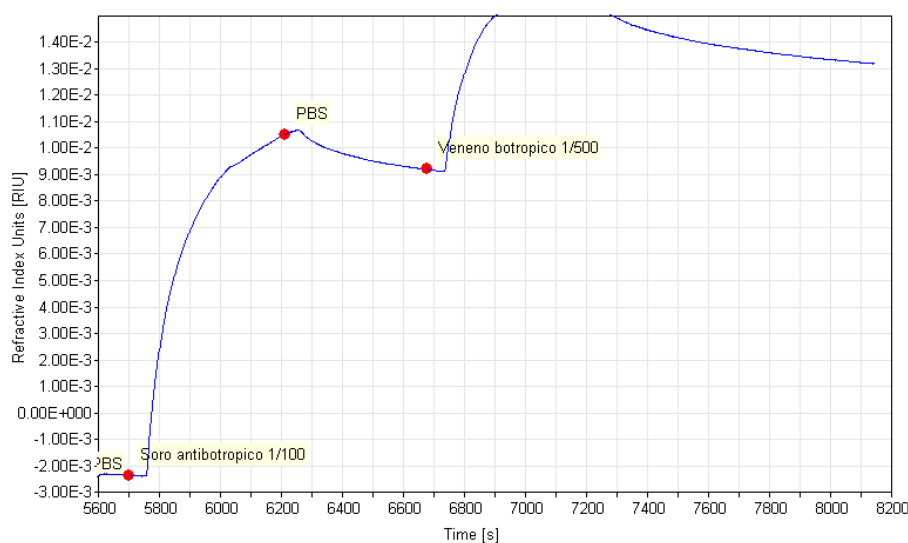


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A curva referente ao SAB continuou seguindo o padrão das análises. O gráfico (figura 7) mostra que, para uma concentração de VenB na proporção de 1:1000, a leitura partiu de $4,94 \times 10^{-3}$ RIU, ascendeu até $6,32 \times 10^{-3}$ RIU, e, após a lavagem com PBS teve o índice decrescido para $5,64 \times 10^{-3}$ RIU.

Dessa maneira, acompanhamos a interação do VenB na proporção de 1:500 com o SAB (1:100) (figura 8).

Figura 8- Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:500).

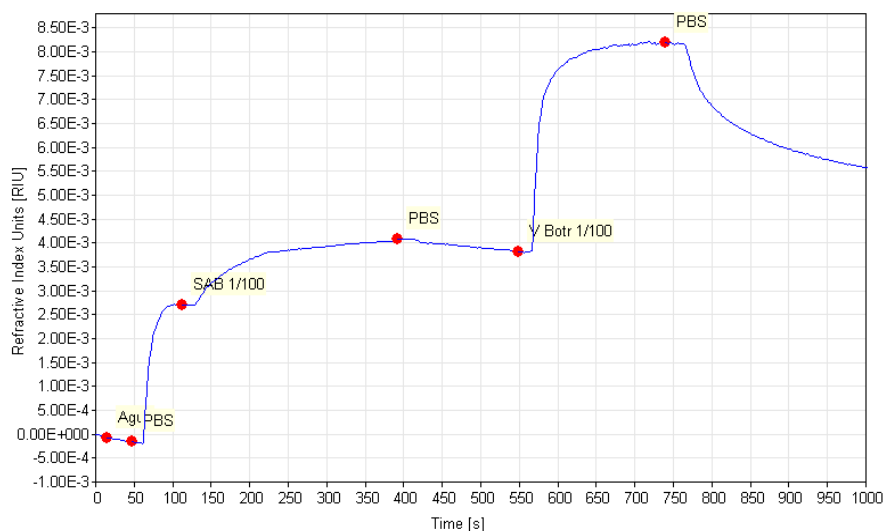


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Na concentração de veneno na proporção de 1:500, o gráfico mostra que o SAB refratou $3,42 \times 10^{-3}$ RIU e o VenB partiu de $9,20 \times 10^{-3}$ RIU, se elevou a $1,59 \times 10^{-2}$ e após a lavagem com PBS, apresentou o índice decrescido para $1,32 \times 10^{-2}$ RIU.

A última proporção de veneno botrópico analisada foi de 1:100, a **Figura 9** traz o gráfico do experimento.

Figura 9- Gráfico do índice de refração em função do tempo da adsorção do soro (1:100) e veneno botrópico (1:100).

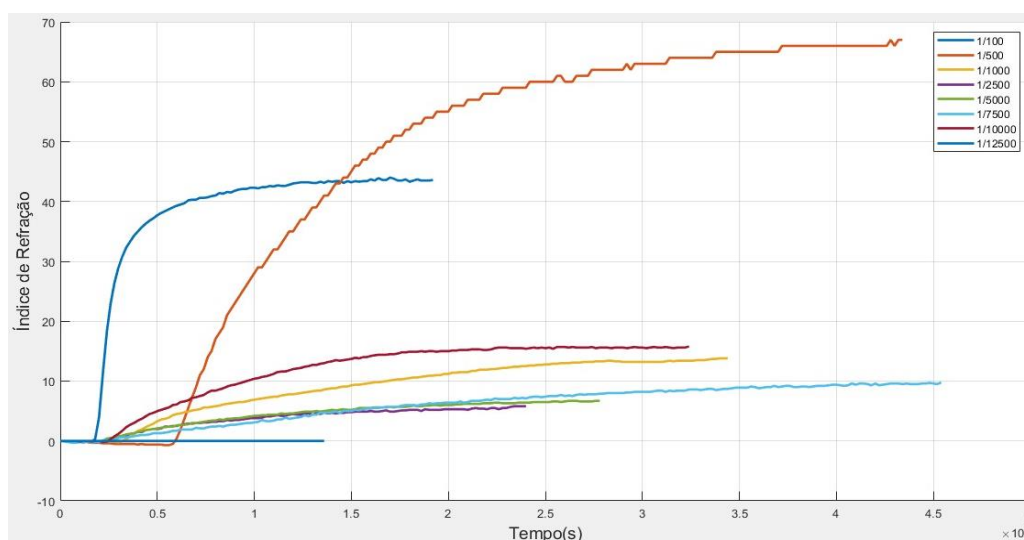


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

O gráfico acima mostra que o SAB refratou $1,12 \times 10^{-3}$ RIU e o veneno na proporção de 1:100 partiu de $3,82 \times 10^{-3}$ RIU, alcançou $8,18 \times 10^{-3}$ RIU, e, após a lavagem com PBS teve o índice decrescido para $5,60 \times 10^{-3}$ RIU.

Para comparação e melhor compreensão dos índices de refração das diferentes diluições, a **Figura 10** apresenta a sobreposição dos gráficos referentes às figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 mostrados anteriormente, as quais o índice de refração das diferentes nas proporções de VenB.

Figura 10- Curvas da adsorção do VenB sobre o SAB em função do tempo para diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A partir da **Figura 10**, a qual apresenta o índice de refração das diferentes proporções, observa-se que a resposta mais alta obtida pelo biossensor foi para a maior concentração de veneno (na proporção de 1:100). Já a diluição com a menor concentração de veneno (proporção de 1:12500) não mostrou resposta pelo biossensor, com isso, a diluição máxima a qual detectou-se interação entre SAB e VeB foi na proporção de 1:10000, corroborando as análises de Alves (2020). Além disso, é possível perceber a presença de uma alta resposta pelo biossensor para a concentração de veneno mais diluída (1:10000), que pode estar relacionada ao depósito de substâncias mesmo após o processo de limpeza ou a possíveis sucessões excedentes de experimentos sem a troca do chip, podendo ter ocorrido imperceptivelmente seu desgaste já que foram realizadas inúmeras repetições para esta concentração a fim de assegurarmos que o sensor respondia a uma tão baixa concentração.

A **Figura 10** reforça a conclusão sobre a sensibilidade do sensor às diversas concentrações de VenB. Observa-se que em algumas destas proporções, o aumento do índice de refração não seguiu o aumento da concentração, ou seja, a leitura apresentada pelo sensor variou desproporcionalmente em relação às concentrações. Não foi possível assegurar totalmente tal desproporcionalidade, pois nem todas as concentrações foram realizadas em triplicata. Esta falta de proporcionalidade também foi observada em Faria (2017) ao empregar um substrato de ouro para o desenvolvimento de imunodiagnóstico para envenenamento por *Bothrops*; entretanto, autores como Laborde *et. al* (2009) e Loureiro (2014) relataram o aumento da resposta do sensor ao passo que a concentração da substância estudada aumentava.

Avaliamos a relação entre a concentração do veneno e o tempo de resposta do biossensor, essas duas variáveis são mostradas na **Figura 10**. Souto *et. al* (2013), ao estudar o desenvolvimento de um imunossensor óptico SPR para detecção de leishmaniose, observaram que tanto a concentração dos antígenos quanto o tempo resulta na sensibilidade do sensor. Em relação a variável 'concentração', observa-se que o grau de resposta oriundo da interação dos antígenos com anticorpos depende da quantidade de antígenos adsorvidos na superfície, já em relação a variável 'tempo' observa-se que quanto menor o tempo

para o biossensor responder mais promissor este será, considerando que a detecção do tipo de envenenamento estudado no nosso trabalho necessita ser rápida. Ainda em relação ao tempo de resposta, tem-se que o tempo é um reflexo da concentração, da afinidade entre as biomoléculas, assim como do procedimento metodológico utilizado para imobilizar os antígenos ou anticorpos (SANTOS, 2016). Por este motivo, para nossos ensaios utilizamos um procedimento metodológico simples e uma imobilização direta no ouro.

Vitoret (2014), em seu estudo para o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para identificação de toxinas de *Bothrops*, utilizou a proporção de 1:2 do veneno da serpente *Bothrops* frente ao soro comercial, quando a proporção mudou para 1:1 também houve aumento de resposta, entretanto, houve saturação do sistema para as proporções de 3:2 e 2:1, o tempo total dos testes foi cerca de 40 min. Uma falha nos experimentos de Vitoret (2014) foi a não determinação da concentração de proteínas no veneno, o que prejudica a avaliação do limite de detecção de seu sistema, assim como o tempo de diagnóstico. Em nosso trabalho não buscamos identificar a concentração máxima de veneno em que ocorreria a saturação já que o veneno tende a ser encontrado em baixa concentração no sangue circulante, entretanto, a detecção da concentração máxima que utilizamos neste trabalho (1:100) mostra que o nosso biossensor é capaz de detectar concentrações bem mais altas até que alcance a saturação.

Faria (2017), investigou o emprego de diferentes substratos transdutores para o desenvolvimento do imunodiagnóstico de envenenamento ofídico pelo gênero *Bothrops*, ao empregar o substrato de ouro, utilizou o veneno de seis espécies botrópicas nas concentrações de 0,001; 0,01; 1; 2; 5; 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; a concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a que gerou maior resposta enquanto a maior concentração (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) provocou o menor resposta, o que significou que a partir de uma determinada concentração o aumento da resposta não foi proporcional à maior concentração de veneno, o tempo total para a detecção foi em média 36,58 min, além disso, a concentração mínima detectada pelo biossensor foi 0,01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O biossensor utilizado na presente pesquisa foi capaz de detectar o veneno em uma concentração mínima de 0,021 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o tempo para detecção nesta concentração foi de 15 min. Tal concentração e tempo baixos são resultados vantajosos e adequados para detecção de envenenamento ofídico, tanto porque esse tipo de agravo deve ser identificado e tratado rapidamente visando minimizar

os efeitos locais e sistêmicos do envenenamento quanto pela baixa concentração de veneno circulante no paciente envenenado. Dessa maneira, mesmo com baixa concentração de veneno no sangue, o biossensor poderá se mostrar efetivo. O sistema desta pesquisa apresentou valores muito próximos ao de Faria (2017), e, mesmo tendo mostrado uma sensibilidade ($0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$) um pouco menor que a do autor ($0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$), nosso sistema é mais promissor pois utiliza soro bruto, possui metodologia simples e apresenta uma resposta mais rápida.

A **Tabela 1** traz a comparação entre os trabalhos citados acima, que também estudaram o desenvolvimento de biossensor para detecção de veneno de espécies de serpentes do gênero *Bothrops*.

Tabela 1- Tabela comparativa em relação às concentrações, limite de detecção e tempo de resposta entre autores.

REFERÊNCIA	CONCENTRAÇÃO/ VENENO	CONCENTRAÇÃO/ SORO	LIMITE DE DETECÇÃO	TEMPO DE RESPOSTA
Borges <i>et al.</i> (2020)	0,021; 0,028; 0,043; 0,086; 0,216; 0,432; $2,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$	5mg/ml	$0,021 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Em média 15 min
Faria (2017)	0,001; 0,01; 0,1; 1; 2; 5; 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Não especifica	$0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Em média 36,58 min
Vitoreti (2014)	Não especifica	100 $\mu\text{g/ml}$	Especifica a proporção 1:1 μl	40 min

Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Em relação à concentração de anticorpos presentes no soro utilizado nos três trabalhos, observa-se que a concentração utilizada na presente pesquisa é bem mais alta que a concentração usada por Vitoreti (2014). Esse dado poderia explicar o menor tempo de resposta do nosso sistema, porém, considerando que os autores citados utilizaram soro purificado, ainda assim nossos resultados são animadores, uma vez que utilizamos soro bruto. Além disso, Faria (2017) não especificou em seu trabalho a concentração de soro utilizada. Novos experimentos serão realizados com nova curva decrescente de concentração do soro para avaliar o menor limite de detecção do complexo Ag-Ac (soro-veneno).

Um fator que pode interferir no limite de detecção é a forma em que os antígenos são utilizados nos experimentos, alguns trabalhos obtêm as amostras a

partir de kits comerciais e utilizam a quantidade proteica absoluta (SANTOS, 2016; VITORETI, 2014) enquanto em outros trabalhos os antígenos (e/ou os anticorpos) são purificados de forma que apenas as espécies antigênicas específicas são utilizadas nos testes (LUZ *et. al*, 2015; FARIA, 2017). Soros e antígenos purificados aumentam a sensibilidade e diminui o tempo da reação, aumentando a leitura e eficiência do biossensor, porém, utilizamos a quantidade total de proteínas do veneno, pois essa forma melhor simula a situação real em que o veneno se encontra nos fluidos humanos após envenenamento. No presente trabalho provamos que, quando se trata de envenenamento ofídico (uma série de diferentes toxinas) em contato com o soro comercial específico (anticorpos policlonais), a metodologia e o sistema utilizados constituíram a melhor forma de detecção de envenenamento ofídico em desenvolvimento no país.

A maior parte dos autores abordados nesta discussão empregaram a técnica de monocamada auto-organizada (SAM, do inglês *Self-Assembled Monolayer*), a qual consiste na formação de camadas monomoleculares que formam espontaneamente arranjos organizados de moléculas anfóteras, como derivados de alquil, álcoois, aminas, tióis, alcanotióis e ácidos graxos sobre superfícies sólidas. As SAMs são utilizadas como uma forma de imobilização em superfícies sólidas para garantir homogeneidade, orientação e estabilidade (FREIRE *et. al*, 2003; FISCHER, 2011). Entretanto, Vittoreti (2014) e Alves (2020) imobilizaram os anticorpos diretamente no ouro. Em nosso estudo também observamos a resposta do biossensor frente ao soro e veneno aplicados diretamente sobre o ouro devido a cinco principais razões: por ser um estudo inicial; para observar se essa metodologia simples geraria respostas positivas; para analisar se o sensor é seletivo mesmo não utilizando SAMs; para produzir um sensor de baixo custo; para se comparar as respostas deste estudo com posteriores utilizando SAMs. A partir dos resultados, fica evidente que a não utilização de SAMs não comprometeu o desempenho do sensor nas condições avaliadas. A preparação da superfície do nosso biossensor foi realizada de acordo com o proposto em Alves (2020) e Makaraviciute (2013), através da Imobilização Direcionada de fragmentos de anticorpos (F(ab')₂) presentes no soro antiofídico sobre a superfície de ouro que são gerados após uma digestão enzimática, estes fragmentos possuem o sítio de ligação ao antígeno e é composto por uma cadeia pesada e uma leve. O local de articulação do anticorpo possui pontes dissulfídicas que, após a fragmentação pela digestão enzimática,

tornam-se disponíveis e se ligam na superfície do ouro. Esta técnica de preparação da superfície do sensor é rápida e simples (MAKARAVICIUTE, 2013).

Em relação ao formato dos ensaios, Wang *et. al* (2017) estudando o impacto da configuração do ensaio do biossensor SPR no anticorpo utilizando o receptor Fc neonatal, analisaram se a escolha do formato do ensaio pode influenciar a interação de ligação, para isto, foram realizados dois formatos de ensaios alternativos com anticorpos monoclonais recombinante humanizado (rhuMAb) e o receptor FcRn: 1) os rhuMAbs foram imobilizados diretamente no chip do biossensor e as proteínas FcRn foram injetadas em seguida; 2) as proteínas FcRn foram diretamente acopladas no chip e os rhuMAbs foram injetados logo após. O autor afirma que até o presente momento não há evidências que impeçam o uso de qualquer formato e que os padrões dos ensaios parecem ser determinados, por exemplo, por facilidade de comparação de moléculas e escolha individual de cada laboratório. Para ele, utilizar formatos distintos em testes com biossensor de SPR dificulta a comparação entre diferentes estudos, pois gera resultados mistos e controversos. Uma revisão realizada por Gurbaxani (2013) sobre as afinidades de ligação a partir de SPR, relata que o formato 1 do ensaio é usado com maior frequência que o formato 2.

Em nossos ensaios com veneno ofídico no biossensor SPR, foi empregado apenas o formato do tipo 1: os anticorpos (soro) foram imobilizados primeiro no chip sensor e em seguida os antígenos (veneno), seguindo o tipo de formato da maioria dos trabalhos utilizados nesta discussão. Neste formato o veneno já encontra a superfície coberta com os anticorpos, como nosso objetivo é produzir um biossensor que detecte veneno, o soro é colocado previamente em uma proporção padrão suficiente para cobrir todo o chip sensor, para que depois sobrevenha o veneno. Como o veneno é o composto estudado trabalhamos com a variação de sua concentração, assim, se o formato 2 fosse utilizado, quando as menores concentrações de veneno se ligasse à superfície sensora sobraria muitos espaços sem antígeno devido a baixa concentração, sendo assim, quando os anticorpos fosse adicionados em seguida, se ligariam tanto aos antígenos quanto aos espaços vazios na superfície o que ocasionaria um falso aumento do índice de refração gerado tanto pela ligação antígeno-anticorpo quanto por anticorpos ligados nos espaços da superfície sem o antígeno.

Barbosa (2008) apresenta 7 atributos considerados importantes para um biossensor ideal, todos eles foram contemplados em nosso biossensor, são eles:

Sensibilidade- comprovada, pois a magnitude do sinal de saída foi modificada em consequência da alteração da concentração do veneno; Linearidade- demonstrada pela continuidade da sensibilidade para todas as concentrações do analito; Limite de detecção- nosso biossensor alcança um limite de detecção da ordem de 10^{-7} RIU; Seletividade- comprovada, pois o biossensor respondeu às mudanças nas concentrações do analito; Tempo de vida- a detecção foi reproduzível e continuou precisa; Histerese- os testes anteriores não prejudicaram as medições posteriores pois as condições foram sempre as mesmas; Resposta dinâmica.

5.2 Estudo da adsorção do veneno de *Bothrops*

Diferentes abordagens podem ser empregadas para investigar a adsorção, dentre elas, modelos de isotermas de adsorção as quais descrevem a adsorção dos mais variados meios e substâncias. Em muitos trabalhos (ELKHALEEFA *et al*, 2020; LIMA, 2013; WASTI *et al*, 2014, PIVA, 2011; PETRONI, 2004; BOEIRA *et al*, 2005; LENZI *et al*, 2000; DIAS *et al*, 2001; YAMAMURA *et al*, 2005; ALCÂNTARA *et al*, 2009) a cinética do processo de adsorção e a isoterma de adsorção foram avaliados por mais de um modelo (de dois a quatro) com o intuito de verificar qual modelo é mais adequado, visando melhor ajuste para os dados.

Sendo assim, os diferentes modelos quando usados em conjunto podem fornecer dados que possibilitam uma maior compreensão da interação entre as substâncias (LIMA, 2013). Alguns dos modelos aplicados para isotermas de adsorção foram os modelos lineares e não lineares de Langmuir, Temkin e Freundlich. Nosso trabalho objetivou estudar a aplicabilidade de dois modelos de adsorção para análise da adsorção do veneno em diferentes concentrações, os resultados são apresentados nas seções a seguir.

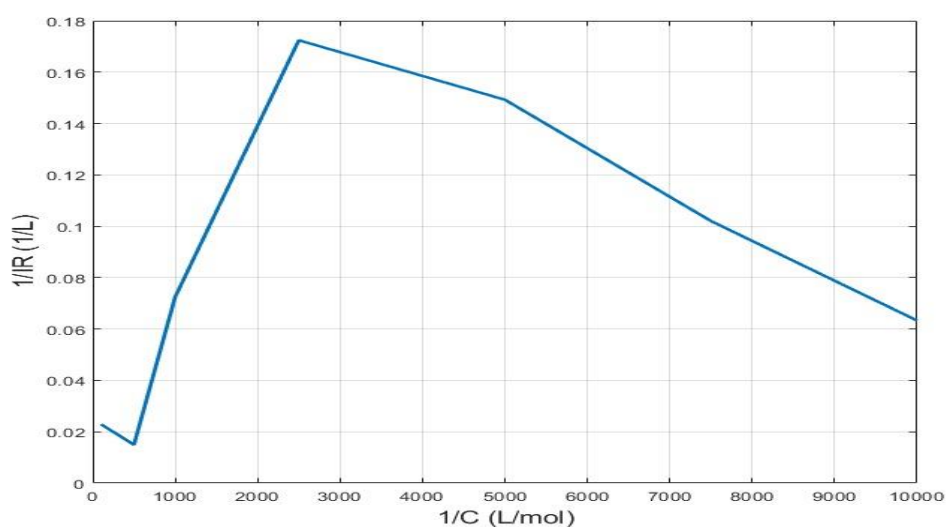
5.2.1 Isoterma de Adsorção de Langmuir para a adsorção específica

Por ser uma maneira prática e usual de quantificar a adsorção, uma das abordagens de quantificação comumente utilizada consiste na construção de isotermas de adsorção segundo um modelo teórico que represente matematicamente o fenômeno, estas são construídas a partir de dados de equilíbrio obtidos experimentalmente (PETRONI, 2004). Objetivando compreender de maneira

mais aprofundada os processos de ligação envolvidos, foi proposto realizar um estudo de adsorção do veneno sobre o veneno.

A isoterma de Langmuir mostra, de maneira simplificada, a adsorção do adsorvente e adsorbato (FALONE; VIEIRA, 2004). Nos resultados apresentados nas seções anteriores, o veneno foi diluído em diferentes proporções e aplicado a uma quantidade fixa de soro, em temperatura constante, por um determinado período de tempo. Os estudos de adsorção do veneno botrópico sobre o soro no ouro foram conduzidos mediante a realização e interpretação da Isoterma de Langmuir. O valor máximo de refletância de cada concentração versus o inverso de concentração resultou na seguinte Isoterma de Langmuir (Figura 11).

Figura 11- Gráfico da Isoterma de Langmuir para a adsorção específica



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

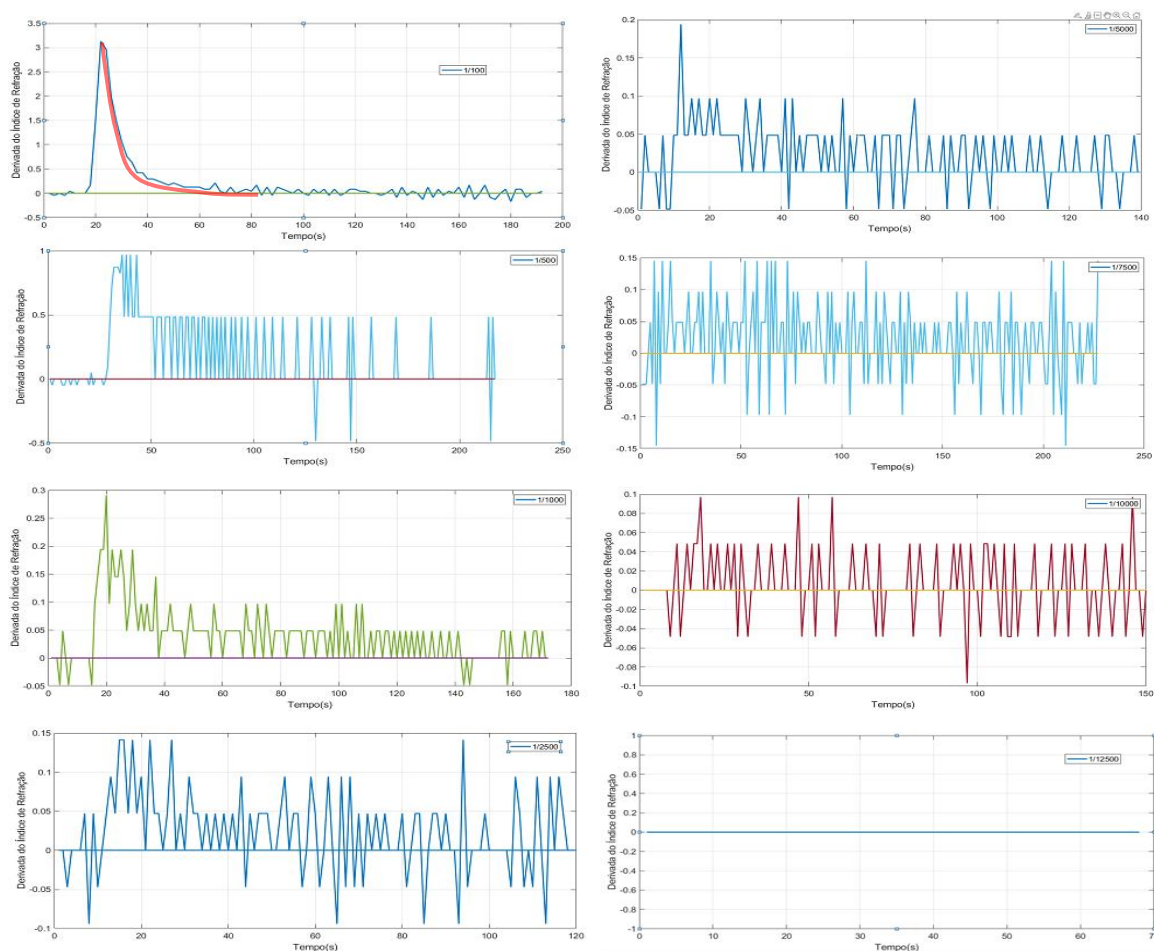
A partir da **Figura 11** é possível detectar a ausência de uma variação linear e inclinação constante, o que demonstra que o modelo de adsorção de Langmuir não foi adequado para esse tipo de experimento. Vale ressaltar que mesmo com anos de pesquisas ainda não estão totalmente compreendidas as interações irreversíveis de macromoléculas (especialmente proteínas) sobre superfícies sólidas bem como os modelos de adsorção continuam dubitáveis (NORDE, 1992). Por isso, torna-se necessário explorar os processos que envolvem a ligações de proteínas a fim de buscar o modelo de adsorção que explica tais processos.

Não foram encontrados na literatura estudos de aplicação de modelos de isotermas de adsorção tratando-se de soro e veneno ofídico. Uma sugestão para a não aplicabilidade deste modelo é o fato dos venenos serem compostos de moléculas com as mais diversas configurações intrínsecas, como: tamanho, peso molecular, ponto isoelétrico e imunogenicidade. O presente estudo é pioneiro e necessita ser aprimorado visando buscar outros modelos matemáticos que melhor se adequem ao nosso objeto de estudo (veneno), nosso sistema e metodologia.

5.2.2 Aproximação do Modelo de Langmuir por uma exponencial (AML) para a adsorção específica

A fim de continuar investigando os processos de adsorção do veneno, buscamos utilizar outro modelo: Aproximação do Modelo do Langmuir por uma exponencial. Para isso, foram determinadas as derivadas dos índices de refração de todas as concentrações de veneno botrópico utilizadas (figura 12). A validade da aplicação do modelo AML descrito em Loureiro (2014) é comprovada quando a evolução temporal da taxa de crescimento tem uma relação de aproximação a uma exponencial decrescente.

Figura 12- Derivada da cobertura das concentrações de 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2500,1:5000,1:7500, 1:10000 e 1:12500



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

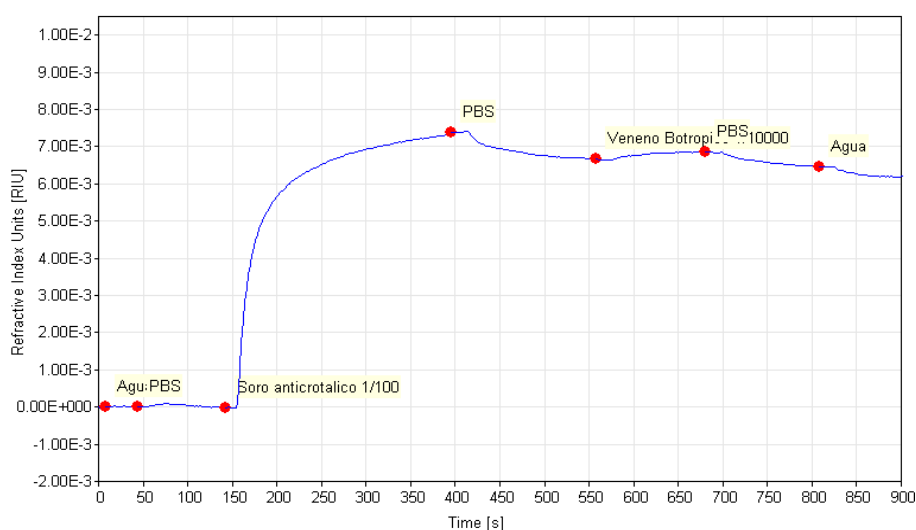
Verifica-se a aplicabilidade do AML para a maior concentração de veneno (1:100) ao observar a derivada do índice de refração desta concentração (primeiro gráfico da **Figura 12**, marcação em vermelho), desconsiderando a parte transitória inicial (LOUREIRO, 2014). Tendo em vista que a taxa de crescimento decresceu exponencialmente com o tempo para a proporção de 1:100, compreende-se que esse modelo se aplica principalmente a altas concentrações, como utilizado em Loureiro (2014). Portanto, a partir de agora trabalharemos com concentrações abaixo de 1:100 assim como buscaremos outro modelo que se aplique às menores concentrações para que assim possamos quantificar tais adsorções.

5.3 Análise da interação entre veneno botrópico e soro anticrotálico (SAC)

Após os resultados se demonstrarem positivos para detecção da interação entre os antígenos e anticorpos específicos, realizaram-se testes para avaliar a presença ou ausência de interação inespecífica, significando reação cruzada, para isso foram utilizados soro anticrotálico (próprio para envenenamento por serpentes gênero *Crotalus*) e veneno botrópico.

Como a concentração mínima detectável pelo biossensor nos experimentos entre veneno botrópico e seu soro específico foi na proporção de 1:10000, optou-se por iniciar os testes nesta mesma proporção de veneno da *Bothrops erythromelas* (1:10000) sobre o Soro Anticrotálico na proporção padrão de 1:100 (figura 13).

Figura 13- Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:10000) sobre o soro inespecífico (SAC).

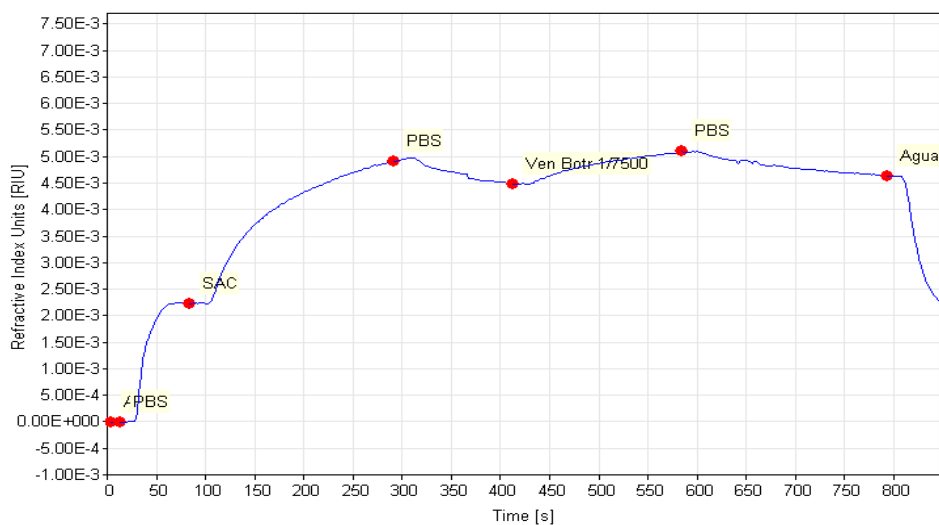


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Segundo o gráfico, o índice de refração do VenB na proporção de 1:10000 sobre o SAC partiu de $6,66 \times 10^{-3}$ RIU e se elevou até $6,87 \times 10^{-3}$, entretanto, depois da circulação com PBS todo veneno antes ligado foi removido, sendo assim, não houve ligação entre antígeno e anticorpo inespecífico nesta proporção.

Em seguida, foi acompanhada a ligação do VenB na proporção de 1:7500 ao SAC (1:100). A **Figura 14** traz o gráfico que indica o índice de refração para esta proporção.

Figura 14- Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:7500) sobre o soro inespecífico (SAC).

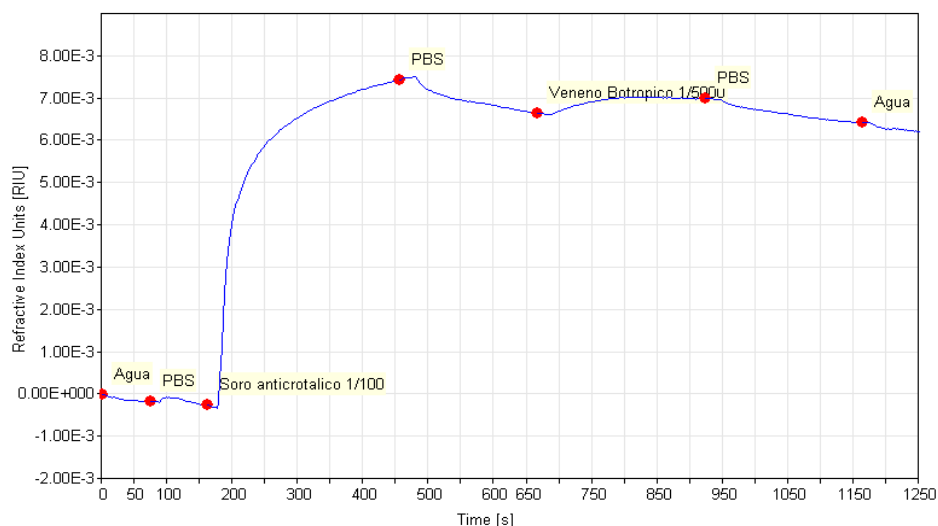


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Nesse ensaio, o VenB sobre o SAC partiu de $4,48 \times 10^{-3}$ RIU, subiu até $5,09 \times 10^{-3}$ RIU, e, após a lavagem com PBS teve o índice decrescido para $4,64 \times 10^{-3}$ RIU. Nesta concentração o biossensor detectou pequena interação inespecífica entre VenB e SAC.

Seguindo as análises, o VenB na proporção de 1:5000 foi submetido ao SAC (1:100) (figura 15).

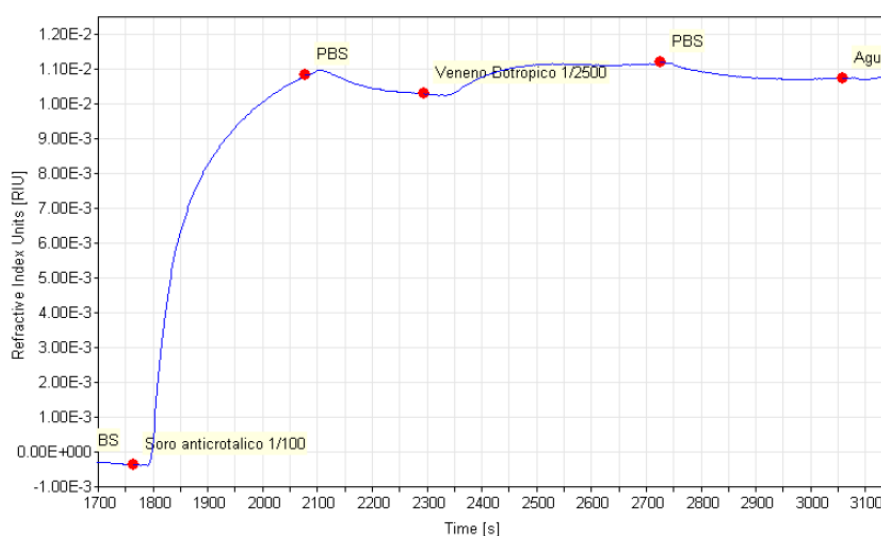
Figura 15- Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:5000) sobre o soro inespecífico (SAC).



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

O gráfico acima mostra que o VenB partiu de $6,64 \times 10^{-3}$ RIU, elevou-se para $6,98 \times 10^{-3}$ RIU e teve o índice decrescido para $6,41 \times 10^{-3}$ RIU após a lavagem com PBS, sendo assim, o biossensor não detectou nenhuma ligação inespecífica nessa proporção de veneno. Continuando os experimentos, foram realizados testes com o VenB na proporção de 1:2500 sobre o SAC (1:100), a **Figura 16** traz o gráfico que indica o índice de refração para esta proporção.

Figura 16- Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:2500) sobre o soro inespecífico (SAC).

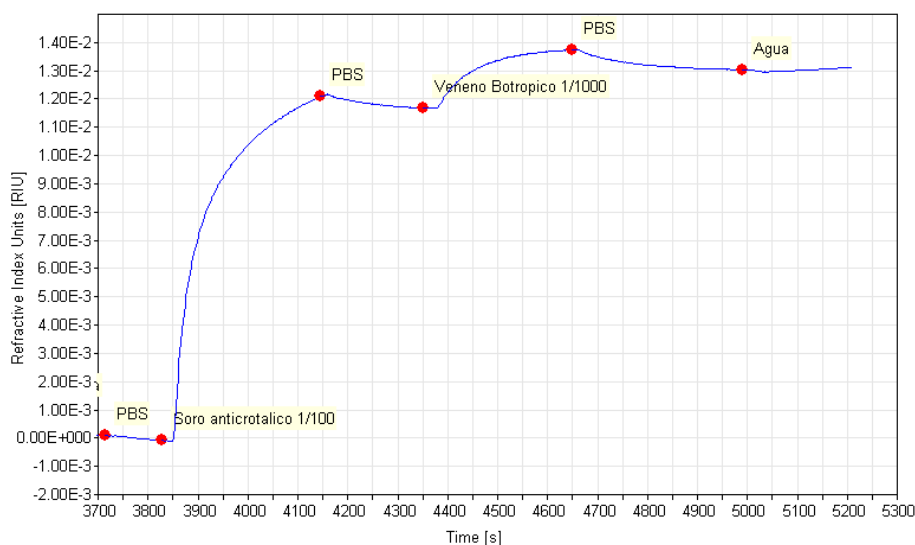


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

O gráfico acima mostra que o VenB partiu de $1,03 \times 10^{-2}$ RIU, subiu até $1,12 \times 10^{-2}$ e teve o índice decrescido para $1,07 \times 10^{-2}$ RIU após a lavagem com PBS, sendo assim, houve interação inespecífica porém muito baixa.

Por fim, a última proporção de VenB analisada foi de 1:1000, a **Figura 17** traz o gráfico do experimento.

Figura 17- Gráfico do índice de refração da interação do VenB (1:1000) sobre o soro inespecífico (SAC).

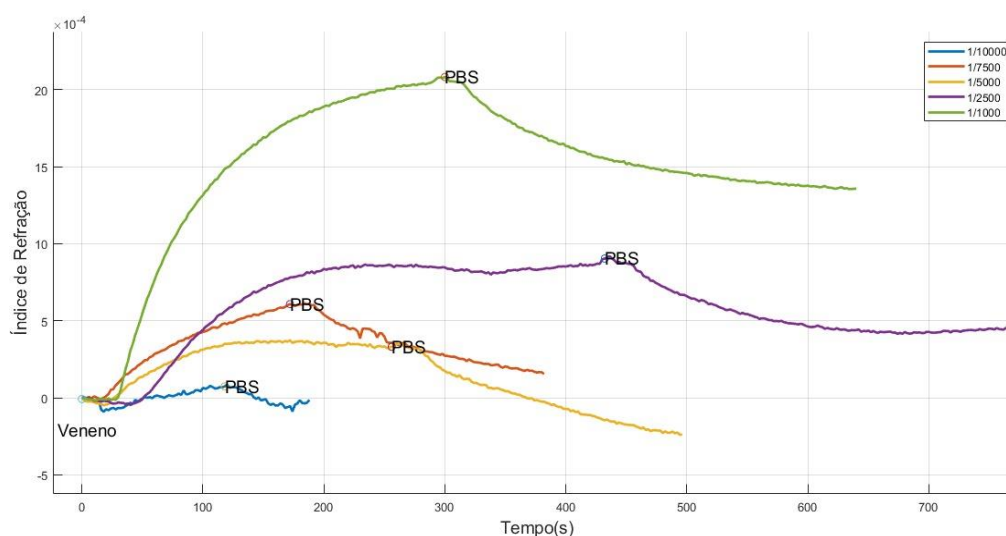


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

O gráfico mostra que o VenB na proporção de 1:1000 partiu de $1,17 \times 10^{-2}$ RIU, alcançou $1,38 \times 10^{-2}$ RIU, e, após a lavagem com PBS teve o índice decrescido para $1,30 \times 10^{-2}$ RIU, portanto ocorreu interação inespecífica entre SAC e VenB.

A figura a seguir (**Figura 18**) apresenta a sobreposição dos gráficos das figuras 13, 14, 15, 16 e 17 mostradas anteriormente.

Figura 18- Curvas da adsorção e dessorção do VenB sobre o SAC em função do tempo para diferentes concentrações.

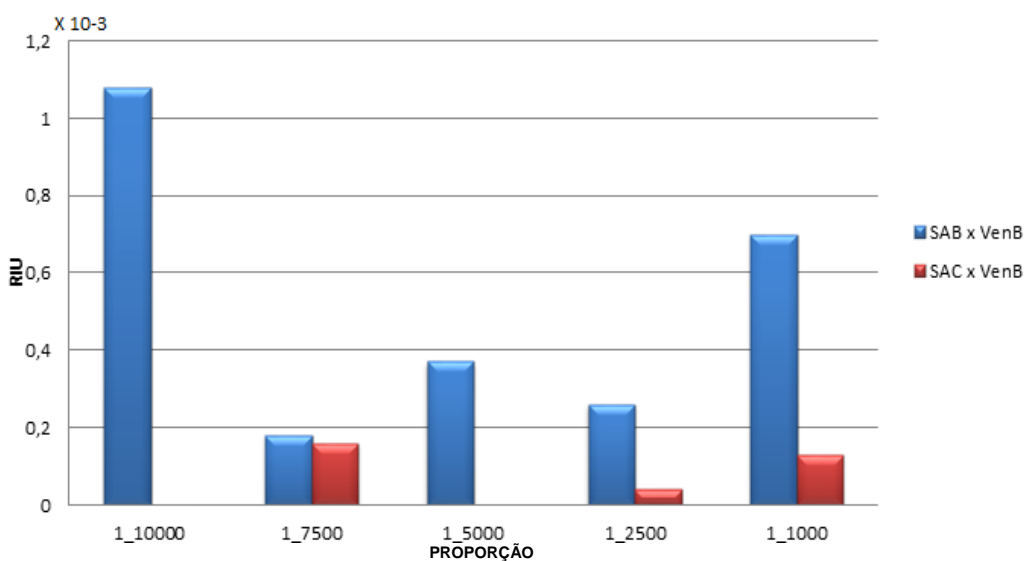


Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

A partir da **Figura 18** é possível observar que dentre as cinco concentrações testadas, três delas apresentaram interação entre SAC x VenB. A ligação inespecífica detectada pelo biossensor é justificada por semelhanças na composição do veneno botrópico e crotálico, Rodriguez *et al.* (2009) avaliou a capacidade de anticorpos IgG contra PLA₂ (fosfolipase A₂) presente no veneno crotálico reagir de forma cruzada com espécies de *Bothrops*, foi confirmado que o IgG contra PLA₂ crotálica reconheceu PLA₂ presentes no veneno botrópico, neutralizando-as.

A **Figura 19** apresenta um gráfico comparativo entre os índices de refração dos experimentos específicos (soro antibotrópico x veneno botrópico) e os índices de refração dos experimentos inespecíficos (soro anticrotálico x veneno botrópico).

Figura 19- Comparação entre os índices de refração do soro e veneno específicos e inespecíficos.



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

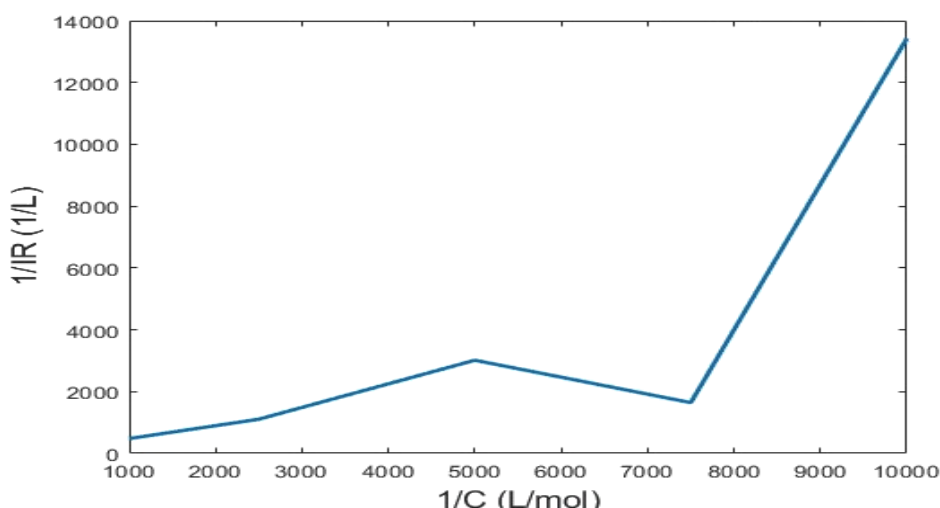
É perceptível que os testes de soro anticrotálico + veneno botrópico, quando comparados com soro antibotrópico + veneno botrópico, apresentaram índices de refração bem mais baixos (exceto em uma das concentrações, em que o teste inespecífico alcançou resposta aproximada do teste específico), confirmando o fato de que os anticorpos e antígenos do mesmo gênero possuem maior afinidade e especificidade. Tal distinção entre a resposta da ligação de SAB x VenB e SAC x VenB é de fundamental importância para a diferenciação entre os venenos dos dois gêneros de serpentes através do biossensor (ALVES, 2020).

Wang *et. al* (2017) em seu estudo com PCR (proteína c-reativa), comparou as detecções específicas e inespecíficas através da técnica SPR. A especificidade foi analisada a partir de testes comparativos utilizando BSA (albumina de soro de bovino) para os experimentos inespecíficos na mesma concentração dos testes específicos com anticorpo monoclonal anti-PCR, os resultados revelaram que houve detecção inespecífica entre PCR e BSA, entretanto, o deslocamento do comprimento de onda da ressonância na detecção específica foi doze vezes maior. Vale salientar que o desvio do comprimento de onda da ressonância flutuou levemente nas detecções de BSA, ou seja, não se obteve um padrão de crescimento de acordo com o aumento da concentração. Semelhantemente, nossos resultados revelaram tal desproporcionalidade entre concentração e resposta (**Figura 18**). Wang *et al.* (2017) não mostra uma razão para tal desproporcionalidade entre a concentração e resposta.

5.3.1 Isoterma de Adsorção de Langmuir para a adsorção inespecífica

O estudo da adsorção do VenB sobre o soro inespecífico foi conduzido da mesma maneira que os estudos entre veneno e soro específicos, mediante a realização e interpretação da isoterma de adsorção, em que o valor máximo de refletância de cada concentração versus o inverso de concentração é empregado.

Figura 20- Gráfico da Isoterma de Langmuir para a adsorção inespecífica



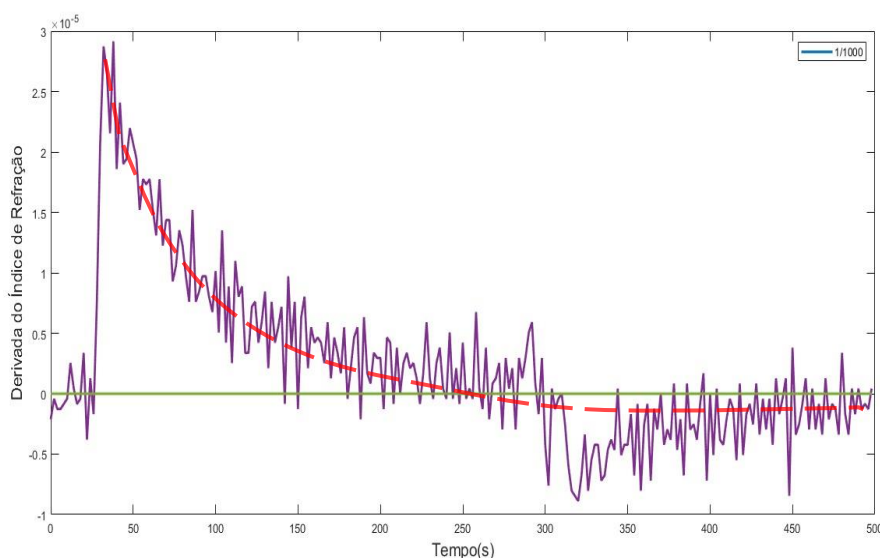
Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Era esperado que a Isoterma de Langmuir não fosse aplicável nos testes inespecíficos, tal como ocorreu para o soro e veneno específicos. Isto é revelado pela ausência de uma variação linear e inclinação constante (Figura 20).

5.3.2 Aproximação do Modelo de Langmuir por uma Exponencial (AML) para a adsorção inespecífica

Do mesmo modo que aplicamos o modelo de aproximação do Langmuir por uma exponencial para o veneno e soro específicos, buscamos utilizá-lo nos experimentos de veneno botrópico sobre o soro anticrotálico para avaliar sua aplicabilidade. Foi determinada a derivada da cobertura da adsorção do veneno botrópico na proporção 1:1000, mostrada na **Figura 21**.

Figura 21- Derivada da cobertura da concentração de 1:1000



Fonte: Elaborada pela autora, 2020.

Através da derivada da concentração de 1:1000 de VenB sobre o SAC (Figura 21), ao desconsiderar a parte transitória inicial (LOUREIRO, 2014), observando a marcação em vermelho, é possível observar que houve uma pequena relação de aproximação do Modelo de Langmuir por uma exponencial decrescente, entretanto, não ficou totalmente nítida, tornando o modelo não adequado para esta proporção. Sugere-se que a razão para isso seja a mesma já discutida para o

veneno e soro específicos, o qual apenas para a concentração de 1:100 houve aproximação da derivada a uma exponencial decrescente, em contrapartida a derivada da interação inespecífica foi da proporção de 1:1000.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O biossensor SPR é uma ferramenta oportuna para averiguar uma diversidade de eventos dinâmicos envolvendo adsorção/dessorção, permitindo acompanhar em tempo real as interações moleculares entre antígeno e anticorpo. O desenvolvimento do presente estudo possibilitou, com êxito, uma análise da dinâmica do soro antitoxínico e veneno toxínico, assim como de soro e veneno inespecíficos no biossensor SPR.

O sensor foi capaz de detectar a interação entre antígeno-anticorpo em altas e baixas concentrações de veneno, tornando conhecidos os índices de refração para as diversas concentrações de veneno bem como a concentração mínima de veneno capaz de gerar resposta, além disso, foi perceptível que a concentração dos antígenos e anticorpos estudados está relacionado às mudanças do índice de refração no sensor.

Ao avaliar se ocorreria resposta inespecífica entre soro antitoxínico e veneno toxínico observou-se que a resposta foi pouco significativa quando comparada aos experimentos entre antígeno-anticorpo específicos, confirmando a especificidade do sensor.

Por fim, foram aplicados dois modelos matemáticos para o estudo da adsorção do veneno sobre o soro, comprovando a aplicabilidade do modelo de Aproximação do Modelo de Langmuir por uma exponencial decrescente.

Considerando que este estudo com veneno ofídico empregando biossensor SPR é pioneiro, e tendo em vista a sua grande importância e impacto para a saúde pública propõe-se dá-lo prosseguimento avaliando a detecção de veneno ofídico pelo sensor na presença de fluido biológico, aplicando outros modelos matemáticos a fim de analisar a adsorção do veneno nas concentrações baixas, determinando o número de vezes em que o sensor pode ser empregado sem prejuízo de sua sensibilidade e realizando estudos com venenos de outros gêneros.

REFERÊNCIAS

- ALTINTAS, Z., TOTHILL, I. Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung câncer. **Sensors and Actuators B**, p. 988-998, nov. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.078>>. Acesso em: 13 mai. 2020.
- 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, ed. 5, 26 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/toxins10050177>>. Acesso em: 30 ago. 2020.
- BARBOSA, A. R. D. B. **Construção de um biossensor para o doseamento de ureia baseado na inibição enzimática de amidase de *Pseudomonas aeruginosa* como recurso a um eletrodo seletivo de íons amônio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, 2008.
- BOEIRA, R. C., SOUZA, M. D., HERMES, L. C., ABAKERLI, R. B., & FAY, E. F. Procedimento para linearização de isotermas de adsorção de clomazone. In: Congresso Virtual Iberoamericano Sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. **Anal. Madrid**, 2005. p. 255-259. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1015876/1/2005AA030.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2020.
- BRASIL. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed, Brasília. Fundação Nacional da Saúde, outubro, 2001. ISBN 85-7346-014-8. Disponível em: <<https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Manual-de-Diagnostico-e-Tratamento-de-Acidentes-por-Animais-Pe--onhentos.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2020.
- COSTA, H.C; BÉRNILS, R.S. Répteis brasileiros: lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**. v. 4, ed. 3, p. 75-93, 12 jan. 2015.
- CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. Goiás, p. 1- 20, 2011.
- CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Lett**, 5 jun. 2009. Disponível em: <[10.1016/j.febslet.2009.03.029](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029)>. Acesso em: 30 abr. 2020
- CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD Jr., V. - **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Sarvier; FAPESP, 2003. ISBN 85-7378-133-5.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIERREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. **Toxicon**, p. 31-39, jan. 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)00135-U](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)00135-U)>. Acesso em: 30 abr. 2020

CHUNG, J. **The application of surface plasmon resonance (SPR) immunobiosensors for medical diagnosis**. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2007.

CUNHA, L. E. R. **Soros antiofídicos: história, evolução e futuro**. **Journal Health NPEPS**, Tangará da Serra (MT), v. 2, n. 1, p. 1-4, 2017. ISSN 2526-1010. Disponível em <<https://periodicos.unemat.br/index.php/jhnpeps/article/view/1808>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

SALOMÃO, M. G.; LUNA, K. P. O.; MACHADO, C. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos e a distribuição de soros: estado de arte e a situação mundial. **Revista de Salud Publica**, Colombia, 2018, v. 20, n. 4, p. 523-529. Disponível em: <<https://doi.org/10.15446/rsap.V20n4.70432>>. Acesso em: 25 jan. 2020.

CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR: Uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**. São Paulo, v. 26, n.1, 2003. ISSN 1678-7064. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100017>>. Acesso em: 6 mar. 2020.

FARIA, R. A. D. **Estudo para o desenvolvimento de biossensor impedimétrico não marcado para detecção de veneno ofídico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

DIAS, N. M., ALLEONI, L. R., CASAGRANDE, J. C., & CAMARGO, O. A. Isotermas de adsorção de cádmio em solos ácidos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande v. 5, n. 2, p. 229-234, 2001. ISSN 1807-1929. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-43662001000200009>>. Acesso em: 6 mar. 2020.

FALONE, S. Z.; VIEIRA, E. M. Adsorção e desadsorção do explosivo tetril em turfa e em argi-solo vermelho amarelo. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 849–854, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600002>>. ISSN 1678-7064>. Acesso em: 5 jul. 2020.

FERREIRA, B. F.; GOMES, M. S. R.; SOUZA, D. L. N.; GIMENES, S. N. C.; CASTANHEIRA L. E. et al. Molecular cloning and pharmacological properties of an acid PLA2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxins**, p. 2403–2419, dez. 2013. Disponível em: <[10.3390/toxins5122403](https://doi.org/10.3390/toxins5122403)>. Acesso em: 21 mai. 2020.

FISHER, J. A. **Estudo da formação de monocamadas auto-organizadas de tióis sobre Au (111)**. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, São

Paulo, v. 26, n. 3, 2003. ISSN 1678-7064. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000300016>>. Acesso em: 29 ago. 2020.

GONÇALVES, L. R., MARIANO, M. Local haemorrhage induced by Bothrops jararaca venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 9, n. 2, p. 101-107, 2000. Disponível em: <[doi:10.1080/096293500411569](https://doi.org/10.1080/096293500411569)>. Acesso em: 2 fev. 2020.

GURBAXANI, B.; DOSTALEK, M.; GARDNER I. Are endosomal trafficking parameters better targets for improving mAb pharmacokinetics than FcRn binding affinity? **Mol Immunol**, v. 56, n.4, p. 660-74, dez. 2013. PMID: 23917469. Disponível em: <[10.1016/j.molimm.2013.05.008](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.008)>. Acesso em: 30 ago. 2020.

GUTIÉRREZ, J.M. & B. LOMONTE. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms, a review. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 51, p. 211-233. 01 jan. 1989. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/280306027_Local_tissue_damage_induced_by_Bothrops_snake_venoms_A_review>. Acesso em: 5 fev. 2020.

GUTIÉRREZ, J.M., ESCALANTE, T., RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom. **Toxicon**, p. 976-987, 01 dez. 2009. Disponível em: <[10.1016/j.toxicon.2009.01.039](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.039)>. Acesso em: 30 ago. 2020.

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**. v. 110, n. 14, p. 7238-7248, 13 abr. 2006. Disponível em: <[10.1021/jp057170o](https://doi.org/10.1021/jp057170o)>. Acesso em: 12 mar. 2020.

JENNINGS, B.; SPEARMAN, W.; SHERPHARD. E. A novel 25 KDa protein from the venom of *Bitis arietans* with similarity to C-type lectins causes fibrinogen-dependent platelet agglutination. **Toxicon**, p. 687-98, 15 set. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.07.011>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

KASTURIRATNE, A; WICKREMASINGHE, A.R; SILVA, N; GUNAWARDENA, N.K; PATHMESWARAN, A; PREMARATNA, R, et al. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **Plos Medicine**. 4 nov. 2008. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

LABORDE H.M., LIMA A.M.N., LOUREIRO F.C.C.L., THIRSTRUP C., NEFF H. Adsorption, kinetics and biochemical interaction of biotin at the gold–water interface. **Thin Solid Films**, p. 221-226, 01 jul. 2013. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.tsf.2013.05.109>>. Acesso em: 8 fev. 2020.

LIMA, L. C. C. **Isotermas de adsorção no estudo do comportamento de cobre e chumbo em solos originais e tratados para remoção de matéria orgânica.** Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

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

NAIMUSHIN, A.N., SOELBERG, S.D., BARTHOLOMEW, D.U. BARTHOLOMEW, ELKIND, J.L.; FURLONG, C.E. A portable Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor System with Temperature Regulation. **Sensors and Actuators B**, EUA, p. 253-260, 15 nov. 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00533-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00533-1)>. Acesso em: 6 abr. 2020.

LUNA, K. P. O. **Avaliação da resposta imune relacionada à ação dos venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella*.** Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

LUZ, J. G. G.; SOUTO, D. E. P.; ASSIS, G. F. M.; LANA, M.; KUBOTA, L.T.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; MARTINS, H.R. Development and evolution of a SPR-based immunosensor for detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in human serum. **Sensors and Actuators B**, p. 287-296, jun. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.135>>. Acesso em: 7 ago. 2020.

GUTIÉRREZ, J.M., ESCALANTE, T., RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, p. 976-987, 01 dez. 2009. Disponível em: <[10.1016/j.toxicon.2009.01.039](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.039)>. Acesso em: 30 ago. 2020.

MAIER, S. A. **“Plasmonics: Fundamentals and Applications”**, ed 1, New York, Springer, 2007. ISBN 978-0-387-37825-1.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 460-471, 15 dez. 2013, p. 460-471. ISSN 0956-5663. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.060>>. Acesso em: 15 set. 2020.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and hemostatic system. **Toxicon**, p. 1749-1800, dez. 1998. Disponível em: <[10.1016/s0041-0101\(98\)00126-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(98)00126-3)>. Acesso em: 30 ago. 2020.

MC CLEARY, R. J. R.; KINI, R. MANJUNATHA. Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. **Toxicon**, p. 56-74, fev. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.008>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

MCDONNELL, J. M. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. **Current opinion in chemical biology**, p. 572–577, 01 out. 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00251-9](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00251-9)>. Acesso em: 12 jun. 2020.

MIYAKE, S.; IRIKURA, D.; YAMAZAKI, T. Specific detection of c-kit expressed on human cell surface by immunosensor based on Surface Plasmon Resonance. **Analytical Sciences**. p. 223-225, fev. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2116/analsci.18N022>>. Acesso em: 15 abr. 2020.

NORDE, W. The behavior of proteins at interfaces, with special attention to the role of the structure stability of the protein molecule. **Clinical Materials**, v. 11, p. 85 – 91, 1992. ISSN 0267-6605. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0267-6605\(92\)90032-O](https://doi.org/10.1016/0267-6605(92)90032-O)>. Acesso em: 15 abr. 2020.

OLIVEIRA, M. H. A. **Cinética e equilíbrio de adsorção para armazenamento de gás natural em carvão ativado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

PETRONI, S. L. G. **Avaliação cinética e de equilíbrio do processo de adsorção dos íons dos metais cádmio, cobre e níquel em turfa**. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Aplicações.) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PIVA, J. A. L.; SANTOS, O.; ANDRADE, C. M. G. Determinação e análise de isotermas de adsorção do corante azul 5G em leito fixo de carvão ativado. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 435-438, 2011. ISSN 1807-8664. Disponível em: <<https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v33i4.8239>>. Acesso em: 28 set. 2020.

ROCHA, O. R. S. D.; NASCIMENTO, G. E. D.; CAMPOS, N. F.; SILVA, V. L. D.; DUARTE, M. M. M. B. Avaliação do processo adsorptivo utilizando mesocarpo de coco verde para remoção do corante cinza reativo BF-2R. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 7, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000700016>>. Acesso em: 5 set. 2020.

RODRÍGUEZ, J.P.; MARZI, M.C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA, O.; MALCHIODI, EL.; LEIVA, L.C. IgG antibodies against phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus*: cross-reaction with venoms from *Bothrops* species from Argentina. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, Botucatu, v.15, n.3, 2009. ISSN 1678-9199. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000300008>>. Acesso em: 5 jun. 2020.

SANTOS, C. S. **Desenvolvimento de diferentes dispositivos eletroquímicos a base de ouro aplicados como sensores e biossensores**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2016.

SANTOS, K. C.; ALMEIDA, M. M.; PESSOA A. M.; SADD, V. A.; SILVA Jr, N. J. Revisão sistemática: as principais complicações do acidente botrópico. **Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, Goiânia, v. 43, p. 71-78, nov. 2016a. ISSN 1983-781X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18224/est.v43i1.5189>>. Acesso em: 15 ago. 2020.

SHANTILATHA, R., VARMA, S., MITRA, C.K. Designing a simple biosensor. In: Malhotra, B.D., Turner, A.P.F. (Eds.), **Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensor**, Stamford, 2003, JAI Press, p. 1-36.

SILVA, L. M. C. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SILVA, A. M.; BERNARDE, P. S.; ABREU, L. C. Acidentes com animais peçonhentos no Brasil por sexo e idade. *Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano*, São Paulo, v. 25, n.1, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7322/JHGD.96768>>. Acesso em: 5 set. 2020.

SODRÉ, F. F.; LENZI, E.; COSTA, A. C. S. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 324-330, 2001. ISSN 1678-7064. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000300008>>. Acesso em: 9 mar. 2020.

SOHN, S.; KIM, D. Modification of langmuir isotherm in solution systems-definition and utilization of concentration dependent factor. *Chemosphere*, v. 58, n. 1, p. 115 – 123, jan. 2005. ISSN 0045-6535. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.091>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

SOLER, M.; ESTEVEZ, M.C.; ALVAREZ, M.; MARINUS; OTTE, A.; SEPULVEDA, B.; LECHUGA, L. M. Direct Detection of Protein Biomarkers in Human Fluids Using Site-Specific Antibody Immobilization Strategies. *Sensors*, p. 2239-2258, 24 jan. 2014. ISSN 1424-8220. Disponível em: <[doi:10.3390/s140202239](https://doi.org/10.3390/s140202239)>. Acesso em: 16 jun. 2020.

SOUTO, D. E. P.; SILVA, J. V.; MARTINS, H. R.; REIS, A. B.; LUZ, R. C. S.; KUBOTA, L. T.; DAMOS, F. S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum. *Biosensors and Bioelectronics*, p. 22-29, 15 ago. 2013. ISSN 0956-5663. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.067>>. Acesso em: 01 jun. 2020.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins*, 9(9), 290, 18 set. 2017.; Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/toxins9090290>>. Acesso em: 2 mai. 2020.

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*, p. 298-308, 15 mai. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.01.010>>. Acesso em: 8 mar. 2020.

VITORETI, A. B. F. **Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para identificação de toxinas de serpentes**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Von Reumont, B.M.; Campbell, L.I.; Jenner, R.A. Quo vadis venomics? A roadmap to neglected venomous invertebrates. **Toxins**, 6(12), 3488-3551, 19 dez., 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/toxins6123488>>. Acesso em: 15 abr. 2020

WANG, W., MAI, Z., CHEN, Y. *et al.* Um biossensor SPR de fibra óptica sem rótulo para detecção específica de proteína C reativa. **Sci Rep**, 04 dez. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17276-3>>. Acesso em: 30 jan. 2020

WANG, X; MCKAY, P; YEE, L. T.; DUTINA, G.; HASS, P. E.; NIJEM, I.; ALLISON, D.; COWAN, K. J.; LIN, K.; QUARMBY, V., YANG, J. Impact of SPR biosensor assay configuration on antibody: Neonatal Fc receptor binding data. **MABS**, p. 319–332, 9 jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.01.010>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

WONG, E. S. W; BELOV, K. Venom evolution through gene duplications. **Gene**, p. 1-7, 15 mar. 2012. Disponível em: <[10.1016/j.gene.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.009)>. Acesso em: 25 dez. 2020.

YAMAMURA, Amanda P. G.; YAMAURA, Mitiko. "Estudo da cinética e das isotermas de adsorção de U pelo bagaço de cana-de-açúcar." In: International Nuclear Atlantic Conference – INAC. Santos, São Paulo, 2005. **Associação Brasileira de Energia Nuclear- ABEN**, São Paulo, Brasil, set. 2005. ISBN: 85-99141-01-5