

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual

Verônica Aparecida Martins do Rosário

**ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DE VENENO DE *TITYUS SERRULATUS* UTILIZANDO
SUPERFÍCIES DE CARBONO E OURO**

Belo Horizonte
2022

Verônica Aparecida Martins do Rosário

**ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DE VENENO DE *TITYUS SERRULATUS* UTILIZANDO
SUPERFÍCIES DE CARBONO E OURO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para cumprimento das exigências para obtenção do título de Mestre em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual.

Orientador: Prof. Dr. Tulio Matencio

Coorientador: Dr. Luiz Guilherme Dias
Heneine

Belo Horizonte

2022

043

Rosário, Verônica Aparecida Martins do.

Estudo para o desenvolvimento de um biossensor impedimétrico para detecção de veneno de *Tityus serrulatus* utilizando superfícies de carbono e ouro [manuscrito] / Verônica Aparecida Martins do Rosário. – 2022.

107 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Tulio Matencio. Coorientador: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual.

1. Inovação. 2. Biotecnologia. 3. Técnicas Biossensoriais. 4. Venenos de Escorpião. 5. Quitosana. 6. Impedância Elétrica. 7. Carbono. 8. Ouro. I. Matencio, Tulio. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 608.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E PROPRIEDADE INTELECTUAL

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 143 DE VERÔNICA APARECIDA MARTINS DO ROSÁRIO

Às 09:00 horas do dia 17 de janeiro de 2022, em ambiente virtual, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de VERÔNICA APARECIDA MARTINS DO ROSÁRIO. A presidência da sessão coube ao PROF. DR. TULIO MATENCIO, ICEX/UFMG – ORIENTADOR. Inicialmente o Presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FRÉZARD, ICB/UFMG; PROF. DR. RODRIGO LASSAROTE LAVALL, ICEX/UFMG; PROFa. DRa. HÁLLEN DANIEL REZENDE CALADO, ICEX/UFMG - SUPLENTE; DR. LUIZ GUILHERME DIAS HENEINE, FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS – COORIENTADOR e PROF. DR. TULIO MATENCIO, ICEX/UFMG – ORIENTADOR. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Dissertação de Mestrado, intitulada “ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE VENENO DE TITYUS SERRULATUS UTILIZANDO SUPERFÍCIES DE CARBONO E OURO”. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar aprovada a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de janeiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Tulio Matencio, Membro de comissão**, em 20/01/2022, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederic Jean Georges Frezard, Professor do Magistério Superior**, em 22/01/2022, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hallen Daniel Rezende Calado, Professora do Magistério Superior**, em 25/01/2022, às 21:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Lassarote Lavall, Professor do Magistério Superior**, em 02/02/2022, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Guilherme Dias Heneine, Usuário Externo**, em 15/02/2022, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1197337** e o código CRC **729F145F**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

“ESTUDO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE VENENO DE TITYUS SERRULATUS UTILIZANDO SUPERFÍCIES DE CARBONO E OURO”

VERÔNICA APARECIDA MARTINS DO ROSÁRIO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 17 de janeiro de 2022, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:

PROF. DR. RODRIGO LASSAROTE LAVALL
ICEX/UFMG

PROFA. DRA. HÁLLEN DANIEL REZENDE CALADO
ICEX/UFMG

PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FRÉZARD
ICB/UFMG

DR. LUIZ GUILHERME DIAS HENEINE - COORIENTADOR
FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS

PROF. DR. TULIO MATENCIO – ORIENTADOR
ICEX/UFMG

Belo Horizonte, 17 de janeiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Tulio Matencio, Membro de comissão**, em 20/01/2022, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederic Jean Georges Frezard, Professor do Magistério Superior**, em 22/01/2022, às 12:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hallen Daniel Rezende Calado, Professora do Magistério Superior**, em 25/01/2022, às 21:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Guilherme Dias Heneine, Usuário Externo**, em 27/01/2022, às 19:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Lassarote Lavall, Professor do Magistério Superior**, em 02/02/2022, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1197338** e o código CRC **FEC1419A**.

A todas as mulheres da ciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha Fé em Deus e à minha Mãe do céu, neste momento muito questionada, porém se manteve firme. Obrigada por me manterem no caminho certo.

Agradeço a toda minha família que vem incondicionalmente me apoiando com meus sonhos. Sem vocês nada disso seria possível, desde o colégio à graduação, ao mestrado e ao futuro.

Agradeço o apoio da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), onde realizou-se toda parte técnica do projeto, aos laboratórios do Serviço de Recursos Vegetais e Oterápicos pelas análises de microscopia eletrônica e do Serviço de Físico-Química de Produtos pelas análises de Infravermelho, em especial ao laboratório de Imunologia Aplicada, onde aprendi muito. Agradeço aos técnicos Thiago, Giancarlo por todo conhecimento compartilhado e à assistente administrativa Rejiane pelo seu apoio.

Agradeço em especial, advindo da FUNED, a um amigo que me ensinou não somente procedimentos técnicos, mas sim muitos conceitos éticos que me fizeram ser um ser humano melhor. Obrigada, Robson Junior!

Agradeço o apoio da startup SmartSensors por ceder os sensores para o estudo.

Agradeço ao Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras (Cbeih) pelo apoio financeiro e pelos ensinamentos altamente colaborativos de toda equipe. Agradeço em especial à Camila Schults, que me acompanhou nessa jornada durante um bom tempo como Iniciação Científica, onde conseguimos aprender juntas uma nova metodologia.

Agradeço aos meus orientadores. Ao Dr. Tulio Matencio, que vem me ensinando e orientando do primeiro até o último minuto sobre esta ciência fora da caixa que decidi aprender, que é a eletroquímica. Ao Dr. Luiz Guilherme meu “pai científico” por todos os ensinamentos e por me ensinar um pouco mais da imunologia, uma ciência de tantos caminhos e por me mostrar essas diversas possibilidades.

Meus agradecimentos e apoio de todos os amigos que sempre torceram pelo meu sucesso. Em especial à Thabata e à Luana que me ouviram, que me abraçaram em um pior momento e que foram, como sempre, minhas irmãs que a Biologia me deu.

Falando de amigos, agradeço o apoio de todos os amigos que o Mestrado me deu: Raquel, Xênia e principalmente a Jéssica Moreira Caetano, mais que uma colega ou parceira de aula, uma amiga da vida inteira. Obrigada por tudo, quantos conselhos, quantos puxões de orelhas, quantas sessões de terapia, quantas palavras necessárias, obrigada por ser este ser humano incrível, essa mulher fora da curva.

Enfim agradeço a todos. A gratidão é a grande memória do coração.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”
Marie Curie, 1865.

RESUMO

Em 2007, ocorreram 37368 acidentes escorpiônicos em humanos. No ano de 2010, o número de acidentes passou para 51754 casos, e em 2017 dobrou-se o número de notificações, atingindo 123964 pessoas, correspondendo a cerca de 70% do total de acidentes por animais peçonhentos notificados no SINAN. Atualmente, um dos maiores problemas encontrados quando há um acidente escorpiônico é o atendimento no ambiente de saúde e a falta de diagnóstico rápido, principalmente em casos que não há relato da picada, registrados com maior incidência em crianças, onde encontrou-se um maior número de óbitos, a confecção de um método mais rápido e mais sensível para o diagnóstico de acidentes por picadas de escorpiões é de grande importância para tratar o acidentado de forma específica e segura. Um método que se apresenta com potencial aplicação e eficácia é a utilização de biossensores, dispositivos compostos de um sistema receptor e outro transdutor, que fornecem dados analíticos utilizando um componente biológico de reconhecimento. Ademais, ainda existe a possibilidade do uso de biopolímeros, que vêm surgindo como uma nova classe de materiais na bioengenharia com uma grande variedade de aplicações, em especial o uso em biossensores. Existem diferentes fontes de obtenção dos biopolímeros, porém uma espécie conhecida como praga e invasora no Brasil pode se tornar um potencial fonte de quitosana, essa espécie é denominada Mexilhão-dourado. A disponibilidade abundante de mexilhão possibilita uma visão de reaproveitamento das partes do animal, como as conchas, tendo impacto direto na destinação da espécie. O objetivo é estudar materiais e métodos para desenvolver um imunossensor impedimétrico para detecção de veneno de *Tityus serrulatus* utilizando superfícies de carbono e ouro. Para metodologia, utilizou-se a purificação de anticorpos e a purificação da quitina a partir das conchas do mexilhão-dourado. Foram utilizados dois sensores um à base de carbono e outro à base de ouro. As medidas foram realizadas com uso da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. Foram obtidos resultados com seletividade e sensibilidade promissoras, com limite de detecção de 1 ng/mL para ambos os sensores, com prototipação inicial utilizando a resposta do sinal em uma frequência apenas, diminuindo assim o tempo. O estudo aqui apresentado é o começo para a produção de métodos diagnósticos rápidos para acidentes escorpiônicos. A sequência deste estudo visando a maturação da tecnologia com sua validação, qualificação e estudo de mercado mais completo impactará diretamente na diminuição do número de óbitos registrados com acidentes escorpiônicos no país.

Palavras-chaves: Escorpionismo. Imunossensores. Inovação biotecnológica. Impedância. Carbono. Ouro. Quitosana

ABSTRACT

In 2007, there were, 37368 scorpion accidents in humans. In 2010, the number of accidents rose to 51754 cases, and in 2017 the number of notifications doubled, reaching 123964 people, corresponding to about 70% of all accidents by venomous animals reported in SINAN. Currently, one of the biggest problems encountered when there is a scorpion accident is the care in the health environment and the lack of rapid diagnosis, especially in cases where there is no report of the sting, recorded with higher incidence in children, where we find a higher number of deaths, the confection of a faster and more sensitive method for the diagnosis of accidents by scorpion stings is of great importance to treat the injured person in a specific and safe way. A method that presents itself with potential application and effectiveness is the use of biosensors, devices composed of a receptor system and another transducer, which provide analytical data using a biological recognition component. Furthermore, there is also the possibility of using biopolymers, which are emerging as a new class of materials in bioengineering with a wide variety of applications. There are different sources of obtaining biopolymers, but a species known as a pest and invader in Brazil can become a potential source of chitosan, this species is called Golden Mussel. The abundant availability of mussels enables a vision of reusing parts of the animal, such as the shells, having a direct impact on the destination of the species. The objective is to study materials and methods to develop an impedimetric immunosensor for detection of *Tityus serrulatus* venom using carbon and gold surfaces. For methodology, the purification of antibodies and the purification of chitin from the shells of the golden mussel were used. Two sensors were used, one carbon-based and one gold-based. The measurements were performed using the Electrochemical Impedance Spectroscopy technique. Results with promising selectivity and sensitivity were obtained, with a detection limit of 1 ng/mL for both sensors, with initial prototyping using the signal response at only one frequency, thus decreasing time. The study presented here is the beginning for the production of rapid diagnostic methods for scorpion accidents. The sequence of this study aimed at the maturation of the technology with its validation, qualification and more complete market study will directly impact on reducing the number of deaths from scorpion accidents in the country.

Keywords: Scorpions. Immunosensors. Biotechnological innovation. Impedance. Carbon. Gold. Chitosan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Notificações de acidentes por animais peçonhentos no Brasil entre 2011 e 2020	20
Figura 2 - Morfologia externa dos escorpiões (<i>Tityus</i> sp.). 1. Vista dorsal. 2. Vista ventral. .	25
Figura 3 - Escorpiões do Gênero <i>Tityus</i> de importância médica no Brasil e suas distribuições geográficas: a: <i>Tityus bahiensis</i> ; b: <i>Tityus serrulatus</i> ; c: <i>Tityus stigmurus</i> e d: <i>Tityus obscurus</i>	28
Figura 4 - Notificações de acidentes escorpiônicos no Brasil de 2011 a 2020 por faixa etária	32
Figura 5 - Notificações de acidentes escorpiônicos no Brasil de 2011 a 2020 por região geográfica.....	33
Figura 6 - Notificações de óbitos por acidentes escorpiônicos no Brasil de 2011 a 2020 por região geográfica	34
Figura 7 - Sensor <i>Screen-Printed</i> à base de tintas de carbono e prata	53
Figura 8 - Esquema de imobilização de Anticorpo Antiescorpiônico	54
Figura 9 - Sensor <i>Screen-Printed</i> à base de tintas de ouro e prata.....	56
Figura 10 - Esquema de imobilização de anticorpo antiescorpiônico	57
Figura 11 - Circuito de Randles e sua resposta idealizada no Diagrama de Nyquist.....	58
Figura 12 - ELISA para verificação da ação de especificidade do anticorpo antiescorpiônico purificado	59
Figura 13 - <i>Western blot</i> ; a: padrão de pesos moleculares; b: veneno de <i>Tityus serrulatus</i> ; c: veneno de <i>Phoneutria nigriventer</i> ; d: veneno de <i>Loxosceles similis</i> , e: veneno <i>pool</i> de serpentes (<i>Crotalus</i> , <i>Bothrops</i> e <i>Micurus</i>).....	61
Figura 14 - FITR da quitina extraída das conchas do mexilhão-dourado	62
Figura 15 - FTIR da quitosana obtida do processo de desacetilação da quitina do mexilhão-dourado	63
Figura 16 - Micrografias da quitina extraída das conchas do mexilhão-dourado. A: 100 µm; B: 10 µm; C: 20 µm e D: 10 µm.....	64
Figura 17 - Micrografias da quitosana obtida por desacetilação da quitina extraída das conchas do mexilhão-dourado. A: 100 µm; B: 10 µm e C e D: 2 µm	65
Figura 18 - Diagrama de Nyquist representando o mapeamento impedimétrico do processo de funcionalização de um eletrodo de carbono.....	66
Figura 19 - Diagrama de Nyquist representando o mapeamento impedimétrico do processo de funcionalização de eletrodos de ouro.....	70
Figura 20 - Ensaio 1: Diagrama de Nyquist do imunossensor de carbono frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL	71

Figura 21 - Circuito equivalente sugerido para simulação do ensaio 1 utilizando sensor de carbono.....	71
Figura 22 – Ensaio 1: ΔR_{tc} do imunossensor de carbono frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL.....	72
Figura 23 - Ensaio 2: Diagrama de Nyquist do imunossensor de carbono frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL	73
Figura 24 – Ensaio 2: ΔR_{tc} no imunossensor de carbono frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL.....	73
Figura 25 - Ensaio 3: Diagrama de Nyquist do imunossensor de carbono frente aos venenos botrópico, crotálico e escorpiônico a 1 $\mu\text{g/mL}$	74
Figura 26 – Ensaio 3: ΔR_{tc} do imunossensor de carbono frente aos venenos botrópico, crotálico e escorpiônico 1 $\mu\text{g/mL}$	74
Figura 27 - Ensaio 4: Diagrama de Nyquist do imunossensor de carbono frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 $\mu\text{g/mL}$ e escorpiônico na concentração de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$	75
Figura 28 - Ensaio 4: ΔR_{tc} no imunossensor de carbono frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 $\mu\text{g/mL}$ e escorpiônico na concentração de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$	76
Figura 29 - Ensaio 1: Diagrama de Nyquist do imunossensor de ouro frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 1, 10, 100, 1000 ng/mL.....	78
Figura 30 - Ensaio 1: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 1, 10, 100, 1000, 1000 ng/mL	79
Figura 31 - Ensaio 2: Diagrama de Nyquist do imunossensor de ouro frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL	80
Figura 32 – Ensaio 2: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL	81
Figura 33 - Ensaio 3: Diagrama de Nyquist do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico, crotálico e escorpiônico a 1 ng/mL	82
Figura 34 – Ensaio 3: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL.....	82
Figura 35 - Ensaio 3: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL, normalizados por meio da subtração dado branco do sistema	83
Figura 36 - Ensaio 4: Diagrama de Nyquist do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL	83
Figura 37 – Ensaio 4: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL.....	84

Figura 38 – Ensaio 4: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL, normalizados por meio da subtração do branco do sistema	84
Figura 39 - Sistema Portátil: a: <i>smartphone</i> ; b: potenciostato; c: sensor (ouro ou carbono) .	87
Figura 40 - Diagrama de Bode: evolução do ângulo de fase x frequência.....	87
Figura 41 - Detecção de veneno a partir da evolução do ângulo de fase na frequência de 0,1 Hz, com análise regressiva. A, B e C: sensor de carbono; D, E e F: sensor de ouro	89
Figura 42 – Análise de seletividade utilizando sensores de carbono na frequência de 0,1 Hz, com retirada do branco dos controles, a e c: dados impedimétricos; b e d: dados do ângulo de fase.....	90
Figura 43 - Análise de seletividade utilizando sensores de ouro na frequência de 0,1 Hz, com retirada do branco dos controles, a e c: dados da parte imaginária da impedância; b e d: dados do ângulo de fase	91
Figura 44 - Análise de seletividade. Relação entre sensores diferentes com detecções de controle negativo e positivo, sendo A: dados da parte imaginária da impedância e B: dados do ângulo de fase na frequência de 0,1 Hz.....	91
Figura 45 - Adaptação da escala de TRL.....	92

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Exemplos de Compostos de Venenos de Escorpião <i>Tityus</i>	31
Tabela 2- Classificação do acidente escorpiônico quanto à gravidade e manifestações clínicas	32
Tabela 3 - Distribuição de casos de escorpionismo segundo a faixa etária e a classificação do acidente notificado no Sistema de Informação de Agravos de Notificação no Brasil de 2011 a 2021	34
Tabela 4 – Caracterização por FTIR quanto aos grupos funcionais da quitina.....	62
Tabela 5 - Caracterização FTIR quanto aos grupos funcionais da quitosana.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos	23
3 REFERENCIAL TEÓRICO	24
3.1 ESCORPIONISMO	24
3.1.1 Caracterização Taxonômica e Morfofuncional do Escorpião	24
3.1.2 Escorpiões de importância médica no Brasil	26
3.1.3 Veneno Escorpionico: mecanismo de ação	27
3.1.4 Diagnóstico e Classificação Clínica do Caso	29
3.1.5 Epidemiologia	30
4 BIOSSENSORES	35
4.1 Contextualização	35
4.2 Imunossensores eletroquímicos	38
5 BIOPOLÍMEROS	40
5.1 Contextualização	40
5.2 Quitina e Quitosana	41
6 INOVAÇÃO	43
6.1 Contextualização	43
6.2 Inovação em Biotecnologia	45
7 METODOLOGIA	48
7.1 Obtenção e Caracterização dos Anticorpos Antiescorpionicos	48
7.2 Obtenção e Caracterização de Quitosana	51
7.3 Funcionalização dos Sensores	53
7.3.1 Elérodos de Carbono	53
7.3.2 Elérodos de Ouro	55
7.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	56
7.6 Circuito Elétrico Equivalente	57
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
8.1 Caracterização dos anticorpos purificados	59
8.2 Caracterização da quitina e quitosana	62
8.3 Caracterização da Funcionalização	65

8.3.1 Sensores de Carbono	65
8.3.2 Sensores de Ouro	68
8.4 Detecção de Veneno	70
8.4.1 Detecção em sensores de carbono	70
8.4.2 Detecção em sensores de ouro	77
8.5 Prototipagem	86
8.6 Maturidade tecnológica	92
9 CONCLUSÃO	93
9.1 Impactos e Contribuições	93
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

Os problemas de saúde pública no Brasil vêm aumentando gradativamente, como os acidentes por animais peçonhentos, que ultrapassaram a marca de 140 mil casos notificados anualmente. Além disso, a diversidade de habitats dos países latino-americanos beneficia a presença de uma variedade de espécies de animais venenosos de importância médica (VALDERRAMA, 2009). Conforme Braga e colaboradores (2021), o desalinhamento da urbanização e do crescimento no país, levaram a um desequilíbrio ecológico, como consequência os animais peçonhentos e humanos começaram a coexistir em um mesmo espaço, o que levou a um aumento na interação entre as duas espécies, levando a um problema no sistema de saúde.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os acidentes por animais peçonhentos têm sido considerados como um agravo negligenciado ligado às situações de pobreza (WHO, 2007). Entre os animais de importância médica, as serpentes, as aranhas e os escorpiões são os responsáveis pela ocorrência da maioria dos acidentes (CARDOSO et al., 2009). Cheung e Machado (2017), comentaram sobre a relevância entre essas espécies de importância médica, no número de notificações, sendo os acidentes ofídicos, escorpiônicos e araneísmo com o maior índice de notificações. Nesse contexto, Sanchez-Castro e Colaboradores (2021) afirmam que os acidentes relacionados às serpentes têm uma incidência mundial de cerca 2,7 milhões de casos por ano e Feola e seus colaboradores (2020) mensuraram cerca de 1,5 milhões de acidentes escorpiônicos em todo mundo.

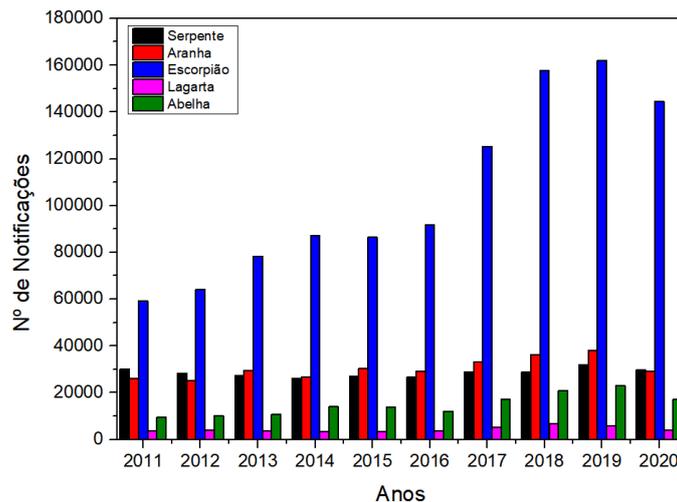
Nesse contexto, a situação epidemiológica do país, conforme dados do Ministério da Saúde, foram registrados entre 1975 e 2020 cerca de 2434681 notificações de acidentes no país, sendo 399780 por serpentes, 398825 por aranhas, 175480 por abelhas, 1248629 por escorpiões e os demais por lagartas e outras espécies. O número de notificações indica como os acidentes são problemas atuais no Brasil, ressaltando a última década (figura 1). Conforme dados do Ministério da Saúde, os acidentes ofídicos são cerca de 15% das notificações, cerca de 16% por araneísmo e cerca de 54% por escorpiônicos, por isso os acidentes enfatizados neste estudo são os escorpiônicos.

Em 2007 ocorreram 37368 acidentes escorpiônicos em humanos, no ano de 2010, o número de acidentes passou para 51754, e em 2017 dobrou-se o número de

notificações, atingindo 123964 pessoas, correspondendo a cerca de 70% do total de acidentes por animais peçonhentos notificados no Sistema de informações de agravos e notificações (SINAN).

O risco de acidentes escorpiônicos é intrínseco às atividades rotineiras exercida pelo homem, pois a alta plasticidade ecológica apresentada por esses animais propicia uma adaptação a ambientes fora do seu nicho ecológico (CUPO et al., 2003). Corroborando com o autor anterior, Torres e colaboradores (2018) argumentam que a urbanização acelerada observada no Brasil nas últimas décadas, sem a criação adequada de infraestrutura básica (água, luz, tratamento de esgoto e coleta regular de lixo), proporcionou a proliferação de algumas espécies oportunistas e invasivas de escorpiões.

Figura 1 - Notificações de acidentes por animais peçonhentos no Brasil entre 2011 e 2020



Fonte: SINAN - Ministério da Saúde/SVS

Atualmente, uns dos maiores problemas encontrados quando um indivíduo é picado por um escorpião são o atendimento no ambiente de saúde e a falta de diagnóstico precoce, principalmente em casos que não há relato da picada, como ocorre com maior incidência em crianças, que são as maiores vítimas. Conforme a Funasa (2001), não existem métodos para diagnosticar de forma rápida os acidentes escorpiônicos. O diagnóstico é feito através da análise de manifestações sistêmicas, com a complementação com exames laboratoriais. Cheng (2014) argumentam que o diagnóstico é baseado inicialmente em uma suspeita clínica, a qual deve ser corroborada com exames clínicos cuidadosos e uma anamnese meticulosa, sendo

essencial, sempre que possível, a captura do animal. Conforme Dias-Lopes e colaboradores (2018), análises laboratoriais clínicas e bioquímicas são insuficientes para apoiar o diagnóstico, além disso, embora os sintomas gerais ocorram logo após a picada, em alguns casos, elas podem ser ocasionalmente adiadas por várias horas, o que pode complicar o diagnóstico.

Nesse contexto, a confecção de um método mais rápido e sensível para o diagnóstico de acidentes por picadas de escorpiões é de grande importância para tratar o acidentado de forma específica e segura. Um método de potencial aplicação e eficácia é a utilização de biossensores. A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 1999) descreve o mesmo como um sistema composto de um receptor e um transdutor, que fornece dados utilizando componentes químicos ou biológicos de reconhecimento. Segundo Goode e seus colaboradores (2015), a criação de novos dispositivos com detecção de analitos de importância biológica tem despertado cada vez mais a curiosidade e atenção de diversos pesquisadores de diferentes áreas de atuação, os quais têm focado seus esforços na criação de um dispositivo sensível, seletivos, economicamente viáveis e de alta potencialidade de aplicação em uma grande plataforma. Os biossensores eletroquímicos estão entre os mais estudados devido às suas características de miniaturização, portabilidade, rapidez de resposta e especificidade de reconhecimento do analito alvo.

Ademais, ainda existe a possibilidade do uso de biopolímeros, que vêm surgindo como uma nova classe de materiais na bioengenharia com uma grande variedade de aplicações. Um dos biopolímeros mais utilizados atualmente é a quitosana, que se trata de um polissacarídeo que está despertando interesse em diversas áreas científicas e tecnológicas, utilizada como material polimérico funcional, por ser um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível e produzido por fontes naturais renováveis, tendo aplicações em diversas áreas (TONHI; PLEPIS, 2002). Jayakumar e Prabakaran (2021) descrevem a quitosana com suas propriedades atóxicas e presença de grupos funcionais como hidroxilas e aminas, que aumentam a estabilidade mecânica na imobilização de superfície de biomoléculas bioreceptoras em biossensores, além de fornecer maior condutividade e sensibilidade na detecção.

Existem diferentes fontes de obtenção dos biopolímeros, porém uma espécie conhecida como praga e invasora no Brasil pode se tornar um potencial fonte de quitina, essa espécie é denominada Mexilhão-dourado. Segundo Morton & Dinesen

(2010), conhecido popularmente no país como mexilhão-dourado, o *Limnoperna fortunei* é uma espécie de mexilhão-de-água-doce da família Mytilidae. Conforme dados do órgão responsável pela preservação e manutenção do meio ambiente brasileiro, o IBAMA, o mexilhão alastra-se com agilidade, por isso a espécie é considerada uma bioinfestação. Conforme dados literários, as bioinfestações são uma das causas de extinção de espécies, atrás apenas da destruição de habitats. A abundância de mexilhão possibilita uma visão de reaproveitamento das partes do animal, como as conchas, tendo impacto direto na destinação do resíduo gerado pela espécie. Dessa forma, será possível transformar uma espécie invasora em um *asset*, isto é, quando um problema se torna um ativo ou coproduto.

Para realização do estudo contou com o apoio e as instalações da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), fundada em 1907 a instituição centenária localizada na capital mineira vem buscando soluções em saúde para o fortalecimento do Sistema Único Saúde (SUS) e é reconhecida no cenário do Estado de Minas Gerais como Instituto de Ciência e Tecnologia, mantendo seus serviços com alta qualidade. A FUNED engloba em seu escopo a busca por inovação, com isso a Smartsensors surgiu como um *spin off* do departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da fundação em uma parceria entre pioneiros pesquisadores da fundação com a Universidade (UFMG), a empresa tem como principal foco a P&D em biossensores com aplicação na área de diagnósticos clínicos, veterinários e controle de alimentos (FUNED, 2019).

Para a obtenção da quitina com a utilização do mexilhão-dourado como matriz, a FUNED firmou parceria com o Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras de Hidrelétricas (CBEIH), o centro foi criado em 2010 a partir do P&D ANEEL, tem uma interação entre áreas de conhecimento de alto nível inovador na ação contra os organismos invasores considerando o Monitoramento, Bioengenharia e Modelagem Ambiental (CBEIH).

Portanto, dentre os conceitos de inovação o do Manual de Oslo (2005), que define a inovação de forma abrangente, existe a inserção de algo novo ou melhorado desde processos, serviços ou produtos nas relações externas, ou organização do local de trabalho. A necessidade de um processo ou produto de caráter inovador para o diagnóstico de acidentes escorpiônicos, pois foi mostrado um cenário com dados de incidência e prevalência com grande relevância.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar materiais e métodos para desenvolver um biossensor impedimétrico para detecção de veneno de *Tityus serrulatus* utilizando superfícies de carbono e ouro.

2.2 Específicos

- Purificar anticorpos antiescorpiônico-específicos, através da técnica de imunocromatografia de afinidade;
- Purificar e caracterizar a quitosana utilizando as conchas do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*);
- Testar métodos para a funcionalização em eletrodos de carbono e ouro, utilizando anticorpos antiescorpiônicos;
- Determinar a linearidade, sensibilidade e limite de detecção do dispositivo frente a diferentes concentrações de venenos de escorpião utilizando a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE);
- Analisar a especificidade frente a venenos ofídicos, aracnídeos e escorpiônicos em diferentes concentrações;
- Gerar um protótipo de campo para diagnóstico de acidentes escorpiônicos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ESCORPIONISMO

3.1.1 Caracterização Taxonômica e Morfofuncional do Escorpião

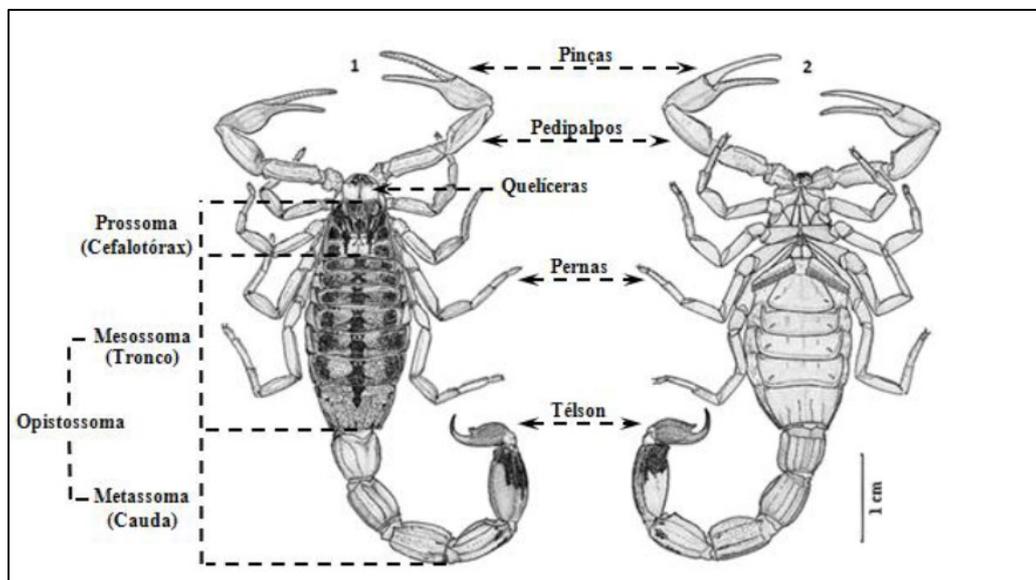
Os artrópodes, um grupo de animais com grande diversidade, pois abrangem cerca de 90% do reino, ocorrem em todos os ambientes. Existe um número estimado de 1097289 espécies de artrópodes identificadas, embora o número exato seja ainda desconhecido, dentre os espécimes desse reino estão o grupo dos queliceriformes: ácaros, aranhas, opiliões, escorpiões, carrapatos, dentre outros, que perfazem cerca de 100000 espécies (Brusca & Brusca, 2007). O escorpião, conhecido popularmente como Lacrau em algumas partes do país, é um quelicerado, que possui a classificação taxonômica: Filo Arthropoda, classe Arachnida e ordem Scorpiones. O nome escorpião é derivado do latim *scorpio/scorpionis* (BRAZIL & PORTO, 2010).

Os escorpiões têm seu corpo dividido em duas partes (figura 2), prossoma uma espécie de carapaça, onde observa-se seus membros locomotores no caso quatro patas, suas quelíceras membros com função de triturar o alimento e um par de pedipalpos que são como pinças, a outra parte é o opistossoma, funcionalmente o abdômen subdividido em mesossoma o tronco do animal, onde encontra os apêndices sensoriais, o opérculo genital e os espiráculos que são aberturas externas dos pulmões, a outra subdivisão chamada de metassoma, que se trata da cauda do animal, onde na sua porção final apresenta uma estrutura chamada telson, onde estão localizadas um par de glândulas secretoras de veneno e o ferrão utilizado na inoculação da peçonha. (CARNEIRO et al., 2015).

Segundo o Ministério da Saúde (2009), os escorpiões têm uma grande diversidade de habitats, porém também são encontrados nas regiões urbanizadas, como regiões peridomiciliares, enquanto em ambiente natural são encontrados embaixo de cascas de árvores, rochas e sob pedras. Apresentam hábitos noturnos e elevada plasticidade ecológica, por isso algumas espécies se adaptam a ambientes antropizados, como consequência há o alto índice de notificações de acidentes registrados nos últimos anos (CUPO et al., 2003). Segundo a Fundação Oswaldo Cruz, os escorpiões se destacam de outros aracnídeos devido à duração de vida que

vai além de uma estação, por apresentar elevado índice de longevidade (de 2 a 6 anos) e pelo maior tempo de vida registrado até hoje, que é de oito anos.

Figura 2 - Morfologia externa dos escorpiões (*Tityus* sp.). 1. Vista dorsal. 2. Vista ventral.



Fonte: Adaptado de Cândido e colaboradores

Os escorpiões possuem hábitos alimentares, consumindo principalmente outros artrópodes como aranhas, grilos e baratas, apresentam estratégia de forrageamento tipo senta-espera, mantendo as presas imóveis com a utilização das pinças, porém se as mesmas apresentarem resistência eles utilizam o artifício do envenenamento, entretanto, os escorpiões, podem passar longos períodos sem alimentação (PORTO & BRAZIL, 2011).

Os escorpiões são vivíparos, a maioria das espécies apresenta a reprodução sexuada e o desenvolvimento da prole pode ser separado em embrionário e pós-embrionário. A disseminação da espécie pode variar de 3 a 18 meses, porém fatores intrínsecos como ambientais afetam diretamente a reprodução e o desenvolvimento até a fase adulta (OUTEDA-JORGE, 2010). Algumas espécies apresentam a reprodução por partenogênese, ou seja, não necessitam dos machos para o desenvolvimento da prole, essa característica é vista com um fator evolutivo no grupo, mesmo com o número de indivíduos relativamente baixo gerado com essa reprodução, o animal consegue garantir a perpetuação da espécie. Existem no Brasil cerca de cinco espécies que reproduzem por partenogênese, todas pertencentes ao mesmo gênero *Tityus* (LOURENÇO, 2008).

A taxonomia do escorpião é instável desde a virada do século, em sua revisão de classificação de escorpiões, Sissom (1990) listou 1077 espécies, 177 gêneros e nove famílias. Nos anos 90, novas famílias foram propostas e ajudaram a criar uma imagem mais clara das relações filogenéticas entre os gêneros de escorpiões. Em seu catálogo de escorpião do Mundo, Fet e seus colaboradores (2000) listaram 16 famílias, 154 gêneros e 1252 espécies de escorpiões. A estimativa mais recente da taxonomia da diversidade de escorpiões é de 19 famílias, 213 gêneros e 2363 espécies (REIN, 2017).

No Brasil, até o ano de 2002, foram registradas 86 espécies, 17 gêneros e 4 famílias de escorpiões (LOURENÇO, 2002). Com as recentes descrições e revisões sistemáticas e taxonômicas, são atualmente registradas 131 espécies, 23 gêneros e 4 famílias, o que representa cerca de 9% da diversidade mundial da espécie. (BRAZIL & PORTO, 2002).

3.1.2 Escorpiões de importância médica no Brasil

Estima-se que todos os escorpiões possuem veneno e capacidade de injetá-lo, mas nem toda espécie consegue causar danos graves em humanos (POLIS 1990). Conforme o Ministério da Saúde, existem no Brasil 4 espécies de escorpiões capazes de causar acidentes graves: *T. serrulatus* (Lutz & Mello, 1922), *T. stigmurus* (Thorell, 1876), *T. bahiensis* (Perty, 1833) e *T. obscurus* (Gervais, 1843). Nesse contexto, seguindo descrições de Lourenço & Eickstedt (2009), e do Manual de Controle de Escorpiões, apresentaram as seguintes características para as 4 espécies:

***Tityus bahiensis*:** um animal de coloração avermelhada ou marrom escura, apresentando algumas manchas nos membros, popularmente conhecido como escorpião-marrom. Atinge cerca de 7 cm de comprimento e tem a reprodução sexuada (figura 3a).

***Tityus serrulatus*:** o escorpião-amarelo, como é conhecido, possui uma coloração amarela, onde do tronco para os membros ocorre uma clarificação, na extremidade da cauda possui uma serrilha e se reproduz de forma partenogenética (figura 3b).

***Tityus stigmurus*:** o escorpião-amarelo-do-Nordeste, muito confundido com o *Tityus serrulatus*, possui algumas semelhanças como a reprodução partenogenética

e a coloração amarelada, mas a presença de uma macha escura no cefalotórax os diferencia (figura 3c).

Tityus obscurus: popularmente conhecido como escorpião-preto-da-Amazônia, um dos maiores animais do gênero, medindo cerca de 9 cm de comprimento. Apresenta coloração negra quando adulto e quando jovem. (figura 3d).

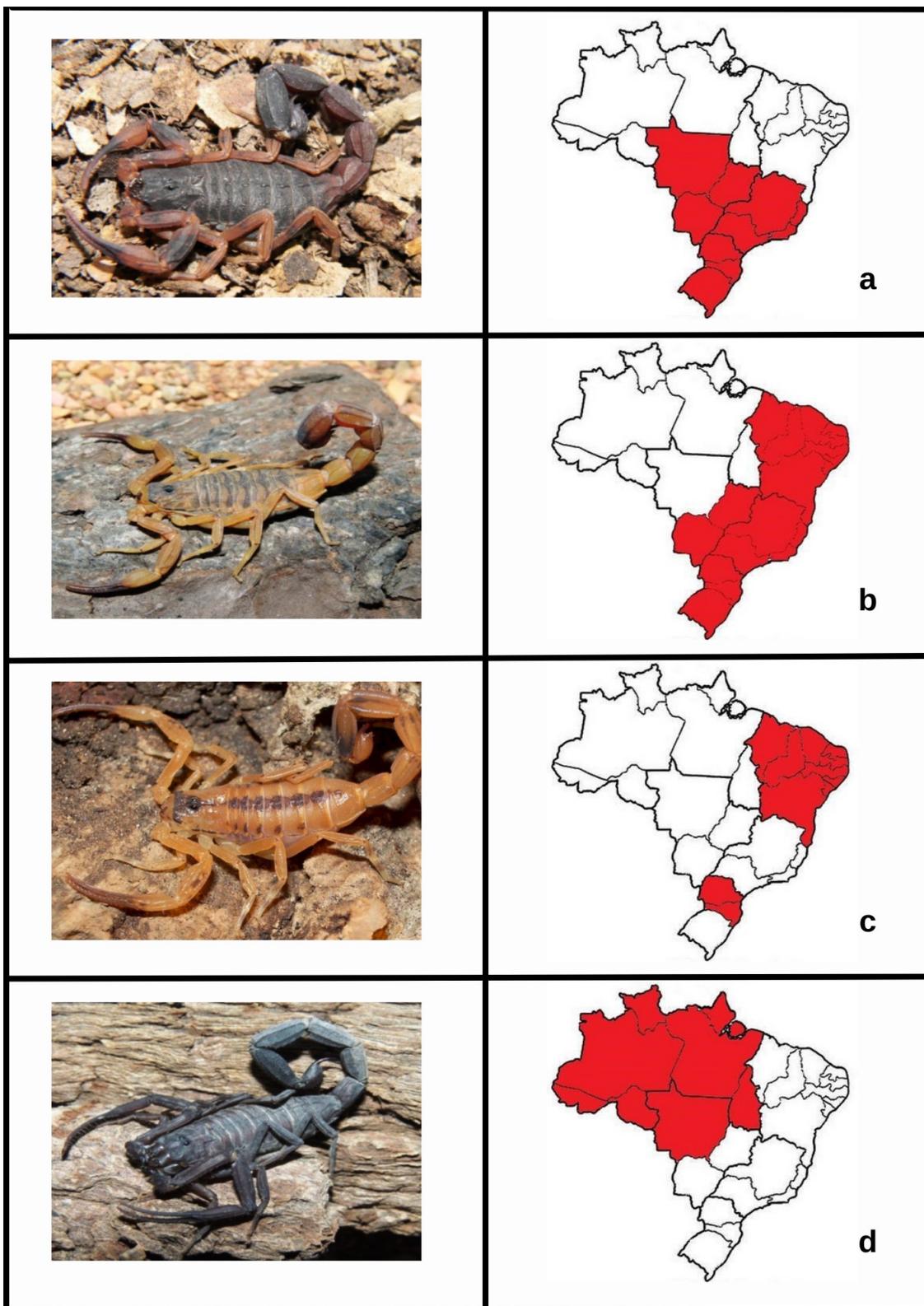
Conforme o Ministério da Saúde (2009), existe uma grande diversidade de escorpiões no país que também podem causar acidentes, porém potencialmente menos graves e com incidência de acidentes não relevantes como: *T. metuendus*, *T. silvestris*, *T. brazilae*, *T. confluens*, *T. costatus*, *T. fasciolatus*, *T. neglectus*, *T. mattogrossensis*, *Ananteris balzani*, *Rhopalurus agamemnon*, *R. rochai*, dentre outros.

3.1.3 Veneno Escorpiônico: mecanismo de ação

O veneno escorpiônico é uma mistura altamente complexa de peptídeos, enzimas, muco, proteínas, aminoácidos livres, nucleotídeos, lipídios, aminas, componentes heterocíclicos, sais inorgânicos e provavelmente outras substâncias, como demonstrado na tabela 1. As toxinas do veneno são amplamente estudadas. Isso é devido à sua ação farmacológica nos canais iônicos e sua relevância clínica como neurotoxinas. Elas são peptídeos com pontes de dissulfeto. As toxinas que atuam nos canais de sódio são as mais relevantes por seus efeitos em mamíferos, incluindo humanos.

Outras toxinas do escorpião atuam nos canais de potássio, cloro e cálcio. Embora possam exibir ações sinérgicas que conduzem a manifestações, seu papel no envenenamento humano parece ser subsidiário. Toxinas ou componentes de veneno de escorpião relacionados a toxicidade são mais conhecidos por seus efeitos deletérios sobre células, tecidos e organismos, paradoxalmente, alguns deles demonstraram exibir atividades que possam ser relevantes para o desenvolvimento de medicamentos anticâncer, antimaláricos e antimicrobianos (RODRIGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005).

Figura 3 - Escorpiões do Gênero *Tityus* de importância médica no Brasil e suas distribuições geográficas: a: *Tityus bahiensis*; b: *Tityus serrulatus*; c: *Tityus stigmurus* e d: *Tityus obscurus*



Fonte: Lourenço & Eickstedt (2009) e Manual de Controle de Escorpiões

O veneno escorpionico tem capacidade de atuar em diferentes partes do organismo, pois a sua composição tem uma alta complexidade proteica (Tabela 1), além de apresentar uma quantidade relativamente baixa de aminoácidos (BARRAVIERA, 1999). Segundo Mebs (2002), a presença de neurotoxinas que possuem afinidade por estruturas nervosas, como canais de íons, consegue causar mudança na condutividade dos canais iônicos de Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , na literatura científica as mais citadas são as que afetam os canais de Na^+ .

Conforme Andrade-Filho e seus colaboradores (2013), as neurotoxinas escorpionicas agem nas terminações nervosas pós-ganglionares. As mesmas podem induzir a liberação de neurotransmissores do sistema nervoso simpático e parassimpático, nos canais de Na^+ . Essa ação é uma das grandes responsáveis pelas manifestações clínicas apresentadas pelo indivíduo.

Como citado, as espécies pertencentes ao gênero *Tityus* são responsáveis pela maioria dos acidentes, principalmente nas Américas. A sua gravidade e sinais clínicos estão ligados principalmente à ação nos neurotransmissores acetilcolinas e catecolaminas, onde os aminoácidos presentes na composição do veneno agem gerando uma sintomatologia diferente consoante as funcionalidades de cada neurotransmissor (DÁVILA et al., 2011).

3.1.4 Diagnóstico e Classificação Clínica do Caso

Conforme Dias-Lopes e seus colaboradores (2018), esses acidentes ainda são uma preocupação médica global, reconhecidos como doenças tropicais negligenciadas. Devido ao mecanismo rápido de ação das toxinas de escorpiões, a rápida detecção e quantificação de veneno são necessárias para acelerar as decisões de tratamento, terapia para racionalizar e reduzir os custos e os riscos do paciente.

Foi desenvolvido um teste utilizando a técnica *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para detecção de veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, detectando a presença de toxinas circulantes nos pacientes de escorpionismo (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, et al., 1994). No entanto, o método imunoenzimático desenvolvido não conseguiu diferenciar acidentes moderados de amostras controle. Assim, sua aplicação na rotina clínica para o diagnóstico de picadas de escorpião em humanos

fica comprometida, não havendo, portanto, um método rápido e preciso (REZENDE et al., 1995).

Existe também um método radioativoimunoensaio que é utilizado para detectar veneno em soro de coelhos envenenados experimentalmente. Verificou-se que as concentrações plasmáticas de toxina de escorpião determinadas pela radioatividade foram significativamente mais elevadas do que os valores determinados por ELISA . Isso pode ser devido à degradação/clivagem de toxinas que podem ocorrer *in vivo*, que ainda poderiam ser quantificadas por radioatividade, mas não por ELISA (KRIFI, et al., 2005). No entanto, esses testes estão ainda em níveis laboratoriais, onde nenhum ainda alcançou um estágio de *point-of-care*, para serem relevantes para auxiliar o médico nas suas decisões terapêuticas.

Conforme a Funasa (2001), o diagnóstico para escorpionismo ainda ocorre sob a análise do quadro clínico do paciente, não havendo um método de detecção específico e rápido para tal finalidade. A suspeita do diagnóstico de escorpionismo é independente do histórico da picada, o encontro de sinais e sintomas correlacionando com alguns exames complementares (eletrocardiograma, radiografia torácica, glicemia e tomografia cerebral) são exigidos quando em casos mais graves.

A classificação clínica dos acidentes escorpiônicos está descrita na literatura abundantemente, Segundo o Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos escrito pelo Ministério de Saúde (2009), essa classificação é dívida entre casos leves, moderados ou graves (tabela 2). É através dessa classificação correlacionada com a sintomatologia que no atendimento de saúde é realizada a prescrição do tratamento adequado.

3.1.5 Epidemiologia

A epidemiologia é uma ciência essencial com enfoque de mensurar a distribuição e fatores relacionados com as enfermidades, através da qual se pode alinhar ações de prevenção, controle e erradicação de doenças. A epidemiologia é considerada uma das principais ferramentas para administração e planejamento enquanto saúde pública (ROUQUAYROL, 1993).

Tabela 1 - Exemplos de Compostos de Venenos de Escorpião *Tityus*

Composição	Exemplos	Espécimes	Peso Molecular (kDa)	Ação no Organismo
Neurotoxinas	Ts3, Ts5	<i>Tityus serrulatus</i>	~6,0-70	Ação nos canais de Na ⁺
	Tbtx5, Tb3	<i>Tityus bahiensis</i>		
	Ts1	<i>Tityus serrulatus</i>	6890.9	
	Ts6, Ts7	<i>Tityus serrulatus</i>	~6.0-7.0	Ação nos canais de K ⁺
Agente Hipotensor	Hipotensão	<i>Tityus serrulatus</i>	2.75	Agonista do receptor B (2)
Proteinases	Metaloproteinase	<i>Tityus serrulatus</i>	~25.0	Lise da Membrana Basal Celular
	Serina Proteinase	<i>Tityus serrulatus</i> e <i>Tityus bahiensis</i>		Ação nos fatores de coagulação
Enzimas	Fosfolipase	<i>Tityus serrulatus</i> <i>Tityus stigmurus</i>		Hidrolise da Membrana Fosfolipídica
	Hialuronidase	<i>Tityus.</i>	~50.0	Catalisa a Hidrólise do hialuronano da Matriz extracelular

Fonte: Cordeiro e Colaboradores (2015), adaptado

Para mensurar a prevalência e incidência de notificações e acidentes escorpiônicos, os dados epidemiológicos são de extrema importância. Segundo o sistema de notificações do Ministério da Saúde, os acidentes escorpiônicos vêm crescendo durante os anos. Em 2009, foram cerca de 50 mil casos notificados, Já em 2019, foram cerca de 150 mil em todo o país, um aumento perigoso. As faixas etárias com maiores prevalências de notificação de acidentes está entre 15 e 39 anos (figura 4). Porém, no mesmo período existe um expressivo aumento nas faixas etárias mais vulneráveis aos acidentes as crianças (1-14) e os idosos(65-80).

Tabela 2- Classificação do acidente escorpiônico quanto à gravidade e manifestações clínicas

Classificação	Manifestações Clínicas	Tratamento Específico
Leve ¹	Somente sintomatologia local: dor e parestesia locais. Taquicardia, agitação e vômito.	-----
Moderado	Apresenta forte dor local, ligada a um ou mais sintomas clínicos como: náuseas, vômitos, sudorese e sialorreia discretos, agitação, taquipneia e taquicardia.	2 a 3 ampolas de SAEsc ² ou SAA ³ , por via endovenosa
Grave	Apresenta sinais clínicos de alto volume como vômitos, sudorese, sialorreia, palidez, prostração, agitação alternada com sonolência, hipotermia, convulsões, coma, taqui ou bradicardia, taquipneia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque cardiogênico.	4 a 6 ampolas de SAEsc ou SAA, por via endovenosa.

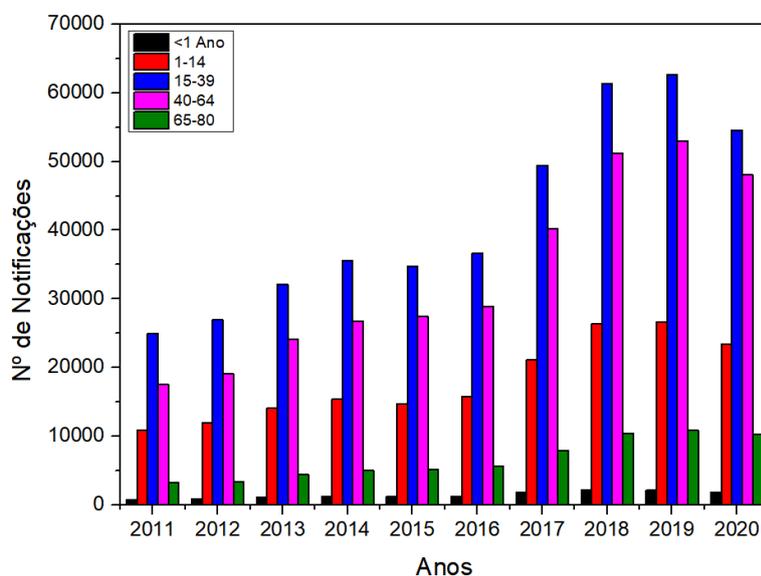
1: tempo de observação das crianças picadas: 6 a 12 horas.

2. SAEsc: soro antiescorpiônico.

3. SAA: soro antiaracnídico (*Phoneutria*, *Loxosceles* e *Tityus*).

Fonte: Adaptado de Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos

Figura 4 - Notificações de acidentes escorpiônicos no Brasil de 2011 a 2020 por faixa etária

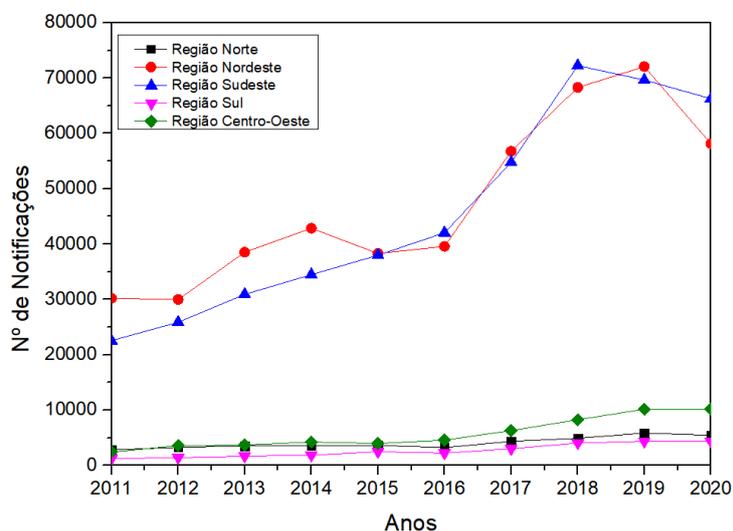


Fonte: SINAN - Ministério da Saúde/SVS

Quando são relacionadas as notificações com as regiões do país (figura 5), nota-se de acordo com dados do Ministério da Saúde que há duas regiões especialmente relevantes: a nordeste e a sudeste, com cerca de 70.000 notificações

no ano 2019. De acordo com Lourenço e Eickstedt (2009), destaca-se a distribuição geográfica do *Tityus serrulatus* nas duas regiões corroborando o maior número de notificações, sendo esse animal o mais expressivo em acidentes. Um índice epidemiológico observado pelo Ministério da Saúde com grande relevância para o desenvolvimento de métodos diagnóstico é, também, a relação da classificação clínica do acidente notificado com a faixa etária. Esses dados são necessários porque nas faixas etárias menores é onde há os maiores índices de gravidade. Horta e colaboradores (2007) mostraram no seu trabalho a preocupação com essa faixa etária, pois os indivíduos na faixa etária menor que 1 ano de idade, não possuem o poder de comunicação ou de identificação dos animais, tais características intensificam a gravidade, porque a falta do relato do ataque do animal e sua identificação correta dificulta o diagnóstico, causando uma demora, conseqüentemente a disseminação do veneno ocorre mais efetiva nesses indivíduos, devido a estatura e seu sistema imunológico está em processo de desenvolvimento, podendo gerar sequelas ou óbitos.

Figura 5 - Notificações de acidentes escorpiônicos no Brasil de 2011 a 2020 por região geográfica



Fonte: SINAN - Ministério da Saúde/SVS

Outro fator que deve também ser considerado é o número de óbitos (figura 6), pois nele se pode encontrar o índice de mortalidade dos acidentes. Destacam-se os óbitos por região geográfica, pois é possível relacionar tais aumentos com a urbanização e a adaptação do animal a essas áreas. Nunes e colaboradores (2000)

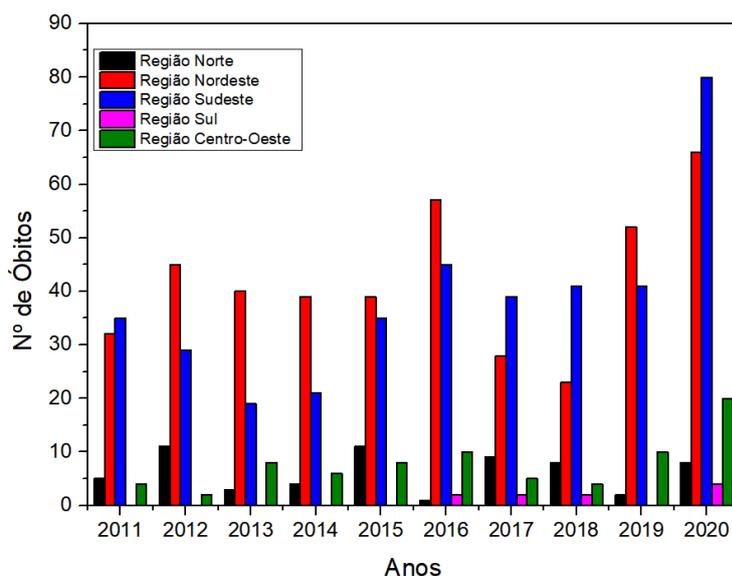
acreditam que as modificações do ambiente natural pelo desmatamento e os diferentes usos do solo urbano pelo homem causam as modificações na cadeia alimentar e no hábitat dos escorpiões, implicando no aumento do índice de notificações em regiões urbanizadas como a Sudeste.

Tabela 3 - Distribuição de casos de escorpionismo segundo a faixa etária e a classificação do acidente notificado no Sistema de Informação de Agravos de Notificação no Brasil de 2011 a 2021

	Ignorado/ Branco	Leve	Moderado	Grave	Total
<1 Ano	815	11722	1551	358	14446
1-4	2078	38135	7747	2431	50391
5-9	2569	51385	7411	1842	63207
10-14	2683	60895	56896	881	70155
15-19	3401	76087	5033	498	85019
20-39	13672	305476	21211	1714	342073
40-59	10896	259327	17758	1498	289479
60-64	1887	48142	3510	273	53812
65-69	1453	36927	2727	263	41370
70-79	1724	43726	3568	301	49319
80 e +	543	15946	1501	160	18150

Fonte: SINAN - Ministério da Saúde/SVS

Figura 6 - Notificações de óbitos por acidentes escorpiônicos no Brasil de 2011 a 2020 por região geográfica



Fonte: SINAN - Ministério da Saúde/SVS

4 BIOSSENSORES

4.1 Contextualização

Uns dos primeiros autores a conceituarem os biossensores, foram Free e Free (1953), considerados os pioneiros nos procedimentos com a implementação de tiras enzimáticas. Todavia, o experimento apresentou algumas falhas, com isso Clark e Lyons (1962) buscaram inovar e, por um experimento utilizando glicose oxidase funcionalizada na superfície de um sensor de oxigênio, foi mensurada a queda nas concentrações de oxigênio proporcionalmente à de glicose. Tal artigo foi o primeiro a especificar o termo “eletrodo enzimático”. Hicks & Updike (1966) resolveram as falhas necessárias para a construção do sensor sensível à glicose. O sensor foi a base de uma grande diversidade de desenhos iniciais para outras enzimas serem imobilizadas.

Arnold e Rechnitz (1987) demonstraram que um sensor era uma ferramenta que traduzia a informação química, que se diferenciava com o gradiente da concentração da amostra a ser investigada, em um sinal analiticamente quantificável. Os sensores químicos apresentam elementos básicos: um receptor de reconhecimento e um transdutor. Conceitos como de Chaubey e Malhotra (2002) os biossensores (figura 7) são dispositivos com biomoléculas imobilizadas, os mesmos possuem um transdutor que emite um sinal de resposta da interação dessas biomoléculas com o analito específicos.

Os biossensores são multidisciplinares, sendo assim, existe uma diversidade de conceitos e delineamentos. De forma geral, são dispositivos de detecção que agrupam tanto um organismo vivo ou produtos derivados de biomoléculas como DNA, anticorpos, enzimas, dentre outras, como um transdutor que emite um sinal de reconhecimento de uma substância específica no ambiente (PATACAS, 2007).

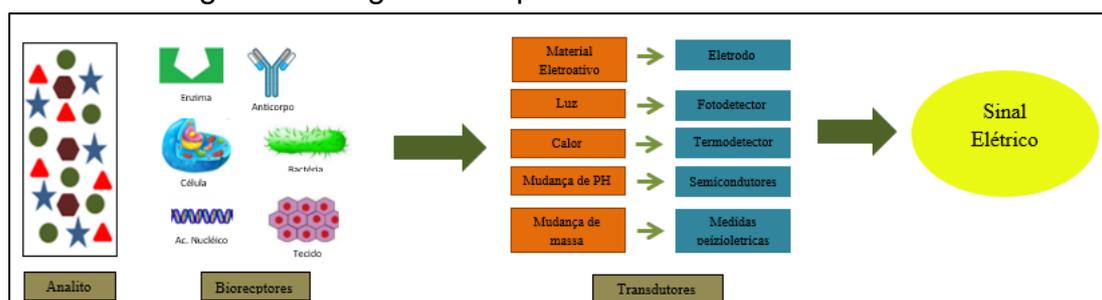
As bases literárias abrigam uma grande diversidade de dispositivos que exploram os receptores celulares em combinação com transdutores acústicos, calorimétricos, eletroquímicos e ópticos, os sistemas de transdução. As mudanças conformacionais observadas no material biológico e/ou no sistema de transdução permitem o desenvolvimento de biossensores (SILVA, 2011).

Zuh e seus colaboradores (2018) definem biossensores como dispositivos para converterem um sinal físico de entrada para um de saída relacionado à sua funcionalidade, geralmente na forma de um sinal elétrico ou óptico que pode ser lido ou detectado por usuários humanos ou por instrumentos eletrônicos. As interfaces associadas a esses sensores são usadas para detectar ou mensurar diferentes propriedades físicas e químicas, incluindo temperatura, pH, força, odor, pressão, presença de produtos químicos especiais, fluxo, posição, intensidade da luz, etc.

Os biossensores têm um conjunto de características essenciais para seu funcionamento. Bhalla e colaboradores (2016) descreveram cinco das principais:

- **Seletividade:** uma das características mais relevantes do biossensor. A seletividade é a capacidade um bioreceptor reconhecer seu analito alvo em uma solução com outros contaminantes;
- **Reprodutibilidade:** essa característica permite observar em caráter experimental a capacidade do biossensor de gerar respostas idênticas para uma configuração duplicada. A reprodutibilidade é dada pela precisão e exatidão do transdutor e da eletrônica de um biossensor. Precisão é a capacidade do sensor de fornecer resultados semelhantes e a exatidão implica na capacidade do fornecimento do valor médio próximo ao valor real quando uma amostra é medida mais de uma vez;

Figura 7 - Diagrama Esquemático de um Biossensor



Fonte: Ensafi, 2019 (Adaptação)

- **Estabilidade:** essa característica permite mensurar a suscetibilidade a distúrbios ambientais dentro e ao redor do sistema de biossensibilidade. Esses distúrbios podem causar desvio na resposta dada pelo biossensor causando um erro na concentração medida e pode afetar diretamente a precisão e exatidão. A estabilidade é a particularidade mais crucial em aplicações quando se requer etapas

de incubação longas ou monitoramento contínuo. Outro fator que pode influenciar a estabilidade é a afinidade do bioreceptor e sua degradação;

- **Sensibilidade:** a quantidade mínima de analito que pode ser detectada define seu limite de detecção ou sensibilidade. Em procedimentos médicos e ambientais é necessário o uso de biossensores para detecção de analitos com concentração muito baixa como nanogramas ou picogramas. Isso faz da sensibilidade uma característica essencial para os biossensores;

- **Linearidade:** é a característica que permite mensurar a precisão da resposta medida (para um conjunto de medidas de diferentes concentrações). A linearidade do sensor pode ser associada com a resolução do mesmo e as faixas de concentrações do analito testado. A resolução de um biossensor é definida como a menor alteração na concentração de um analito necessário para gerar uma alteração na resposta.

A classificação dos biossensores é segundo o transdutor utilizado para se obter o sinal de resposta, assim os mesmos podem ser eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos, calorimétricos, e transístores de efeito de campo (CHAUBEY e MALHOTRA, 2002).

De acordo Dai e Liu (2019), biossensores eletroquímicos quantificam a concentração de analitos medindo a corrente ou a impedância por vários métodos eletroquímicos. Conforme Daniels e Pourmand (2007), existe uma variedade de vantagens para utilização desses dispositivos, destacando: a rapidez e simplicidade do método, a aplicação em moléculas apolares, que apresentam certas dificuldades de respostas em outras tecnologias, o baixo custo e a possibilidade do uso de instrumentação de pequenas dimensões. Segundo Kim e colaboradores (2019), a área de biossensores aumentou continuamente, tornando-se uma das interdisciplinares mais importantes, com aplicações que vão da medicina ao monitoramento ambiental, à análise de alimentos e ao controle on-line em processos industriais, tornando-se um potencial produto inovador dentro dos parâmetros de tradução do sinal e o processo de imobilização do analito.

4.2 Imunossensores eletroquímicos

Diferentes autores vêm discutindo sobre o uso de imunossensores. De acordo com Prodromidis (2010), o desenvolvimento de métodos que utilizam a interação anticorpos-antígenos é altamente atraente para as pesquisas que abordam conceitos de afinidades entre moléculas sem rótulos. Dentre as muitos imunossensores, um que vem ganhando espaço são os eletroquímicos, os quais, segundo o autor, permitem o monitoramento direto dessa interação, as características de baixo custo de produção e a capacidade de miniaturização, faz dessa categoria de biossensores um sistema integrado em diagnósticos de monitoramento remoto.

Morgan e seus colaboradores (1996) conceituaram um imunossensor como um dispositivo que compreende um antígeno ou espécies de anticorpos acoplados a um transdutor de sinal, que detecta vinculação das espécies complementares.

Furtado (2008) conceituou imunossensores como sensores cuja detecção do analito de interesse é baseada em ligações específicas entre antígenos e anticorpos, que têm demonstrado vantagens no custo das análises, sendo menor em relação aos *kits* comerciais.

Para Cristea e colaboradores (2015), os imunossensores são dispositivos em que a reação antígeno-anticorpo ocorrida na superfície do sensor, é a resposta observada com a técnica de eletroquímica pelo transdutor, como consequência obteve-se os imunossensores eletroquímicos com uma das classes mais importantes de biossensores de afinidade.

A simplificação do processo de detecção, a redução de tempo de análise e a maior sensibilidade são uns dos gargalos para a construção de um imunossensor. Dentre as técnicas de detecção final, a eletroquímica e a óptica trazem os dados mais confiáveis e de qualidade. Essas duas formas têm sido utilizadas para detecção de antígenos como citocinas, enzimas e outras substâncias, porém o método óptico requer equipamentos de alta complexidade, por isso o uso da técnica eletroquímica vem crescendo, pois fornece resultados com um processo de fácil execução (KONGSUPHOL et al., 2014).

Com isso, o mercado e várias áreas, principalmente a da saúde, vêm despertando o interesse em métodos analíticos, rápidos e de baixo custo para a detecção de amostras. Com isso, houve um crescimento no desenvolvimento de

sensores como os potenciométricos, amperométricos e voltamétricos no meio científico (ALFAYA & KUBOTA, 2002). O desenvolvimento dos eletrodos impressos (*screen-printed electrodes*) possibilitou a miniaturização dos eletrodos, aliando ao sistema a redução dos custos, facilidade de manipulação e necessidade de baixo volume de amostra para análise (PUMERA et al., 2007).

Segundo Thévenot e seus colaboradores (2001), um sensor amperométrico é a medida de uma corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas, ocorrendo em um potencial determinado onde a corrente gerada está relacionada com a espécie da solução.

As medidas são obtidas *in situ* e em tempo real e, mesmo não sendo tão precisas e exatas como às obtidas por outros métodos instrumentais, para uma tomada de decisão pode ser suficiente (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006). Corroborando com isso, Gopinath e seus colaboradores (2014), argumentam que os imunossensores têm como principal objetivo gerar produtos de caráter inovativo para utilização como *point-of-care testing* (POCT) que permitem diagnosticar doenças ou substâncias tóxicas por um dispositivo portátil que possa ser levado ao lugar onde o indivíduo necessita, da cabeceira da sua cama a um lugar bem distante.

Os procedimentos analíticos necessitam de equipamentos complexos e pessoal especializado, no entanto, a busca por ensaios rápidos e de fácil aplicação tem sido cada vez maior. Sensores químicos são dispositivos com características que satisfazem essa necessidade e têm sido elementos essenciais na instrumentação analítica, onde se dispensa o uso de aparelhos complexos e uma grande infraestrutura (ALFAYA & KUBOTA, 2002).

A eletroquímica estuda os sistemas capazes de gerar corrente elétrica a partir de reações de oxirredução ou sistemas nos quais a oxirredução ocorre pela passagem de uma corrente elétrica (eletrólise). Um sistema eletroquímico é composto por, no mínimo, dois eletrodos (condutores eletrônicos) separados por um eletrólito (condutor iônico) (TICIANELLI & GONZALEZ, 2005).

Desde a última década, a técnica eletroquímica mais utilizada para gerar resultados com os imunossensores foi a EIE, pois as várias categorias de interações biomoleculares proporcionaram relevantes expectativas no meio científico (DANIELS & POURMAND, 2007). A EIE é uma técnica eletroquímica utilizada para

caracterização de superfícies de eletrodos em diversos campos como energia, eletrocatalise, medicina e analítica.

Fundamentalmente, a EIE consiste na aplicação de uma pequena onda senoidal de potencial (ou corrente) numa faixa de frequência determinada, a resposta em corrente (ou tensão) é registrada, e a partir da razão entre os módulos de tensão e corrente e da defasagem entre sinal aplicado e sinal de resposta é determinada uma função complexa Z , a impedância, que depende da frequência (BARSOUKOV & MACDONALD, 2018). Os dispositivos imunossensores estão entre os sensores vitais para requisitos biomédicos, pois eles apresentam alta condutividade (KUMAR, et al., 2019).

5 BIOPOLÍMEROS

5.1 Contextualização

Nas últimas décadas, a pesquisa e o desenvolvimento de biossensores aumentaram exponencialmente financeiramente e cientificamente, levando a um grande aumento em publicações. Os biossensores podem interagir com os ambientes físicos, químicos e biológicos. Visto isso, o que vem ganhando grande visibilidade dentro desse meio são os polímeros naturais por estarem ligados a algumas necessidades dos biossensores (ADHIKARI & MAJUMDAR, 2004).

De acordo com Maia e colaboradores (2000), as variedades de aplicações de polímeros vêm sendo pesquisadas com base nas seguintes propriedades: condutividade do polímero ou de uma blenda do mesmo, nas suas propriedades eletroquímicas como oxidação e redução e em suas morfologia e microestrutura. Corroborando, Medeiros e colaboradores (2012) descreveram os polímeros como conjugados formados por uma cadeia principal contendo ligações simples e duplas alternadas, onde essa conformação fornece uma estrutura orbital estendida. Franchetti e Marconato (2006) descreveram os polímeros pela sua estrutura de cadeia de macromoléculas repetitivas interligadas covalentemente e possuindo alta massa molecular, podendo ou não ter estruturas tridimensionais, ou até mesmo cadeias lineares, essa diversidade estrutural diferencia os polímeros de sintéticos e naturais.

Entre os polímeros naturais existentes, a quitina e a quitosana vêm sendo as mais utilizadas cientificamente devido às suas boas propriedades para o uso em imobilização de anticorpos para aplicação em biossensores. São polímeros de fácil disponibilidade, pois são encontrados em abundância na natureza, o que diminui os custos, e por suas características peculiares como a biocompatibilidade, baixa toxicidade, boas propriedades físico-químicas e facilidade de serem processados de várias formas como membranas, filmes, esferas, entre outras (NARANG & PUNDIR, 2011).

5.2 Quitina e Quitosana

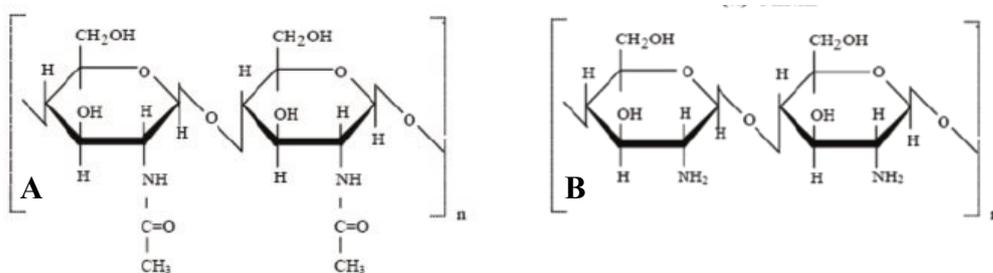
A quitina foi descoberta em 1811 como uma substância presente em cogumelos, sendo altamente distribuída especialmente no reino animal e também em animais menos evoluídos como os protozoários (RUIZ-HERRERA, 1978). As concentrações mais altas de quitinas são encontradas em Artrópodes cerca de 85% dos animais são capazes de sintetizar quitina. As cascas de Gastrópode e Lamelibrânquia, no entanto, contêm apenas pequenas quantidades de quitina. Todos os anos, cerca de 100 bilhões de toneladas de quitina são produzidas por crustáceos, moluscos, insetos e fungos. Quitina é a biomassa mais explorada de recurso renovável disponível na Terra (THARANATHAN & KITTUR, 2012).

De acordo com Canella e Garcia (2001), a quitina é um biopolímero linear com unidade monomérica β -D-(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, é insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos e álcalis, é precursora da quitosana e é o segundo biopolímero mais abundante encontrado na natureza depois da celulose. A quitina existe no ambiente em três formas diferentes, distinguidas conforme o posicionamento das cadeias que constituem o polímero, onde podem assumir três conformações polifórmicas (α , β e γ) dependendo de suas estruturas cristalinas (JAWORSKA et. al, 2003). Proveniente da desacetilação da quitina, a quitosana vem sendo um biopolímero empregado para aplicações biomédicas, por ser um material alta biocompatibilidade, biodegradável, antigênico e pela não adsorção de proteínas de acordo com Peter e colaboradores (2010). Sagnella e Mai-ngam (2005) citam as propriedades físicas, químicas e mecânicas da quitosana a torna um insumo no meio

tecnológico nas aplicações farmacêuticas e biomédicas como hemodiálise, pele artificial, curativos e sistema de entregas de fármacos.

A quitina e a quitosana (figura 8) são polissacarídeos que estão despertando interesse em diversas áreas desde a científica às tecnológicas, utilizando os ativos como materiais poliméricos funcionais, por serem polímeros biocompatíveis, atóxicos, biodegradáveis e biorrenováveis, tendo uma diversidade de aplicações em grandes áreas como a agricultura, a farmacêutica, a biomédica, a bioengenharia dentre outras (TONHI & PLEPIS, 2002).

Figura 8 - Estrutura química da quitina (A) e quitosana (copolímero) (B)



Fonte: TÂNASE, et al., 2014

A quitosana com sua estrutura molecular, com grande número de grupos funcionais como amino e hidroxilas primárias e secundárias disponíveis, é considerada ideal para utilização no suporte de imobilização de anticorpo, no processo funcionalização. (OLIVEIRA & VIEIRA, 2006).

Nos últimos 40 anos, o interesse comercial nas aplicações de quitosana e derivados aumentou vertiginosamente nas últimas quatro décadas, o que pode ser constatado pelo depósito de patentes no Japão, Europa, China, Coreia e, principalmente, nos EUA (USPTO, 2020).

6 INOVAÇÃO

6.1 Contextualização

O conceito de inovação vem sendo esboçado diferentemente por alguns autores. Schumpeter (1988) afirmou que para existir inovação existe a necessidade de uma transação financeira gerando lucros envolvendo a invenção. No mesmo ano, Dosi (1988) propôs que a inovação está essencialmente ligada à descoberta de novos produtos, novos processos e novos arranjos organizacionais. Higgins (1995) descreveu inovação como o desenvolvimento, adaptação e geração de um novo comportamento de uma corporação. Rogers (1995) definiu inovação como uma ideia ou objetivo novo compreendido por um indivíduo. Curmming (1998) conceituou inovação como a inserção bem-sucedida no mercado de um novo produto ou processo.

Conceitos como o de Hashimoto (2006) mostrou a inovação como a mudança, sendo ela grande ou pequena, que conseqüentemente traz uma transformação e uma quebra de paradigmas que permitam entender e visualizar o tradicional como passível de mudanças positivas e melhorias. Para Rosa e colaboradores (2013), a inovação está relacionada com a criatividade e como fazemos uso dela, utilizando a mesma para desenvolver conhecimento e habilidades, gerando uma mudança que altere o estado do produto, serviço, processo, ou ainda, na criação de um novo mercado não explorado. Rocha (2017) em sua definição de inovação por um viés também econômico, que inovação pode ser entendida como um processo social que parte ou se cria das necessidades humanas, possui legitimação social e resulta em algo novo, útil, viável, sustentável e/ou lucrativo. Niosi e McKelvey (2018) conceituaram a inovação como um processo em que a aplicação científica e industrial do conhecimento tecnológico alimenta novas rotinas e instituições, de modo a relacionar as inovações em mudança do modelo de negócios às cascatas da inovação.

Conforme o Manual de Oslo (2005), existe uma classificação de diferentes tipos de inovação, dentre elas a inovação de produto, a inovação de processo, a inovação organizacional e a inovação em marketing (Figura 9).

Figura 9 - Classificação dos Tipos de Inovação

Tipo	Objeto	Exemplos
Inovação de produto	Introdução de um bem ou serviço novo ou significativamente melhorado no que tange a suas características ou usos previstos.	Melhoramentos significativos em especificações técnicas, componentes e materiais, softwares incorporados, facilidade de uso ou outras características funcionais.
Inovação de processo	Inserção de um método de produção ou distribuição novo ou significativamente melhorado.	Mudanças significativas em técnicas, equipamentos e/ou softwares.
Inovação de marketing	Implementação de um novo método de marketing com mudanças significativas na concepção do produto ou em sua embalagem, no posicionamento do produto, em sua promoção ou na fixação de preços.	Mudanças substanciais no design do produto, variedade de produtos, novos canais de vendas, constituição de um novo conceito de marketing.
Inovação organizacional	Adoção de um novo método organizacional nas práticas de negócios da empresa, na organização do seu local de trabalho ou em suas relações externas.	Novos métodos para a organização de rotinas e procedimentos para a condução do trabalho.

Fonte: Manual de Oslo, 2005

A eficácia da inovação está atrelada à sua simplicidade, caso contrário poderia ser confuso ou a tornaria inútil. O processo de inovar é sistemático, pois é uma busca organizada de mudanças e oportunidades que geram uma inovação econômica e social (BHUPENDRA & SANGLE, 2015).

A inovação de produtos é uma estratégia para empresas que estão começando ou expandindo seu portfólio, onde as mesmas apresentam originalidade, singularidade referente a inovações de produtos. Portanto, a novidade é contabilizada sob duas perspectivas: a do consumidor e a da empresa (SANTOS, PERIN, & SAMPAIO, 2018). A singularidade desses conceitos direciona o método diagnóstico para acidentes escorpiônicos como uma inovação de produto. Nesse contexto, destaca-se a utilidade do produto ao consumidor, que é um dos fatores essenciais para a inovação de produto (SOUZA, DELAZARI, & SEVERO, 2017).

A inovação de processo representa também uma oportunidade para o desenvolvimento de novas tecnologias, conforme o Manual de Oslo (2005), essa categoria de inovação foi conceituada como a implementação de um novo método com mudanças expressivas na forma de produção, sendo essas nas técnicas, equipamentos e/ou *softwares*, gerando uma redução nos gastos e um aumento na qualidade. Kahn (2018) caracterizou a inovação em processo como um ciclo com três princípios: o descobrir, o desenvolver e o entregar. Cada fase desse processo envolve pesquisa experimental, mercadológica e aplicabilidade.

6.2 Inovação em Biotecnologia

A biotecnologia inclui uma série de disciplinas científicas, bem como conhecimento tecnológico aplicado em diferentes setores. As definições incluem aspectos centrais das disciplinas científicas subjacentes que podem ser aplicadas em muitos setores (MCKELVEY & ORSENIGO, 2006). Para Jesus-Filho e colaboradores (2016), a biotecnologia é uma inovação tecnológica que está revolucionando setores distintos da economia, já que fornece novos processos, produtos e serviços mais eficientes. No entanto, para ocorrer inovação, consubstanciada em novos produtos e processos é necessário algo que transcenda o nível de pesquisa nas universidades e centros de pesquisas. Bianchi (2016) definiu biotecnologia em relação à saúde como um corpo de conhecimento e um conjunto abrangente de procedimentos e tecnologias que analisa os atributos das células permitindo que as moléculas de DNA e proteínas possam criar ou modificar produtos ou processos para usos específicos com várias aplicações. O autor também argumentou que mesmo usando uma definição geral de biotecnologia, não existe uma definição evidente da biotecnologia no setor da saúde, devido à variedade de sistemas biotecnológicos, técnicas químicas e de bioinformática introduzidos nas indústrias relacionadas com saúde.

Segundo Felipe (2007), gerar uma inovação no meio biotecnológico não é fácil, demanda vencer alguns obstáculos como o modelo regulatório, captar o investimento público e privado, contar com pessoal qualificado com foco na inovação, gestão, propriedade intelectual voltado para as necessidades da bioindústria e em parceria com o setor empresarial público e privado; buscar uma estrutura empresarial produtiva na forma de uma pirâmide em que existam grandes empresas líderes na área que alimentem e viabilizem a existência de médias e pequenas empresas; e identificar o potencial do mercado brasileiro atraente para o campo. O Brasil tem uma pequena, mas significativa, quantidade de empresas dedicadas à biotecnologia na saúde humana bem como uma grande acumulação de capacidades científicas nesse campo (TORRES FREIRE 2014). De acordo com Bianchi (2016), no período de 2004 a 2014, o Brasil se destacou nos ramos da inovação e políticas produtivas especialmente na importância estratégica das biotecnologias como um instrumento para lidar com os desafios nacionais de saúde, bem como para promover novos conhecimentos e atividades.

A biotecnologia avança em paralelo aos avanços na área de Biologia Molecular, que permite a interação e construção com biomoléculas tão complexas como DNA, enzimas, proteínas, dentre outras que demonstram ser ferramentas valiosas no desenvolvimento de tecnologias diagnósticas, principalmente em casos de doenças que necessitam de uma resposta rápida e confiável. Entretanto, deve-se considerar a complexidade das amostras biológicas, os diferentes níveis moleculares de algumas proteínas e interferentes encontrados são fatores imprescindíveis para a eficácia de uma inovação no ambiente médico (SEZGINTURK, 2011).

Segundo Gartland e Gartland (2018), as estratégias de biotecnologia devem considerar as oportunidades de pesquisa, inovação e o crescimento do negócio, considerando o progresso recente em áreas como genômica, diagnóstico em saúde, biologia sintética, edição de genes e tecnologias bi-digitais. As oportunidades de pesquisa são discutidas como investimentos inteligentes, estratégicos e especializados. Essas oportunidades geralmente envolvem tecnologias convergentes ou disruptivas, combinando, por exemplo, elementos da ciência farmacêutica, biologia molecular, bioinformática e desenvolvimento de novos dispositivos para aprimorar a biotecnologia e as ciências da vida.

Conforme Natoli e colaboradores (2018), avanços recentes na biotecnologia permitiram o desenvolvimento de testes de diagnóstico sensíveis e específicos que detectam e quantificam células, proteínas e ácidos nucleicos. Tais testes são considerados como uma inovação importante no ambiente médico, considerados POCT, os mesmos fornecem benefícios aos cuidados de saúde, especialmente no diagnóstico e detecção de doenças. Verificou-se que os dispositivos POCT têm muitas vantagens, como resposta rápida e precisa, portabilidade, baixo custo e não exigência de equipamentos especializados.

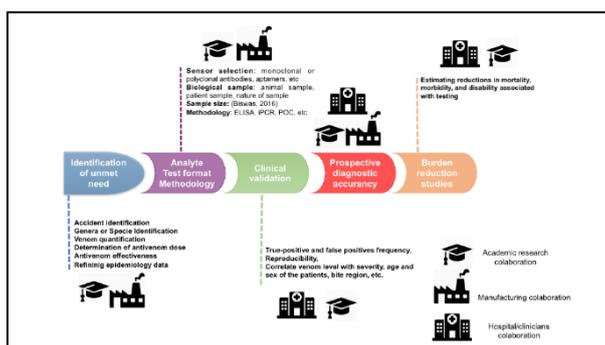
O principal objetivo de uma pesquisa de diagnóstico POCT é desenvolver um dispositivo miniaturizado autocontido e baseado em chip que possa ser usado para examinar diferentes analitos em amostras complexas, sendo assim uma inovação biotecnológica destinada à saúde (PANDEY, et al., 2017). O desenvolvimento de testes rápidos é relevante para o ambiente médico, pois os métodos moleculares atuais estão limitados ao uso de equipamentos de alto custo, volumosos, associados a demorados processos e operadores qualificados. Tais limitações dentro de um

ambiente clínico implicam na busca por ferramentas econômicas e quantitativas que possam ser implementadas nas rotinas clínicas (CAMPUZANO et al., 2018).

Neste contexto, a biotecnologia voltada para o desenvolvimento de dispositivos de POCT com a utilização de biossensores vem despertando grande interesse, pois relacionam o reconhecimento de moléculas biológicas com alta sensibilidade, rapidez, menor volume de amostra, pouco gasto com energia e compatibilidade com diferentes níveis moleculares (CAMPUZANO et al., 2017).

Para ocorrer a validação do método diagnóstico (figura 10), é preciso que o dispositivo apresente sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, exatidão e limites de detecção. Na revisão de Dias-Lopes e seus colaboradores (2018), apresentou uma breve revisão sobre a construção e validação de métodos diagnósticos visando a biotecnologia para acidentes com animais peçonhentos.

Figura 10 - Roteiro de cinco fases para validação clínica do teste de diagnóstico aracnídeo



Fonte: Dias-Lopes e Colaboradores (2018)

7 METODOLOGIA

7.1 Obtenção e Caracterização dos Anticorpos Antiescorpiônicos

Todo o desenvolvimento técnico do estudo foi realizado na FUNED, no setor de Pesquisa e Desenvolvimento, no Laboratório de Imunologia Aplicada. A purificação foi adaptada da metodologia descrita por Heneine (1995), que consiste no preparo de resinas e a posterior passagem do plasma por elas de modo a obter anticorpos de alta especificidade. Inicialmente, foram confeccionadas três colunas utilizando a resina de Cyanogen bromide-activated Agarose, preparada segundo a metodologia descrita pelo fornecedor Sigma-Aldrich. A resina foi distendida com a utilização da solução de HCl 0,1 M gelada durante 30 minutos, sob agitação constante seguida de centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos a 20°C utilizando a centrífuga refrigerada Sorvall ST40-R Thermo Scientific. A resina passou, então, por um procedimento de lavagem com a mesma água ultra pura por cinco vezes (20 mL), sendo a quinta lavagem realizada com solução de acoplamento. Paralelamente, foi realizado o preparo dos venenos, foram pesados e solubilizados em solução de acoplamento (NaHCO₃ 0,1 M contendo NaCl 0,5 M, pH: 8,3), a cada 1 mL de resina distendida cerca de 5 a 10 mg de veneno, nesse processo é recomendado que não se utilize soluções que tenham aminas na sua composição, pois as mesmas podem reagir com os sítios de ligação da resina.

Com o processo de lavagem realizado, foram adicionados às resinas os venenos ofídicos e aracnídeos. Para a resina de serpente, foram utilizados cerca de 15 mg de cada veneno do *pool* (*Crotalus*, *Bothrops* e *Micrurus*) em uma resina de 5 mL de volume. Para a resina escorpiônica, também 15 mg de veneno de *Tityus serrulatus* foram utilizados para uma resina de 5 mL de volume, porém para a resina aracnídea foi feito também um *pool* de veneno de *Loxosceles similis* e *Phoneutria nigriventer* com 3 mg e 6 mg respectivamente em uma resina de 2,5 mL, devido à quantidade de proteína de acoplamento a resina aracnídea foi menor. As três resinas foram mantidas em agitação por 2 horas, após esse período retirou os venenos não acoplados a resina, através de centrifugação utilizando os mesmos parâmetros anteriores e os sítios não ligados foram bloqueados utilizando uma solução de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 por duas horas. Em seguida, as resinas foram lavadas com um

gradiente de pH utilizando duas soluções de acetato 0,1 M pH 3,5 contendo NaCl 0,5 M e Tris-HCl 0,1 M pH 8,7 contendo NaCl 0,5 M, alternando as duas soluções. Posteriormente, as resinas foram lavadas com água ultra pura e empacotadas em sistema de empacotamento de vidro de 10 mL com auxílio de bomba peristáltica. Após o acoplamento, as três colunas foram guardadas em etanol 20%.

Para a obtenção dos anticorpos escorpiônicos específicos, plasma hiperimune de cavalo cedido pela FUNED, foi diluído 1:1 em solução de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos a 20°C utilizando a centrífuga refrigerada Sorvall ST40-R *Thermo Scientific*, primeiramente realizou a eluição do plasma na coluna ofídica, com o auxílio da bomba peristáltica, com um fluxo de 1 mL/min. A coluna foi lavada com água ultra pura utilizando 5 volumes de resina (totalizando 5 mL). Posteriormente, o mesmo volume de solução Tris-HCl 0,1 M pH 8 foi empregado para equilibrar a coluna e então adsorver o plasma diluído e centrifugado, o plasma foi eluído na coluna 3 vezes para atingir uma saturação de ligação com a mesma, em seguida lavou-se a coluna com 5 volumes de coluna com a mesma solução de equilíbrio para retirar não ligantes e depois realizou a eluição utilizando tampão de glicina 2 M pH 3,0 que permite a quebra da ligação com a proteína de acoplamento, foram utilizados 5 volumes de coluna. O procedimento foi repetido até o plasma coletado não ter mais ligantes cruzados ofídicos. Para a coluna aracnídea, foi realizado o mesmo processo apenas utilizando o volume de coluna de 2,5 mL. Para coluna escorpiônica, realizou-se o mesmo processo, porém o tampão de glicina foi coletado, pois, ele continha o anticorpo específico.

Para a retirada do excesso salino da amostra de anticorpo, a amostra passou por um processo de diálise, com a utilização de membrana de celulose 33 mm da Sigma Aldrich, utilizou-se água ultra pura do sistema Merck Millipore como solução de troca. Tal processo durou 24 horas com trocas periódicas a cada três horas, após, o anticorpo foi acondicionado em tubos próprios para o processo de liofilização.

Os anticorpos purificados foram testados através da técnica de ELISA, método pelo qual se verifica o grau de seletividade e especificidade dos anticorpos obtidos. O protocolo da técnica foi adaptado a partir de Clark e colaboradores (1986). Para a sensibilização da placa de 96 poços, foram utilizados os venenos ofídicos dos gêneros *Crotalus*, *Bothrops* e *Micurus* e venenos aracnídeos das espécies *Loxosceles similis*, *Phoneutria nigriventer* e *Tityus serrulatus* na concentração fixa de 2,5 µg/mL.

Foram adicionados à placa 100 µL de cada veneno utilizando uma linha de 12 poços e a mesma foi incubada *overnight*. Posteriormente, a placa foi lavada utilizando a lavadora de microplacas automática *Wellwash* da *Thermo Scientific*, utilizando o protocolo de 300 µL de solução de lavagem por cada poço repetindo 3 vezes. Esse processo foi repetido durante todo ensaio quando era necessário. Após, foram adicionados 100 µL de solução contendo albumina 1% para bloquear sítios onde o veneno não tenha aderido à placa por 1 hora a 37°C, em seguida a placa foi lavada e 100 µL de anticorpos em diluições seriadas iniciando em 12,5 µg/mL foram adicionados à placa, que foi incubada por uma hora a 37°C. Na sequência, uma nova etapa de lavagem foi conduzida e aos poços foram adicionados 100 µL de anticorpo secundário, um conjugado anti-cavalo na diluição de 1:40.000, que foi incubado por mais uma hora a 37°C. Em seguida, lavou-se a placa e adicionou 80 µL do substrato que confere a reação de cor do ELISA, contendo 10 mg de OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride*) e 4 µL peróxido de hidrogênio 30% solubilizado em solução de citrato de sódio pH 4,5, normalmente a reação e o aparecimento de cor demora cerca de 30 minutos, após este período adicionou-se 40 µL de solução de ácido sulfúrico a 30 % para interromper a reação. Em seguida, a leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro *Multiskan GO* de microplacas no comprimento de onda de 492 nm. Os resultados obtidos foram mapeados utilizando o Origin Lab, todo processo foi realizado em duplicatas.

Contudo, identificar as proteínas com outra metodologia para verificar as reações cruzadas é essencial, para isso utilizou a técnica de *Western Blot*, uma técnica utilizada para separar e identificar proteínas. A ferramenta permite separar as proteínas por massa molecular com a utilização da eletroforese. O protocolo utilizado foi adaptado de Mahamood e Yang (2012), onde iniciou com o preparo do gel *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide* (SDS-PAGE) de 10%, utilizando o sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* da *Bio Rad*, foi adicionado ao gel amostras dos venenos sendo um do *pool* de serpentes, um de cada veneno aracnídeo e um do veneno escorpiônico na concentração de 1 mg/mL e um padrão molecular. Durante o processo de corrida do gel, deixou-se sob agitação e incubando 4 papéis filtro *Whatman* e uma membrana de nitrocelulose cortada do tamanho do gel em solução de transferência. Após o término da corrida, o gel de eletroforese também foi incubado em tampão de transferência por 15 minutos. Para a transferência para a membrana, utilizou o

sistema semisseco Slot de Transferência *Trans-Blot Bio Rad*. O aparelho foi limpo com etanol 70%, o sistema foi montado com 2 folhas de papel filtro, seguido da membrana de nitrocelulose com o gel da eletroforese por fim mais 2 folhas de filtro, retirou-se o excesso de solução e qualquer formação de bolhas. A transferência ocorreu com a aplicação de uma tensão de 15 V por 15 minutos. Após, identificou na membrana de nitrocelulose a posição dos venenos e incubou a mesma em solução de bloqueio contendo leite desnatado 5% *overnight*. Após 24 horas, lavou a membrana com solução de PBS + Tween 20, por 5 vezes e adicionou o anticorpo antiescorpiônico na concentração de 50 µg/mL e foi incubado por 2 horas sob agitação constante. Em seguida, a membrana passou novamente pelo processo de lavagem e adicionou o anticorpo secundário anti-cavalo na diluição de 1: 25.000 incubou-se por 1 hora sob agitação constante. Novamente a membrana foi lavada e foi adicionado o substrato contendo 5 mg DAB (3,3'-Diaminobenzidine) e 40 µL peróxido de hidrogênio solubilizados em solução de TBS (Tris Base 0,2 M + NaCl 1,3 m) com isso observou-se na membrana o aparecimento de bandas proteicas reativas onde pode encontrar ligações cruzadas e inespecificidades do anticorpo purificado.

7.2 Obtenção e Caracterização de Quitosana

A matéria-prima utilizada para extração da quitina e quitosana foram os mexilhões-dourados, os quais foram cedidos pelo Centro de Bioengenharia de Espécies Invasoras de Hidrelétricas (CBEIH), coletados em pontos de bioinfestação.

Para extração de quitina foram utilizadas as conchas do mexilhão empregando um protocolo de extração adaptado de Rasti e colaboradores (2017), que utilizaram conchas de Polyplacophora para a extração da quitina. O processo de obtenção de quitina iniciou com a limpeza das conchas e pulverização utilizando um moinho IKA Analítico básico A11 até a obtenção de um pó fino. Na sequência, procedeu-se com a desmineralização utilizando solução de HCl 1 M, onde para 10 g de pó das conchas se utilizou 100 mL de solução por 24 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 15000 x g por 15 minutos a 25°C, utilizando a centrífuga refrigerada Sorvall ST40-R Thermo Scientific. O pó das conchas desmineralizadas passou por um procedimento de lavagem até atingir a neutralidade e foram secos em estufa a 37°C. Posteriormente, realizou a desproteinização utilizando solução de NaOH 15%, para

cada 10 g de amostra desmineralizada utilizou-se 100 mL de solução, por 6 horas a 70°C após o tempo a amostra foi centrifugada nas mesmas condições do processo anterior, a solução alcalina foi trocada e a amostra foi acondicionada a 70°C e a cada 30 minutos a solução foi trocada, com o acompanhamento da clarificação do sobrenadante, que indica a eficácia do método, ou seja, a extração de todo conteúdo proteico. Em seguida lavou-se a amostra até a neutralidade e secou em estufa a 37°C e obteve a quitina.

Para obter a quitosana, realizou-se um processo químico na quitina de desacetilação onde empregou uma solução de NaOH 45% a 110°C por 6 h, onde a cada 10 g de amostra utilizou-se 100 mL de solução, após a amostra foi centrifugada. O precipitado foi solubilizado em solução de ácido acético 0,5 M por 24 horas, sob agitação, em seguida utilizou o sobrenadante para realizar a precipitação da quitosana, adicionando o peróxido de amônio 30% até atingir o pH 8,0. Por fim, a amostra foi centrifugada e o precipitado foi seco em estufa a 37°C e caracterizado como quitosana.

Para caracterização das amostras obtidas foi utilizado a técnica de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Confeccionou pastilhas contendo KBr em proporção de 1 mg de amostra para 100 mg do reagente. As duas substâncias foram misturadas com auxílio de almofarizes e pistilos de ágata até a mistura se tornar homogênea e com a utilização de moldes evacuáveis e a petelizador GS15011 Specac foram produzidas pastilhas de 3 mm. Os espectros de quitina e quitosana foram obtidos utilizando o seguinte método de quatro varreduras no comprimento de onda de 4000 a 450 cm^{-1} , posteriormente os dados obtidos com os espectros foram analisados usando o *software* ORIGIN 8.0 (Thermo-Nicolet, Madison, WI, EUA).

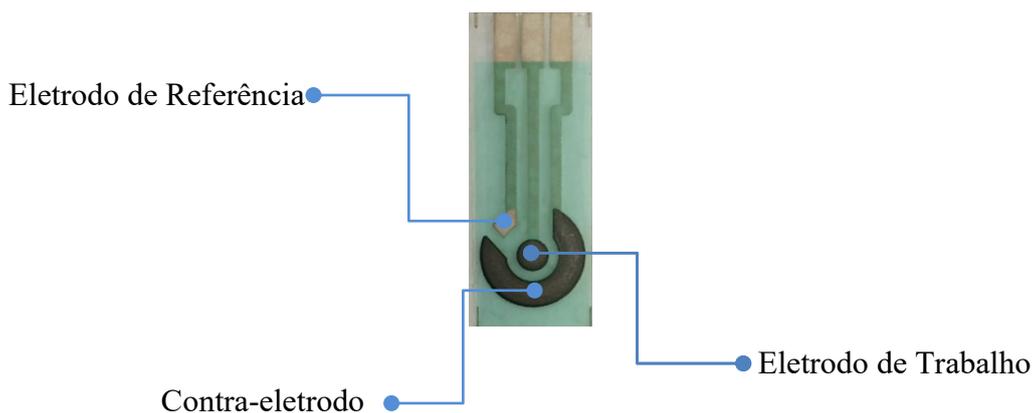
A microscopia eletrônica foi utilizada como método de investigação da topografia das amostras em altas ampliações. As amostras de quitina e quitosana foram acondicionadas em porta amostras de alumínio com a utilização de fita adesiva dupla de carbono de 8 mm, posteriormente as amostras passaram por um procedimento de metalização com ouro, que permite uma maior interação com o feixe de elétrons, pois as mesmas se tornam mais condutivas. Em seguida, a morfologia das amostras foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM6610LV.

7.3 Funcionalização dos Sensores

7.3.1 Eléttodos de Carbono

Os sensores utilizados foram confeccionados à base de tintas de carbono e prata (figura 11), produzidos pela *Startup SmartSensors*, utilizando a técnica de *Screen-Printing*. Para a realização do estudo, foram utilizadas as dependências da FUNED, no setor de pesquisa no laboratório de Imunologia Aplicada. Para fornecer uma matriz de imobilização adequada, as superfícies dos eletrodos podem ser funcionalizadas com diferentes modificadores. Srivastava (2014) caracteriza a funcionalização como a modificação química da superfície, proporcionando condições ótimas para o processo de imobilização de moléculas biológicas.

Figura 7 - Sensor *Screen-Printed* à base de tintas de carbono e prata

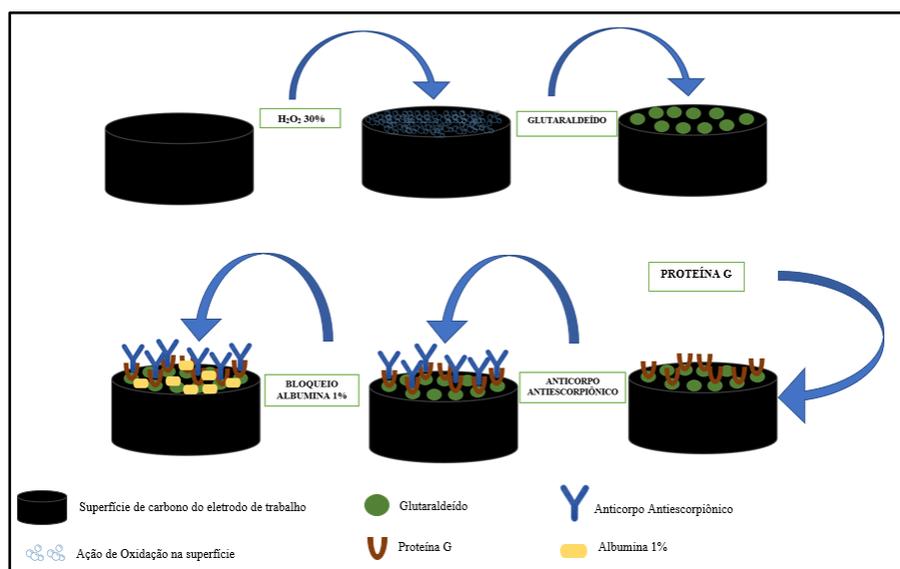


Fonte: autora

Para a funcionalização do eletrodo utilizou-se a técnica de imobilização por ligação covalente conforme a metodologia proposta por Sassolas e colaboradores (2012). A imobilização de um anticorpo por ligações covalentes é basicamente uma reação do mesmo com os grupos amino e carboxílico com a superfície modificada. Tais imobilizações são geralmente classificadas conforme as reações químicas utilizadas. Para a funcionalização da superfície do eletrodo de trabalho, iniciou-se com a limpeza da superfície adicionando 10 μL de peróxido de hidrogênio na concentração de 30% por 10 minutos, observou-se o aparecimento de bolhas. A ação do reagente com a superfície de carbono possibilitou uma oxidação que gerou uma quantidade de

grupos hidroxilas e realizar uma limpeza de resíduos orgânicos, em seguida foi realizado uma lavagem com água ultra pura para retirar o excesso da solução anterior e o eletrodo foi seco utilizando fluxo de nitrogênio. Assim, com a superfície do eletrodo de trabalho limpa, foi realizado a reticulação dos reagentes para a imobilização do anticorpo escorpiônico. inicialmente adicionou 10 μL a solução de glutaraldeído na concentração de 0,5% e incubou por 40 minutos em ambiente úmido. Em seguida, o eletrodo foi lavado delicadamente com água ultra pura para retirada do excesso de glutaraldeído e seco utilizando gás nitrogênio. Então, foram adicionados 10 μL de solução de proteína G a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubou em ambiente úmido por uma hora, logo após o eletrodo passou pelo processo de lavagem, sendo adicionado 10 μL do anticorpo escorpiônico na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e foi incubado por uma hora em ambiente úmido. Em seguida, o eletrodo foi lavado e foi adicionado 10 μL de solução de bloqueio contendo albumina 1%, por 30 minutos (figura 12), após o período o eletrodo foi lavado com água cuidadosamente e seco sob temperatura ambiente. Todo o processo de modificação da superfície do eletro de trabalho foi mapeado utilizando a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, que permitiu mensurar as mudanças conformacionais ocorridas no eletrodo de trabalho a cada adição de reagente.

Figura 8 - Esquema de imobilização de Anticorpo Antiescorpiônico



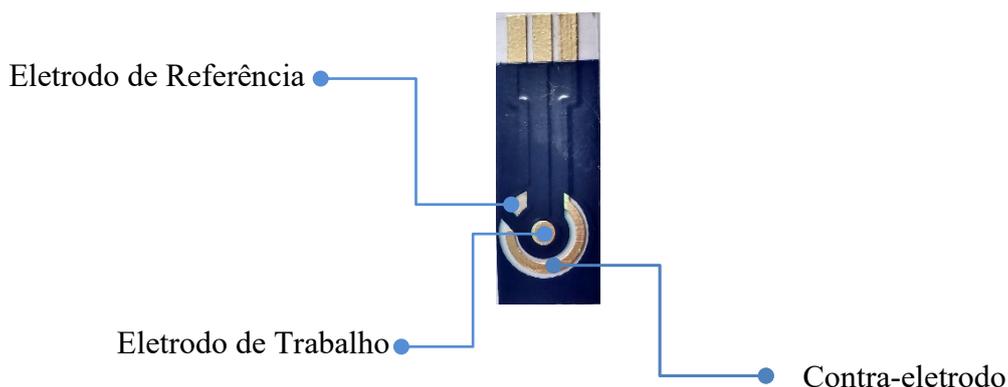
Fonte: Autora

7.3.2 Elétrodos de Ouro

Os sensores de ouro (figura 13) foram produzidos pela *Startup SmartSensors*, utilizando a técnica de *Screen-Printing*. Para a realização do estudo foram utilizadas as dependências da FUNED, no setor de Pesquisa no laboratório de Imunologia Aplicada. Os sensores são constituídos por um sistema de eletrodo de trabalho e contra-eletrodo de ouro e eletrodo de referência à base de tinta de prata.

Para a realização da funcionalização na superfície de ouro utilizou-se a metodologia adaptada de Canbaz e colaboradores (2014) e Farka e colaboradores (2016), onde construiu monocamadas por ligações covalentes (figura 14). O processo de funcionalização do eletrodo de trabalho foi realizado em ambiente úmido. Para a retirada de qualquer resíduo orgânico da superfície do eletrodo de trabalho, o mesmo foi submetido a um tratamento químico utilizando peróxido de hidrogênio na concentração de 30%. Adicionou-se 10 μL da solução por 10 minutos, após o sensor foi lavado constantemente com água ultra pura para retirar o excesso do reagente anterior e foi seco utilizando fluxo de gás nitrogênio. Em seguida ao processo de limpeza, iniciou a imobilização das biomoléculas com a adição de 10 μL de cisteamina na concentração de 100 mM por 2 horas. Após o processo de ligação da cisteamina uma lavagem com água ultra pura foi conduzida para retirar o excesso do reagente. Seguindo a metodologia, adicionou 10 μL de solução de 0,5% de glutaraldeído, por 1 hora. Ao término dessa etapa, novamente o elétrodo foi lavado para retirada do excedente do reagente anterior e adicionou 10 μL do anticorpo escorpiônico na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e incubou por 2 horas. Posteriormente, novamente o eletrodo foi lavado e acrescentou 10 μL de solução de bloqueio contendo albumina 1% por 30 minutos, após o eletrodo foi lavado com água cuidadosamente e seco sob temperatura ambiente, todo esse processo de modificação da superfície do eletrodo de trabalho foi mapeado utilizando a técnica Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

Figura 9 - Sensor *Screen-Printed* à base de tintas de ouro e prata



Fonte: autora

7.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Atualmente, a EIE é utilizada em ampla gama de estudos, abrangendo desde o processo cinético de diferentes naturezas ao estudo de dispositivos semicondutores (CARVALHO et al., 2006).

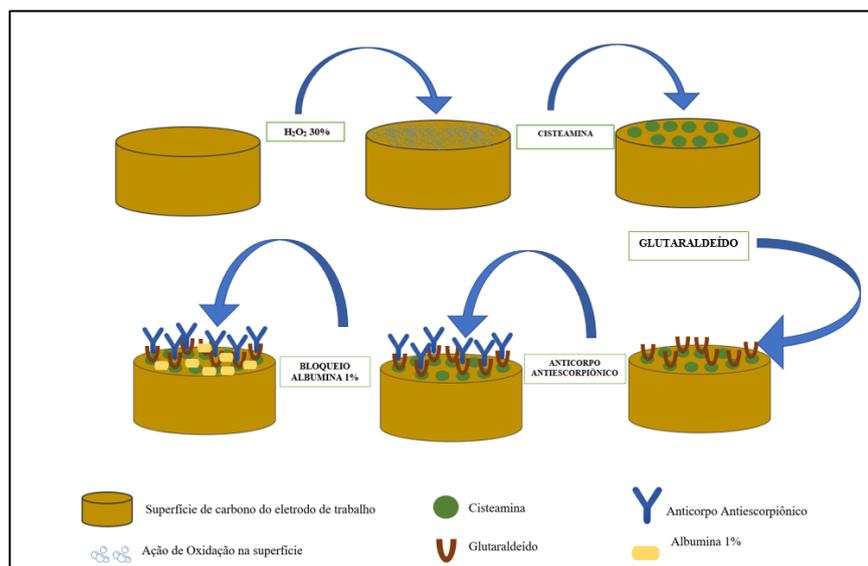
Em particular, a EIE é uma técnica utilizada para caracterização de sistemas eletroquímicos que não se alteram com um dado período, pelo menos naquele necessário para que a medida seja realizada. Segundo Chang e Park (2010), a EIE é uma ferramenta muito relevante em diversos campos de utilização como a cinética de cargas e regiões interfaciais, que foram aplicadas em biossensores eletroquímicos; transferência de carga de condutores iônicos; eletrodos semicondutores, estudo de procedimentos de inibição da corrosão de eletrodos; verificação de revestimento de metais e na diferenciação de dispositivos de estado sólido.

A técnica de EIE foi utilizada para mensurar a linearidade e sensibilidade do dispositivo frente a diferentes concentrações de toxinas de escorpião e analisar a sua especificidade frente a venenos ofídicos e toxinas de aranhas em diferentes concentrações. Os testes foram realizados em soluções tampões.

Para realizar as medições, foi utilizado um potenciostato da PalmSens, o Sensit/smart. Inicialmente foi realizado um mapeamento nas frequências de 0,1 a 1000 Hz para verificação de uma frequência ótima utilizando solução eletrolítica contendo KCl 0,1 M em Fosfato 0,01 M com pH 7,34 onde foram considerados os valores em relação aos limites de detecção, sensibilidade e seletividade para o melhor

diagnóstico, pois é nessa frequência que foi desenvolvido o protótipo de campo, todos os gráficos foram trabalhados com o *software OriginLab 9.0*.

Figura 10 - Esquema de imobilização de anticorpo antiescorpiônico



Fonte: Autora

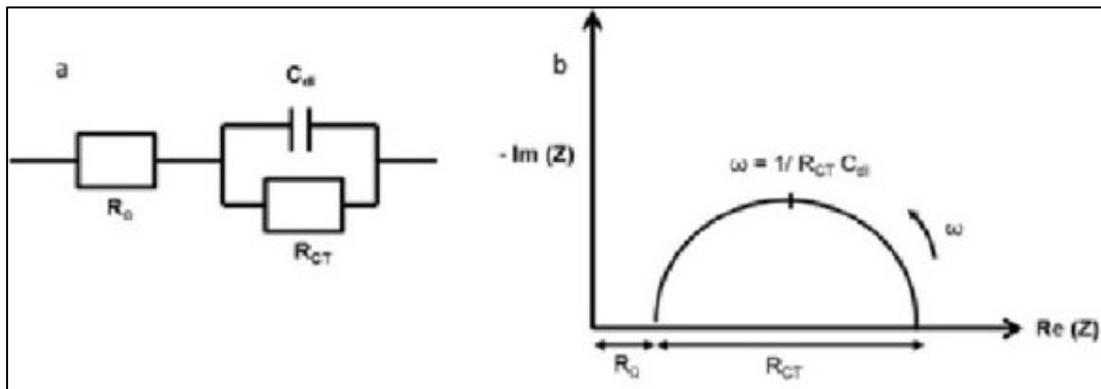
7.6 Circuito Elétrico Equivalente

Os circuitos elétricos equivalentes têm como principal objetivo consolidar os dados obtidos com a EIE. Os circuitos consistem em combinação de resistores, capacitores e indutores, além de outros componentes que possam ser apresentados nos ensaios, estes por sua vez podem ser distribuídos em série ou paralelos (BĂNICĂ, 2012). Esse procedimento é utilizado em diversos sistemas eletroquímicos.

Um dos circuitos mais utilizados na literatura é o circuito de Randles, (figura 15), pois ele se enquadra em parâmetros onde utilizou-se ensaios em meios aquosos condutores, como é realizado neste estudo. O circuito de Randles é composto por uma resistência da solução em série com uma capacitância da dupla camada elétrica paralela a uma resistência de transferência de carga (CHANG & PARK, 2010).

Neste estudo, empregou a análise do circuito equivalente para organizar dados da EIE, além de determinar valores elétricos da resistência à transferência de carga (ΔR_{tc}) que irão fornecer dados da detecção do analito. O *software Zview* foi utilizado para realizar o tratamento dos dados obtidos.

Figura 11 - Circuito de Randles e sua resposta idealizada no Diagrama de Nyquist



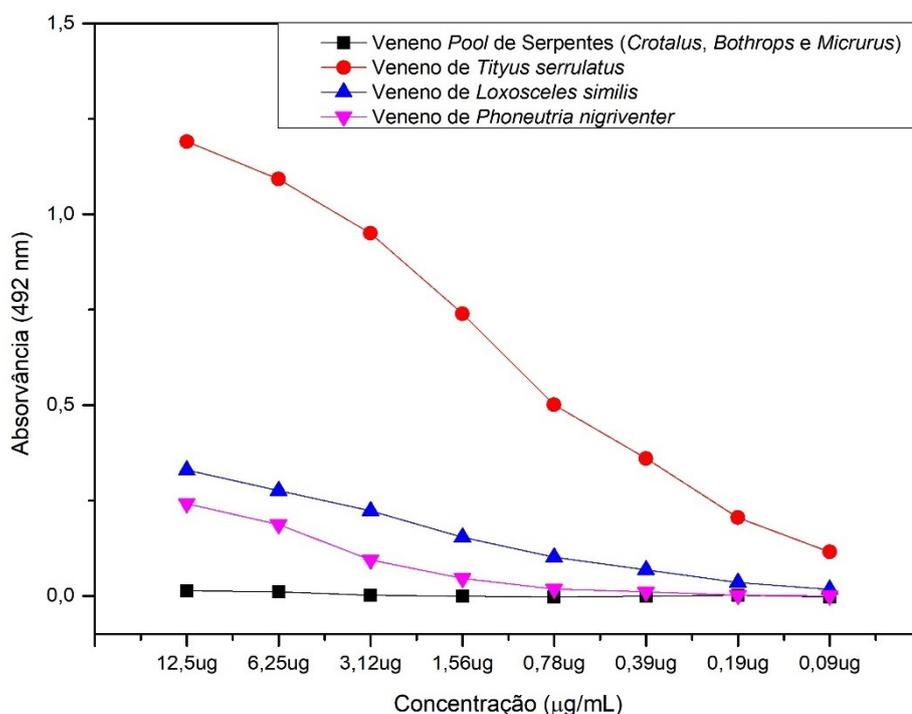
Fonte: SEKAR & RAMASAMY, 2013

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Caracterização dos anticorpos purificados

A imunocromatografia por afinidade é uma técnica que permite obter anticorpos altamente específicos. Heneine (1995) demonstrou em seu trabalho a identificação espécie-específica de venenos de serpente, com foco para o desenvolvimento de imunoenensaio para o diagnóstico gênero-específico para acidentes ofídicos. Tal diagnóstico permite o tratamento do paciente com antissoros específicos para serpentes de um mesmo gênero buscando minimizar as taxas de mortalidade e morbidade, com uma aplicação do soro correto para o acidente. Por isso, utilizou-se esta metodologia com objetivo de conseguir um anticorpo altamente específico para construção do imunossensor. Posteriormente à purificação dos anticorpos específicos, foi realizado um mapeamento da sua utilização no biossensor por meio do teste imunoenzimático ELISA (figura 16) a fim de verificar a especificidade dos anticorpos obtidos.

Figura 12 - ELISA para verificação da ação de especificidade do anticorpo antiescorpionico purificado



Verifica-se que mesmo com o processo de cromatografia por imunoafinidade realizado conforme a metodologia descrita, observou-se uma significativa reatividade com os venenos aracnídeos. Tal fato pode ser explicado por diferentes hipóteses, filogeneticamente os escorpiões estão próximos às aranhas e são de clados próximos, assim, a composição proteica dos venenos de ambos pode estar muito próxima. Um ancestral comum e a conservação de genes comuns ou pouco modificados explicaria a reação cruzada apresentada no teste. Observa-se na literatura que, até o presente momento, não existem estudos que comparem venenos de *Tityus serrulatus* com os de *Loxosceles similis* e *Phoneutria nigriventer*, ao contrário, alguns trabalhos reportam a análise mais detalhada dos venenos individualmente. Hernández-quintero e seus colaboradores (2011) revisaram a maioria dos achados importantes relacionados aos componentes do veneno isolados de escorpiões e aranhas, principalmente por clonagem e expressão gênica, porém sem uma relação da composição em algo descrito sobre essa ligação cruzada entre os espécimes. Outra hipótese levantada foi na ineficácia do processo de adsorção do anticorpo, quando utilizou a coluna aracnídea, pois como foi observado na metodologia descrita a quantidade de veneno de aranhas eram inferiores, por isso conseguiu-se confeccionar uma coluna menor. Por isso, é necessária uma mudança no processo de adsorção do anticorpo, com o aumento do volume ou a individualização das colunas aracnídeas para verificação da inespecificidade.

Para análise de reação cruzada, considerou-se a técnica de *western blot*, pela qual se separam as proteínas das toxinas por eletroforese em gel, e em seguida se transfere essas proteínas para uma membrana de imunodeteção seletiva de um antígeno específico imobilizado. Hnasko e Hnasko (2015) ressaltam a relevância dessa metodologia para análises de proteínas sujeitas à especificidade da interação anticorpo-antígeno, para a identificação qualitativa ou semiquantitativa de proteínas específicas e seu peso molecular.

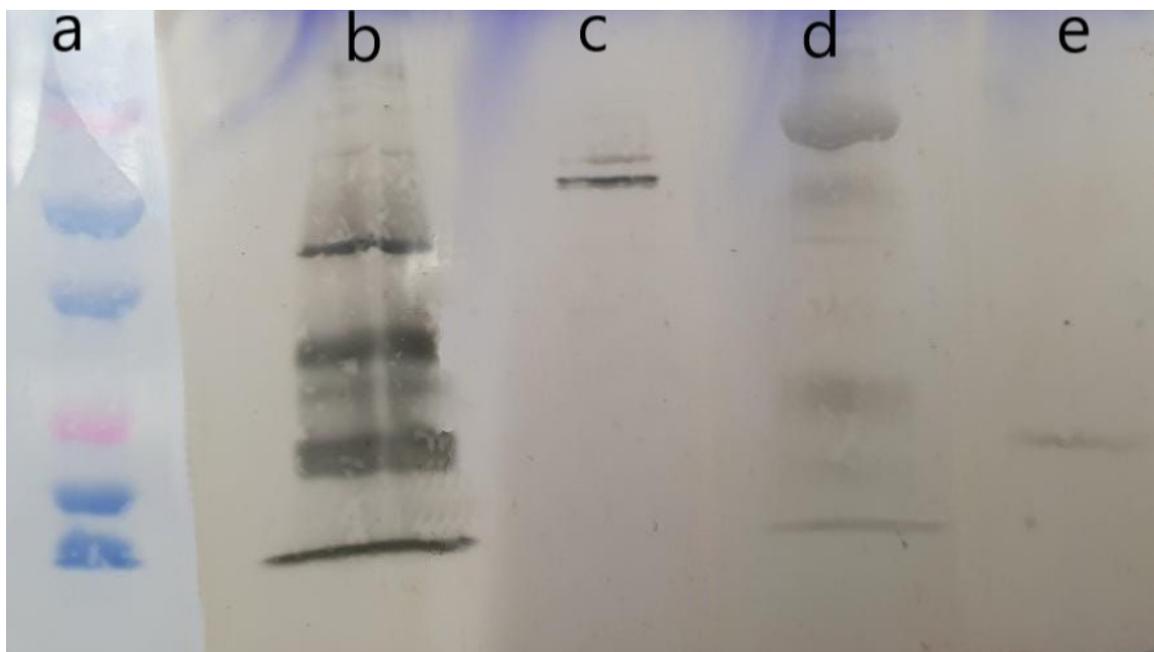
Em suma, pela análise do resultado de *western blot* (figura 17) notou-se que algumas proteínas, mesmo com o anticorpo adsorvido, possuem reação cruzada principalmente com os venenos aracnídeos, corroborando com o resultado do ELISA. O veneno de *Loxosceles similis* (figura 17d) demonstrou maior reação, enquanto o veneno de *Phoneutria nigriventer* (figura 17c) demonstrou uma reação somente em

proteínas de alto peso molecular e o *pool* de serpentes (figura 17e) demonstrou uma reação somente com proteínas de baixo peso molecular.

O veneno escorpiônico (figura 17a) demonstrou alta imunogenicidade em toda sua composição proteica, assim o uso de novas técnicas de mapeamento da composição proteica do veneno escorpiônico é essencial, como a técnica de cromatográfica, por exemplo, que possibilita o fracionamento do veneno em toxinas e através de um breve estudo de imunogenicidade das mesmas, que possibilitará a escolha de uma ou mais frações para o desenvolvimento de um anticorpo espécie-específico, com foco de um diagnóstico ainda mais preciso.

Nesse contexto, como esse estudo se encontra em uma escala de desenvolvimento laboratorial e controlada, foi escolhido como controles negativos dois venenos de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, como baixa inespecificidade em relação ao anticorpo escorpiônico, para a realização dos testes nos biossensores.

Figura 13 - *Western blot*; a: padrão de pesos moleculares; b: veneno de *Tityus serrulatus*; c: veneno de *Phoneutria nigriventer*; d: veneno de *Loxosceles similis*, e: veneno *pool* de serpentes (*Crotalus*, *Bothrops* e *Micurus*)



8.2 Caracterização da quitina e quitosana

As análises realizadas com a quitina obtida do mexilhão-dourado utilizando a FTIR mostraram, conforme o espectro (figura 18), bandas vibracionais (tabela 4), onde cada uma expressa um grupo funcional característico da quitina. Rasti e colaboradores (2017) identificaram no seu estudo de extração de quitina de conchas de uma espécie de bivalve utilizando a mesma técnica de análise um espectro com bandas vibracionais próximas às encontradas neste estudo. Entretanto, Paulino e colaboradores (2006) explicaram que se deve relacionar os resultados dos espectros com a forma de obtenção e com a matéria-prima matriz.

Figura 14 - FITR da quitina extraída das conchas do mexilhão-dourado

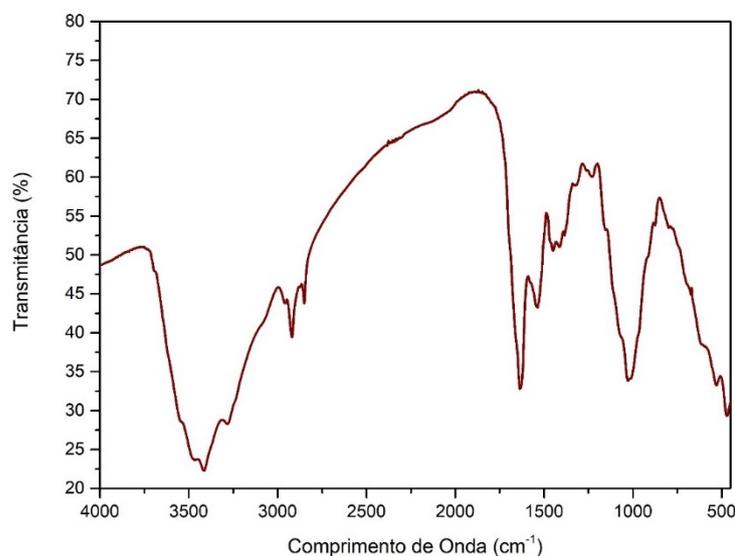


Tabela 4 – Caracterização por FTIR quanto aos grupos funcionais da quitina

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Característica da banda	Grupo funcional associado
3420	Banda forte e larga	O-H (Hidroxilas)
3282	Banda forte e fina	N-H (Amidas)
2917	Banda fraca e fina	C-H (Alcanos)
1639	Banda fina e forte	C=O (carbonila)
1019	Banda fina e forte	C-O (Éteres aromáticos)

A análise de caracterização da quitosana (figura 19) obtida após o processo de desacetilação da quitina indica a presença de bandas vibracionais (tabela 5) muito próximas à de quitina, com uma diferenciação em um dos grupos funcionais que apresentam aminas livres, características da quitosana. Paulino e colaboradores (2006) encontraram resultados próximos de obtenção de quitosana a partir de quitina extraída de artrópodes.

Contudo, deve-se considerar a pureza das amostras, pois o processo de obtenção de quitina encontra-se em validação, é necessário um refinamento no protocolo para a obtenção de uma amostra com um maior grau pureza, pois acredita-se que como o estudado foi iniciado é necessário delinear vários fatores, para evoluir nos procedimentos metodológicos, para enfim conseguir uma quitosana de grau analítico.

Figura 15 - FTIR da quitosana obtida do processo de desacetilação da quitina do mexilhão-dourado

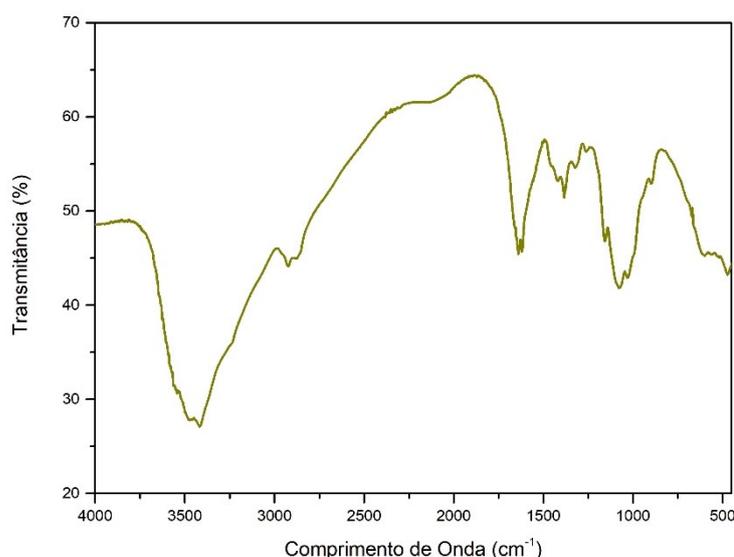


Tabela 5 - Caracterização FTIR quanto aos grupos funcionais da quitosana

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Característica da banda	Grupo funcional associado
3479	Banda forte e larga	O-H (Hidroxilas)
3423	Banda forte e fina	N-H (Aminas)
2936	Banda fraca e fina	C-H (Alcanos)
1646	Banda fina e forte	C=O (carbonila)
1071	Banda fina e fraca	C-O (Éteres aromáticos)

Para realização de uma análise da morfologia da quitina e quitosana utilizou a microscopia eletrônica de varredura. Considerando as micrografias (figura 20 e 21) representadas em diferentes ampliações, verificou que o estudo da morfologia foi semelhante ao relatado por Ibitoye e seus colaboradores (2018), que extraíram quitina e quitosana a partir de artrópodes. A quitina e quitosana em menores aumentos apresentou uma superfície com camadas lisas (figura 21 A e 22 A) e quando ampliadas observou a formação de placas lisas (figura 21 B e 22 B), porém não se notou fibras nos maiores aumentos como observada em estudos na literatura, entretanto em várias observações e análises de micrografias de quitosanas na literatura observou a presença de poro (KACUKGULMEZ, et al, 2011; IBITOYE, et al. 2018), como observado na amostra de quitosana em altas ampliações (figura 22 C e D).

Figura 16 - Micrografias da quitina extraída das conchas do mexilhão-dourado. A: 100 μm ; B: 10 μm ; C: 20 μm e D: 10 μm

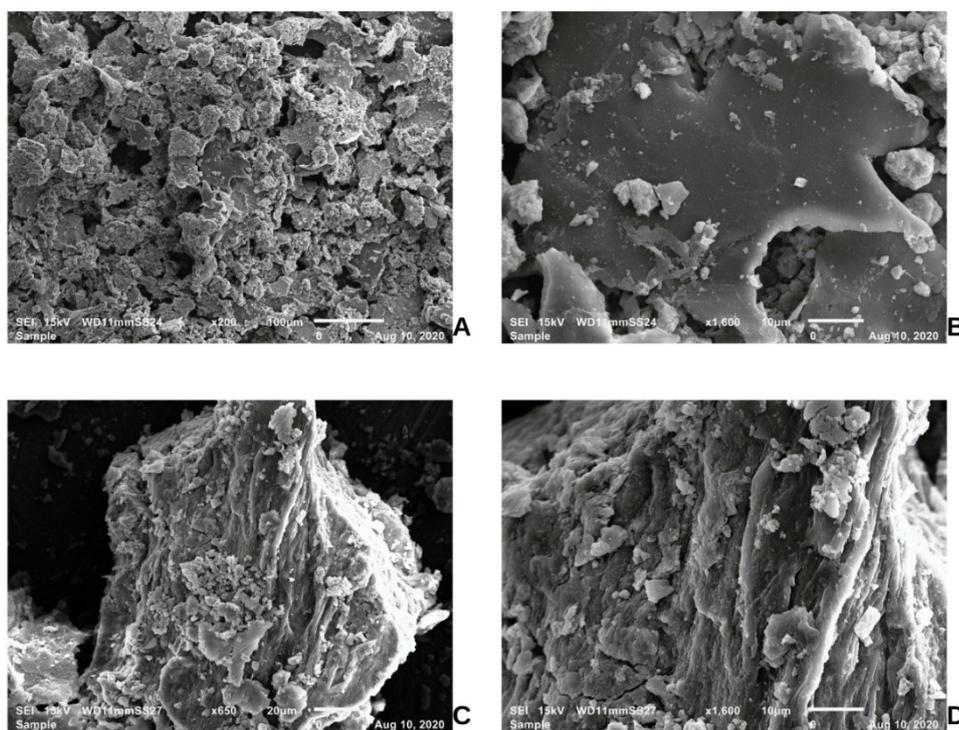
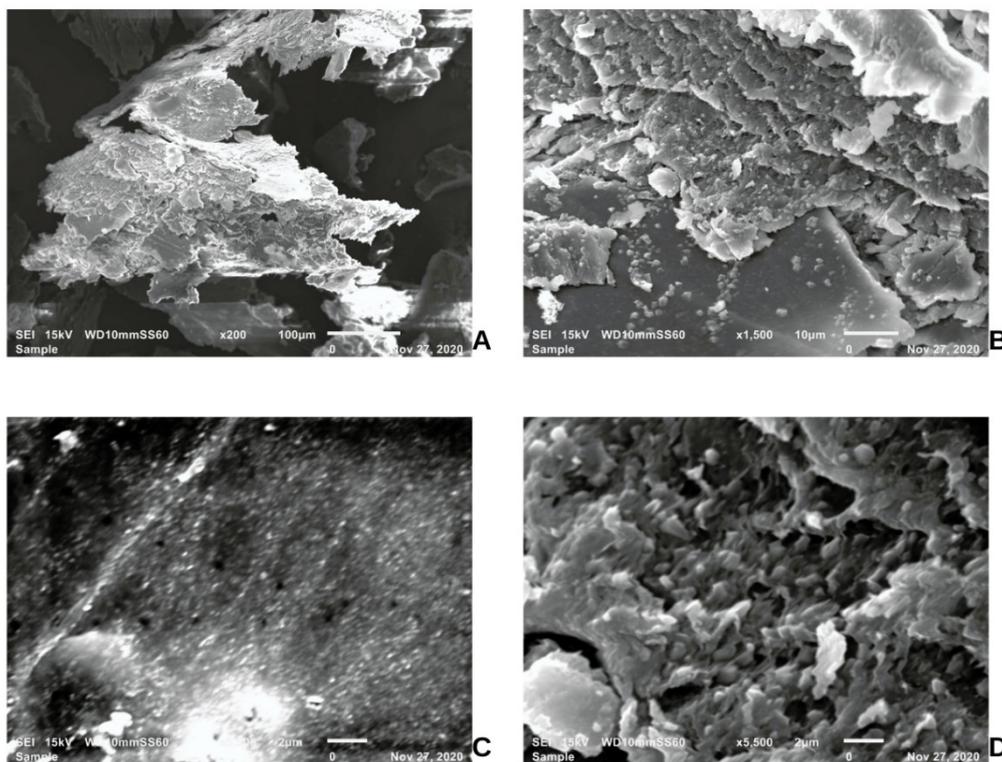


Figura 17 - Micrografias da quitosana obtida por desacetilação da quitina extraída das conchas do mexilhão-dourado. A: 100 μm ; B: 10 μm e C e D: 2 μm



8.3 Caracterização da Funcionalização

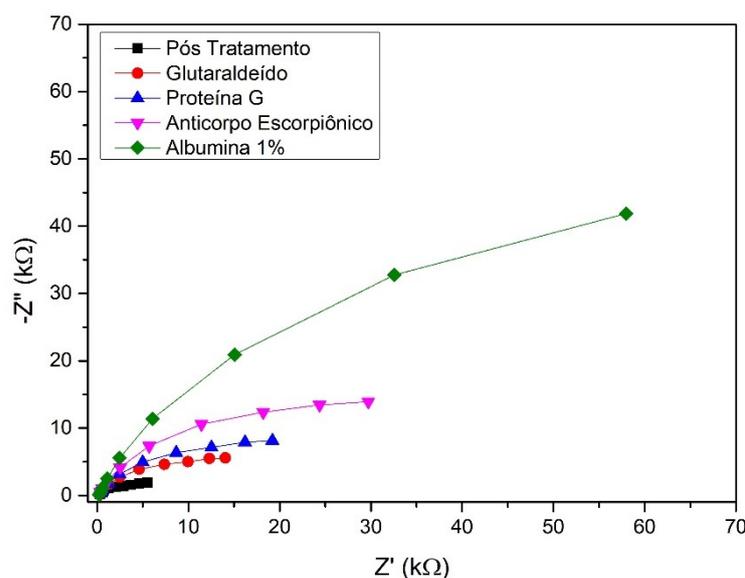
8.3.1 Sensores de Carbono

O processo de caracterização da funcionalização da superfície do eletrodo de trabalho foi realizado utilizando a técnica de EIE visando observar as mudanças do comportamento da impedância entre os processos de funcionalização

O procedimento de funcionalização (figura 22) foi feito em etapas, seguindo a metodologia citada. com isso, realizou inicialmente um tratamento com peróxido de hidrogênio 30%, para retirar resíduos de matéria orgânica e gerar através da reação de oxidação da superfície uma quantidade mais elevada de terminais do grupo hidroxila, essenciais para ocorrer as ligações covalentes com o glutaraldeído. Conforme, Mirsky e seus colaboradores (1997), que utilizaram em seus ensaios soluções para a limpeza com intuito de melhorar a qualidade da superfície a ser funcionalizada.

A preferência pelo uso do peróxido deve-se ao custo, à praticidade e ao enfoque de gerar os mencionados grupos funcionais. Entretanto, existem outros processos possíveis para essa finalidade, desde métodos eletroquímicos a tratamentos químicos mais sofisticados (LI et al., 2005). Dai e Liu (2019) descreveram a imobilização de diversas moléculas enfatizando uma superfície ideal para ocorrerem as ligações necessárias. Prodromidis (2010) afirmou que as análises e a qualidade de superfície funcional de eletrodos são geralmente impactadas pela estabilidade do revestimento, superfícies com baixa rugosidade e limpas são altamente reprodutíveis. Observou-se nos ensaios que, após o uso do peróxido de hidrogênio, ocorreu uma queda na impedância em relação às suas leituras basais, o que acontece devido à superfície do eletrodo de trabalho ter sofrido uma oxidação e lixiviação que levaram à queda da resistência à transferência de carga.

Figura 18 - Diagrama de Nyquist representando o mapeamento impedimétrico do processo de funcionalização de um eletrodo de carbono



Uma vez feita a limpeza do eletrodo de trabalho, a superfície foi oxidada aumentando o número de grupos funcionais, utilizou-se uma solução aquosa de glutaraldeído em PBS 0,1 M pH 7,4 colocada sobre o eletrodo de trabalho. O glutaraldeído é amplamente utilizado como agente ligante nos processos de imobilização de anticorpo de biossensores, sendo uma molécula bifuncional, que quando se liga à superfície ocasiona uma mudança conformacional em sua molécula deixando livres os grupos amina necessários para a ligação com a proteína de

interesse (neste estudo, os anticorpos) (LOPEZ-GALLEGO, et al., 2013). Muitos trabalhos utilizam o glutaraldeído como agente ligante e/ou de reticulação. Zhou e Chen (2001) utilizaram o reagente como agente de reticulação em uma superfície de grafite para a imobilização de enzimas. Eldin e colaboradores (2011) utilizaram-no como agente de imobilização de ligação de enzimas em polímeros.

Um dos pontos mais críticos no desenvolvimento de imunossensores, é a maneira com que o elemento de reconhecimento e a superfície do transdutor estão configurados, porque tais configurações afetam diretamente a sensibilidade e a seletividade do imunossensor. A assimetria na imobilização do elemento de reconhecimento, neste trabalho, os anticorpos, é complexo, pois sítios viáveis de ligação são afetados, o que pode levar à diminuição da atividade de ligação com o antígeno. Li e Chen (2018), em sua revisão, mostraram estratégias para a diminuição dessa assimetria a partir de técnicas de imobilização de moléculas.

Uma das estratégias mais utilizadas cientificamente para não ocorrer essa assimetria na imobilização do anticorpo é a utilização das proteínas G e A, que são proteínas derivadas de bactérias que se ligam por interação específica a uma determinada região do anticorpo (CHOE, et al., 2016). O uso da proteína G nos possibilitou o direcionamento dos anticorpos permitindo a seus sítios de ligação estarem mais expostos para a interação com o antígeno. Observou que a ligação de ambos foi efetiva, pois após a adição da solução de proteína G notou-se uma alteração na impedância (aumento no diâmetro do semicírculo do diagrama de Nyquist) e com a adição do anticorpo escorpiônico também observou uma mudança impedimétrica.

Durante o processo de mapeamento impedimétrico, notou-se que o aumento considerável apresentado com bloqueio na utilização da albumina é um ponto relevante e tem que ser investigado, pois, foi levantada as seguintes hipóteses que a rugosidade e a baixa área funcionalizada da superfície estão ligadas diretamente a esse aumento, que pode levar à diminuição da seletividade do sensor. Bhalla e seus colaboradores (2016) mostraram que a interação antígeno-anticorpo é um dos melhores exemplos de seletividade e com isso, espera-se biossensores de excelentes desempenhos com o processo de imobilização correto sob a superfície, e assim tais dispositivos são promissores para realização de testes de *point-of-care*.

Assim, o processo de funcionalização para os sensores de carbono precisa de otimização e refinamento. Tal processo foi realizado durante todo o estudo, porém foi realizado com diversos lotes de sensores cedidos com fabricação não uniforme e sem boa reprodutibilidade, com isso notou que esse estudo, foi em paralelo com a otimização da fabricação do sensor.

8.3.2 Sensores de Ouro

O procedimento de funcionalização (figura 23) do ouro seguiu as etapas descritas nas metodologias desse estudo, sabendo das características técnicas do sensor, utilizou o peróxido de hidrogênio na superfície do eletrodo de trabalho para o processo de limpeza rápido e menos agressivo. Esse procedimento resultou em uma queda da impedância em relação à leitura basal do sensor. Geralmente, as superfícies de ouro precisam ser limpas para a retirada de qualquer parte orgânica ainda remanescente. Em um estudo no estado da arte e técnica, notou que existem diversos processos de limpeza, observou também que esses processos têm que ser analisados criticamente e adaptados de acordo com as necessidades do ensaio e as dos sensores, pois alguns protocolos de limpeza são agressivos e podem danificar a superfície do sensor. Como Canbaz e seus colaboradores (2014), que utilizaram um eletrodo de ouro onde o processo de limpeza foi bem agressivo, com polimento e utilização de solução piranha e etanol puro. Diferentemente, Arya e Bhansali (2012) utilizaram para limpeza solventes como acetona e álcool isopropílico um processo menos agressivo. Outros processos de limpeza utilizam técnicas eletroquímicas, Cordeiro e colaboradores (2019), que utilizaram a voltametria cíclica uma técnica eletroquímica que promove uma oxirredução na superfície, um pré tratamento muito utilizado. Tais processos, sem devidos controles de parâmetros, podem ser prejudiciais à superfície, causando uma oxidação elevada.

Na continuidade do processo de funcionalização, foi adicionado ao sensor a cisteamina com o objetivo da formação de uma monocamada por quimissorção no ouro por ligação com terminais de enxofre e, com isso, as amins da molécula de cisteamina permaneciam livres para a próxima monocamada (CANBAZ, et al., 2014). Como observado no diagrama da figura 23, a adição da cisteamina aumentou o diâmetro do semicírculo, consolidando assim a confirmação da ligação e da mudança

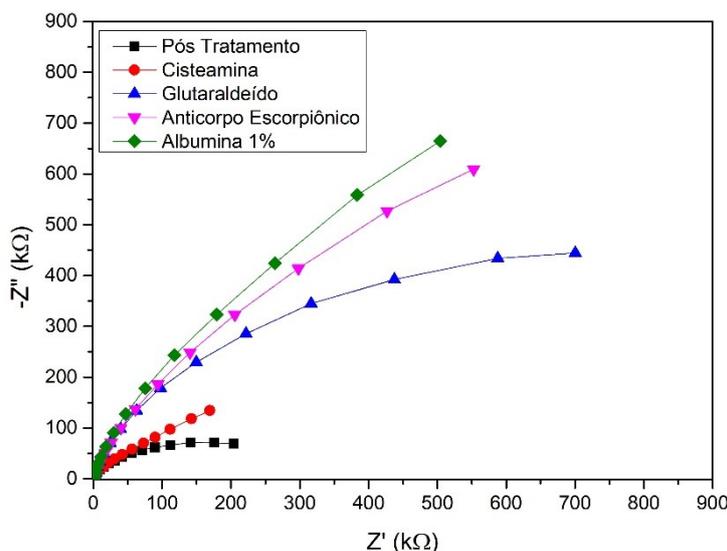
na superfície pelo mapeamento impedimétrico. A cisteamina é utilizada como agente ligante à superfície de ouro em vários estudos científicos como o de Arya e Bhansali (2012), que utilizaram a mesma na fabricação de um imunossensor para detecção de antígeno prostático específico (PSA), para diagnóstico de câncer de próstata e conseguiram resultados promissores que podem ser futuramente utilizados como *point-of-care*. Em uma solução de problema mais recente, a cisteamina foi usada como agente de adsorção com ouro no desenvolvimento de um método diagnóstico rápido para COVID-19, com resultados onde o tempo e o limite de detecção foram destaques, tornando essa tecnologia promissora para uso no campo (LIV, 2021).

Em seguida, utilizou o glutaraldeído como agente de reticulação com a cisteamina para formação de uma ligação covalente para a adesão do anticorpo, o glutaraldeído é amplamente utilizado nos processos de desenvolvimento de imunossensores, pelo seu baixo custo e pela característica molecular, o glutaraldeído tem uma estrutura que reage com grupos como aminas, hidroxilas e amidas, por exemplo (LOPEZ-GALLEGO, et al., 2013). Com a adição do glutaraldeído observou um pequeno aumento dos diâmetros do semicírculo, gerando assim uma mudança no sistema como esperado.

Posteriormente, adicionou o anticorpo antiescorpiônico purificado e novamente observou um aumento do semicírculo. O novo aumento foi observado após adição da albumina 1% para bloqueio dos sítios não ocupados.

O mapeamento impedimétrico, mostrou que o protocolo de funcionalização dos sensores de ouro resultava na ligação dos anticorpos à superfície do eletrodo com sua atividade preservada, mas ainda é necessária uma reprodutibilidade dos resultados obtidos. Todos esses parâmetros foram otimizados para a funcionalização ser reprodutível durante todo estudo.

Figura 19 - Diagrama de Nyquist representando o mapeamento impedimétrico do processo de funcionalização de eletrodos de ouro



8.4 Detecção de Veneno

Segundo o Ministério da Saúde (2009), quando ocorrem acidentes escorpiônicos, a quantidade de veneno inoculada na vítima é baixa, por isso a divisão de casos de leves a graves depende muito da velocidade de ação do veneno no organismo, que está relacionada a fatores cruciais, como a idade e as condições fisiológicas da vítima. Um processo que consiga identificar esse veneno no sangue humano antes mesmo dos sinais clínicos mais graves é crucial, por isso o estudo buscou realizar a detecção em baixas concentrações na escala de nanograma para encontrar um limite de detecção ótimo visando a quantidade de veneno inoculada.

8.4.1 Detecção em sensores de carbono

Os sensores de carbono apresentaram resultados promissores quanto à detecção em baixas concentrações, o que demonstra na escala laboratorial uma inicial prova de conceito da técnica. Como observou no ensaio 1 (figura 24), a adição de veneno com o aumento da concentração alterou a impedância gradativamente, apresentando um aumento no raio do semicírculo, seguindo possivelmente para uma saturação do sensor. Quando adaptou o circuito elétrico (figura 25) para curva, utilizou-se o circuito com uma resistência inicial R1, que é referente à resistência do

eletrólito, o *Constant Phase Element* (CPE) e outra resistência para representação da extrapolação da parte real relacionada a ΔR_{tc} , nesse caso R2. Nesse ensaio, foi observado que a ΔR_{tc} de carga (figura 26) segue o mesmo padrão do nyquist, ou seja, tendendo para uma saturação, mostrando, assim, que o imunossensor detectou o veneno escorpionicó.

Figura 20 - Ensaio 1: Diagrama de Nyquist do imunossensor de carbono frente ao veneno escorpionicó nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL

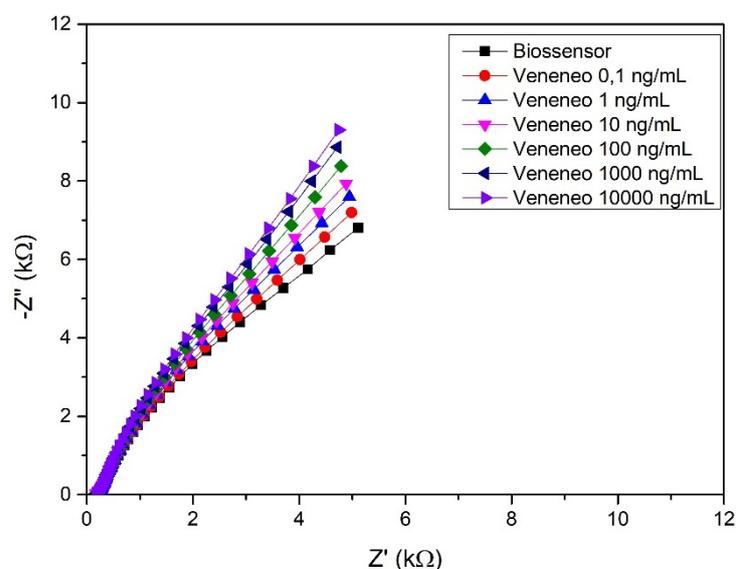


Figura 21 - Circuito equivalente sugerido para simulação do ensaio 1 utilizando sensor de carbono

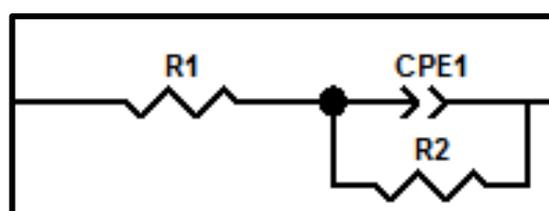
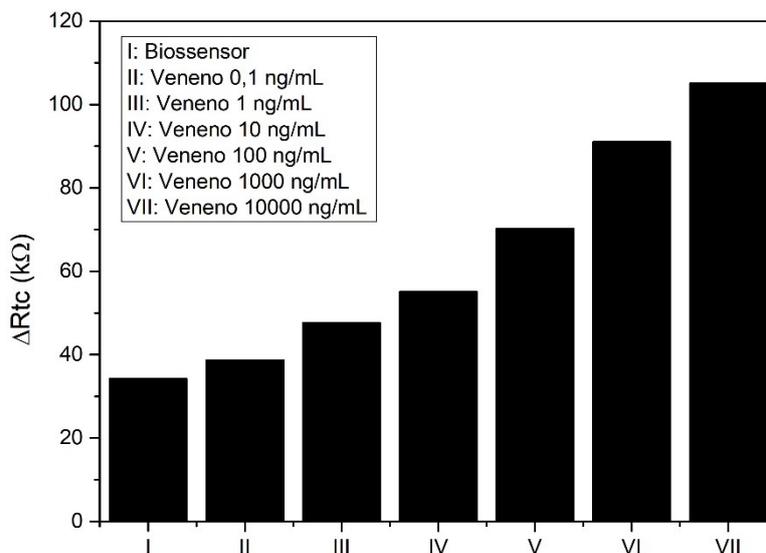


Figura 22 – Ensaio 1: ΔR_{tc} do imunossensor de carbono frente ao veneno escorpiónico nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL



No ensaio 2 (figura 27), observou o mesmo comportamento impedimétrico, a mudança no raio do semicírculo com um aumento crescente, porém a saturação com a adição constante do veneno foi mais evidenciada nesse processo, levantando a diversas hipóteses, dentre elas a eficácia do processo de funcionalização, otimizada mudando a concentração de glutaraldeído para 0,075% e incubando por 2 horas e mudando também a concentração da proteína G para 200 $\mu\text{g/mL}$, incubando por 1 hora, aumentando assim o número de sítios de ligação para o anticorpo, resultando em uma funcionalização em processo de refinamento. Neste ensaio, empregou o mesmo circuito equivalente do ensaio 1 (figura 25) e foi observado que ΔR_{tc} corroborou com os resultados apresentados pelo nyquist, em relação à saturação mais visível do que no ensaio anterior (figura 28).

Um das características cruciais de um biossensor é a sensibilidade. Bhalla e seus colaboradores (2016) descreveram essa característica como uma das mais relevantes, pois observou a capacidade da biomolécula imobilizada na superfície de detectar um analito específico, como foi mostrado os sensores de carbono apresentou uma sensibilidade e linearidade promissora, pois durante a incubação em diferentes concentrações do analito ficou evidente o aumento dos dados impedimétricos e a ΔR_{tc} .

Figura 23 - Ensaio 2: Diagrama de Nyquist do imunossensor de carbono frente ao veneno escorpionic nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL

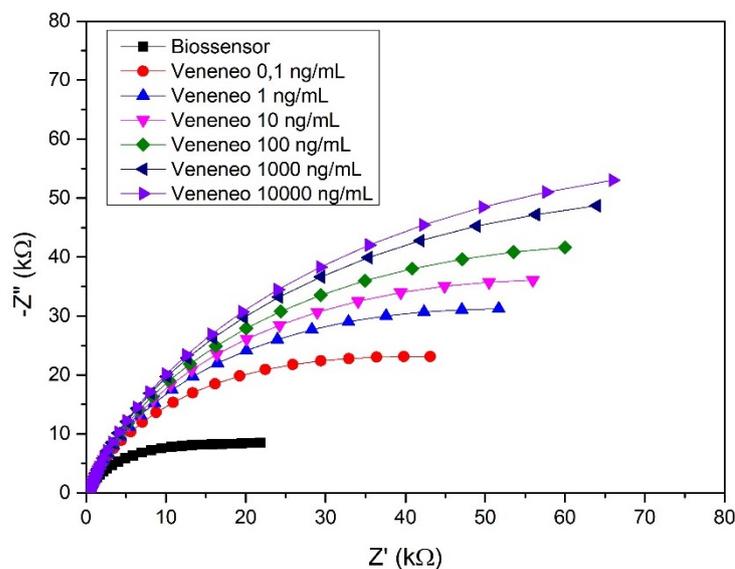
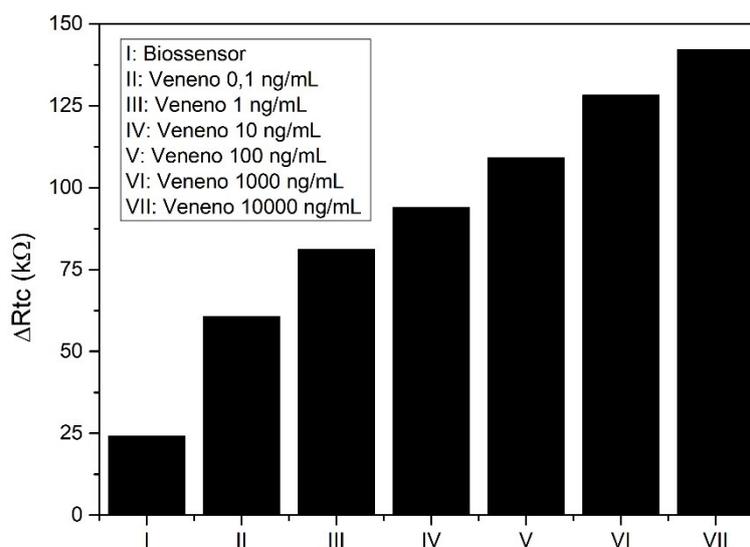


Figura 24 – Ensaio 2: ΔR_{tc} no imunossensor de carbono frente ao veneno escorpionic nas concentrações de 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL



Outra característica essencial é a seletividade. Os dois ensaios a seguir foram realizados para mensurar essa característica, assim utilizou dois controles negativos mapeados de acordo com os ensaios de especificidades realizados na caracterização do anticorpo, neste caso dois venenos ofídicos. Pelo ensaio 3 (figura 29), notou que segundo o diagrama de Nyquist, os venenos ofídicos tiveram uma reação em relação à curva inicial, tal comportamento não era esperado, pois os controles não apresentavam reação nos testes moleculares. É notável que as curvas não se distinguem entre si, mantendo-se em valores de resposta aproximados. Neste ensaio,

com a utilização da simulação de circuito equivalente (figura 30), é observado o mesmo comportamento no diagrama de Nyquist, em que as curvas de impedância dos controles negativos são superpostas, indicando que o eletrodo não discrimina os venenos heterólogos. Quando é adicionado o controle positivo (veneno de escorpião) na mesma concentração dos controles negativos, há um aumento da impedância em relação aos controles negativos, indicando que o sensor detectou o veneno de escorpião.

Figura 25 - Ensaio 3: Diagrama de Nyquist do imunossensor de carbono frente aos venenos botrópico, crotálico e escorpiônico a 1 $\mu\text{g/mL}$

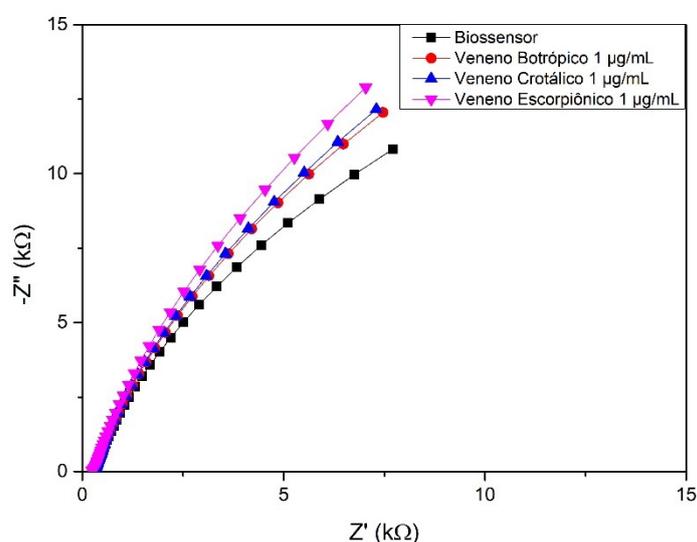
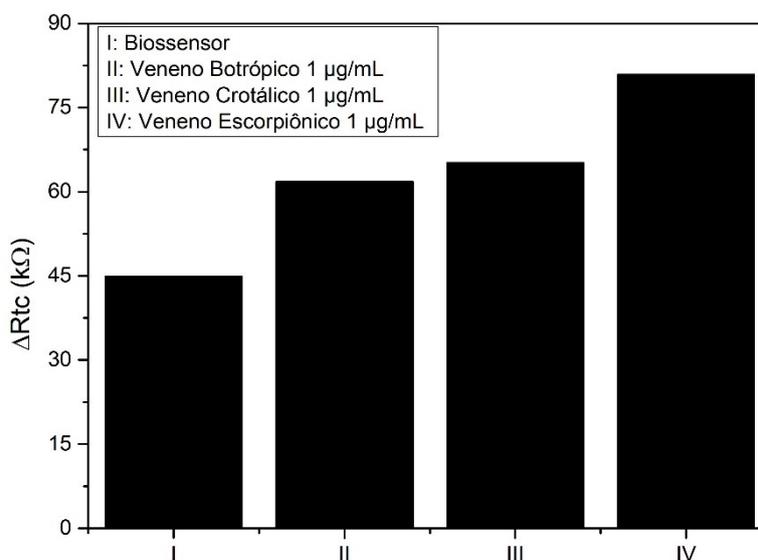


Figura 26 – Ensaio 3: ΔR_{tc} do imunossensor de carbono frente aos venenos botrópico, crotálico e escorpiônico 1 $\mu\text{g/mL}$



No ensaio 4 (figura 31), a seletividade ficou mais evidente, pois os controles negativos tiveram grande semelhança com o valor da curva basal (biossensor), isto é, as mudanças no raio do semicírculo foram baixas e quando adicionou o controle positivo a mudança brusca no raio do semicírculo foi muito mais notável e expressiva, resultados evidenciados também no processo de transferência de carga (figura 32). Com isso, existem algumas hipóteses para os dois ensaios de seletividade terem apresentado resultados diferentes, pois para o segundo teste foi realizado uma otimização no processo de funcionalização, o mesmo empregado no ensaio 2.

Conforme Bhalla e seus colaboradores (2016), a seletividade permite uma tecnologia evoluir na sua maturação, pois os autores explicaram que a seletividade é a capacidade do biossensor reconhecer seu analito alvo específico, em situações onde as amostras podem conter outros compostos. Com isso, a realização de testes de detecção utilizando controles negativos é essencial para delinear a seletividade do sensor.

Figura 27 - Ensaio 4: Diagrama de Nyquist do imunossensor de carbono frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 $\mu\text{g/mL}$ e escorpiônico na concentração de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$

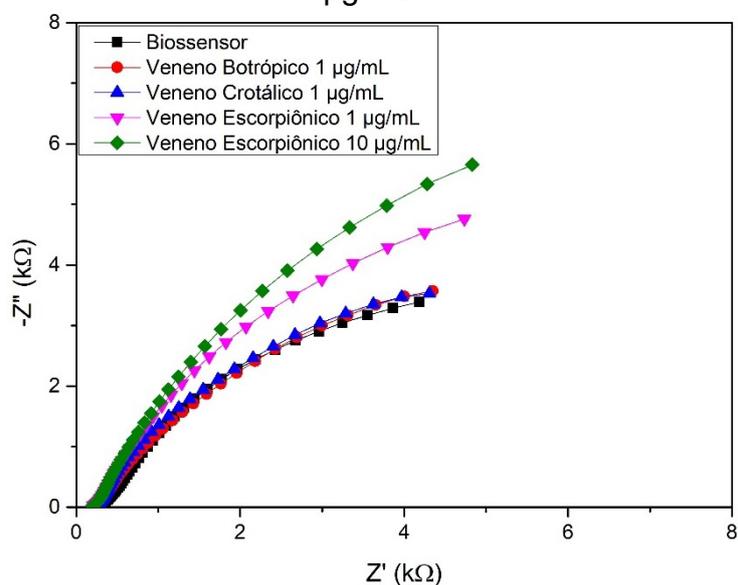
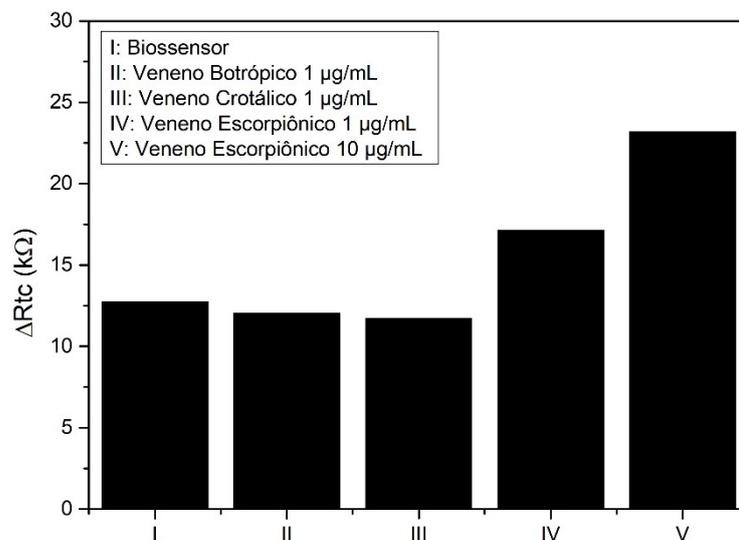


Figura 28 - Ensaio 4: ΔR_{tc} no imunossensor de carbono frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 $\mu\text{g/mL}$ e escorpiônico na concentração de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$



Os ensaios 2 e 4 apresentaram sensibilidade e linearidade. Esses resultados mostram o bom funcionamento da técnica, porém com a falta da reprodutibilidade necessária, a evolução na escala de maturidade tecnológica fica ainda estacionada dentro de um ambiente controlado. A busca pela maturação de uma tecnologia é muito complexa, os ensaios utilizando sensores de carbono apresentaram efetividade na detecção de veneno escorpiônico, porém a seletividade ainda tem que ser estudada juntamente com a reprodutibilidade dos resultados para haver um avanço na maturidade da tecnologia de uma escala laboratorial com efetiva prova de conceito e relevância. Bhalla e seus colaboradores (2016), em suas pesquisas para otimização dos biossensores, citam que eles precisam apresentar atributos estáticos e dinâmicos que refletem em seu desempenho, como seletividade, linearidade, reprodutibilidade, estabilidade e sensibilidade.

Os nanomateriais derivados de carbono para construção de sensores vêm sendo amplamente utilizados, principalmente com foco na confecção de métodos diagnósticos no ambiente científico, sendo vistos como potenciais produtos destinados a diversos mercados. Cristea e seus colaboradores (2015) argumentaram que existe uma grande demanda por dispositivos analíticos rápidos, de baixo custo e de fácil manuseio para os mercados de clínica médica, veterinária e ambiental, bem como na indústria farmacêutica e alimentícia. O uso dos sensores fabricados com tintas à base de carbono é altamente citado na literatura. Kumar e seus colaboradores

(2019) demonstraram como a utilização de sensores de carbono tem potencialidade promissora para a fabricação de biossensores, evidenciando diversas técnicas de imobilização visando as características principais dos biossensores para sua eficácia.

Trabalhos semelhantes com sensores à base de carbono vem sendo desenvolvidos, como o de Bekir e seus colaboradores (2015), que realizaram uma investigação da qualidade de água frente à contaminação por bactérias utilizando eletrodos impresso à base de carbono, com resultados promissores além da escala laboratorial. Khan e seus colaboradores (2016) desenvolveram uma plataforma promissora para diagnóstico precoce local de infarto do miocárdio. Em uma breve revisão do estado da técnica no que se refere à Propriedade Intelectual, observou um número considerável de patentes com a utilização de sensores à base de carbono. A patente WO2018208610A1, que utilizou sensores baseados em tintas eletroativas à base de carbono, métodos de detecção eletroquímicos e imobilização de anticorpos visando atingir um amplo mercado na área de diagnósticos *point-of-care*. Outra patente, WO2020012001A1, também utilizou sensores impressos à base de carbono para quantificação de hormônios tireoidianos livres para diagnósticos de doenças relacionadas à tireoide, ambos estudos são promissores quanto ao desenvolvimento de produtos e processos. Relacionar o estudo com estudos relevantes do estado da arte e da técnica é essencial para que os resultados sejam corroborados ao que já existe nas duas bases de dados, pois permitem realizar prospecções para o desenvolvimento da tecnologia e estudo mercadológico.

8.4.2 Detecção em sensores de ouro

A escolha de realizar ensaios com sensores à base de ouro, os quais também têm produção ligada à *startup SmartSensors*, tem como principal objetivo melhorar a resolução dos resultados quanto à seletividade, reprodutibilidade, linearidade e sensibilidade. A disponibilidade de superfícies funcionais para a adesão de biomoléculas é relativamente alta e uma das superfícies mais estudadas para a técnica de EIS é o ouro, que permite respostas rápidas, pois segundo Uslu e Ozkan (2007), a cinética de transferência de elétrons em superfícies metálicas são mais rápidas do que em superfícies à base de carbono.

Os ensaios com ouro seguiram os mesmos parâmetros dos eletrodos à base de carbono, porém nos ensaios buscou testar as amostras em condições mais próximas de um soro de mamífero, por isso foi utilizado a albumina a 1% diluída em PBS 0,01 M no pH 7,4 para solubilizar os venenos analisados. Com isso, para um resultado de detecção mais próximo da situação real, foi realizado uma leitura de impedância da solução de albumina 1% antes dos ensaios com os venenos, essa leitura foi denominada de branco do método, após foi realizado a normalização dos dados com a subtração do branco das detecções dos venenos, com o objetivo de verificação das ligações específicas do analito com nossa molécula alvo. Os ensaios com eletrodos de ouro também foram realizados constantemente, para verificar as características principais dos biossensores, portanto, o que foi apresentado é um panorama de todos os ensaios realizados durante todo o período do estudo.

O ensaio 1 apresentou um aumento da impedância (figura 33) nos valores das componentes real e imaginária à medida que a concentração do analito (veneno de escorpião) aumentou. Porém, o aumento da impedância para a incubação da albumina 1% pôde indicar que o bloqueio da superfície de ouro durante a fase de funcionalização não foi eficaz. A saturação da resposta frente ao veneno de escorpião na concentração de 100 ng/mL pôde indicar uma baixa ligação dos anticorpos antiescorpiônicos na superfície do eletrodo de trabalho. Todo comportamento impedimétrico foi confirmado utilizando a simulação do circuito equivalente (figura 25), que mostrou mudanças nos valores de ΔR_{tc} (figura 34).

Figura 29 - Ensaio 1: Diagrama de Nyquist do imunossensor de ouro frente ao veneno escorpiônico nas concentrações de 1, 10, 100, 1000 ng/mL

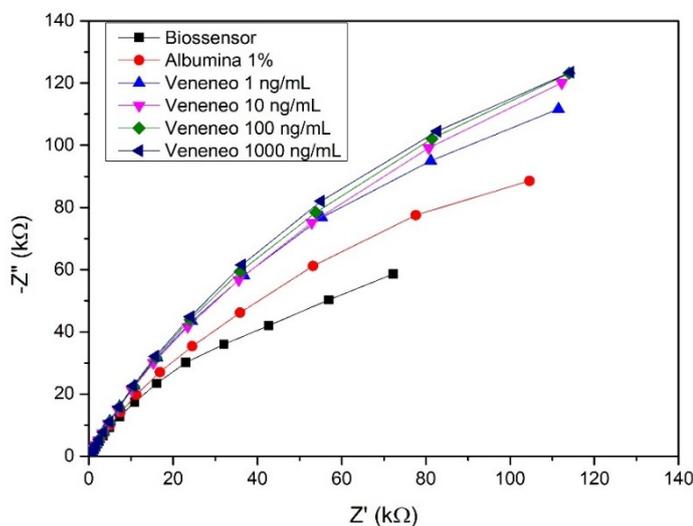
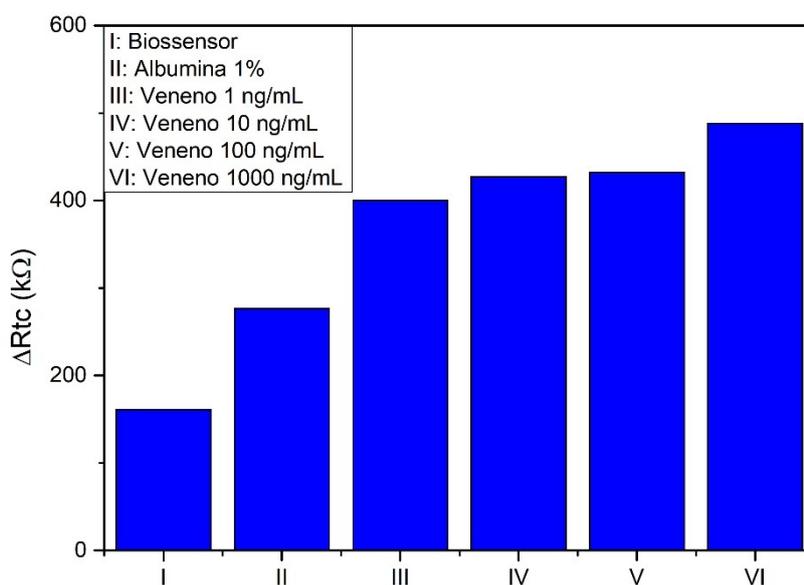
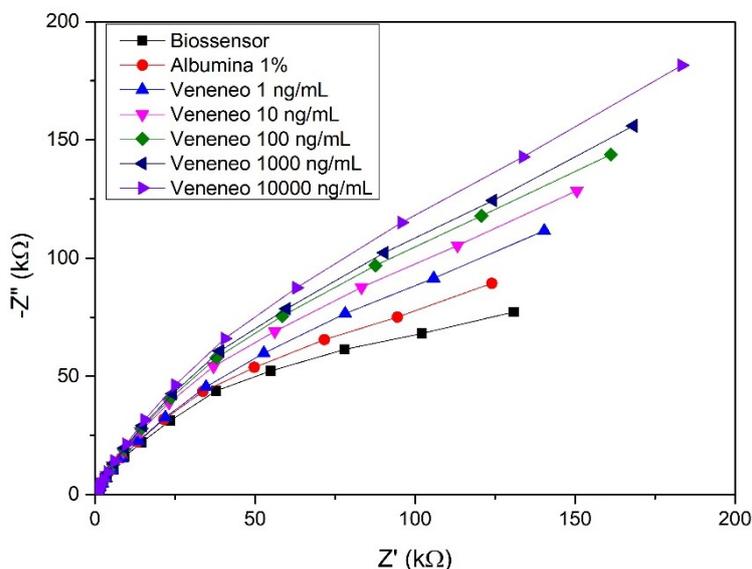


Figura 30 - Ensaio 1: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente ao veneno escorpionicó nas concentrações de 1, 10, 100, 1000, 1000 ng/mL



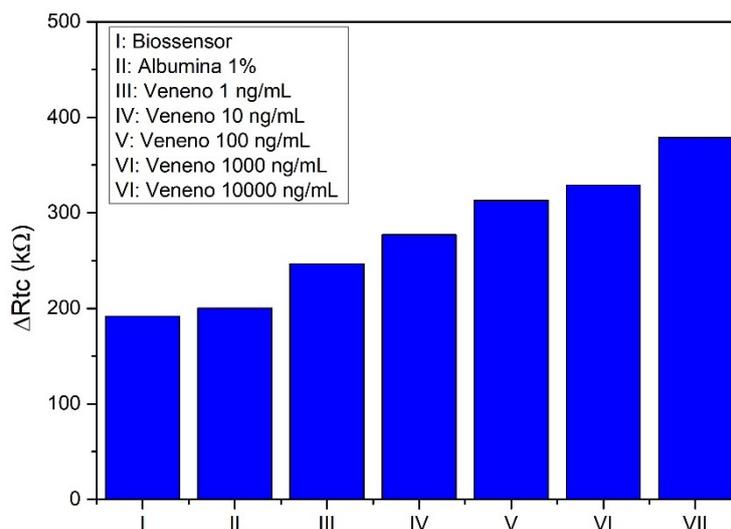
O ensaio 2 apresentou um aumento da impedância (figura 35) concomitantemente ao aumento da concentração do analito. A impedância resultante da incubação da albumina a 1%, sem reação em relação à curva inicial do biossensor, indica que o processo de bloqueio da superfície durante a funcionalização foi relativamente efetivo, processo esse modificado com o aumento no tempo de incubação do glutaraldeído para 2 horas, na concentração de anticorpo para 200 $\mu\text{g/mL}$ e o tempo de bloqueio para 60 minutos. Os resultados da série de venenos mostram um perfil que caminha para a saturação até a concentração de 10000 ng/mL como esperado. Porém, após a adição do veneno na concentração de 10000 ng/mL, a impedância aumenta, contrariamente ao perfil esperado. A explicação pode se dar pela característica da fase de funcionalização que deixa sobre a superfície de ouro várias camadas de reagentes e proteínas. Essas camadas geram espaços onde substâncias podem se fixar inespecificamente. Então, o incremento da impedância pode ter elementos de inespecificidade e de especificidade. Esse resultado pode ser indicativo da faixa de detecção do ensaio.

Figura 31 - Ensaio 2: Diagrama de Nyquist do imunossensor de ouro frente ao veneno escorpiónico nas concentrações de 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL



O ensaio 3 foi realizado para verificação de seletividade frente a venenos ofídicos como controles negativos. Nesse primeiro momento, constatou que ainda não existe reprodutibilidade com a leitura da albumina, como no ensaio anterior. Tal comportamento pode ser explicado pela falta de reprodutibilidade da produção dos sensores, que ainda estão em um processo de desenvolvimento, ou por problemas experimentais ocorridos durante o processo de funcionalização. Entretanto, foi observado que os controles negativos, apesar de apresentarem uma reação neste ensaio, seguiram sobrepostos na curva de Nyquist, assim mostrando que o biossensor não discriminou os controles (figura 37), diferentemente, quando foi testado o veneno escorpiónico que apresentou um aumento na impedância real e complexa. Os resultados a respeito da seletividade e do limite de detecção são promissores, pois a resposta de detecção com baixa concentração em escala de ng/mL.

Figura 32 – Ensaio 2: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente ao veneno escorpionicó nas concentrações de 1, 10, 100, 1000, 10 000 ng/mL



Quanto à análise da resistência à transferência de carga (figura 38), foi observado uma seletividade discreta, visto isso, é necessário um refinamento no sistema para o resultado ser mais robusto. Os valores de ΔR_{tc} , por estarem muito altos, podem ter afetado diretamente a seletividade e sensibilidade do ensaio, comportamento observado em alguns sensores durante todo período de testes. Com a normalização dos resultados de detecção obtidos com a subtração do branco do método nos valores de resistência à transferência de carga (figura 39), observou uma seletividade moderada frente ao controle positivo (veneno escorpionicó). Os testes de seletividade durante todo estudo foram otimizados, com o objetivo de encontrar parâmetros para aumentar o grau de seletividade. Segundo Daniels e Pourmand (2007), a seletividade em sensores é essencial principalmente na adaptação de uma tecnologia no ambiente real, onde as amostras analisadas provavelmente terão interferentes importantes e também deve ser observado cuidadosamente o que está analisando enquanto a concentração do analito presente.

Figura 33 - Ensaio 3: Diagrama de Nyquist do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico, crotálico e escorpiônico a 1 ng/mL

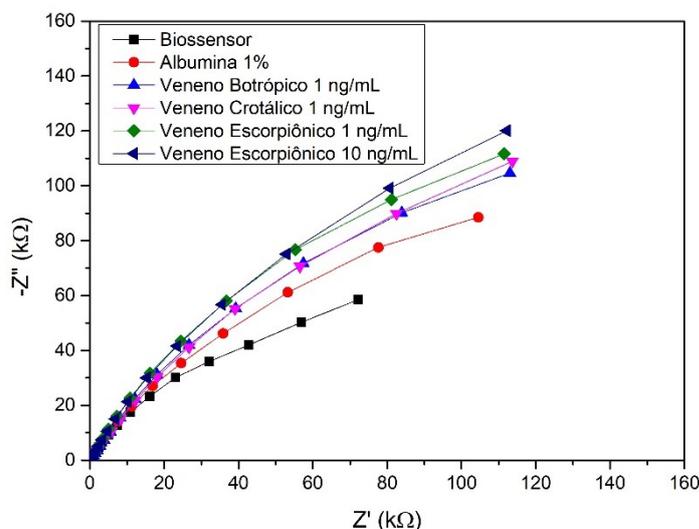
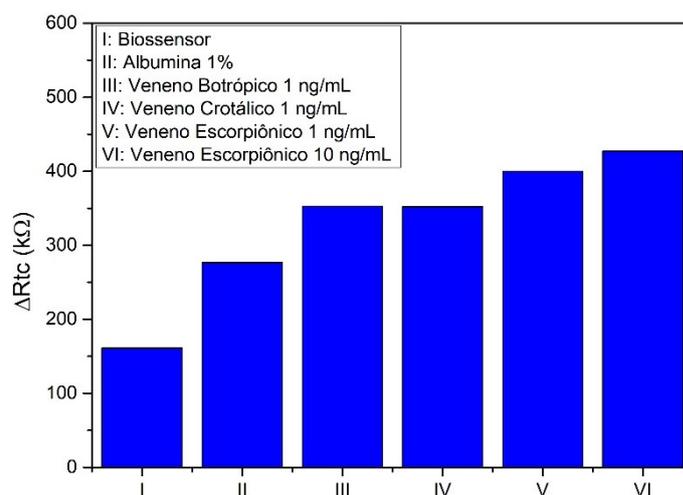


Figura 34 – Ensaio 3: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL



O ensaio 4 também foi realizado para verificar a seletividade do sensor frente aos controles negativos e apresentou uma melhor resposta em relação ao ensaio anterior. Como foi observado no diagrama de Nyquist (figura 40), não aparecerem mudanças consideráveis na resistência quando o sistema foi submetido aos controles negativos, porém quando foi submetido ao controle positivo, em duas concentrações diferentes, houve mudança nas partes real e imaginária da impedância. A ΔR_{tc} seguiu o comportamento apresentado no nyquist (figura 41), os controles negativos e a albumina ainda tiveram uma reação, porém menor em relação ao ensaio anterior e os controles positivos tiveram uma reação dentro do esperado, quando verificou-se a variação da resistência à transferência de carga com a subtração do branco do

método e a normalização dos dados permitiu demonstrar que o sistema está seletivo, mesmo com a ação de interferentes (figura 42).

Figura 35 - Ensaio 3: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL, normalizados por meio da subtração dado branco do sistema

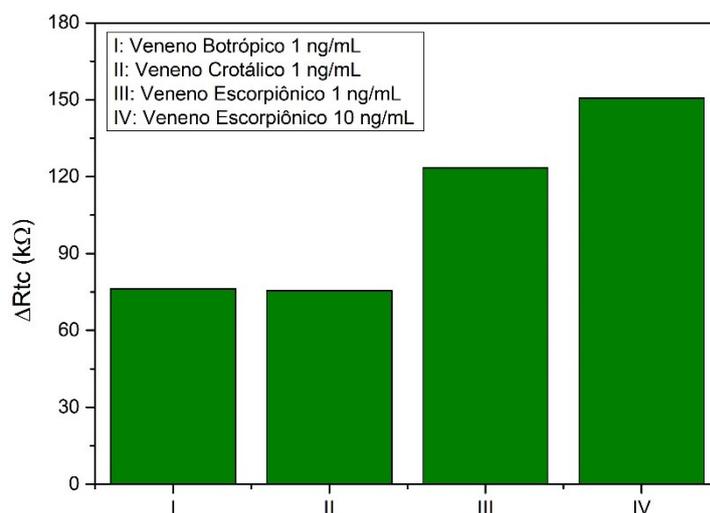
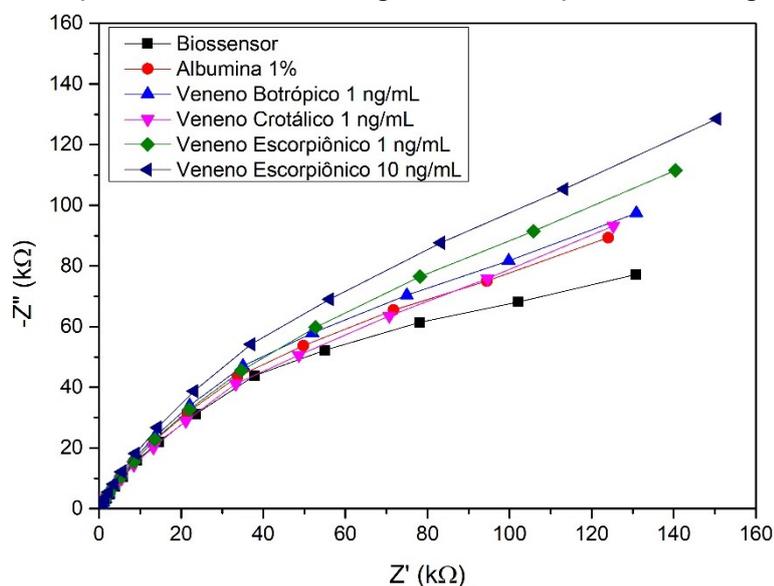


Figura 36 - Ensaio 4: Diagrama de Nyquist do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL



Em um estudo no estado da técnica, no domínio referente a patentes e da arte no que se refere à literatura científica, foi visto como os imunossensores desenvolvidos com a utilização do ouro como superfície vêm recebendo cada vez mais espaço no meio biotecnológico. A utilização de metais como ouro é relevante

devido à estabilidade relacionada com a cinética dos elétrons que interfere diretamente na técnica utilizada (USLU & OZKAN, 2007). Por isso, a escolha pelo ouro como superfície funcional, demonstrou uma eficiência relativa, principalmente na parte de seletividade em relação aos sensores de carbono nesse estudo.

Figura 37 – Ensaio 4: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL

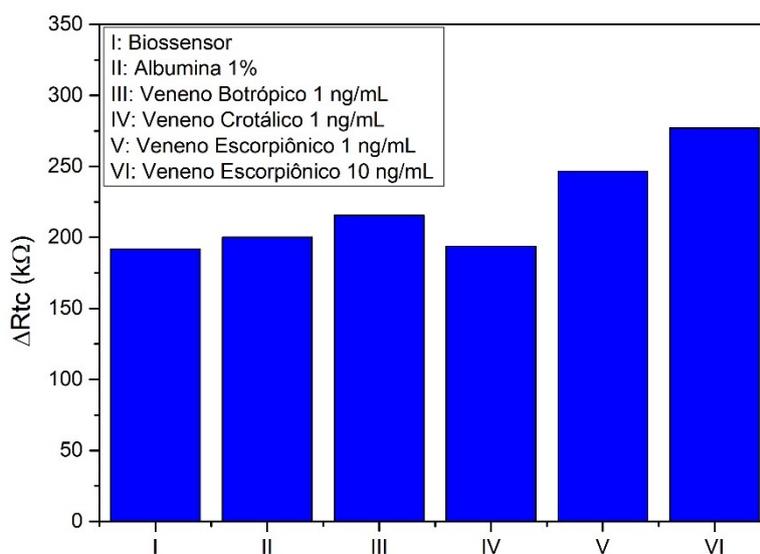
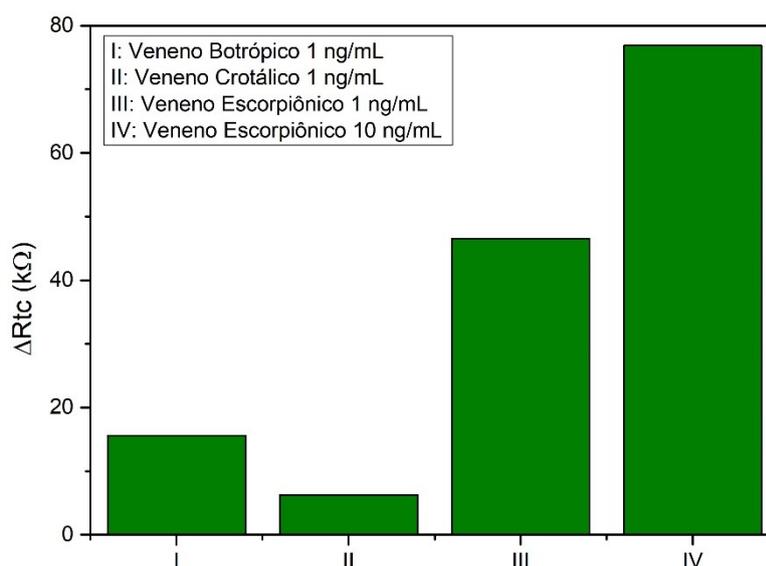


Figura 38 – Ensaio 4: ΔR_{tc} do imunossensor de ouro frente aos venenos botrópico e crotálico a 1 ng/mL e escorpiônico a 1 ng/mL e 10 ng/mL, normalizados por meio da subtração do branco do sistema



Estudos como o de Címafonte e seus colaboradores (2020), utilizaram um sensor impresso de ouro, mostraram resultados promissores para detecção de

bactérias em água. Os autores conseguiram um imunossensor com funcionalização covalente do anticorpo que foi altamente eficaz na seletividade, maximizando o tempo de funcionalização e detecção, tornando assim possível o uso do mesmo em campo. Corroborando, uma tecnologia desenvolvida na China, com o número de registro de patente CN2010101467501A, onde foi descrita uma invenção que se refere à detecção rápida de microrganismos nocivos ao meio ambiente ou ao corpo humano, utilizando um imunossensor de ouro com ligação reticulada entre superfície e anticorpo. Essa tecnologia, no escopo do seu documento, demonstrou resultados significativos quanto à precisão e ao tempo de detecção.

Os ensaios com sensores de ouro, porém, precisam melhorar em alguns aspectos como sensibilidade, limite de detecção e linearidade. O estudo de Shamsuddin e colaboradores (2021) demonstrou os desafios de desenvolver um método diagnóstico *point-of-care* para câncer, onde o limite de detecção correlacionado com a área de eletrodo precisa ser ainda otimizado. Outra tecnologia, esta italiana, EP3071957A0, visou à confecção de um biochip impedimétrico para o diagnóstico simultâneo de algumas patologias ginecológicas utilizando um biossensor vítreo com superfície de ligação de ouro reticulado por anticorpos. Essa tecnologia, como a apresentada nesta dissertação, é uma solução de fácil acesso e manuseio, ou seja, um *point-of-care* que visa sanar um problema como a finalização de diagnósticos, por muitas vezes lentos, por não terem processos ou produtos que os agilizem.

Nesse contexto, a busca pela seletividade e reprodutibilidade é essencial para a construção de um produto de alta eficácia. Foi percebido que os resultados apresentados nesse estudo com a utilização dos sensores de ouro demonstraram uma sensibilidade e seletividade, todavia é necessário desenvolver a reprodutibilidade dos mesmos. Assim sendo, é imprescindível a otimização na reprodutibilidade na produção dos sensores e no processo de funcionalização, confirmando esse argumento, Daniels e Pourmand (2007) afirmam que a reprodutibilidade irá influenciar diretamente no limite de detecção do bioensaio na aplicação no ambiente real.

8.5 Prototipagem

O processo de obtenção de um produto funcional ou protótipo é complexo. A complexidade da maturação de uma tecnologia advinda da pesquisa científica saindo da escala laboratorial para uma escala de produção industrial é um grande desafio, porém quando se consegue chegar ao alto nível de maturidade, isso pode gerar um impacto na sociedade não somente no meio científico como financeiro e social.

A prototipagem é um processo que ampara o processo de desenvolvimento do produto, visto que viabiliza a simulação do mesmo em escala real e a partir dele ajustar o que é necessário e evoluir na maturidade da tecnologia, definindo, alinhando objetivos e expectativas. O processo de prototipação foi utilizado no desenvolvimento de *software* na tecnologia de informação como evidenciado por Sommerville (2011), o processo permitiu desenvolver de forma rápida a estrutura funcional de um sistema ou parte dele, que beneficia o estágio final da tecnologia.

Nesse contexto, a miniaturização é um fator importante, corroborando Daniels e Pourmand (2007), que mostram a importância da miniaturização como uma das características de um produto para fins diagnósticos de *point-of-care*, principalmente em vista do baixo custo. Foi desenvolvido, então, um sistema portátil (figura 43), onde o leitor um potenciostato *Sensit Smart* da PalmSens que tem essa característica de portabilidade, um telefone celular e os sensores (carbono ou ouro) devidamente funcionalizados.

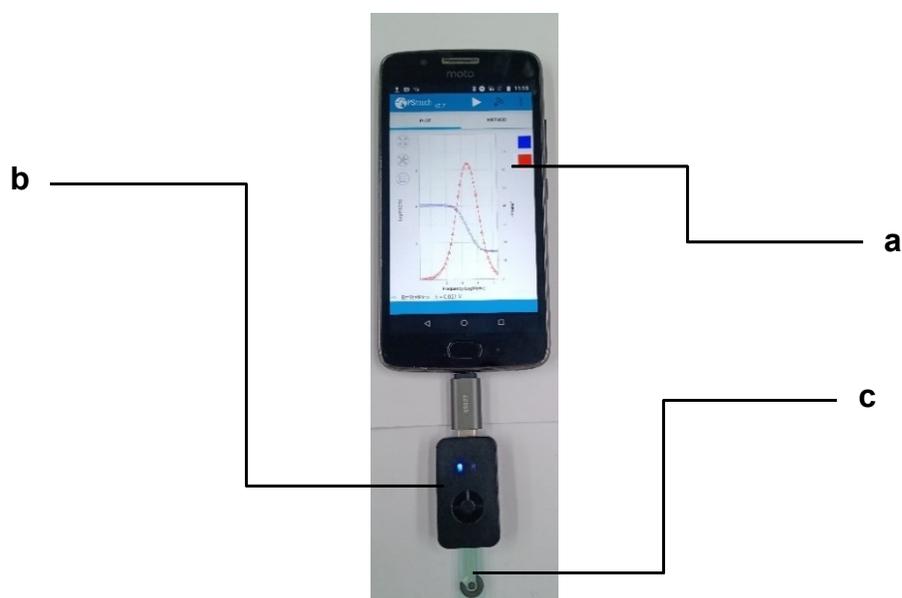
Um dos pontos cruciais para um produto *point-of-care* é o tempo de resposta, visto isso, com foco em diminuir o tempo de resposta foi escolhido uma frequência dentre as estudadas anteriormente (0,1 a 1000 Hz), essa escolha foi realizada pensando na reprodutibilidade das respostas entre os testes, com isso o tempo de resposta variou de 3 a 5 minutos para se obter o resultado do teste. Nesse contexto, visando uma exploração dos dados impedimétricos fornecidos em função da frequência foi utilizado os dados do ângulo de fase obtidos a partir do diagrama de Bode (figura 44), e impedimétricos, para elaboração de testes de sensibilidade e seletividade.

Foi constatado que a detecção do veneno escorpiônico mostra resultados esperados de sensibilidade e seletividade, tanto para os sensores de carbono quanto para os de ouro na frequência de 0,1 Hz (figura 45), realizando uma análise estatística por regressão linear. Os dados obtidos estão dentro de uma linearidade, com

dispersão quase nula, com isso gerando um coeficiente de determinação acima de 0,8 em todos os ensaios, o que confere ao teste uma variação mínima quanto à detecção do veneno em uma única frequência. Isso garante à tecnologia desenvolvida uma sensibilidade relativamente alta e promissora.

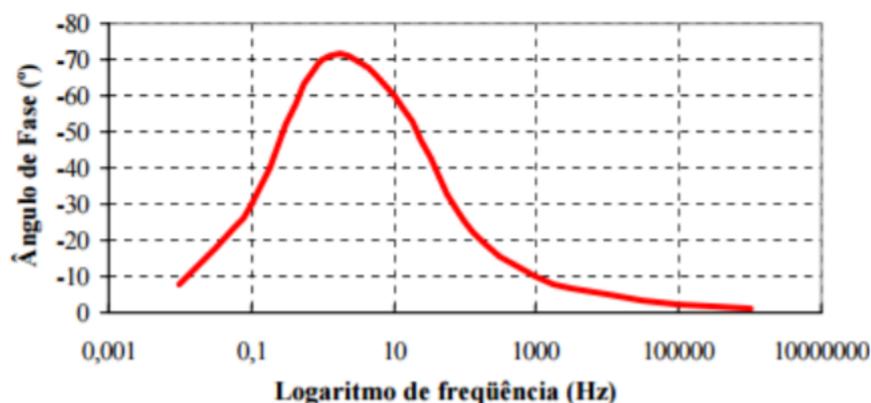
Delineou-se inicialmente um limite de detecção para os sensores de carbono e de ouro de 1 ng/mL em veneno em solução salina. Esses valores são expressivos, visto que em situações reais, o soro humano terá moléculas que poderão ser agentes interferentes à identificação do nosso analito alvo.

Figura 39 - Sistema Portátil: a: *smartphone*; b: potenciostato; c: sensor (ouro ou carbono)



Fonte: autora

Figura 40 - Diagrama de Bode: evolução do ângulo de fase x frequência



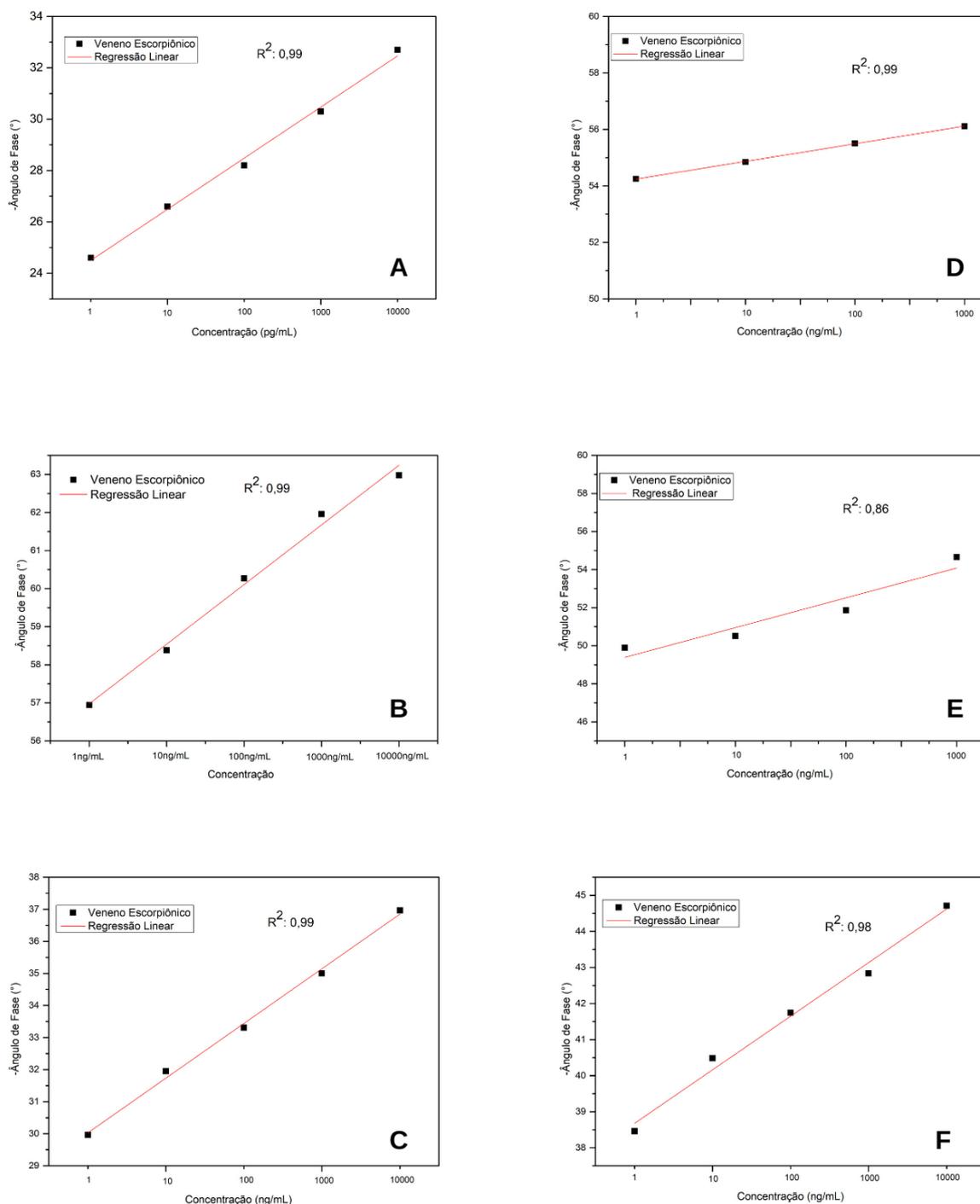
Fonte: SCHAFTINGHEN et al., 2004

Sendo assim, foi realizado análises com os controles negativos e positivos, adicionando albumina na solução do analito, proteína mais abundante no soro. Em sua revisão, Daniels e Pourmand (2007) mostraram a complexidade e o desafio dos biossensores em relação às amostras reais e seus interferentes. Para isso, foi sugerida uma preparação adequada da amostra que não afete a seletividade. Dessa maneira, a albumina foi utilizada como um branco do método no ensaio, como realizado em ensaios anteriores, assim simulou o mais próximo às condições reais das amostras que venham a ser analisadas com a tecnologia em campo. Nesse contexto, utilizou os valores da parte imaginária do diagrama de Nyquist e do ângulo de fase do diagrama de Bode na frequência de 0,1 Hz. Assim, correlacionou os dois valores e duas formas de detecção final para análise e notar a reprodutibilidade dos resultados.

O limite de detecção de 1 ng/mL e com o desconto do branco na frequência de 0,1 Hz, utilizando valores do ângulo de fase e da parte imaginária da impedância, os sensores de carbono (figura 46) apresentaram uma seletividade robusta nas análises realizadas e alta seletividade para veneno escorpiônico. A utilização dos dados do ângulo de fase e da parte imaginária da impedância em relação à frequência 0,1 Hz para os sensores de carbono podem gerar resultados para futuros testes de diagnósticos. Isso demonstra que o método de funcionalização foi eficaz. Para protótipos futuros, é fundamental garantir a reprodutibilidade na fabricação do sensor e no processo de funcionalização.

Quanto aos sensores de ouro (figura 47), os dados da parte imaginária da impedância não foram seletivos como os dados do ângulo de fase, comparado aos sensores de carbono, o que pode acontecer pela falta de reprodutibilidade do processo de funcionalização ou de produção do sensor, com isso observou que os resultados com os dados do ângulo de fase são mais seletivos.

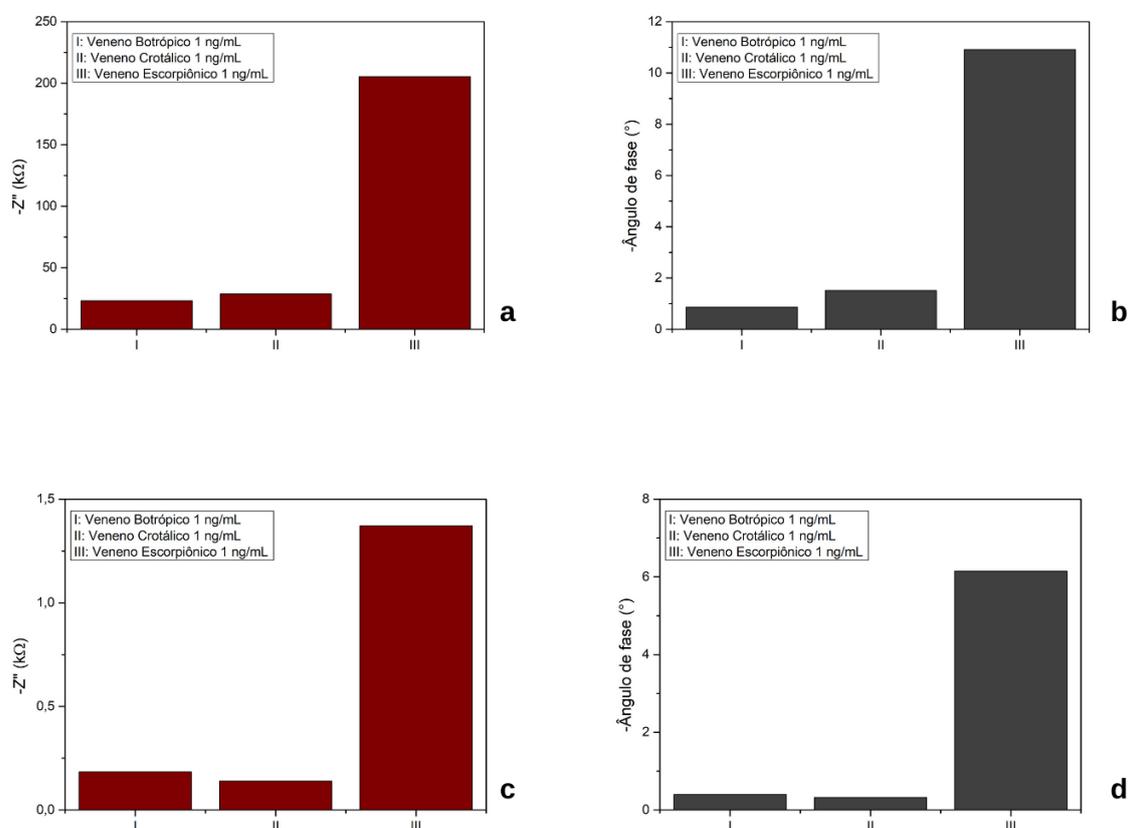
Figura 41 - Detecção de veneno a partir da evolução do ângulo de fase na frequência de 0,1 Hz, com análise regressiva. A, B e C: sensor de carbono; D, E e F: sensor de ouro



Em outro ensaio foi verificada a relação entre dois sensores de ouro (figura 48), enquanto a seletividade, os dois de características impedimétricas básicas semelhantes, foram funcionalizados utilizando as mesmas condições técnicas, um

deles foi realizado o teste de detecção com o controle negativo (veneno botrópico) e outro com controle positivo (veneno escorpiônico). A relação entre os dois sensores apresentou uma resposta esperada tanto os dados impedimétricos quanto os do ângulo de fase foram seletivos. Com isso, observou-se que são necessários testes de relação entre sensores e observar a reprodutibilidade da fabricação e da funcionalização, os quais são necessários para os testes *point-of-care*.

Figura 42 – Análise de seletividade utilizando sensores de carbono na frequência de 0,1 Hz, com retirada do branco dos controles, a e c: dados impedimétricos; b e d: dados do ângulo de fase



A utilização de uma frequência para a análise diminuiu consideravelmente o tempo de detecção. Para os sensores de carbono, foi utilizado tanto dados impedimétricos quanto dados do ângulo de fase. Para os sensores de ouro apenas a fase inicialmente, porém com um refinamento da técnica futuramente poderá escolher quais dados utilizar e delinear quais deles podem aprimorar os resultados. Tendo conseguido o sistema portátil e a reprodutibilidade desses resultados em laboratório, poderá evoluir para um primeiro protótipo, que será levado a um processo de

validação com amostras reais em um ambiente controlado inicialmente, e depois validado em campo.

Figura 43 - Análise de seletividade utilizando sensores de ouro na frequência de 0,1 Hz, com retirada do branco dos controles, a e c: dados da parte imaginária da impedância; b e d: dados do ângulo de fase

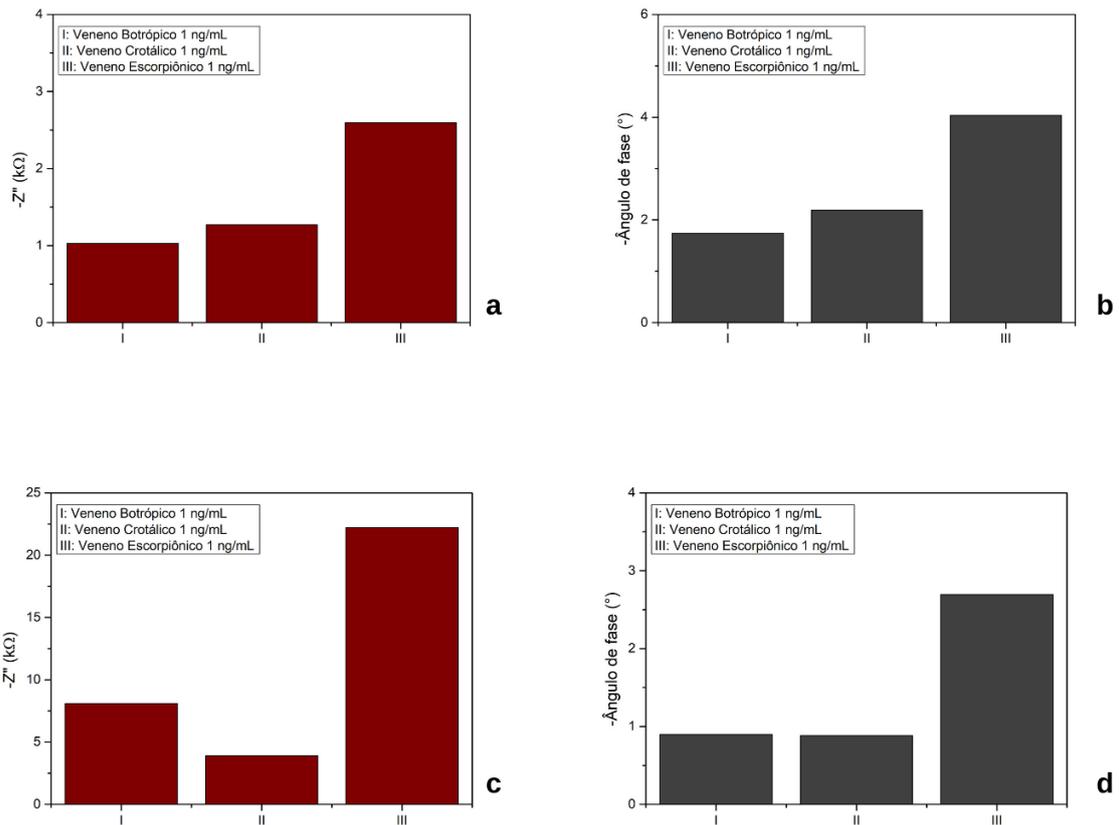
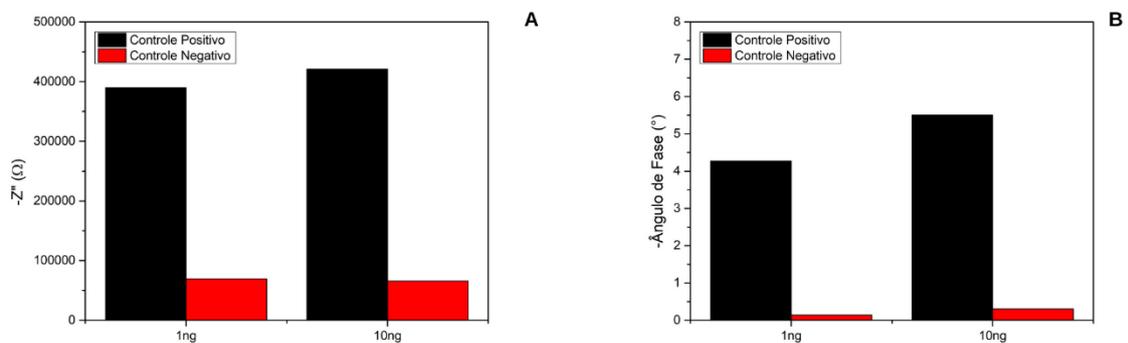


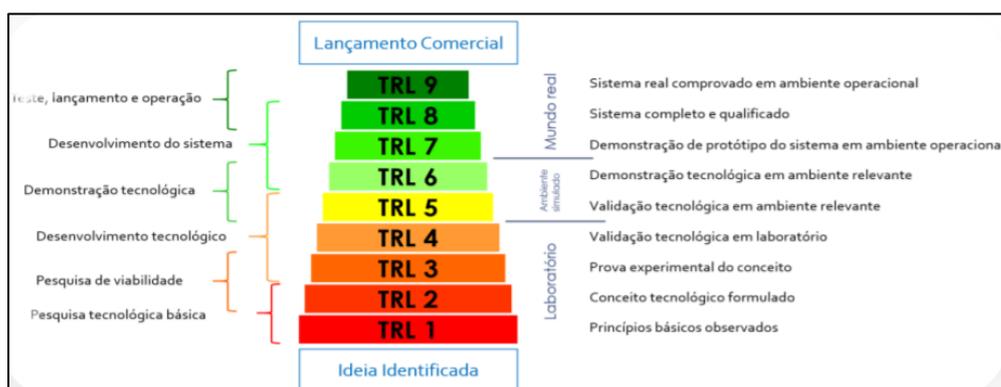
Figura 44 - Análise de seletividade. Relação entre sensores diferentes com detecções de controle negativo e positivo, sendo A: dados da parte imaginária da impedância e B: dados do ângulo de fase na frequência de 0,1 Hz



8.6 Maturidade tecnológica

As pesquisas científicas que geram novas tecnologias têm que passar por diversos níveis, desde o processo de ideação até um produto à venda no mercado. Corroborando com isso, Velho e seus colaboradores (2017) argumentaram que toda tecnologia quando é inventada deve ser sujeita à experimentação, simulação, refinamento, prototipagem e ensaios de desempenho até que esteja pronta para comercialização. Visto isso, os níveis de maturidade tecnológica ou *Technology Readiness Level* (TRL) (figura 49), sendo uma sistemática métrica utilizada pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) criada por Stan Sadin em 1974 (BANKE, 2010).

Figura 45 - Adaptação da escala de TRL



Fonte: Rodrigues e colaboradores (2019)

Através da avaliação da tecnologia proposta nesse estudo e sua evolução dentro dos níveis de maturação tecnológica, concluiu que essa está entre os níveis 3 e 4 da escala TRL, saindo de uma prova experimental do conceito, para uma validação tecnológica em laboratório. É relevante citar que essa maturidade é atrelada ao desenvolvimento dos sensores cedidos, pois eles também se encontram ainda em processo de validação, demandando melhoria na reprodutibilidade.

9 CONCLUSÃO

9.1 Impactos e Contribuições

O estudo aqui apresentado é o começo para a produção de um método diagnóstico rápido para acidentes escorpiônicos. A sequência deste estudo visando à maturação tecnológica com sua validação, qualificação e estudo de mercado completo irá impactar diretamente no número de óbitos registrados, que em 2020 dobrou.

Nesse contexto, foi realizado nesse estudo a purificação dos anticorpos escorpiônicos específicos, a purificação e caracterização da quitina e quitosana, foi testado os métodos de funcionalização, foi analisado a especificidade frente a venenos ofídicos e foi demonstrando uma inicial linearidade, sensibilidade e seletividade nas detecções utilizando sensores de carbono e ouro.

Em suma, a possibilidade de duas tecnologias, uma com a utilização dos sensores de carbono e outra com a utilização dos sensores de ouro, com o refinamento, padronização e reprodutibilidade dos testes em ambiente laboratorial poderá alcançar um nível de maturidade elevado para validação em ambiente relevante utilizando amostras reais.

Foi apresentado nesse estudo dois sensores com limite de detecção de 1 ng/mL, valor relativamente promissor para produção de um produto para detecção rápida em baixa concentração de analito no sangue, sendo o caso de acidentes escorpiônicos.

Enquanto a inovação na biotecnologia existe muitos desafios até mesmo o conceito está em constante mudança, sendo que focando neste estudo, foi delimitado um conceito onde as inovações biotecnológicas são o desenvolvimento de um produto ou processo obtidos através da pesquisa científica, geralmente vinda das universidades, fundações do Estado ou centros de pesquisa privados, onde os entregáveis geralmente impactam diretamente em mercados diversos como saúde, agrônomo e ambiental.

Em suma, este estudo que se encontra ainda em escala laboratorial, será de extrema importância para a produção final de uma inovação no meio biotecnológico, visto que não há no mercado forma de diagnosticar rapidamente e com precisão

acidentes escorpiônicos. Utilizando os sensores e a metodologia de funcionalização aqui expostos poderá desenvolver outras finalidades visando outros mercados como ambiental, fiscal e outros, passando pelo processo de pivotagem, ou seja, mudança no modelo de negócio.

9.2 Perspectivas Futuras

O estudo aqui apresentado necessita de vários refinamentos para chegar ao seu nível de maturidade máximo e assim iniciar o uso em campo. As perspectivas futuras são:

- A purificação do anticorpo frente a outros aracnídeos para ser altamente específico para escorpião;
- O uso da quitosana do mexilhão-dourado como agente polimerizante na funcionalização;
- Teste com amostras controladas, isto é, utilização de soros de mamíferos com veneno para delinear a seletividade frente a um meio com interferentes;
- Garantir a reprodutibilidade na produção dos sensores;
- Desenvolver um protótipo de campo funcional e validar o mesmo com amostras reais;
- Estudo de escalonamento da tecnologia;
- Estudo mercadológico de para entender a demanda do mercado.

REFERÊNCIAS

1. ADHIKARI, B. & MAJUMDAR, S. **Polymers in sensor applications**. Journal Progress in Polymer, v. 29, n. 7, p. 699-766, 2004.
2. ALFAYA, A. A .S. & KUBOTA, L. T. **A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores**. Revista Química Nova, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
3. AMIRTHALINGAM, S. e RANGASAMY, J. Chitosan-Based Biosensor Fabrication and Biosensing Applications. In: JAYAKUMAR R., PRABAHARAN M. (eds) **Chitosan for Biomaterials III. Advances in Polymer Science**, vol 287. Springer, 2021.
4. ARNOLD, M. A.; RECHNITZ, G. A. Biosensors based on plant and animal tissue. In: TURNER, A.P.F.; KARUBE, I.; WILSON, G.S. **Biosensors: Fundamentals and Applications**. New York, Oxford University Press, p. 30-59, 1987.
5. AYRA, S. K.; BHANSALI, S. **Anti-Prostate Specific Antigen (Anti-PSA) Modified Interdigitated Microelectrode-Based Impedimetric Biosensor for PSA Detection**. Biosensors Journal, v. 1, p. 1-7, 2012.
6. BANKE, J. **Technology readiness levels demystified**. NASA, 2010.
7. BĂNICĂ, F. G. **Dynamic Electrochemistry Transduction Methods**. p. 1–56, 2012,
8. BARSOUKOV, E. & MACDONALD, J. R. **Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and Application**. Hoboken: Wiley, 479pp, 2018.
9. BEKIR, K., BOUSIMMA, F., BARHOUMI, H. et al. **An investigation of the well-water quality: immunosensor for pathogenic Pseudomonas aeruginosa detection based on antibody-modified poly (pyrrole-3 carboxylic acid) screen-printed carbon electrode**. Environ Sci Pollut, v. 22, p. 18669-18675, 2015.
10. BERISIO, R.; GRANATA, V.; VITAGLIANO, L.; ZAGARI, A. **Estabilidade de aminoácidos e hélice tripla de colágeno: caracterização de polipeptídeos semelhantes a colágeno contendo repetições de sequência Hyp-Hyp-Gly**. Jornal da American Chemical Society, v. 126, n. 37, p. 11402-11403, 2004
11. BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N. ESTRELA, P. **Introduction to biosensors**. Essays in Biochemistr, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2016.
12. BIACHI, CALOR. **Brazilian Health Biotechnology Innovation System: an essay about the public policy rationale**. Journal of Social, Technological and Environmental Science, v. 5, n.1, p. 14-30, 2016.
13. BRAZIL, T. K.; PORTO, T. J. **Os escorpiões**. Salvador: Cambridge University Press, 2010.

14. BHUPENDRA, K. V., & SANGLE, S. (2015). **What drives successful implementation of pollution prevention and cleaner technology strategy? The role of innovative capability.** Journal of environmental management, v. 155, p. 184-192, 2015.
15. BOUHLEL, Z.; GENARD, B.; IBRAHIM, N.; CARRINGTON, E.; BABARRO, J. M. F.; LOK, A.; FLORES, A. A. V.; PELLERIN, C.; TREMBLAY, R.; MARCOTTE, I. **Interspecies comparison of the mechanical properties and biochemical composition of byssal threads.** J. Exp. Biol. v. 220, p. 984–994, 2017.
16. BRAGA, J. R. M.; SOUZA, M. M. C.; MELO, I. M. L.; FARIA, L. E. M.; JORGE, R. J. B. **Epimiology of accidents involving venomous animals in the State of Ceará, Brazil (2077/2019).** Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, v. 54, p. 1-7, 2021.
17. BRUSCA, C. R. & BRUSCA, G. J. **Invertebrados.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 968 p. 2007.
18. CBEIH. **Centro Bioengenharia de Espécies Invasoras.** Disponível em: < Sobre o CBEIH – CBEIH >. Acesso em 24 de jan. 2022.
19. CAMPUZANO, S.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. **Current trends and challenges in bioelectrochemistry for non-invasive and early diagnosis.** Current Opinion in Electrochemistry, v. 12, p. 81-91, 2018.
20. CAMPUZANO, M.; PEDRERO, P.; PINGARRÓN, J. M. **Non-Invasive Breast Cancer Diagnosis through Electrochemical Biosensing at Different Molecular Levels.** Sensors, v. 17, n. 9, p. 1-23, 2017.
21. CAMPOLINA, D.; GUERRA, C. M. N.; GUERRA, S. D.; DIAS, M. B.; ANDRADE FILHO, A. Escorpionismo. In: ANDRADE FILHO A.; CAMPOLINA D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na prática clínica.** 2 ed. Belo Horizonte: Folium; p. 295-319, 2013.
22. CANBAZ, M. Ç.; SEZGINTÜRK; M. K. **Fabrication of a highly sensitive disposable imunossensor based on indium tin oxide substrates for biomarker detection.** Analytical Biochemistry 446, p. 9-18, 2014.
23. CANBAZ, M. Ç.; SIMSEK, Ç. S.; SEZGINTÜRK; M. K. **Electrochemical biosensor based on self-assembled monolayers modified with gold nanoparticles for detection of HER-3.** Analytica Chimica Acta, v. 814, p. 31-38, 2014.
24. CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. **Chitina characterization por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente.** Química Nova, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.
25. CANDIDO, D.; M, LUCAS,S.; SOUZA, C. A. R.; DIAZ. D.; LIRA-DA-SILVA, R. M. **Uma nova espécie de *Tityus C. L. Koch, 1836 (Scorpiones, Buthidae)* do estado da Bahia, Brasil.** Biota Neotrop 2005; 5(1): 193-200.

26. CARNEIRO, D. D. E. A. et al. **Guia de Bolso Animais Peçonhentos**.
27. CHANG, B. Y.; PARK, S. M. **Electrochemical impedance spectroscopy**. Annual review of analytical chemistry, v. 3, p. 207–229, 2010.
28. CHAUBEY, A. & MALHOTRA, B. D. **Mediated Biosensors**. Biosensors and Bioelectronics, v. 17, p. 441-456, 2002.
29. CHAVALI, A. K. & RAMJI, R. Frugal Innovation in Bioengineering for the Detection on Infectious Disease. In: NATOLI, M. E.; SCHWARZ, R. A.; BOND, M.; MOJORS. C. E.; ROHRMAN, B. A.; SMITH, C. A.; KORTUM-RICHARDS, R. R. **Advances in Point-of-care Diagnostics for Infectious Disease**. San Diego: Springer, 129pp, 2018.
30. CHENG, D. **Scorpion Envenomation: differential diagnoses**. New England Journal of Medicine, v. 37, n. 16, p. 1557-1560, 2014.
31. CHEUNG R & MACHADO C. **Acidentes por animais peçonhentos na região dos Lagos, Rio de Janeiro, Brasil**. Journal Health NPEPS, v. 2, .n. 1 , p. 73-87, 2017.
32. CHOE, W.; Durgannavar, T. A.; Chung, S.J. **Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides**. Materials, v. 9, p. 2-17, 2016.
33. CIMAFONTE. M. FULGIONE, A.; GAGLIONE, R.; PAPAIAANNI, M.; CAPPARELLI, R.; ARCIELLO, A.; CENSI, S. B.; BORRIELLO, G.; VELOTTA, R.; VENTURA, B. D. **Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of Escherichia coli in Drinking Water**. Sensors, v. 20, n. 1 p. 2-17, 2020.
34. CLARK, M. F.; LISTER, R. M.; BAR-JOSEPH, M. **ELISA Techniques**. Methods in Enzymology, v. 118, p. 742-766, 1986.
35. CLARK JR., L. C.; LYONS, C. **Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery**. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, 1962.
36. CORDEIRO, F. A.; AMORIM, F. G.; ANJOLETTE, F. A. P.; ARANTES, E. C. N. **Arachnids of Medical Importance in Brazil: main active compounds present in scorpion spider venoms and tick saliva**. Journal of Venoms Animals and Toxins, v. 21, n. 1, p. 21-24, 2015.
37. CORDEIRO. T. A. R.; GONÇALVES, M. V. C.; FRANCO, D. L.; REIS, A. B.; MARTINS, H. R.; FERREIRIA, L. F. **Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis**. Talanta, v. 195, p. 327-332, 2019.
38. CRISTEA, C.; FLOREA, A.; TERTIS, M.; SANDULESCU, R. **Immunosensors**. Biosensors, Chapter 6, 40pp, 2015.

39. CUMMING, B. **Innovation overview and future Challenges**. European journal of Innovation Management, v. 9, n. 41, p. 9-21, 1998.
40. CUPO, P.; MARQUES-AZEVEDO, M. M.; HERING, S. E. **Acidentes por animais Peçonhentos: Escorpiões e Aranhas**. Medicina Ribeirão Preto, v. 36, p. 490-497, 2003.
41. DAI, Y.; LIU, C. C. **Recent Advances on Electrochemical Biosensing Strategies toward Universal Point-of-Care Systems**. Angew. Chem. Int. Ed. 2, v, 58, 2019.
42. DANIELS, J. S.; POURMAND, N. **Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges**. Review. Electroanalysis, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.
43. DAVIDE, C.; GIUSEPPE, M.; SERENA, C. M.; et al. **Impedenciometric Biochip for the simultaneous diagnosis of *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis* and *Streptococcus agalactiae***. Depositante: Ekuberg Pharma SRL. 28 de Setembro de 2016.
44. DÁVILA, C. A. M.; DÁVILA-SPINETTI, D. F.; RAMONI-PERAZI, P.; DONIS, J. H.; SANTIAGO, J.; VILLARROEL, V, et al. Epidemiología, clínica y terapéutica del accidente escorpiónico em Venezuela. In: PANIAGUA SOLIS, J.F. **Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas**. Mexico: Instituto Bioclon; p. 115-146, 2011.
45. DIAS-LOPES, C.; PAIVA, A. L.; GUERRA-DUARTE, C.; MOLINA F.; FELICORI, L. **Venomous Arachnid Diagnostic Assays, Lessons from Past Attempts**. Toxins, v. 10n. 365, p. 1-26, 2018.
46. DOSI, G. **Sources, Procedures, and Microeconomic Effects of Innovation**. Journal of Economic Literature, v. 26, n. 3, p. 1120-1171, 1988.
47. ELDIN, M. S. M.; ELAASSAR, M. R.; ELZATAHRY, A. A.; AL-SABAH, M. M. B., HASSAN, E. A. **Covalent Immobilization of b-Galactosidase onto Amino-Functionalized PVC Microspheres**. Journal of Applied Polymer Science, v. 125, p. 1724-1735, 2011.
48. FARKA, Z.; JURIK, T.; PASTUCHA, M.; KOVAR, D.; LACINA, K.; SKLDAL, P. **Rapid Immunosensing of Salmonella Typhimurium Using Electrochemical Impedance Spectroscopy: the Effect of Sample Treatment**. Electanalysis, v. 28, n. 8, p. 1803-1809, 2016.
49. FAPESP. **Biossensores na Medicina**. Disponível em: <Biossensores na medicina : Revista Pesquisa Fapesp >. Acesso em 20 de out 2021.
50. FELIPE, Maria Sueli Soares. **Desenvolvimento Tecnológico e Inovação no Brasil: Desafios da área de Biotecnologia**. Novos Estudos, v. 78, p. 711-14, 2007.

51. FEOLA, A.; PERRONE, M. A.; PISCOPO, A. CASELA, F.; PIETRA, B. D.; MIZIO G. D. **Autopsy Findings in Case of Fatal Scorpion Sting: A Systematic Review of the Literature**. Healthcare, v. 8, p. 325 -335, 2020.
52. FET, V., SISSOM, W. D., LOWE, G., & BRAUNWALDER, M. E. **Catalog of the scorpions of the world (1758-1998)**. New York: The New York Entomological Society, 690 p. 2000.
53. FREE, A. H.; FREE, H. M. **A simple test for urine bilirubin**. Gastroenterologia, v. 24, p. 414-416, 1953.
54. FUNASA. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 120pp, 2001.
55. FUNED. **Fundação Ezequiel Dias**. A Funed. Disponível em: <A Funed - Fundação Ezequiel Dias >. Acesso em 24 de jan. 2022.
56. FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ. **Escorpionídeos**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/escorpionideos.htm>>. Acesso em 09 set. 2019.
57. FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. **Polímeros biodegradáveis - Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos**. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.
58. GARTLAND, K. M. A. EGARTLAND, J. S. **Opportunities in biotechnology**. Journal of Biotechnology, v. 282, p. 38-45, 2018.
59. GOODE, J. A.; RUSHWORTH, J. V. H.; MILLNER, P. A. **Biosensor Regeneration : A Review of Common Techniques and Outcomes**. Langmuir, v. 31, p. 6267–6276, 2015.
60. GOPINATH, S. C. B.; TANG, T-H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, T. **Current aspects in immunosensors**. Biosensors and Bioelectronics, v. 57, p. 292–302. 2014.
61. HASHIMOTO, Marcos. **Espírito empreendedor nas organizações: aumentando a competitividade através do intra-empendedorismo**. São Paulo: Saraiva, 2006.
62. HENEINE, L. G. D. **An immunological study of Brazilian snake venom antigens towards a species-specific diagnostic assay**. Tese de Doutorado, University of Birmingham, 1995.
63. HERNÁNDEZ-QUINTERO, V.; ORTIZ, E.; RENDÓM-ANAYA, M.; BECERRIL, B.; GORZO, G.; POSSANI, L.D. **Scorpion and spider venom peptides: Gene cloning and peptide expression**. Toxicon, v. 58, n. 8, p. 644-663, 2011.

64. HICKS, G. P.; UPDIKE, S. J. **The preparation and characterization of lyophilized polyacrylamide enzyme gels for chemical analysis**. *Analytical Chemistry*, v. 38, n. 6, p. 726–730, 1966.
65. HIGGINS, J. M. **Como empresas inovadoras eficazes operam? Lições da estratégia japonesa**. *Gerenciamento de criatividade e inovação*, v. 4, n. 2, p. 110–119, 1995.
66. HNASKO, T. S.; HNASKO, R. M. **The Western Blot**. Em: **Hnasko R. (eds) ELISA**. *Methods in Molecular Biology*, vol 1318. Humana Press, New York, 2015.
67. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
68. HORTA, F. M. B.; CALDEIRA, A. P.; SARES, J. A. S. **Escorpionismo em crianças e adolescentes: aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes hospitalizados**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 3, p. 351-353, 2007.
69. IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Mexilhão-dourado**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/especies-exoticas-invasoras/mexilhao-dourado>>. Acesso em 04 Set. 2020.
70. IBITOYE, E. B.; LOKMAN, I. H.; HEZMEE, M. N. M.; GOH, Y. M.; ZUKI, A. B. Z.; JIMOH, A. A. **Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket**. *Biomedical Materials*, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2018.
71. IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. **Electrochemical Biosensors: recommended definitions and Classification**. Technical report. *Pure Appl. Chem.*, v. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999.
72. JANG, M. K.; KONG, B.; JEONG, Y.; LEE, C. H.; NAH, J. W. **Physicochemical Characterization of Alfa-Chitin, Beta-Chitin, and Gama-Chitin Separated from Natural Resources**. *Journal of Polymers Science*, v. 42, p. 3423-3432, 2004.
73. JAWORSKA, M.; SAKURAI, K.; GAUDON, P.; GUIBAL, E. **Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties**. *Polymer International*, pp. 198–205, 2003.
74. JESUS-FILHO, A. L.; GOMES, E. B. P.; PEIXOTO, J. C.; PÍNHEIRO, R. ROSSETO, R. **Biotecnologia e Inovação: dos laboratórios de ensino e pesquisa às políticas públicas**. *Journal of Social, Technological and Environmental Science*, v. 5, n. 1, p. 11-13, 2016.
75. KAHN, K. B. **Understanding Innovation**. *Business Horizons*, v. 61, n. 3, p. 453-460, 2018
76. KIM, J.; CAMPBELL, A. S.; ÁVILA, B. E. F.; WANG, J. **Wearable biosensors for healthcare monitoring**. *Nature Biotechnology*, v. 37, p. 389-406, 2019.

77. KONGSUPHOL, P.; NG, H. H.; PURSEY, J. P.; ARYA, S. K.; WONG, C. C.; STULZ, E.; PARK, M. K. **EIS-based biosensor for ultra-sensitive detection of TNF- α from non-diluted Human serum**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 61, p. 274-279. 2014.
78. KUMAR, S.; BUKKITGAR, S. D.; SINGH, S.; SINGH, P. V.; REDDY, K. R.; SHETTI, N.P.; REDDY, CH. V.; SADHU, V.; NAVEEN, S. **Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Graphene Functionalized with Metal Oxide Nanostructures for Healthcare Applications**. *Chemistry, Select*, v. 4, p. 5322-5337, 2019.
79. LABELLE, J.; REPP, G.; , LIN, C.; et al. **Point-Of-Care Apparatus and Methods For Analyte Detection Using Electrochemical Impedance Or Capacitance**. Depositantes: Arizona State University; Mayo Foundation for Medical Education. WO2018/208610A1. Depósito em 11 de Maio de 2017.
80. LI, Z. & CHEN, G. Y. **Current Conjugation Methods for Immunosensors**. *Journal Nanomaterials*, v. 8, n. 278, p. 1-11, 2018.
81. LI C.; LIU, Y.; LUONG, J. H. T. **Impedance sensing of DNA binding drugs using gold substrates modified with gold nanoparticles**. *Anal Chem*, v. 77, n. 2, p. 475-485, 2005.
82. LIV, lokman. **Electrochemical immunosensor platform based on gold-clusters, cysteamine and glutaraldehyde modified electrode for diagnosing COVID-19**. *Microchemical Journal*, v. 168, 1-7, 2021.
83. LOPEZ-GALLEGO, F.; GUISAN, J. M.; BETANCOR, L. **Glutaraldehyde-Mediated Protein Immobilization**. *Methods in Molecular Biology book series*, v. 1051, p. 33-41, 2013.
84. LOURENÇO, W. R. *Scorpiones*. In: ADIS, J. (Org.). **Amazonian Arachnida and Myriapoda: identification keys to all classes, orders, families, some genera and lists of known terrestrial species**. Moscow: Pensoft Publishes, p. 399-438, 2002.
85. LOURENÇO W.R. **Parthenogenesis in Scorpions: some history – new data**. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* v. 14, n. 1, p.19-44, 2008.
86. LOURENÇO. W. R.; EICKSTEDT. V. R. D. V. *Escorpiões de importância médica*. In: 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**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, p. 182-197, 2009.
87. LOWINSOHN, D. & BERTOTTI, M. **Sensores Eletroquímicos: considerações sobre os mecanismos e funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos**. *Revista Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, 2006.

88. KHAN, R.; PAL, M.; KUZIKOV, A. V.; BULKO, T.; SUPURUN, E. V.; SHUMYANTSEVA, V. V. **Impedimetric immunosensor for detection of cardiovascular disorder risk biomarker**. *Materials Science and Engineering*, v. 68, n. 1, p. 52-58, 2016.
89. KRIFI, M. N. L.; SAVIN, S.; DEBRAY, M.; BON, C.; EL AYEB, M.; CHOUMET, V. **Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy**. *Toxicon*, v. 45, p. 187-198, 2005.
90. MAHMOOD, T. e YANG, P. C. **Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting**. *Journal of Medical Sciences*, v. 4, n. 8, p. 429-434, 2012.
91. MAIA, D. J.; PAOLI, M. A.; ALVES, O. L.; ZARBIN, A. J. G.; NEVES, S. **Síntese de Polímeros Condutores em Matrizes Sólidas Hospedeiras**. *Química Nova*, v. 23, p. 204-2015, 2000.
92. MANUAL DE OSLO. **Diretrizes para Coleta e Interpretação de Dados sobre Inovação. Produção**. Produção: ARTI e FINEP. 3. ed. 2005.
93. MCKELVEY M, ORSENIGO L. **Economics of biotechnology: a two-volume reference collection**. Cheltenham: Edward Elgar Publishers, 198pp, 2006.
94. MEBS D. **Venomous and poisonous animals: A handbook for biologists, toxicologists and toxinologists, physicians and pharmacists**. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, p. 172-178, 2002.
95. MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. **Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores**. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 7, n. 2, p. 62-77, 2012.
96. MINISTÉRIO DA SAÚDE; Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 120p, 2001.
97. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Controle de Escorpiões**. Brasília: Ministério da Saúde; 72p. 2009.
98. MIRSKY, V. M.; RIEPL, M.; WOLFBEIS, O. S. **Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen-antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes**. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 12. n. 9-10, p. 977-989, 1997.
99. MORGAN, C. L.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P.; **Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine**. *Clinical Chemistry*, v. 42, p. 193-209. 1996.

100. NARANG, J.; PUNDIR, C. S. **Construction of a triglyceride amperometric biosensor based on chitosan-ZnO nanocomposite film**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, n. 4, p. 707–715, 2011.
101. NIOSI, J. & MCKELVEY, M. **Relating business model innovations and innovation cascades: the case of biotechnology**. *Journal of Evolutionary Economics*, v. 28, n. 5, p. 1081-1109, 2018.
102. NUNES, C. S.; BEVILACQUA, P.D.; JARDIM, C. C. G. **Aspectos demográficos e espaciais dos acidentes escorpiônicos no Distrito Sanitário Noroeste, Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, 1993 a 1996**. *Caderno de Saúde Pública*, v. 16, p. 213-223, 2000.
103. OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. **Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana**. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 932–939, 2006.
104. OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. N. **Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos**. In: CARDOSO, J.L.; HADDAD-JR, V.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MALAQUE, C.M.S. **Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica**. São Paulo: Sarvier, pp. 6-21, 2009.
105. OUTEDA-JORGE S. **Corte e aspectos da biologia reprodutiva do escorpião brasileiro *Tityus bahiensis* (Scorpiones: Buthidae)**. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia; 2010.
106. PANDEY, C. M.; AUGUSTINE, S.; KUMAR, S.; KUMAR, S.; NARA, S.; SRIVASTAVA, S.; MALHOTRA, B. S. **Microfluidics based Point-of-care Diagnostics**. *Journal Biotechnonology*, v. 13, p. 1-11, 2017.
107. PATACAS, R. C. **Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2007.
108. PAULINO, A. T.; SIMIONATO, J. I.; GARCIA, J. C.; NOZAKI, J. **Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides**. *Journal Carbohydrate Polymers*, v. 64, p. 98-103, 2006.
109. PETER, M.; BINULAL, N. S.; SOUMYA, S.; NAIR, S. V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. **Nanocomposite scaffolds of bioactive glass ceramic nanoparticles disseminated chitosan matrix for tissue engineering applications**. *Carbohydrate Polymers*, v.79, n. 2, p. 284-289, 2010.
110. POLIS G. A. **The Biology of Scorpions**. California: Stanford University Press; 587p. 1990.

111. PORTO T. J & BRAZIL T. K. Quem são os escorpiões? In: Brazil T.K & Porto, T. J. **Os Escorpiões**. Salvador: Edufpa; 2011b. p. 15-32.
112. PRODROMIDIS, M. I. **Impedimetric immunosensors—A review**. *Electrochimica Acta*, v; 55, p. 4227-4233, 2010.
113. PUMERA, M. SANCHEZ, S.; ICHINOSE, I.; TANG, J. **Electrochemical Nanobiosensors**. *Journal, Sensors and Actuators*, v. 123, p. 1195-1205, 2007.
114. RAPOSO, M. & OLIVEIRA, O. N. **Energies of Adsorption of Poly (o-methoxyaniline) Layer-by-Layer Films**. *Langmuir*, v.16, p. 2839-44, 2000.
115. RASTI, H.; PARIVAR, K.; BAHARARA, J.; IRANSHAHI, M.; NAMVAR, F. **Chitin from the Mollusc Chiton: Extraction, Characterization and Chitosan Preparation**. *Journal of Pharmaceutical Reserch*, v. 16, n. 1, p. 366-379, 2017.
116. REIN, J. O. **The scorpion files**. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology, 2017.
117. ROCHA, C. R. **Aceleração corporativa: uma análise de sua dinâmica e implicações, com base em cinco iniciativas brasileiras**. Minas Gerais. 2017. 149 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Tecnológica e Propriedade de Intelectual) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
118. RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. **Overview of scorpion toxins specificfor $N\alpha$ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution**. *Toxicon* v.46, p.831-844, 2004.
119. ROGERS. E. M. **Diffusion of innovations**. 4 ed. New York: The Free Press, 519pp, 1995.
120. ROSA, J. P.; SOARES, R. S.; DOMINGOS, A. P. **A estratégia da inovação, a chave para o desenvolvimento: uma comparação entre a realidade brasileira e americana**. *Iberoamerican Journal of Industrial Engineering*. 2018, Vol. 10 Issue 19, p157-176. 20p.
121. ROUQUAYROL, M. Z. **Epidemiologia e Saúde**. 4^a ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 1993.
122. RUIZ-HERRERA, J. **The distribution and quantitative importance of chitin in fungi**. In **Proc. First Internal. Conf. Chitin and Chitosan**, MIT Sea Grant Report, v. 78, n. 7, p. 11-21, 1978.
123. SAGNELLA, S.; MAI-NGAM, K. **Chitosan based surfactant polymers designed to improve blood compatibility on biomaterials**. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, v.42, n.2, p.147-155, 2005.

124. SANCHEZ - CASTRO E. E, et al. **Mesenchymal Stromal Cell - Based Therapies as Promising Treatments for Muscle Regeneration After Snakebite Envenoming.** Immunol, v. 11, p. 1-17, 2021.
125. SANTOS, M. J.; PERIN, M. G.; SAMPAIO, C. H. **Capacidade de inovação de produto: Percepção dos gestores.** Revista Pretexto, v. 19, n. 1, p. 43-55, 2018.
126. SASSOLAS, A. L. J.; BLUM, B. D. LECA-BOUVIER. **Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors.** Biotechnol Adv, v.30, n.3, p. 489-511, 2013.
127. SEKAR, N.; RAMASAMY, R. **Electrochemical Impedance Spectroscopy for Microbial Fuel Cell Characterization.** Journal Microbial & Biochemical Technology, p. 1-15, 2013.
128. SEZGINTÜRK, M. K. **A new impedimetric biosensor utilizing VEGF receptor-1 (Flt-1): Early diagnosis of vascular endothelial growth factor in breast cancer.** Biosensors Bioelectronics, v. 26, n. 10, p. 4032-4039, 2011.
129. SCHAFTINGHEN, T. V.; PEN, C. L.; TERRYN, H.; HÖRZENBERGER, F. **Investigation of the barrier properties of silanes on cold rolled steel.** Electrochimica Acta, New York, v. 49, n.17-18, p. 2997-3004, 2004.
130. SCHUMPETER, J. A. **A teoria do desenvolvimento econômico.** São Paulo: Nova Cultural, 1988.
131. SHAMSUDDIN, S. H.; GIBSON, T. D.; TOMILINSON, D. C.; MCPHERSON, M. J.; JAYNE, D. G.; MILLNER, P. A. **Reagentless Affiner and antibody-based impedimetric biosensors for CEA-detection using a novel non-conducting Polymer.** Biosensors and Bioelectronics, v. 178, p. 1-8, 2021.
132. SILVA, L. M. C. **Desenvolvimento de um biossensores Eletroquímicos para Fenol e Ureia com Foco na Aplicação Ambiental.** 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Biológicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.
133. SISSOM, W. D. **Systematics, biogeography, and paleontology.** In G. A. POLIS (Ed.), The biology of scorpions. Stanford, p. 64-160, 1990.
134. SRIVASTAVA, S.; KUSHAG, P.; TAKWA, M. S. S. et al. **Biosensor for Diagnosis of Thyroid Dysfunction.** Depositante: Thyrolytics Ab. WO2020012001A1. Deposito em: 16 de Janeiro 2020.
135. SRIVASTAVA, A.; O'CONNOR, I. B.; PANDIT, A.; WALL, J. G. **Polymer-antibody fragment conjugates for biomedical applications.** Progress in Polymer Science, v. 39, n. 2, p. 308-329, 2014.
136. SOMMERVILLE, I. **Engenharia De Software.** São Paulo: Pearson, 2011. p. 544. Acesso em: 18 nov. 2021.

137. SOUZA, R. L. G.; DELAZARI, S.; SEVERO, E. A. **A Percepção das Gerações Sobre a Inovação de Produto: Um Estudo no Norte do Rio Grande do Sul**. Revista IPTEC, v. 5, n.1, p. 26-44, 2017.
138. TANG, A. **The World Congress on Biosensor**. Biosensors and Bioelectronics, v. 26, p. 1129-1130, 2010.7
139. TĂNASE, E. E.; RÂPĂ, M.; POPA, O. **Biopolymers Based on Renewable Resources - a Review**. 2014.
140. THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F.S. **Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential**. Food Science and Nutrition, v. 43, n. 1, p. 61-87, 2012.
141. THÉVENOT, D. R. et al. **Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications**. Biosensors and Bioelectronics, v. 16, p. 121-131, 2001.
142. TONHI, E., PLEPIS, A. M. G. **Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-Quitossana**. Química Nova, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.
143. TORRES FREIRE C. E. **Biotecnologia no Brasil: Uma Atividade Econômica baseada em Empresa, academia e Estado**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
144. TORREZ. P. P. Q.; DOURADO, F. S.; BERTANI, R.; CUPO, P.; FRANÇA. F. O. S. **Scorpionism in Brazil: exponential growth of accidents and deaths from scorpion stings**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 52, p. 1-3, 2018.
145. USLU, B.; OZKAN, S. **Solid Electrodes in electroanalytical chemistry: presente applications and prospects for high throughput screening of drug compounds**. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, v. 10, p. 495-513, 2007.
146. USPTO. **United States Patent and Trademark Office**. Disponível em: <<http://patft.uspto.gov/>>. Acesso em 07 Set 2020.
147. VALDERRAMA, R. **Animales ponzoñosos em latinoamérica**. Biomedica, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2009.
148. VELHO, S. R. K.; SIMONETTI, M. L.; SOUZA, C. R. P.; LKEGAMI, W. Y. **Nível de Maturidade Tecnológica: uma sistemática para ordenar tecnologias**. Parc. Estrat. V. 22, n. 45, p. 119-145, 2017.
149. VIDAL, F. S. **Uso de Métodos Químicos como Ferramenta de Prevenção e Controle do Mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei* (DUNKER, 1857)**. Dissertação. Escola de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 83pp, 2019.
150. WHO. **Rabies and envenomings: a neglected public health issue**. Geneva: World Health Organization; 2007.

151. YI, W.; DUN, Z. **Impedance Sensor for Detecting Microbes Quickly and CONstruction Method Thereof**. Depositante: Instituto de Oceanologia, Academia Chinesa de Ciências. CN2010101467501A. Deposito em: 09 de Abril 2010.
152. ZHOU, Q. Z. K. & CHEN, X. D. Immobilization of beta-galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *Journal of Food Engineering*, v. 48, n. 1, p. 69-74, 2001.