
UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DIAGNÓSTICO DE DENGUE.**

JULIANA CECCHETTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 2014

Araraquara

2014

JULIANA CECCHETTO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DIAGNÓSTICO
DE DENGUE.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno
Co-orientadora: Dr. Fernanda Carvalho

Araraquara
2014

JULIANA CECCHETTO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 26 de setembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Profª Drª Hideko Yamanaka
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – CCET/UFSCAR, São Carlos

DADOS CURRICULARES

JULIANA CECCHETTO

DADOS PESSOAIS

Nascimento: 03/07/1982 - Araraquara/SP - Brasil

Nacionalidade: Brasileira

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,

Instituto de Química de Araraquara

R. Prof. Francisco Degni, nº 55

Quitandinha – Araraquara – CEP: 14800-900, SP - Brasil

URL da home page: www.iq.unesp.br

Endereço eletrônico

E-mail para contato: jucecchetto@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2004-2007 Graduação em Ciências – Licenciatura Plena.

Centro Universitário Barão de Mauá

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP- Vínculo institucional.

2012 - Atual. Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestranda, Regime: Dedicção: exclusiva.

2. Fundecitrus: Vínculo empregatício. Análise de pragas em Citrus (PCR, PCR em tempo real, Eletroforese, ELISA e Clonagem gênica) (2011 e 2012).

3. Escolas Estaduais: Professora de Biologia e Química (2008).

4. Bicho sem grilos: Aquarista (animais de água doce e marinos) (2006).

5. USP Universidade de São Paulo: (Departamento de Genética). Estágio e apoio no Projeto: Determinação dos perfis eletroforéticos de alimento larval de *Frieseomelitta varia* (2005).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Silvia Figueira Cecchetto e José Marcos Cecchetto, pelo apoio de todos estes anos, ensinando-me, a importância dos verdadeiros valores e luta pelos meus sonhos. Á minha irmã, Fabiana Cecchetto, pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar e me dar força interior para superar as dificuldades, mostrando-me os caminhos nas horas incertas.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno, pela confiança, orientação, apoio e principalmente pela formação profissional fornecida durante a execução deste trabalho.

Á Fernanda Carvalho, pelo constante apoio, ensinamento e incentivo, pela formação tanto profissional quanto pessoal, sendo essencial para execução deste trabalho. E, acima de tudo, por acreditar em minha capacidade.

Aos amigos e companheiros de laboratório Adriano Santos, Denise Martins, Flávio Bedatty, Juliana Sá, Luís Gonçalves, Márcio Góes, Márcio Santos, Simone Marques, Tiago Benites, Welder Callera e Willian Ribeiro, pela amizade, apoio, carinho e pelas discussões e contribuições no trabalho.

Á Rose Portasio, pelo apoio nas questões técnico-administrativas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia, pela formação.

Aos funcionários da seção de pós-graduação e da biblioteca que sempre foram solícitos e compreensivos ante as necessidades que demandamos cotidianamente.

A todos os funcionários do Instituto de Química, da UNESP, campus Araraquara - SP.

Á CAPES pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me apoiaram e colaboraram para realização deste trabalho.

“É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão que se sentar fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes, em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King

RESUMO

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por um *Flavivirus*, transmitido pela picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado. Sua evolução é rápida, o diagnóstico é baseado em sintomas clínicos imprecisos e laboratorial demorado e inespecífico, o tratamento é paliativo, trata-se os sintomas e não a infecção. Neste contexto, a proteína NS1, glicoproteína não estrutural do vírus da dengue, tem sido utilizada comercialmente como alvo para diagnóstico, pelo método ELISA. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um biossensor eletroquímico para diagnóstico da dengue baseado na detecção da proteína NS1, por técnica impedimétrica e capacitiva. Pela técnica impedimétrica, monocamadas auto-organizadas de alcanotióis, sobre os eletrodos de ouro, formadas pelo ácido 11-mercaptoundecanóico e 6-mercapto-1-hexanol foram usadas para ancorar o anticorpo anti-NS1 e minimizar o impedimento estérico entre as proteínas, respectivamente. Esta camada funcionalizada e sua interação com o analito, proteína NS1, geram um bloqueio para reações redox da espécie eletroativa $[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{Fe}^{+3}(\text{CN})_6]^{3-}$ contidas na solução de PBS, resultando em um aumento da resistência a transferência de carga em função da concentração do analito alvo. Para a abordagem capacitiva, foram utilizados os alcanotióis ácido 16-mercaptohexadecanoico e 11-ferrocenil-undecanotiol sobre o eletrodo de ouro para ancorar o anticorpo anti-NS1 e as medidas foram realizadas em TBAClO_4 dissolvido em acetonitrila. Nesta técnica, esta camada funcionalizada e sua interação com o analito, proteína NS1, geram uma variação do sinal de capacitância redox (C_r). Por Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e Voltametria Cíclica (CV), pôde-se verificar que a capacidade impedimétrica à transferência de carga foi gradativamente aumentada pela construção da monocamada, imobilização do anticorpo anti-NS1 e adições crescentes de NS1 diluída em PBS ou soro. Os valores estimados foram extraídos e sua relação com a concentração gerou uma curva analítica. Com a proteína diluída em PBS, foram obtidos excelentes limites de detecção e quantificação, 0,003 $\mu\text{g/mL}$ ou $6,25 \times 10^{-11}$ mol/L e 0,006 $\mu\text{g/mL}$ ou $1,25 \times 10^{-10}$ mol/L, respectivamente. Para NS1 diluída em soro humano, os limites de detecção (0,03 $\mu\text{g/mL}$ ou $6,25 \times 10^{-10}$ mol/L) foram muito satisfatórios. Contudo, os limites de quantificação obtidos (29,56 $\mu\text{g/mL}$ ou $6,16 \times 10^{-7}$ mol/L) ainda sugerem

necessidade de ajustes para emprego da técnica. Por Espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECS) pôde-se verificar uma variação de C_r (capacitância redox), resultante da capacidade de armazenamento de energia eletroquímica desta interface e o sinal de C_r pôde ser utilizado como sinal analítico. Os limites de detecção e quantificação para capacitância foram 0,0005 $\mu\text{g/mL}$ ou $1,04 \times 10^{-11}$ mol/L e 0,003 $\mu\text{g/mL}$ ou $6,25 \times 10^{-11}$ mol/L, respectivamente, obtidos para amostras de NS1 diluídas em PBS, sugerindo que esta técnica apresenta maior sensibilidade comparada com EIS. O aprimoramento desta abordagem e da engenharia de superfície pode oferecer uma alternativa atraente do tipo *point-of-care* para o diagnóstico da dengue.

Palavras-chave: Biossensores. Dengue. Diagnóstico. Espectroscopia de capacitância eletroquímica derivada da impedância. Espectroscopia de impedância eletroquímica. NS1.

ABSTRACT

Dengue is a non-contagious infectious disease caused by a *Flavivirus* transmitted by a bite of infected mosquito *Aedes aegypti*. The evolution is fast, the diagnosis is based on clinical symptoms inaccurate and prolonged and nonspecific laboratory, the treatment is palliative, is treated the symptoms and not the infection. In this context, NS1 protein, nonstructural glycoprotein of dengue virus has been used commercially as a diagnostic target by ELISA. The aim of this study was to develop an electrochemical biosensor for dengue diagnosis based on the detection of this protein, by impedimetric and capacitive technique. Through impedimetric technique, self-assembled monolayers of alkanethiols on gold electrodes formed by 11-mercaptoundecanoic acid and 6-mercapto-1-hexanol were used to anchor the anti-NS1 antibody and minimize steric hindrance between the proteins, respectively. This functionalized layer and its interaction with the analyte, the NS1 protein, generate a lock for redox reactions of electroactive species $[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{Fe}^{+3}(\text{CN})_6]^{3-}$ contained in the PBS solution, resulting in an increase in charge transfer resistance due to the concentration of the target analyte. For capacitive approach, alkanethiols acid 16-mercaptohexadecanoico and 11-ferrocenyl-undecanotiol on gold electrode were used to anchor the anti-NS1 antibody and measurements were performed in TBAClO_4 dissolved in acetonitril. In this technique instead of a steric hindrance, this functionalized layer and its interaction with the analyte, the NS1 protein, generate a variation of signal redox capacitance (C_r). Initially ELISA test was performed to verify and confirm the specificity of interaction anti-NS1 by NS1. Through Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) can be verified that impedimetric ability to transfer load was gradually increased by the construction of the monolayer, immobilization of anti-NS1 and increasing additions of NS1 diluted in PBS or serum. The estimated values were extracted and their relation to the concentration generated a calibration curve. With diluted protein in PBS, excellent limits of detection and quantification $0.003 \mu\text{g/mL}$ or $6.25 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ and $0,006 \mu\text{g/mL}$ or $1.25 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, respectively, were obtained. For NS1 diluted in human serum, limits of detection ($0.03 \mu\text{g/mL}$ or $6.25 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$) were very satisfactory. However, limits of quantification obtained ($29.56 \mu\text{g/mL}$ or $6.16 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) suggest the need for adjustment to use this technique. Through Electrochemical capacitance

spectroscopy (ECS) it could be verified a variation of C_r (redox capacitance), resulting from the electrochemical energy storage capacity of this interface and the signal C_r could be used as an analytical signal. The limits of detection and quantification 0.0005 $\mu\text{g/mL}$ or 1.04×10^{-11} mol/L and 0.003 $\mu\text{g/mL}$ or 6.25×10^{-11} mol/L, respectively, were obtained for samples of NS1 diluted in PBS, suggesting that this technique presents greater sensitivity compared to the EIS. The improvement of this approach and surface engineering may offer an attractive alternative as a point-of-care for dengue diagnosis.

Keywords: Biosensors. Dengue. Diagnosis. Electrochemical capacitance spectroscopy derived impedance. Electrochemical impedance spectroscopy. NS1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição mundial das áreas de risco de infecção de dengue no ano de 2008.....24
- Figura 2.** Processo de infecção pelo vírus da Dengue. O vírus pode ser encontrado no organismo principalmente no período febril (viremia), juntamente com seu material genético (RNA) e o antígeno característico (proteína NS1) se estendendo até o final da fase crítica. A produção de anticorpos (IgM e IgG) se inicia na fase crítica e atinge o pico na fase de recuperação, permanecendo em níveis reduzidos no organismo podendo ter seus níveis aumentados rapidamente após uma reinfecção.(SIMMONS et al., 2012).....26
- Figura 3.** Estrutura do vírus da Dengue. Determinada a uma resolução de 9,5 Å por crio-EM e técnicas de reconstrução de imagem que estabelece a disposição estrutural secundária do envelope (E) e proteínas de membrana (M) no envelope lipídico. Cadeias de proteínas são coloridas a partir do N-terminal para C-terminal, utilizando gradiente de cor em arco-íris (espectro), retirada de ZHANG et al., 2013.27
- Figura 4.** Representação do genoma do vírus da Dengue. Região Estrutural: C = proteína capsídeo, prM = proteína de membrana, E = proteína do envelope. Região Não Estrutural: proteína NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, adaptado de PEREIRA, 2008.....27
- Figura 5.** Estrutura cristalina de um dímero da proteína não estrutural NS1 do vírus da dengue. Cadeias das proteínas são coloridas a partir do N-terminal para o terminal-C (resíduos 172 - 352), utilizando um espectro de gradiente de cor arco-íris. A descrição da estrutura cristalina foi realizada por difração de raio-X, resolução de 2.69 Å, a proteína é composta por 9% helicoidal (6 hélices e 18 resíduos) e 29% folha beta (15 fios e 54 resíduos). A montagem biológica é gerada pelo PISA (software), dados obtidos de EDELING et al., 2014.....30
- Figura 6.** a) Circuito de Randles utilizado para ajustar os dados experimentais de espectroscopia de impedância faradaica. b) Espectro típico de Nyquist de impedância faradaica associado ao circuito mostrado em (a). No circuito equivalente, R_{ct} (o diâmetro do semi-círculo no espectro de impedância) representa a resistência de transferência eletrônica que controla a cinética de elétrons de transferência da sonda redox na interface do eletrodo. Z' é a impedância real associada aos valores de resistência à transferência de carga, enquanto que Z'' é a impedância imaginária que se correlaciona a capacitância da dupla camada elétrica.35

Figura 7. a) Representação esquemática da impedância interfacial das interfaces receptivas utilizadas no monitoramento biológico. b) Circuito equivalente capaz de modelar dados do biossensor impedimétrico onde sonda redox está presente na solução. O elemento Warburg (Z_w) representa as características de difusão em massa da sonda redox e R_{ct} é a resistência de transferência de carga redox. A resistência (s) de eletrólito é modelado em série com a impedância interfacial total superior e, geralmente, não é importante na análise, uma vez que não varia. c) Circuito equivalente capaz de modelar biossensores eletroquímicos capacitivos. Note que a capacitância interfacial de um eletrodo modificado por uma monocamada dielétrica é definida por duas capacitâncias em série, as da monocamada (C_m) e da dupla camada (C_{dl}) onde $C_{dl} \gg C_m$, significando que C_m domina as análises e é, por conseguinte, a única representada na capacitância do circuito equivalente mostrada nestes modelos de circuitos equivalentes. Além disso, $C_m \ll C_t$ de uma forma de R_t e C_t controlar a monocamada dielétrica (não faradaica). Fonte: FERNANDES et al., 2014.39

Figura 8. Voltamograma cíclico de limpeza eletroquímica.43

Figura 9. Representações esquemáticas comparativas para (a) EIE faradaica e (b) ECE. (a) A engenharia de superfície impedimétrica faradaica é baseada na resistência de transferência de elétrons (R_{ct}) da sonda redox em solução para a superfície metálica. (b) A abordagem capacitiva não precisa de uma sonda redox em solução, mas confinada no eletrodo. A sensibilidade desta capacidade de carga é utilizada como o repórter de bioreconhecimento vizinho.....46

Figura 10. Célula eletroanalítica típica de três eletrodos para uso em EIE: (A) eletrodo auxiliar ou contra eletrodo, (B) eletrodo de referência e (C) eletrodo de trabalho.47

Figura 11. AUTOLAB® (PGSTAT302N, METROHM®).....47

Figura 12. Eletrodos de trabalho..47

Figura 13. Curva padrão para o ensaio ELISA pela interação do anticorpo anti-NS1 e o antígeno NS1. Microplacas de poliestileno foram revestidas com concentrações de antígenos NS1 (0,005 $\mu\text{g/mL}$ - 5 $\mu\text{g/mL}$). Após bloqueio com BSA 0,1% o anticorpo Anti-NS1 (1 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado, seguido de incubação com Anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase. A reação foi revelada com TMB e H_2O_2 e bloqueada com ácido sulfúrico H_2SO_4 . A leitura procedida a 450 nm. Cut off = 0.019. O coeficiente de regressão linear obtido foi 0,99.50

Figura 14. Voltametria cíclica do eletrodo de Au modificado com a monocamada mista de alcanotóis 11-MUA + C6OH no potencial -0,1 a 0,5V e velocidade de varredura 100 mV/s, evidenciando o processo de oxidação e redução da espécie

eletroativa 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. O bloqueio significativo dos processos de oxidação e redução foram gerados a partir da imobilização da SAM mista de 11-MUA e C_6OH , na proporção 1:1. No voltamograma estão as correntes de pico catódico (I_{pc}) em 30 j ($\mu\text{A cm}^{-2}$) e anódico (I_{pa}) no potencial em 0,2 V.51

Figura 15. Voltamograma cíclico da atividade redox existente na monocamada mista de alcanotióis 11-ferrocenil-undecanotiol + tiol (16-mercaptohexadecanoico) no potencial -0,2 a 0,8V com velocidade de varredura 100 mV/s medido com eletrodo de referência de Ag|AgCl. Voltamograma realizado em solução TBAClO_4 dissolvido em acetonitrila: H_2O 20:80.....52

Figura 16. a) Diagrama de Nyquist para os eletrodos utilizados nos testes impedimétricos para (a) e para testes capacitivos (b). (a) Ilustração da construção do biossensor funcionalizado, com faixa de frequência de 0.01Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. A camada mista de alcanotióis (11-Mua + C_6OH) foi funcionalizada com anticorpo anti-NS1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e, em seguida, bloqueada com adição de BSA 0,1% e (b) Resposta capacitiva para o eletrodo funcionalizado como em (a), com faixa de frequência de 0.01 Hz a 100.000 Hz, as medidas foram realizadas em solução de TBAClO_4 em acetonitrila: H_2O 20:80. A camada mista de alcanotióis (11-ferrocenil-undecanotiol + ácido 16-mercaptohexadecanoico) foi funcionalizada com anticorpo anti-NS1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e, em seguida, bloqueada com adição do Bloqueio (BSA 0,1%), e $E_{1/2} \approx 0.44$54

Figura 17. Interação par comercial Antígeno-Anticorpo (NS1 - anti-NS1) por EIE. O eletrodo funcionalizado (SAM + Anticorpo + Bloqueio) recebeu adição sucessiva de diferentes concentrações do analito (NS1: 0,01 - 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a faixa de frequência variou de 0.01 Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução.55

Figura 18. Curva padrão do imunossensor para proteína NS1 do vírus da dengue em PBS. Comparação dos valores da porcentagem (%) de variação da resistência de transferência de carga em função das diferentes concentrações do antígeno NS1. Eletrólito composto por 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução PBS pH 7.4. O coeficiente de regressão linear obtido foi 0,99.56

Figura 19. Interação do anticorpo anti-NS1 e fetuína sobre o eletrodo funcionalizado. a) Análise por EIE, com faixa de frequência de 0.01Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. A camada mista de alcanotióis (11-Mua + C_6OH) foi funcionalizada com anticorpo anti-NS1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), bloqueado com BSA 0,1% e incubada com Fetuína na concentração 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. b) Gráfico de barras representativo para resposta do biossensor frente á incubação de diferentes espécies (anticorpo anti-NS1 (Branco), Fetuína e antígeno NS1). R_n

corresponde ao R_{ct} do sensor após a incubação das espécies e R_0 corresponde ao R_{ct} do sensor após a incubação do anticorpo anti-NS1.....57

Figura 20. Interação par comercial Antígeno-Anticorpo (NS1 - anti-NS1) por EIE. a) O eletrodo funcionalizado (SAM + Anticorpo + Bloqueio + Soro sem diluição) recebeu adição sucessiva de diferentes concentrações do analito (NS1: 0,01 $\mu\text{g/mL}$ - 1 $\mu\text{g/mL}$), a faixa de frequência variou de 0.01Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. b) Mesmas condições usando Bloqueio com Gelatina 0,1% em substituição ao BSA.59

Figura 21. Interação par comercial Antígeno-Anticorpo (NS1 - anti-NS1) utilizando método EIE. O eletrodo funcionalizado (SAM + Anticorpo + Bloqueio) recebeu adição sucessiva de diferentes concentrações do analito (NS1: 0,01 $\mu\text{g/mL}$ - 1 $\mu\text{g/mL}$) diluídas em Soro puro, a faixa de frequência variou de 0.01Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução PBS pH 7.4. O bloqueio foi realizado com o próprio soro.60

Figura 22. Curva padrão obtida por EIE do imunossensor para proteína NS1 do vírus da dengue em presença de Soro sem diluição. Comparação dos valores da % de variação da resistência à transferência de carga em função das diferentes concentrações do antígeno NS1. Eletrólito composto por 1mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. O coeficiente de regressão linear obtido foi 0,97.61

Figura 23. Diagrama de Nyquist. Interação par comercial Antígeno-Anticorpo (NS1 - anti-NS1) utilizando método ECE. O eletrodo funcionalizado (SAM + Anticorpo + Bloqueio) recebeu adição sucessiva de diferentes concentrações do analito (NS1: 0,005 $\mu\text{g/mL}$ - 1 $\mu\text{g/mL}$) diluídas em PBS, a faixa de frequência variou de 0.01 Hz a 100.00 Hz, as medidas de capacitância foram realizadas em TBAClO_4 dissolvido em acetonitrila: H_2O 20:80. C_r foi obtido a partir dos diâmetros dos semicírculos.63

Figura 24. Curva padrão obtida por ECE. Comparação do percentual de variação da parte real da capacitância redox em função da variação da concentração da proteína alvo, relatando o C_r para proteína NS1 do vírus da dengue diluído em PBS. O coeficiente de regressão linear obtido foi 0,983.63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de casos notificados de dengue e taxa de incidência	25
Tabela 2. Limites de detecção relatados para biossensores de dengue referenciados pela literatura.....	31
Tabela 3. Reagentes utilizados	42
Tabela 4. Parâmetros analíticos para detecção da proteína NS1.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a	Coeficiente linear das medições
Å	Angstrom
AC	Corrente alternada
anti-NS1	Anticorpo anti-NS1
Au-SR	Ouro - enxofre - proteína (grupamento carbônico, cadeia de tamanho variável)
b	Coeficiente angular da curva padrão
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Albumina do soro bovino
C	Capsídeo
C_{dc} ou C_{dl}	Capacitância da dupla camada
cDNA	DNA complementar
C.E.E.	Circuito elétrico equivalente
C^*	Capacitância complexa total
C''	Capacitância imaginária
C'	Capacitância real
C_m	Capacitância da monocamada
C_r	Capacitância redox
$C_{r,a}$	Capacitância redox obtida na amostra
$C_{r,b}$	Capacitância redox obtida na medida no branco
CRP	Proteína C-reativa
C_t	Capacitância total
CV	Voltametria cíclica
6COH	6-mercapto-1-hexanol
DENV	<i>Dengue virus</i> , Dengue vírus
DF	<i>Dengue fever</i> , Dengue clássica
DHF	<i>Dengue hemorrhagic fever</i> , Dengue hemorrágica
DSS	<i>Dengue shock syndrome</i> , Síndrome do choque por dengue
DENV-1	Dengue Vírus Sorotipo 1
DENV-2	Dengue Vírus Sorotipo 2
DENV-3	Dengue Vírus Sorotipo 3

DENV-4	Dengue Vírus Sorotipo 4
dsRNA	<i>Double - stranded RNA</i> , RNA de fita dupla
D.O.	<i>optical density</i> , densidade ótica
<i>e</i>	Carga elementar
E	Envelope
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ECE	Espectroscopia de capacitância derivada da eletroquímica
EIE	Espectroscopia de Impedância eletroquímica
exp.	Exponencial
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
fM	Femtomolar
Hab.	Habitantes
Hz	Hertz
HRP	Horseradish peroxidase
i.e.	Isto é
I_0	Máxima amplitude de corrente
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
I_{pa}	Potencial de pico anódico
I_{pc}	Potencial de pico catódico
<i>j</i>	Componente imaginário cujo valor é $\sqrt{-1}$
Kb	Kilobase
k_B	Constante de Boltzmann
kDa	kiloDaltons
L	Litro
L.O.D	Limite de detecção
L.O.Q	Limite de quantificação
<i>n</i>	Ocupação de densidade de elétrons
NS1	Proteína Não-estrutural 1
OCP	Potencial de circuito aberto
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase

pfu	Unidade formadora de placa
prM	Proteína pré-membrana
Proteína M	Proteína de Membrana
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> , Antígeno Prostático Específico
QCM	Microbalança à cristal a quartzo
R_0	R_{ct} do sensor após a incubação do anticorpo anti-NS1
r^2	Coefficiente de regressão linear
R_{ct}	Resistência à transferência de carga
$R_{ct,a}$	Resistência de transferência de carga obtida na amostra
$R_{ct,b}$	Resistência de transferência de carga da medida no branco
R_e ou R_s	Resistência da solução eletrolítica
R_n	R_{ct} do sensor após a incubação das espécies
RNA	Ácido Ribonucléico
R_t	Resistência total
RT-PCR	<i>Reverse transcription polimerase chain reaction</i> , transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase
s	Segundo
SAM	Monocamadas auto-organizadas
SE	Semana epidemiológica
sin	Seno
t	Tempo
T	Temperatura absoluta
TBA	Tetrabutylamônio
TMB	Tetrametilbenzidina
μA	Microamper
μ_e	Potencial químico dos elétrons
>	Maior
<	Menor
°C	Grau Celsius
\leq	Menor ou igual
\approx	Aproximadamente
ΔR (%)	Porcentagem de variação da resistência à transferência de carga
ΔC_r (%)	Porcentagem de variação da capacitância redox

y	Desvio padrão das medições do ensaio em branco
Z	Impedância
Z^*	Impedância complexa total
Z'	Impedância real
Z''	Impedância imaginária
Z_w	Impedância de Warburg
$ Z $	Módulo de Z^*
11-MUA	Ácido 11-mercaptohundecanóido
γ^*	Admitância complexa
φ	Deslocamento de fase
Γ	Cobertura da superfície molecular redox

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Doenças Negligenciadas.....	22
1.2 Dengue.....	22
1.3 Histórico: a Dengue no Brasil e no mundo.....	23
1.4 Caracterização da doença.....	25
1.5 O vírus da dengue e a proteína NS1.....	27
1.6 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	30
2. DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES	32
2.1 Técnica de funcionalização do transdutor - Monocamadas Auto-organizadas (SAM, self-assembled monolayer).....	33
2.2 Voltametria cíclica (CV).....	34
2.3 Espectroscopia de capacitância eletroquímica	34
2.4 Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica derivada da Impedância.....	38
3. OBJETIVOS	41
4. METODOLOGIA	41
4.1 Materiais	42
4.1.1 Limpeza do eletrodo.....	43
4.1.2 Funcionalização do transdutor para ensaios impedimétricos.....	44
4.1.3 Interação antígeno-anticorpo por EIE.....	44
4.1.4 Funcionalização do transdutor para ensaios ECS.....	45
4.1.5 Interação antígeno anticorpo por ECS.....	45
4.1.6 Ilustração esquemática da funcionalização dos eletrodos por EIE e ECS.....	45
4.1.7 Avaliação Eletroquímica.....	46
4.1.8 Ensaio ELISA.....	48
4.2 Resultados e discussão	49
4.2.1 Construção da SAM mista para ensaios de EIE e ECS.....	50
4.2.2 Processo de Imobilização do Anticorpo e Bloqueio para ensaios de EIE e ECS.....	53
4.2.3 Interação do Anticorpo anti-NS1 com diferentes concentrações de NS1 em PBS.....	54
4.2.4 Interação do Anticorpo anti-NS1 com diferentes concentrações de NS1 em Soro.....	58
4.2.5 Interação do Anticorpo anti-NS1 com diferentes concentrações de NS1 em PBS utilizando a técnica ECS.....	62
4.2.6 Análise comparativa dos limites de detecção e quantificação obtidos por EIE e ECS.....	64
4.2.7 Considerações Finais.....	65
REFERÊNCIAS	66

1. Introdução:

1.1. Doenças Negligenciadas

Doenças negligenciadas referem-se a doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários associadas a precárias condições de vida, pobreza e as iniquidades em saúde e que afetam severamente a população das áreas tropicais e subtropicais (WHO, 2009). Dentre o grupo de doenças negligenciadas estão a dengue, doença de Chagas, hanseníase, esquistossomose, malária, leishmaniose e tuberculose. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) devido principalmente a condições sanitárias precárias, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas. Apesar do número significativo de infecções, há grande dificuldade de avanços nessa área prejudicando o desenvolvimento de novos fármacos ou métodos de diagnósticos (BRASIL, 2010).

1.2. Dengue

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por um vírus que recebe o nome de DENV, pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, transmitido pela picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado. A dengue é uma das arboviroses (virose transmitidas por artrópodes hematófagos) mais importantes do mundo, que pode ser causada por quatro diferentes formas do vírus, sendo que qualquer um dos sorotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) tem a capacidade de gerar a infecção (HALSTEAD, 2007).

A severidade da doença é influenciada pelos antecedentes genéticos e idade do paciente, a linhagem e o sorotipo do vírus infectante e o histórico de prévias infecções por dengue do paciente (AASKOV, 2003). Segundo a WHO, metade da população mundial, ou seja, cerca de 3.5 bilhões, vive em áreas onde o vetor da dengue, *Aedes aegypti*, pode ser encontrado (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE E ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014 e BRASIL, 2014).

A dengue pode se apresentar em determinados casos com a forma mais grave, como a dengue hemorrágica (DHF, do inglês *dengue hemorrhagic fever*) e a

síndrome do choque por dengue (DSS, do inglês *dengue shock syndrome*), que pode levar o paciente a óbito. Esta doença trata-se de uma enfermidade sazonal, com aumento de incidência nos períodos chuvosos, constitui um grave problema de saúde pública no Brasil e na maioria dos países tropicais em termos de morbidade e letalidade (GUZMAN, 2004). Atualmente não há tratamento antiviral específico disponível, nem mesmo medicação útil no tratamento e complicações que esta doença possa causar. O tratamento de suporte com analgésicos, reposição de líquidos e repouso é geralmente suficiente (GUZMAN, 2004 e CHAWLA, 2014).

1.3. Histórico: A Dengue no Brasil e no mundo

No século XVII, estima-se que no continente americano ocorreram os primeiros casos de dengue, embora não haja consenso entre sua origem geográfica. Algumas teorias apontam a Ásia e outras, a África como ponto de partida. Entretanto, independente da origem, sabe-se que o vírus causador da dengue, foi difundido na América através do comércio marítimo de escravos vindos das regiões asiáticas e/ou africanas (GUBLER, 1998 e AASKOV, 2003). Havendo pandemias desde o século XVIII, somente em 1940, durante a segunda Guerra Mundial os primeiros vírus da dengue foram isolados. Novas cepas de vírus da dengue e sorotipos foram introduzidas (DEN-1 em 1977, uma nova cepa de DEN-2 em 1981, DEN-4 em 1981, e uma nova estirpe de DEN-3, em 1994) (GUBLER, 1998).

Em mais de 100 países endêmicos e áreas onde há transmissão do vírus da dengue há ocorrência de mais de 50 milhões de infecções anuais. Desse total, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e aproximadamente 20 mil vêm a óbito (WHO, 2009).

No Brasil, a introdução do vírus da dengue foi relatada no século XIX e desde então a população brasileira sofre com ciclos periódicos de epidemias. No século passado, há relatos em 1916, de infestação do vírus em São Paulo e em 1923, no Rio de Janeiro, sendo a primeira transmissão em massa da dengue notificada em 1986 (BRASIL, 2002). Hoje em dia, todos os quatro sorotipos do vírus da dengue circulam no país. Mais do que três décadas desde o seu ressurgimento, o Brasil se tornou o país que produz maior número de casos no mundo (TEIXEIRA et al., 2009).

Em 2013, os países das Américas informaram mais de 2,3 milhões de casos de dengue, com 37.692 casos de dengue grave e 1.280 mortes, resultando em uma taxa de mortalidade de aproximadamente 0.05% relatados pela ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. No ano de 2013, no Brasil foram notificados 1,4 milhão de casos prováveis de dengue (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE E ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014). Em 2014, foram registrados 659.051 casos de dengue no país até a semana epidemiológica (SE) 27 (BRASIL, 2014). Somente até julho de 2014, uma epidemia de dengue em Campinas (SP) chegou à marca de 40.005 casos notificados e três mortes de acordo com balanço de registros processados divulgado por Torres, 2014.

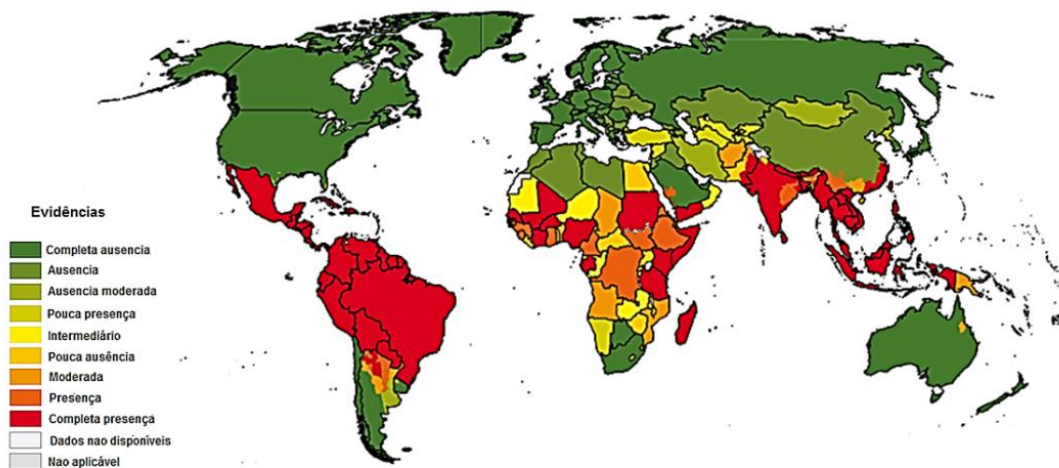


Figura 1. Distribuição mundial das áreas de risco de infecção de dengue no ano de 2008.

Fonte: Adaptada de WHO, 2008.

Casos de dengue são relatados em todo mundo desde 1780, mas devido a sua raridade não eram considerados um problema de saúde pública. Esta perspectiva mudou a partir da segunda metade do século XX, no sudeste da Ásia durante e após a Segunda Guerra Mundial, como consequência das perturbações ecológicas, que tornaram ideais as condições para proliferação de doenças causadas por mosquitos em geral (GUBLER, 1998).

Atualmente, dengue clássica e dengue hemorrágica são considerados problemas de saúde pública. Devido a diversos problemas que o aumento

populacional descontrolado causa e falta de medidas eficazes de contenção do mosquito transmissor, faz com que o problema ainda esteja fora de controle, colocando o Brasil nas estatísticas dentre os países da América Latina o que mais sofre com a doença (BRASIL, 2013; GUBLER, 1998 e CATÃO, 2011).

A Tabela 1 evidencia os dados relativos aos números de casos de dengue no país até a 27^a semana de 2014 (BRASIL, 2014).

Tabela 1. Número de casos notificados de dengue e taxa de incidência (por 100 mil hab.), por região e Unidade de Federação, 2013 e 2014.

Região/UF	SE 01 a 27		Incidência (/100 mil hab.)	
	2013 ^a	2014 ^b	2013 ^a	2014 ^b
Norte	44.671	32.476	262,6	190,9
Rondônia	8.585	3.223	496,8	186,5
Acre	2.392	5.191	308,1	668,5
Amazonas	15.787	8.078	414,6	212,1
Roraima	489	733	100,2	150,2
Pará	8.289	6.296	103,6	78,7
Nordeste	121.292	76.763	514,6	137,6
Maranhão	2.935	2.086	43,2	30,7
Piauí	3.931	5.352	123,5	168,1
Ceará	21.246	22.348	242,0	254,6
Rio Grande do Norte	12.622	7.626	374,1	226,0
Paraíba	9.337	4.783	238,5	122,2
Pernambuco	6.366	10.265	69,1	111,5
Alagoas	6.647	6.924	201,4	209,8
Sergipe	488	2.401	22,2	109,4
Bahia	57.720	14.978	383,7	99,6
Sudeste	903.686	383.212	1.069,9	453,7
Minas Gerais	414.667	77.956	2013,6	378,5
Espírito Santo	62.812	18.166	1636,0	473,2
Rio de Janeiro	208.811	9.765	1275,6	59,7
São Paulo	217.396	277.325	497,9	635,1
Sul	66.949	45.113	232,5	156,7
Paraná	66.169	44.269	601,7	402,5
Santa Catarina	353	426	5,3	6,4
Rio Grande do Sul	427	418	3,8	3,7
Centro-Oeste	252.178	121.487	1.681,9	810,3
Mato Grosso do Sul	77.718	6.813	3003,9	263,3
Mato Grosso	32.595	8.333	1024,3	261,9
Goiás	131.105	92.563	2037,7	1438,6
Distrito Federal	10.760	13.778	385,7	493,9
Total	1.388.776	659.051	690,2	327,8

Fonte: Ministério da Saúde

^a Sinan online (atualizado em 20/01/2014)

^b Sinan online (consultado em 09/07/2014) e SES^b. Dados sujeitos a alteração.

1.4. Caracterização da doença

Os diferentes sorotipos do vírus da dengue são transmitidos pelo mosquito do gênero *Aedes*. As fêmeas da espécie *Aedes aegypti*, destacam-se, pois se alimentam de sangue como parte fundamental do ciclo de desenvolvimento e maturação dos ovócitos, podendo picar várias pessoas num mesmo dia (WHO, 2009 e BRASIL, 2013).

Após um indivíduo ser picado, ocorre o período de incubação do vírus que varia entre 3 a 7 dias. No primeiro contato do organismo com o patógeno, chamado infecção primária, o indivíduo pode não apresentar manifestações típicas ou apenas uma febre indiferenciada. Quando há o desenvolvimento da dengue, a infecção inicia abruptamente com períodos febris, durando de 2 a 3 dias, seguido de sintomas não específicos como mialgia, cefaleia, prostração, artralgia, anorexia, dor retroorbital, náuseas, vômitos, exantema e prurido cutâneo. Estes sintomas podem variar de acordo com a idade do paciente, sendo a presença de dor abdominal mais comum nas crianças e ocorrência de manifestações hemorrágicas em adultos (WHO, 2009, BRASIL, 2002, SIMMONS et al., 2012 e SRIKIATKHCHORN, 2009).

Após o período febril inicia-se a fase crítica, na qual ocorrem distúrbios circulatórios de gravidade variada, geralmente há diminuição da contagem de plaquetas e aumento do número de hemácias. É nesta fase que podem surgir os sintomas mais graves, característicos da dengue hemorrágica. Cerca de uma semana após a infecção o paciente começa a melhorar, havendo a estabilização da contagem das células no sangue (WHO, 2009 e SRIKIATKHCHORN, 2009). A Figura 2 exemplifica o processo de infecção pelo vírus da dengue e resposta imunológica no indivíduo.

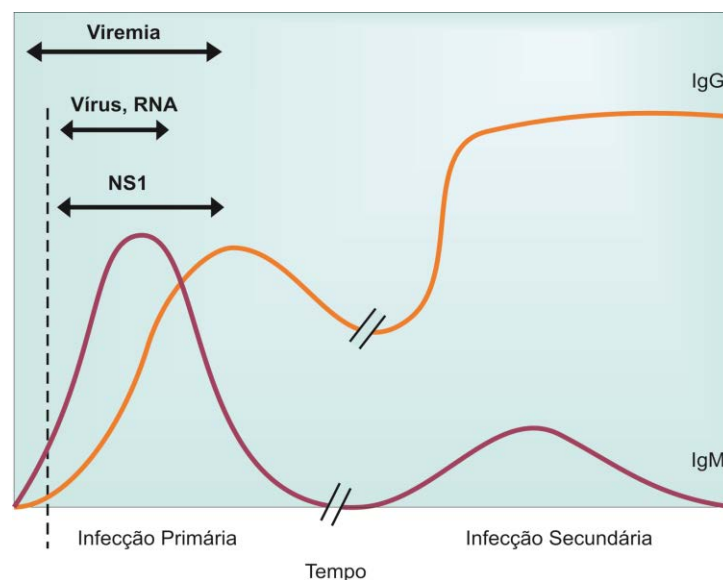


Figura 2. Processo de infecção pelo vírus da Dengue. O vírus pode ser encontrado no organismo principalmente no período febril (viremia), juntamente com seu material genético (RNA) e o antígeno característico (proteína NS1) se estendendo até o final da fase crítica. A produção de anticorpos (IgM e IgG) se inicia na fase crítica e atinge o pico na fase de recuperação, permanecendo em níveis reduzidos no organismo podendo ter seus níveis aumentados rapidamente após uma reinfeção (SIMMONS et al., 2012).

Para os casos de dengue hemorrágica, os sintomas iniciais são os mesmos de uma infecção por dengue comum ou clássica (DF, do inglês *dengue fever*), tendo uma complicação do quadro a partir do terceiro dia de infecção. A caracterização da dengue hemorrágica (DHF, do inglês *dengue hemorrhagic fever*), ocorre basicamente por 4 sintomas: febre alta ($> 39^{\circ}\text{C}$), podendo durar por 7 dias, hemorragia em diversos órgãos (gastrointestinal, intracraniana, entre outras), trombocitopenia ($\leq 10^5$ células. mm^{-3}) e colapso circulatório. O maior diferencial entre DF e DHF é a ocorrência de extravasamento de plasma, devido a índices elevados de glóbulos vermelhos ou hemácias no sangue, geralmente 20%, podendo chegar até 54% maior que o valor basal (GUBLER, 1998; WHO, 2009 e SRIKIATKHCHORN, 2009).

Neste quadro há ainda um agravante, que são os pacientes que progridem para um estado de choque, proveniente da síndrome do choque por dengue (DSS, do inglês *dengue shock syndrome*), que é a crise aguda de insuficiência cardiovascular havendo dificuldade da irrigação de oxigênio para os tecidos do corpo. DSS é chamado de choque hipovolêmico, derivado de hemorragias graves e desidratação, ocasionando diminuição da pressão arterial devido a perda de sangue, tendo o paciente, neste estado grandes chances de óbito, em um curto período de tempo, de 12 a 24 horas, se não tiver acesso de tratamento imediato (GUBLER, 1998, WHO, 2009 e SRIKIATKHCHORN, 2009).

1.5. O vírus da dengue e a proteína NS1

O genoma do vírus causador da dengue é constituído por uma molécula de ácido ribonucléico de fita simples (RNA, do inglês *ribonucleic acid*), polaridade positiva, com aproximadamente 11 Kb (kilobases). (LINDENBACH; RICE, 2003 e ACHESON, 2007)

A Figura 3 mostra a estrutura cristalográfica do vírus da dengue, obtida por crio-microscopia de raio-X a uma resolução de 9.5 Å, retirada de ZHANG et al., 2013. Os vírions maduros são esféricos, medem entre 40 e 60 (nm) nanômetros de diâmetro e apresentam simetria icosaédrica (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH; RICE, 2003). Possuem um envoltório glicoproteico que consiste nas

proteínas do envelope (E) e membrana (prM), seu interior consiste apenas de material genético e proteína do capsídeo (C), (ZHANG et al., 2013).

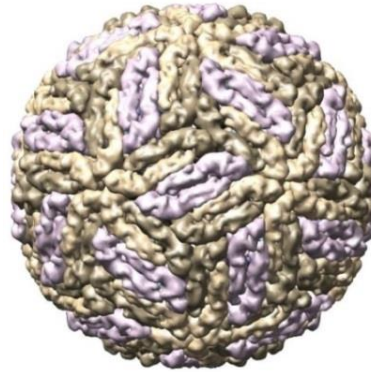


Figura 3. Estrutura do vírus da Dengue. Determinada a uma resolução de 9,5 Å por crio-EM e técnicas de reconstrução de imagem que estabelece a disposição estrutural secundária do envelope (E) e proteínas de membrana (M) no envelope lipídico. Cadeias de proteínas são coloridas a partir do N-terminal para C-terminal, utilizando gradiente de cor em arco-íris (espectro), retirada de ZHANG et al., 2013.

Este genoma codifica três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, o precursor da proteína de membrana e proteína E do envelope, além de sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, (CHAMBERS et al., 1990) representado na Figura 4. As proteínas não estruturais podem desempenhar funções na montagem, organização e liberação do vírus (RICE, 1996). Além disso, estão envolvidas na modulação da resposta imune do hospedeiro, por não fazerem parte da estrutura do vírus e são ativadas somente durante a replicação viral (CHAMBERS et al., 1990).



Figura 4. Representação do genoma do vírus da Dengue. Região Estrutural: C = proteína capsídeo, prM = proteína de membrana, E = proteína do envelope. Região Não Estrutural: proteína NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, adaptado de PEREIRA, 2008.

A proteína NS1, alvo neste trabalho, é uma das glicoproteínas não estruturais do vírus, massa molecular em torno de 46 kDa, com 12 resíduos de cisteína extremamente conservados, sítios de glicosilação invariáveis, seis pontes de sulfetos intramoleculares, além de regiões de alta homologia entre os flavivírus (Figura 5), (CHAMBERS et al., 1990; EDELING et al., 2014). É uma glicoproteína hidrofílica com importante, embora desconhecido, papel na replicação viral e está reconhecidamente envolvida na patogênese e na ativação do sistema complemento (EDELING et al., 2014). No RE (retículo endoplasmático) a NS1 é sintetizada na forma de monômeros, sendo glicosilados e assumindo rapidamente a forma dimerica. Os carboidratos ligados aos dímeros sofrem algumas modificações no Complexo de Golgi, antes de serem transportados para fora da célula, como uma partícula de lipoproteína hexamérica (NOISAKRAN et al., 2007; MULLER, 2013), com um núcleo rico em lipídeos central que são mantidos juntos por interações hidrofóbicas fracas (CROOKS et al., 1994, FLAMAND et al., 1999; WINKLER, 1989). Esta glicoproteína é encontrada tanto em sua forma ligada à célula quanto secretada no meio extracelular (forma solúvel) em forma de hexâmeros (FLAMAND et al., 1999; CHAMBERS et al., 1999), em forma de barril com seu centro aberto, com \approx 10nm, entretanto, a natureza da associação com a membrana é controversa por não conter domínios de transmembrana (GUTSCHE et al., 2011).

A forma extracelular da NS1 induz função imunoprotetora, sendo caracterizado como antígeno fixador de complemento (JACOBS et al., 2006). NS1 intracelular co-localiza-se com dsRNA e outros componentes do complexo de replicação viral e desempenha um papel essencial como cofator na replicação (MACKENZIE; JONES e YOUNG, 1996).

NS1 é um importante alvo para o diagnóstico de infecção por dengue, uma vez que esta proteína circula em níveis elevados no sangue durante a fase aguda da doença (DAS; MONGKOLAUNGKON e SURESH, 2009) em pacientes com infecções primárias e secundárias as concentrações variam de 10 ng/mL a 2 μ g/mL podendo chegar até cerca de 50 μ g/mL (LIBRATY et al., 2002 e ALCON et al., 2002). Estudos demonstraram que os níveis de NS1 secretados no plasma têm correlação com os níveis de viremia e, portanto, pode ser utilizada para diagnosticar pacientes em risco para o desenvolvimento de dengue hemorrágico (DAS; MONGKOLAUNGKON e SURESH, 2009).



Figura 5. Estrutura cristalina de um dímero da proteína não estrutural NS1 do vírus da dengue. Cadeias das proteínas são coloridas a partir do N-terminal para o terminal-C (resíduos 172 - 352), utilizando um espectro de gradiente de cor arco-íris. A descrição da estrutura cristalina foi realizada por difração de raio-X, resolução de 2.69 Å, a proteína é composta por 9% helicoidal (6 hélices e 18 resíduos) e 29% folha beta (15 fios e 54 resíduos). A montagem biológica é gerada pelo PISA (software), dados obtidos de EDELING et al., 2014.

1.6. Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico definitivo não pode ser feito através de observação clínica, a confirmação laboratorial é necessária, devido à variabilidade e generalidade nos sintomas associados a dengue (HALSTEAD, 2007 e HENNESSEY et al., 2009). Para os casos de dengue clássica (não hemorrágica) são considerados como prováveis aqueles que o paciente apresenta febre e dois ou mais sintomas mostrados na sessão 1.4, como cefaleia, náuseas e dor retroorbital. Para os casos mais graves como DHF, o diagnóstico deve apresentar todos os sintomas (BRASIL, 2010 e KUMARASAMY et al., 2007) e sua evolução em síndrome do choque por dengue, necessita de pressão baixa (< 20 mmHg), agitação, pele fria e pegajosa (WHO, 2009). A confirmação do diagnóstico se faz através da junção dos sintomas e dos exames laboratoriais, como por exemplo, alterações nos níveis de anticorpos IgG e IgM, e antígenos do vírus da dengue, pela proteína NS1, detectados através do exame de imunofluorescência (ELISA) ou através de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) (HALSTEAD, 2007 e HENNESSEY et al., 2009).

Por ser considerada alta a concentração da proteína NS1 no sangue de pacientes infectados, esta proteína torna-se um alvo viável de ser usado no diagnóstico da doença. Porém as plataformas de diagnósticos descritas na literatura

relatam uma queda significativa desta proteína nas infecções secundárias, incentivando a busca por dispositivos para diagnóstico com limites de detecção mais sensíveis e rápidos, levando em consideração a chance de DHF nestes casos. (DIAS et al., 2013 e KUMARASAMY et al., 2007).

Testes diagnósticos para dengue vêm utilizando a proteína NS1 como alvo. Por exemplo, em ensaios ELISA e ensaios imunocromatográficos, a proteína NS1 tem sido detectada em 87% e 95% de pacientes com dengue, nos respectivos métodos (BISORDI et al., 2011). Kits de diagnóstico para dengue, disponíveis no mercado são capazes de detectar a proteína NS1 com sensibilidade acima de 69% (SILVA et al., 2011). Segundo Alcon e colaboradores (ALCON et al., 2002), no diagnóstico de dengue, pela detecção de NS1 por ELISA, os limites de detecção desta proteína variam de 0.04 a 2 µg/mL em soro de pacientes em fase aguda na primeira infecção e de 0.01 a 2 µg/mL na segunda infecção. Este teste apresenta algumas desvantagens, como tempo longo para o diagnóstico (em torno de dias, desde a coleta da amostra) requerendo múltiplas etapas de lavagem e incubação, além da medida ser realizada de modo indireto, necessitando de um marcador para diagnóstico (MOREIRA, 2010).

Na busca de testes diagnósticos com melhor sensibilidade os biossensores analíticos vêm sendo construídos. Na Tabela 2 abaixo, são relatados o desenvolvimento de biossensores para diagnóstico de dengue, utilizando diferentes técnicas.

Tabela 2. Limites de detecção relatados para biossensores de dengue referenciados pela literatura.

Mecanismo de Transmissão	Analito (Alvo)	Limite de detecção (LD)	Referencia
Piezolétrico	Proteína NS1 e Glicoproteína-E (Δ)	3 µg/mL (6,25x10 ⁻⁸ mol/L)	Su et al 2003
	Proteína NS1 (◆)	0,740 µg/mL (1,39x10 ⁻⁸ mol/L)	Wu et al 2005
	Glicoproteína-E (◆)	0,740 µg/mL (1,39x10 ⁻⁸ mol/L)	Dias et al 2013
	Proteína NS1 (◆) Proteína NS1 (◆)	1-10 µg/mL (2,08x10 ⁻⁸ - 2,08 x10 ⁻⁷ mol/L) 12 ng/mL (6,25x10 ⁻⁸ mol/L)	Tai et al 2006 Dias et al 2013
Óptico	IgM e IgG (◆)	21 pg	Blaksell et al 2006
	RNA (▲)	1nM	Chen et al 2009
	IgM (▲)	10 ⁶ diluições	Kumbhat et al 2010
	RNA (◆)	10 pM	Baeumner et al 2002
	RNA (▲)	0.01 µM	Zhang et al 2006
	Partícula viral (Δ)	partícula única	Kwakye et al 2003
Eletroquímico	cDNA (◆)	10 fM	Oliveira et al 2009
	Partículas do vírus DENV 2 (Δ)	1 pfu/mL	Cheng et al 2012
	Proteína NS1 (◆)	0,33 ng/mL (6,88x10 ⁻¹² mol/L)	Cavalcanti et al 2012

Fonte: Adaptada de TELES, 2011.

(Δ) = diluição em PBS

(▲) = diluição em Soro comercial

(◆) = diluição em Soro de paciente

A perspectiva apresentada na Tabela 2 motivou o presente trabalho a investir esforços na elaboração de métodos eletroanalíticos, utilizando técnica eletroquímica (com ênfase em técnicas de resposta em frequência), capaz de detectar a proteína NS1 do vírus da dengue com bom desempenho.

2. Desenvolvimento de Biossensores

Um biossensor pode ser definido como sendo um dispositivo capaz de identificar a espécie de interesse através de sua interação com um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecido vegetal e animal, células, organelas, etc.), imobilizado neste dispositivo (FILHO e CAPELATO, 1992).

Biossensores baseados em determinadas técnicas de transdução de sinal como a eletroquímica apresentam a possibilidade de construção de dispositivos miniaturizados, permitindo análises em frações reduzidas de amostras. O biossensor tem como objetivo a identificação, quantificação e eventual triagem de moléculas específicas, como aquelas presentes em misturas complexas. Assim eles podem ter grande utilidade na pesquisa analítica, no diagnóstico clínico, na indústria de alimentos e farmacêutica, no controle ambiental e no monitoramento de processos.

O interesse no desenvolvimento de biossensores decorre da necessidade de uma análise rápida e de rotina de um grande número de amostras, o que requer a robustez, sensibilidade e reprodutibilidade. Além de recursos adicionais desejáveis como: baixo custo de produção, miniaturização, instrumentação simples e processamento automático de amostras (VILLAVERDE, 2003).

Devido ao fato destas moléculas biológicas serem altamente específicas para seu ligante (analito), a interação gerará um determinado tipo de sinal, que será identificado pelo transdutor no qual o material biológico está imobilizado. O transdutor é um dispositivo capaz de converter um sinal em outro mensurável e, no caso de biossensores, um transdutor converte o sinal de reconhecimento biológico (interação do analito com a molécula específica) em um sinal elétrico. (FILHO e CAPELATO, 1992).

Os elementos de reconhecimento biológico de um biossensor são classificados em enzimáticos, imunossensores e genossensores. Estes podem ser classificados de acordo com o método de detecção em transdutores ópticos,

elétricos, eletroquímicos, térmicos, amperométricos, entre outros. Os biossensores eletroquímicos são os mais comuns e estudados para uso em análises clínicas e baseiam-se na construção de eletrodos quimicamente modificados com materiais biológicos imobilizados (VO, 2000).

2.1. Funcionalização do transdutor - Monocamadas Auto-organizadas (SAM, *self-assembled monolayer*)

Uma maneira de funcionalização de um transdutor se faz com a construção de monocamadas auto-organizadas (SAMs). As SAMs consistem de uma camada ordenada e organizada de moléculas, formada espontaneamente sobre uma superfície sólida, um processo dirigido pela interação de ligações e forças intermoleculares (ULMAN, 1996). Uma importante aplicação de tais camadas é na construção de eletrodos quimicamente modificados, usados para detecção e quantificação de biomarcadores. Esta aplicação torna possível pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, como uma forma de alterar a reatividade e a seletividade do sensor, tornando suas propriedades muito mais atraentes. Um eletrodo quimicamente modificado consiste em eletrodo base, como exemplo, o ouro e a camada do modificador químico, ou seja, a monocamada auto-organizada.

Segundo Taniguchi e colaboradores, as monocamadas auto-organizadas de dissulfetos e tióis sobre os eletrodos de ouro são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em uma solução constituída de moléculas anfóteras. As SAMs têm sido desenvolvidas e aplicadas em eletroquímica e classificadas de acordo com o mecanismo de fixação da monocamada sobre as superfícies sólidas. Os sistemas mais utilizados têm sido os tióis e alcanotióis sobre as superfícies de ouro, devido a estabilidade da ligação Au-SR, (ouro - enxofre - proteína) resultando em uma estrutura ordenada e orientada. Existem alcanotióis com diferentes grupos funcionais, sendo possível o desenvolvimento de superfícies com propriedades e funções distintas, viabilizando a funcionalização da superfície do eletrodo com materiais biológicos (TANIGUCHI et al., 1982).

2.2. Voltametria cíclica (CV)

A caracterização das SAMs pode ser realizada utilizando a técnica de CV. Medidas utilizando CV são frequentemente utilizadas como uma forma eficaz para o fornecimento de informações relacionadas ao estado físico-químico em uma interface eletrodo/solução. Como informações para a caracterização superficial do efeito das SAMs, evidenciando a estipulação do grau de cobertura das superfícies modificadas (CAMPUZANO et al., 2006).

CV é uma técnica normalmente realizada como ferramenta de medição de corrente que flui entre uma solução eletrolítica e um eletrodo sólido condutor ou semiconductor, que permite investigar diversos fenômenos interfaciais entre eletrodo/meio. No caso de um experimento eletroquímico realizado por CV, respostas elétricas são medidas e estas são associadas a fatores intrínsecos do material de interesse em contato com uma superfície condutora, por exemplo, o ouro, pois a aplicação de uma varredura linear de potencial elétrico mede uma resposta em corrente contínua, de tal modo, que é possível associar a magnitude da corrente medida às propriedades redox de um dado analito, como no caso de uma solução iônica eletroativa (BARD e FAULKNER, 1982).

2.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica fornece uma visão completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução (CARVALHO; ANDRADE e BUENO, 2006), além disso, é uma técnica de caracterização elétrica, que permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um número grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades. Os estudos utilizando EIE abrangem desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até a avaliação de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas, como processos que ocorrem em baterias de íons lítio, células fotovoltaicas, sistemas de corrosão e/ou processos eletrocatalítico (CARVALHO; ANDRADE e BUENO, 2006).

Reações eletroquímicas que envolvem o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores e condutores como o ouro, fazem o monitoramento do comportamento eletroquímico de uma espécie redox quando o sistema é perturbado por meio da aplicação de um potencial (tensão) senoidal de pequena amplitude acompanhado da resposta da corrente de rastreamento (MACDONALD, 2003). A resposta de tensão-corrente linear é obtida tipicamente por uma pequena perturbação de ≈ 10 mV (DANIELS e POURMAND, 2007) que não perturba a sustentação química e bioquímica do filme receptivo. A linearidade da resposta da tensão-corrente no intervalo de frequências estudadas pode ser avaliada através do ajuste dos dados experimentais usando um circuito equivalente (descrito por relações Kronig-Kramers, que contém elementos resistivos e capacitivos apropriados para a interpretação do sistema).

A representação do comportamento da interface eletrodo/solução é até certo ponto análogo a uma combinação em paralelo de um resistor (que representa a resistência de transferência de carga) e um capacitor (capacitância da dupla camada elétrica) que pode ser representado por um modelo de circuito elétrico equivalente (C.E.E) do tipo Randles (Fig. 6a) que é um modelo que representa as equações cinéticas que levam as funções da impedância (CARVALHO; ANDRADE e BUENO, 2006). Um (C.E.E) (Fig. 6a) engloba os termos R_{ct} , R_e , C_{dc} e Z_w (resistência a transferência de carga, resistência da solução eletrolítica, capacitância da dupla camada e impedância de Warburg) que servem para descrever o efeito de cada componente elétrico distinguível pela impedância.

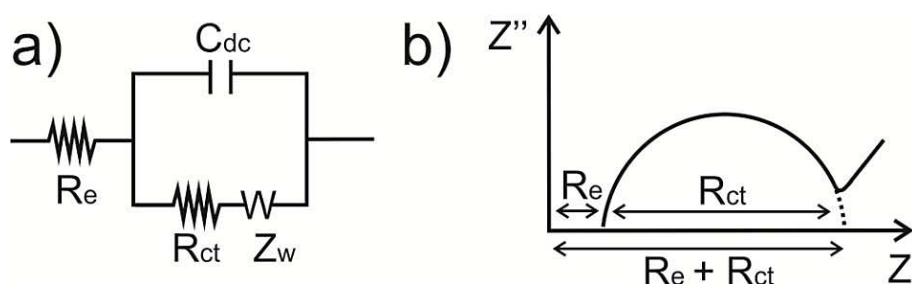


Figura 6. a) Circuito de Randles utilizado para ajustar os dados experimentais de espectroscopia de impedância faradaica. **b)** Espectro típico de Nyquist de impedância faradaica associado ao circuito mostrado em (a). No circuito equivalente, R_{ct} (o diâmetro do semi-círculo no espectro de impedância) representa a resistência de transferência eletrônica que controla a cinética de elétrons de transferência da sonda redox na interface do eletrodo. Z' é a impedância real associada aos valores de resistência à transferência de carga, enquanto que Z'' é a impedância imaginária que se correlaciona a capacitância da dupla camada elétrica.

A resistência da solução está relacionada com a condutividade/mobilidade da sonda redox em solução e não é afetada por eventos de bioreconhecimento na superfície do eletrodo (LUO E DAVIS, 2013). A capacitância da dupla camada é uma característica intrínseca de eletrodos polarizados imersos em solução eletrolítica. Dependendo do potencial aplicado ao eletrodo, íons de carga oposta se aproximam da superfície, formando uma dupla camada separada carregada que pode ser interpretada como uma dupla camada elétrica. O elemento capacitivo é geralmente substituído por um elemento de fase constante (CPE) para refletir a não idealidade da capacitância na superfície (DANIELS e POURMAND, 2007). A resistência à transferência de elétrons quantifica a barreira eletrostática e/ou estérica apresentada para a sonda redox na superfície (Fig. 6b). A impedância de Warburg, que não é geralmente usada com proposta analítica, representa a difusão imperturbável da sonda redox em solução em massa em direção ao eletrodo, por um gradiente de difusão (K'OWINO e SADIK, 2005 e SANTOS; DAVIS e BUENO, 2014).

A instrumentação para análise das respostas é composta essencialmente por um potenciostato/galvanostato e um analisador de resposta de frequência (FRA) e este, envia uma onda senoidal de uma determinada tensão de amplitude de AC para o potenciostato e, simultaneamente, o potenciostato impõe a tensão de comando e mede a resposta atual.

Matematicamente, a impedância complexa (Z^*) é a relação entre a função de tensão ($V(t) = V_0 \sin(\omega t)$) e a função de resposta de corrente resultante ($I(t) = I_0 \sin(\omega t + \varphi)$), ambos em função do tempo (Equação 1):

$$Z^*(\omega) = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \varphi)} = \frac{1}{Y^*} \quad (1)$$

Sendo V_0 e I_0 são os sinais de máxima (amplitude) de potencial e corrente, ω é a frequência angular ($\omega = 2\pi f$), f é a frequência, t é o tempo, φ é a fase da onda senoidal e Y^* é a admitância complexa (relacionada com a condutância complexa do sistema). A impedância obtida em diferentes frequências gera um espectro de impedância ($Z^*(\omega)$), característico da técnica de EIE. A função $Z^*(\omega)$ é descrita

como uma série complexa, $Z^*(\omega) = Z' + jZ''$, em que $j = \sqrt{-1}$, Z' e Z'' são as partes real e imaginária, respectivamente. O espectro de impedância pode ser representado por seu módulo de $|Z|$, ou pelo deslocamento de fase φ , ou mesmo pelas componentes Z' e Z'' em função da frequência. Para interpretar os resultados de espectroscopia de impedância, os dados podem ser analisados de duas maneiras diferentes: pelo diagrama de Bode, que traça $\log |Z|$ e φ em função de $\log f$, que representa as respostas de impedância em função da frequência; ou pelo diagrama de Nyquist, que plota $-Z''$ versus Z' (por convenção, em eletroquímica é referido como Z'' versus Z' e o sinal de menos na $-Z''$ é implícito), segundo Santos; Davis e Bueno, 2014.

Um dos elementos utilizados como sinal analítico em biossensores impedimétricos é a resistência à transferência de carga (R_{ct}), que é a resistência do par redox em se reduzir ou oxidar ao trocar elétrons com o metal na superfície do eletrodo. Essa resistência à atividade eletroquímica do par redox aumenta proporcionalmente com o bloqueio da superfície do eletrodo, obtido pela imobilização da monocamada, i.e. funcionalização pela adição do anticorpo e adição de diferentes concentrações do analito (Johnson, 2012). Essa abordagem vem sendo aplicada, por exemplo, para detecção de baixos níveis (de picomolar até femtomolar) de biomoléculas no organismo que indicam o início de certas patologias, permitindo diagnósticos mais sensíveis e do tipo *point of care* (XU; LUO e DAVIS, 2013). Elshafey et al., por exemplo, relatou um imunossensor impedimétrico com baixo nível de detecção (0,29 pg/mL em tampão e 1,3 pg/mL em tecido cerebral homogeneizado de rato) para um biomarcador de câncer (ELSHAFEY et al., 2013). Bryan et al., e Fernandes et al., relataram um biossensor impedimétrico para quantificação da CRP (marcador de estado cardíaco e trauma em geral) em soro diluído com um LOD em níveis de concentração na ordem de 176 pM e 0,265 nM, respectivamente (BRYAN et al., 2013 e Fernandes et al., 2014). Barton e colaboradores desenvolveram um sensível ensaio impedimétrico (LOD = 1 pg/mL) para PSA, marcador de câncer de próstata (BARTON; DAVIS e HIGSON, 2008).

No presente trabalho de dissertação, foi desenvolvido um sensor impedimétrico utilizando R_{ct} como sinal elétrico mensurável para detectar a interação da biomolécula (anticorpo anti-NS1) com seu ligante (antígeno NS1). Esta

modificação na superfície funcionalizada gera um bloqueio para as reações redox das espécies eletroativas contidas na solução, resultando em uma alternância na resistência à transferência de carga, como discutido anteriormente, no segundo parágrafo deste tópico.

2.4. Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica

Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECE) derivada da Impedância é uma técnica que se baseia na conversão dos valores obtidos experimentalmente, por EIE para valores de capacitância complexa, realizado por meio de expressões matemáticas, gerando um segundo espectro que demonstra o efeito de acúmulo de carga do sistema eletroquímico em função da resistência à passagem de carga (BUENO et al., 2013). Esta técnica se mostra promissora para a investigação biológica (FERNANDES et al., 2014 e LEHR et al., 2014). O monitoramento biológico com ECS tem a vantagem de eliminar a necessidade de uma sonda redox na matriz biológica ou no eletrólito. As diferenças entre EIS e ECS são associadas com a comunicação eletroquímica entre a sonda redox e a superfície metálica do eletrodo (FERNANDES et al., 2014). No entanto, o sinal de transdução de ECS mede a mudança da capacitância redox (C_r) das interfaces receptivas redox confinadas (FERNANDES et al., 2013, FERNANDES et al., 2014, LEHR et al., 2014, BUENO E DAVIS, 2014a, BUENO E DAVIS, 2014b) e não necessita de uma sonda redox em solução.

A descrição geralmente associada com um componente dielétrico, um componente ativo redox e comparação das respostas mais detalhada entre EIE e ECE são mostradas na Fig. 7, (BRYAN et al., 2014 e BUENO; FABREGAT e DAVIS, 2013).

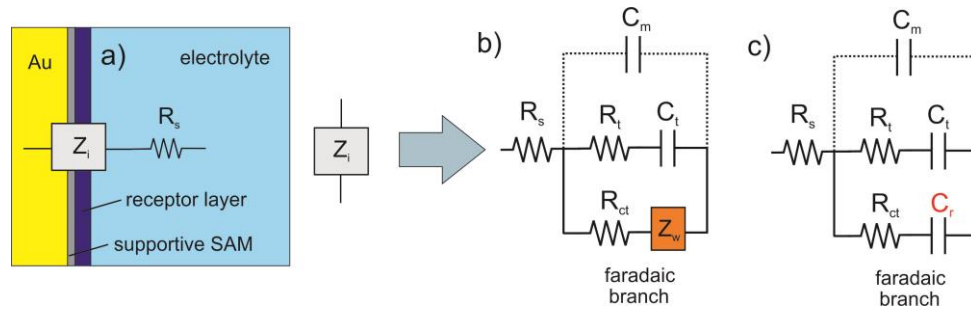


Figura 7. (a) Representação esquemática da impedância interfacial das interfaces receptoras utilizadas no monitoramento biológico. **(b)** Circuito equivalente capaz de modelar dados do biossensor impedimétrico onde sonda redox está presente na solução. O elemento Warburg (Z_w) representa as características de difusão em massa da sonda redox e R_{ct} é a resistência de transferência de carga redox. A resistência (s) de eletrólito é modelado em série com a impedância interfacial total superior e, geralmente, não é importante na análise, uma vez que não varia. **(c)** Circuito equivalente capaz de modelar biossensores eletroquímicos capacitivos. Note que a capacitância interfacial de um eletrodo modificado por uma monocamada dielétrica é definida por duas capacitâncias em série, os da monocamada (C_m) e da dupla camada (C_{dl}) onde $C_{dl} \gg C_m$, significando que C_m domina as análises e é, por conseguinte, a única representada na capacitância do circuito equivalente mostrada nestes modelos de circuitos equivalentes. Além disso, $C_m \ll C_t$ de uma forma de R_t e C_t controlar a monocamada dielétrica (não faradaica). Fonte: FERNANDES et al., 2014.

Resumidamente, em ECE a transdução de sinal, C_r , está relacionada com a densidade dos estados redox (DOS), cuja ocupação, por um único nível de estados, é dada por (BUENO et al., 2012; BUENO et al., 2013; BUENO E DAVIS, 2014a; BUENO E DAVIS, 2014b): (Equação 2).

$$C_r = \frac{e^2 \Gamma}{k_B T} f(1 - f) \quad (2)$$

Onde $f = n/\Gamma = F(E_r, \mu_e) = \{1 + \exp [(E_r - \mu_e)/k_B T]\}^{-1}$ é a função de ocupação dada pela função Fermi Dirac, n densidade de elétrons ocupada nos centros redox, e é a carga elementar, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, Γ é a cobertura da superfície molecular redox. Na equação 2, C_r é maximizado quando $f = 1/2$ e $f(1 - f) = 1/4$, ou seja, no potencial de meia-onda. Além disso, pode-se notar que f é uma função do potencial químico dos elétrons, μ_e e E_r , é o potencial de centros redox que controla a atividade de acordo com o nível do

potencial redox por $\Delta G = E_r - \mu_e$, (BUENO et al., 2012; BUENO et al., 2013 e FERNANDES et al., 2014).

A natureza destas interfaces redox capacitivas podem ser avaliadas pela conversão da função complexa de impedância $Z^*(\omega)$ em capacitância $C^*(\omega)$ sabendo-se que $C^*(\omega) = 1/i\omega Z^*(\omega)$, onde ω é frequência angular e $i = \sqrt{-1}$. Praticamente, isso consiste em obter dados de impedância em diferentes frequências $Z^*(\omega)$ no potencial de meia onda (região redox) e convertê-los em capacitância, com seus componentes reais e imaginários, notando que $C'' = \varphi Z'$ e $C' = \varphi Z''$, onde $\varphi = (\omega|Z|^2)^{-1}$ e $|Z|$ é o módulo de Z^* . Se uma análise for realizada fora da janela de potencial faradaica (região não redox) é possível obter o termo C_r puramente, i.e. livre da contribuição eletrostática devido aos íons na interface e isso se dá a partir da subtração entre as capacitâncias obtidas no potencial da região redox (redox in) e região não redox (redox out). É notável que este componente capacitivo faradaico é significativamente mais sensível ao ambiente interfacial, como em eventos de bioreconhecimento (BUENO et al., 2012 e LEHR et al., 2014).

A interação entre biomoléculas, como por exemplo, antígeno-anticorpo e lectina-glicoproteína, tem sido analisada por meio da capacitância redox. Lehr et al. relataram a fabricação de interfaces para a detecção das proteínas PAP (marcador de prognóstico para câncer de próstata) e CRP (marcador de estado cardíaco e trauma em geral) com limites de detecção de 11 pM e 28 pM, respectivamente, diluídas em PBS (LEHR et al., 2014). Santos et al., caracterizaram, por exemplo, a interação entre ArtinM-HRP ($1,6 \pm 0,6$) $\times 10^8$ L mol⁻¹) em condições de alta diluição de HRP em PBS (150 μ g/mL), permitindo o uso da isoterma de Langmuir (SANTOS et al., 2014). Fernandes et al. construíram interfaces capacitivas para detecção de CRP com LOD = 0,240 nM diluídas em PBS (FERNANDES et al., 2014). A hipótese é que uma sonda redox confinada em uma SAM tem uma impressão digital de carga (armazenamento de energia a partir de uma combinação do campo eletrostático associado com a separação de carga e um termo quantizado resultante do acesso de ressonância para os estados moleculares específicos confinados – C_r ou capacitância redox) sensivelmente dependentes do ambiente. A mudança no ambiente, devido a um evento de bioreconhecimento como antígeno-anticorpo, perturba a C_r , permitindo assim a transdução do sinal. Esta ideia tem sido usada

para detectar com sucesso biomarcadores relevantes (LEHR et al., 2014; FERNANDES et al., 2013; FERNANDES et al., 2014 e SANTOS et al., 2014).

Neste trabalho de dissertação, a técnica de ECS foi aplicada no monitoramento de interações específicas entre o anticorpo-antigênico, demonstrando que o uso de superfícies de reconhecimento com atividade redox é útil no desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação de biomarcadores (BUENO et al., 2012; BUENO et al., 2013 e FERNANDES et al., 2013).

3. Objetivos:

O objetivo geral foi desenvolver um biossensor eletroquímico para diagnóstico de dengue.

Os objetivos específicos foram:

- 1) Construir superfícies de reconhecimento utilizando monocamadas auto-organizadas de alcanotóis para acoplar o anticorpo anti-NS1 tanto para técnica impedimétrica quanto capacitiva;
- 2) Construir, utilizando análise impedimétrica, uma curva analítica para interação do anticorpo anti-NS1 com diferentes concentrações de antígeno NS1 diluídos em PBS ou soro sem diluição.
- 3) Construir, utilizando análise capacitiva, uma curva analítica para interação do anticorpo anti-NS1 com diferentes concentrações de antígeno NS1 diluídos em PBS.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

Na Tabela 3 é mostrada a procedência dos reagentes, solventes e demais materiais que foram utilizados neste trabalho.

Tabela 3. Reagentes utilizados

Reagentes	Fórmula Molecular	Procedência
Ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) 95%	C ₁₁ H ₂₂ O ₂ S	Sigma-Aldrich
6-mercapto-1-hexanol (C6OH) 97%	C ₆ H ₁₄ O _S	Sigma-Aldrich
N-etil N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)	C ₈ H ₁₇ N ₃	Fluka
N-hidroxisuccinimida (NHS) 97%	C ₄ H ₅ NO ₃	Sigma-Aldrich
Anticorpo anti-NS1	ab138696	Abcam
Antígeno NS1	ab64456	Abcam
Soro fetal bovino (Fetuína)	-	Sigma-Aldrich
Gelatina	-	Shynth
Albumina do soro bovino (BSA)	-	Sigma-Aldrich
Cloridrato de potássio	KCl	Sigma-Aldrich
Cloreto de Sódio 99,5%	NaCl	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrogênio	H ₂ O ₂	Qhemis
Hexacianoferrato (III) de potássio 99%	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Sigma-Aldrich
Hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado 99%	K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O	Sigma-Aldrich
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
Monohidrogenofosfato de sódio dodecahidratado	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Sigma-Aldrich
Ácido sulfúrico concentrado P.A	H ₂ SO ₄	Qhemis
Etanol anidro 99,8%	C ₂ H ₆ O	Sigma
Água Milli-Q (18,2 MΩ a 25°C)	H ₂ O	Millipore
Aluminas 1 μm, 0.5 μm e 0.03 μm	Al ₂ O ₃	Buehler
16-mercaptohexadecanoico (99%)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ S	Sigma-Aldrich
11-ferrocenil-undecanotiol (95%)	C ₂₁ H ₃₂ FeS	Sigma-Aldrich
Perclorato de tetrabutilamônio	TBAClO ₄	Fluka
Acetonitrila	CH ₃ CN	Synth
Soro Humano	-	Sigma-Aldrich
Etanolamida	NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	Sigma-Aldrich
Tetrametilbenzidina	C ₁₆ H ₂₀ N ₂	Sigma-Aldrich
Tween 20 (Monolaurato de polioxietilenosorbitan)	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich

4.1.1. Limpeza do eletrodo

O pré-tratamento dos eletrodos consistiu de um polimento mecânico em politriz, usando alumina 1,0 μm , 0,3 μm e 0,05 μm , até que suas superfícies apresentassem um aspecto espelhado. Após lavagem com água, os eletrodos de ouro foram limpos eletroquimicamente através de uma dessorção eletroquímica, em solução de NaOH 0,5 mmol/L, variando o potencial entre -1,7 a 0,7 V (vs. Ag|AgCl|KCl saturado) durante 400 ciclos a 100 mV/s, obtém-se um gráfico com o perfil indicado na Figura 8. Em seguida foram submergidos em etanol sob agitação, para redução de óxido de ouro, por 20 minutos e finalmente foram submetidos a uma limpeza eletroquímica em solução de H₂SO₄ 0,5 mmol/L, variando o potencial entre - 0,2 a 0,5 V, durante 25 ciclos de voltamogramas cíclicos, a 100 mV/s. Neste trabalho utilizou-se um intervalo de fator de rugosidade (F_r) entre 1 e 1,3 para que a área ativa (A_{ativa}) esteja o mais próximo da área geométrica (Tkac e Davis, 2008).

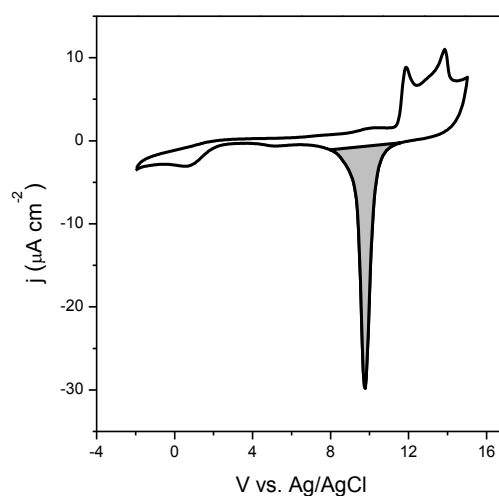


Figura 8. Voltamograma cíclico de limpeza eletroquímica.

4.1.2. Funcionalização do transdutor para ensaios impedimétricos

A funcionalização do transdutor (eletrodo de ouro) foi realizada por meio da formação de monocamada auto-organizada de alcanotióis. A monocamada

homogênea foi construída a partir de uma solução 1:1, contendo dois alcanotióis, o ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e o 6-mercapto-1-hexanol (C_6OH) nas concentrações de 2 mM e 2 mM, respectivamente. O MUA foi utilizado para a ligação do anticorpo (anti-NS1) por meio de uma ligação entre um grupamento amina presente na estrutura da proteína e o grupamento carboxílico presente em uma das extremidades da molécula do alcanotiól. O 6-mercapto-1-hexanol foi utilizado como espaçador entre as moléculas.

A mistura dos alcanotióis foi preparada em etanol e nesta solução, o transdutor foi imerso por um período de 16 h. Em seguida, o eletrodo foi lavado com etanol e solução tampão fosfato salina 0,1 mmol/L com pH 7,4 (PBS). Posteriormente, o eletrodo foi imerso, em uma solução de EDC 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e NHS (N-hidroxisuccinimida) com concentração de 0,4 M de EDC e de NHS 0,1 M respectivamente, por 30 min, para a ativação dos grupamentos carboxílicos presentes no alcanotiól.

4.1.3. Interação antígeno-anticorpo por EIE

O eletrodo de ouro modificado com a SAM, foi lavado com PBS (pH 7,4) mantido por 1 h em solução de anticorpo anti NS1 (1 $\mu\text{g/mL}$ em PBS), seguido de exposição a uma solução 1 mmol/L de etanolamina, por 5 min, para desativação do NHS remanescentes. Posteriormente, ele foi incubado com solução de BSA 0,1 % (Sigla em inglês para *bovine serum albumin*) por 30 min, para o bloqueio dos grupamentos carboxílicos remanescentes. Após este procedimento, o eletrodo foi imerso em diferentes concentrações do antígeno NS1 (0,01 - 2 $\mu\text{g/mL}$) diluído em PBS para construção da curva analítica em PBS.

Para construção da curva analítica em Soro, as etapas de ativação da SAM e imobilização do anti-NS1 foram realizadas de forma similar ao experimento em PBS, seguido de incubação com soro sem diluição por 30 min para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após a caracterização eletroquímica, o eletrodo foi imerso em diferentes concentrações do antígeno NS1 (0,01 - 10 $\mu\text{g/mL}$) diluídos em Soro sem diluição. Entre cada etapa o eletrodo foi lavado com PBS.

4.1.4. Funcionalização do transdutor utilizado para ensaios ECE

Para o experimento com ECE, a funcionalização do transdutor foi realizada por meio da formação de monocamada mista. Para tanto, o eletrodo de Au foi imerso por 16 h em uma solução de 0,2 mM de ácido 16-mercaptohexadecanoico (para ligação covalente do anti-NS1) e 2,0 mM de 11-ferrocenil-undecanotiol, utilizado como sonda redox confinada. Em seguida, o eletrodo foi lavado com etanol e PBS pH 7,4. As etapas seguintes, corresponderam a ativação da SAM, imobilização do anticorpo anti-NS1 e bloqueio com BSA 0,1%, semelhante ao descrito nos itens 4.1.2 e 4.1.3.

4.1.5. Interação antígeno anticorpo por ECE

Concentrações sucessivas do antígeno NS1 (0,005 – 1 µg/mL) foram adicionadas ao eletrodo funcionalizado descrito no item 4.1.3. Entre cada etapa o eletrodo foi lavado com PBS.

4.1.6. Ilustração esquemática da funcionalização dos eletrodos por EIE e ECE

A Figura 9 abaixo mostra em detalhes as diferenças entre EIE e ECE do ponto de vista da química de superfície.

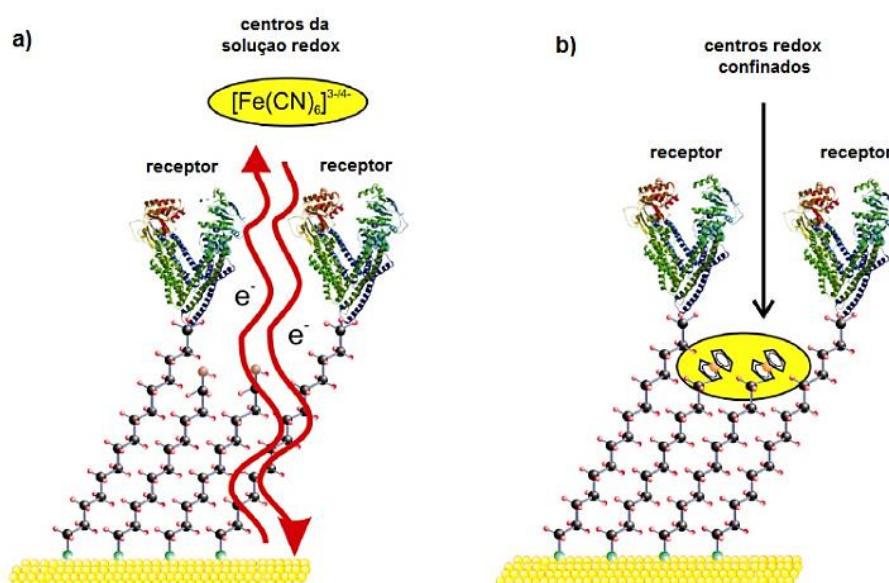


Figura 9. Representações esquemáticas comparativas para (a) EIS faradaica e (b) ECE. **(a)** A engenharia de superfície impedimétrica faradaica é baseada na resistência de transferência de elétrons (R_{ct}) da sonda redox em solução para a superfície metálica. **(b)** A abordagem capacitiva não precisa de uma sonda redox em solução, mas confinada no eletrodo. A sensibilidade desta capacidade de carga é utilizada como o repórter de bioreconhecimento vizinho. Fonte: Adaptada de FERNANDES et al., 2014.

4.1.7. Avaliação Eletroquímica

Para os experimentos eletroquímicos foram empregados a Voltametria Cíclica (CV) e a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica derivada da Impedância (ECE).

O sistema usado para as medidas eletroquímicas consistiu de uma célula eletroquímica com volume de 20 mL e um sistema convencional de 3 eletrodos: o eletrodo de Ag|AgCl como referência, uma placa de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de ouro com 2,0 mm de diâmetro, modificado com os filmes automontados como eletrodo de trabalho (Figura 10). As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando o potenciostato/galvanostato Autolab, modelo PGSTAT30 com módulo de análise de resposta em frequência (FRA) para aquisição e tratamento de dados (Figura 11).

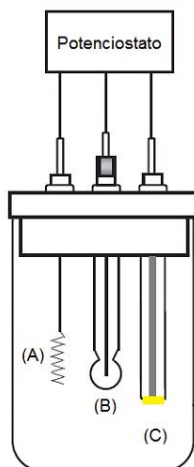


Figura 10. Célula eletroanalítica típica de três eletrodos para uso em EIE e ECE: (A) eletrodo auxiliar ou contra eletrodo, (B) eletrodo de referência e (C) eletrodo de trabalho. Fonte: Adaptada de Damos; Mendes e Kubota, 2004.



Figura 11. AUTOLAB® (PGSTAT302N, METROHM®).



Figura 12. Eletrodo de trabalho. Fonte: Metrhom Autolab B. V. Disponível em: <http://www.ecochemie.nl/Products/Echem/Accessories/Metal_WE.html>. Acesso em: 06/08 2014.

As CVs foram realizadas a uma velocidade de varredura de 100 mV/s, entre a faixa de -0,1 V e 0,5 V, relativo ao eletrodo de referência de Ag|AgCl, para obtenção de respostas qualitativas e quantitativas da interface eletrodo/solução. As medidas

de EIE para monitoramento das interfaces foram realizadas em eletrólito suporte composto por $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução, conduzidas na faixa de frequência entre 0.01Hz a 1 MHz, com potencial ≈ 0.22 V, aplicado entre os eletrodos de trabalho e de referência, variando a velocidade em função do tempo.

Para o experimento por ECE, o eletrólito suporte contido na célula eletroquímica foi uma solução de 20 mmol/L TBAClO₄ (perclorato de tetrabutylamônio) dissolvido em acetonitrila e H₂O (20:80). Não foi usado nenhum tipo de sonda redox na solução TBA e as medidas foram conduzidas na faixa de frequência 0.1 Hz a 100.000 Hz no potencial de meia onda (região redox) obtidos a partir das medidas VC (ver Figura 15). Adicionalmente, também foram realizadas medidas no potencial de 0,1 V (para região não redox).

As medidas foram realizadas no potencial ≈ 0.44 V extraídos pela verificação média dos picos de corrente na voltametria cíclica da SAM, ou seja, na região de potencial com maior atividade faradaica.

Esses procedimentos foram realizados a cada etapa de imobilização da formação da monocamada, funcionalização e análise das interações.

Os dados gerados foram tratados em software, com o programa Origin 8, para obtenção da área real do eletrodo trabalho e fator rugosidade. O Sigma Plot foi utilizado para tratamento por EIE dos dados e cálculo do R_{ct} . O R_{ct} foi estimado a partir do valor de Z' obtido na frequência ≈ 22 Hz.

Para ECE o cálculo dos dados foi feito através do sinal de C_r , que é obtido a partir de $Z^*(\omega)$ que é convertido matematicamente a capacitância usando a relação $C^*(\omega) = 1/i\omega Z^*(\omega)$, em que ω é a frequência angular e $i = \sqrt{-1}$ (Bueno et al., 2013).

Os experimentos com EIE e ECS foram realizados em triplicatas. Os gráficos exemplificam uma das medidas das triplicatas.

4.1.8. Ensaio ELISA

Para avaliação da interação anti-NS1 e NS1 por teste ELISA as microplacas foram revestidas com diferentes concentrações de antígenos NS1 (0,005 - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

diluídos em tampão carbonato pH = 9,0 (50 µL/poço), por 16 horas a 4°C. Os poços foram lavados quatro vezes com tampão PBS-Tween (PBS, 0,05% de Tween 20, 200 µL/poço). O bloqueio foi procedido com BSA 0,1% em PBS pH 7,4 (100 µL/poço) em temperatura ambiente, por 1 hora, seguido de nova lavagem. Em seguida, foram adicionados 50 µL de anticorpo anti-NS1 (1 µg/mL) por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente e incubados com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase, durante 1 hora. Após lavagem, o revelador tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂ foram adicionados à placa. A reação foi bloqueada com H₂SO₂. A leitura foi realizada a 450 nm no leitor de microplacas.

4.2. Resultados e discussão

O principal método utilizado para diagnóstico da dengue é o teste sorológico por ELISA, sendo considerado o método padrão preconizado pela Organização Mundial da Saúde e adotado pelo Ministério da Saúde no Brasil (BRASIL, 2005).

A interação do anticorpo anti-NS1 com o antígeno NS1, ambos comerciais, foi inicialmente avaliada por ensaio ELISA. Para tanto, a placa foi revestida com a proteína NS1, seguido do reconhecimento pelo anticorpo específico.

Esta curva foi construída utilizando o percentual de variação da resposta de interação da proteína NS1, aqui nomeado $\Delta NS1(\%)$, construída da seguinte forma $(D.O._a - D.O._b) / D.O._b$, sendo $D.O._a$ a densidade ótica obtida na amostra e $D.O._b$ a densidade ótica da medida no branco. A Figura 13 apresenta um gráfico que correlaciona $\Delta NS1\%$ versus concentração do analito, evidenciando uma boa linearidade entre os pontos e coeficiente de regressão linear de 0,99, confirmando a interação do par comercial antígeno-anticorpo através da verificação de um sinal de dose resposta à medida que a quantidade de antígeno aumentou. Os limites de detecção foram 0,008 µg/mL ou $1,66 \times 10^{-10}$ mol/L e quantificação 0,03 µg/mL ou $6,25 \times 10^{-10}$ mol/L, comprovando a sensibilidade da interação para este par comercial. Tal fato demonstra confiabilidade para o uso deste par comercial nos ensaios subsequentes.

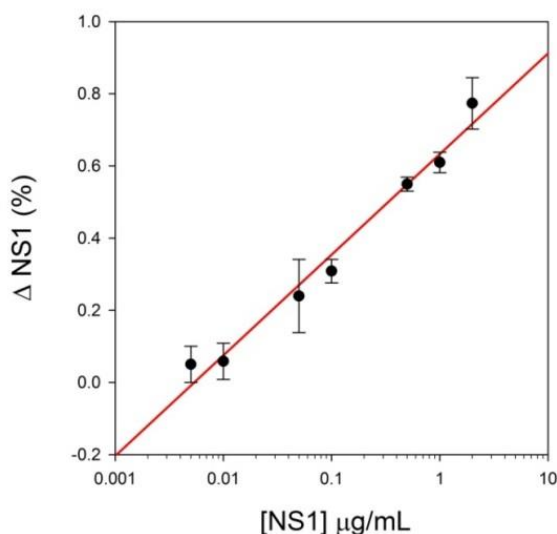


Figura 13. Curva padrão para o ensaio ELISA pela interação do anticorpo anti-NS1 e o antígeno NS1. Microplacas de poliestileno foram revestidas com concentrações de antígenos NS1 (0,005 µg/mL - 5 µg/mL). Após bloqueio com BSA 0,1% o anticorpo Anti-NS1 (1 µg/mL) foi adicionado, seguido de incubação com Anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase. A reação foi revelada com TMB e H₂O₂ e bloqueada com ácido sulfúrico H₂SO₄. A leitura procedida a 450 nm. Cut off = 0.019. O coeficiente de regressão linear obtido foi 0,99.

4.2.1. Construção da SAM mista para ensaios de EIE e ECE

A confirmação da interação antígeno-anticorpo por ELISA nos permitiu explorar esse sistema usando técnicas eletroquímicas, estas são capazes de fornecer uma visão completa e detalhada das características da interface eletrodo/solução, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores, até os estudos de processos cinéticos eletroquímicos (Carvalho; Andrade e Bueno, 2006). Em biossensores, o componente biológico é imobilizado no eletrodo de trabalho e a impedância ou capacitância do sistema é analisada como função da concentração do analito desejado em solução ou em função do tempo (LISDAT e SCHAFER, 2008 e FERNANDES et al., 2013 e FERNANDES et al., 2014).

Neste trabalho, em um primeiro passo, foi dada atenção especial à construção das monocamadas auto-organizadas sobre os eletrodos, pois, através delas, foi feito o acoplamento do anticorpo anti-NS1, possibilitando a funcionalização do eletrodo.

Neste trabalho alcanotióis foram escolhidos para confecção das SAMs. Tióis ligam-se ao ouro devido à afinidade do enxofre por esse metal. O processo de formação dessas monocamadas ocorre em duas etapas: a primeira, rápida, em que a molécula de tiol é adsorvida na superfície metálica, e a segunda, com duração de horas, corresponde ao processo organizacional da monocamada pelas interações intermoleculares entre as espécies adsorvidas adjacentes (ULMAN, 1991).

Para os ensaios de EIE, foi adotada a construção de monocamadas mistas, obtidas pela mistura de dois alcanotióis: 11-MUA e C₆OH na proporção 1:1. O comportamento eletroquímico das monocamadas auto-organizadas sobre eletrodo de ouro foi investigado por meio da CV utilizando uma espécie redox 1 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em solução PBS. No eletrodo limpo, sem moléculas imobilizadas em sua superfície, o par redox forneceu um voltamograma com picos de oxidação e redução, como ilustra a curva (—) Au da Figura 14. Nesta mesma figura a curva (—) SAM, correspondente a monocamada apresentou o bloqueio para o processo redox do par ferri/ferro e, portanto, evidenciou um elevado grau de recobrimento da superfície de ouro, como anteriormente verificado por Cancino, 2008 e Santos, 2012.

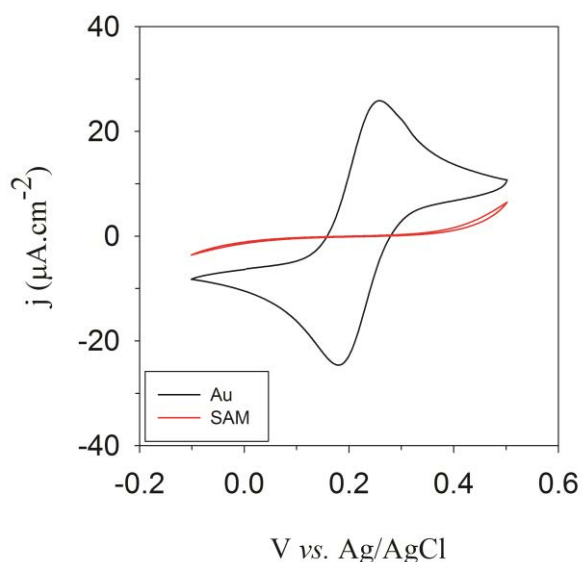


Figura 14. Voltametria cíclica do eletrodo de Au modificado com a monocamada mista de alcanotióis 11-MUA + C₆OH no potencial -0,1 a 0,5V e velocidade de varredura 100 mV/s, evidenciando o processo de oxidação e redução da espécie eletroativa 1 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em solução. O bloqueio significativo dos processos de oxidação e redução foram gerados a partir da imobilização da SAM mista de 11-MUA e C₆OH, na proporção 1:1. No voltamograma estão as correntes de pico catódico (I_{pc}) em 30 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e anódico (I_{pa}) no potencial em 0,2 V.

4.2.2. Processo de Imobilização do Anticorpo e Bloqueio para ensaios de EIE e ECE

Após a ancoragem das SAMs ao eletrodo foi realizada a ativação da monocamada, especificamente ativação do 11-MUA nos ensaios em EIE e 16-mercaptohexadecanoico para ECS, utilizando solução aquosa contendo EDC/NHS. EDC reage com os grupos carboxílicos formando um éster intermediário instável, que quando hidrolisado regenera o grupo carboxílico. Na presença de NHS, ocorre a formação de éster-NHS, composto mais estável, permitindo maior eficiência na reação de imobilização de material biológico (SANTOS, 2012).

Seguido pela ativação dos grupos carboxílicos, o eletrodo foi funcionalizado com adição do anticorpo anti-NS1, posteriormente o eletrodo foi submetido ao bloqueio (Figuras 16a e 16b).

Por EIE (Fig. 16a), pode-se verificar a capacidade impedimétrica à transferência de carga promovida pela imobilização do anticorpo anti-NS1. Esta resistência foi aumentada após adição do bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 0,1% em tampão PBS (pH 7,4). Este aumento de R_{ct} estimado, resistência à transferência de carga estimada, é consistente com um aumento do volume espacial interfacial associado à imobilização do anticorpo (BRYAN et al., 2013).

Paras os ensaios ECE, o eletrodo funcionalizado pela ancoragem e ativação das SAMs, imobilização com anticorpo anti-NS1 e bloqueio com BSA, foi submetido a medidas impedimétricas realizadas em TBAClO₄ dissolvido em acetonitrila: H₂O 20:80.

As medições foram realizadas no potencial de meia onda ($E_{1/2}$), ou seja, na região de potencial com maior atividade faradaica visualizado através de VC, conforme mostrado na Figura 15. Os estados das moléculas redox confinadas determinam o pico de corrente na voltametria cíclica observada na Figura 15 e, depende da estatística de Fermi-Dirac (BUENO; MIZZON E DAVIS, 2012 e BUENO; FABREGAT E DAVIS, 2013). Os valores de C_r foram obtidos a partir da projeção do diâmetro do semi-círculo no eixo C' (Fig. 16b), que evidencia uma variação para o sinal capacitivo quando o anticorpo anti-NS1 é imobilizado. A adição do bloqueio com BSA também promoveu variação do sinal capacitivo. (Fig. 16b).

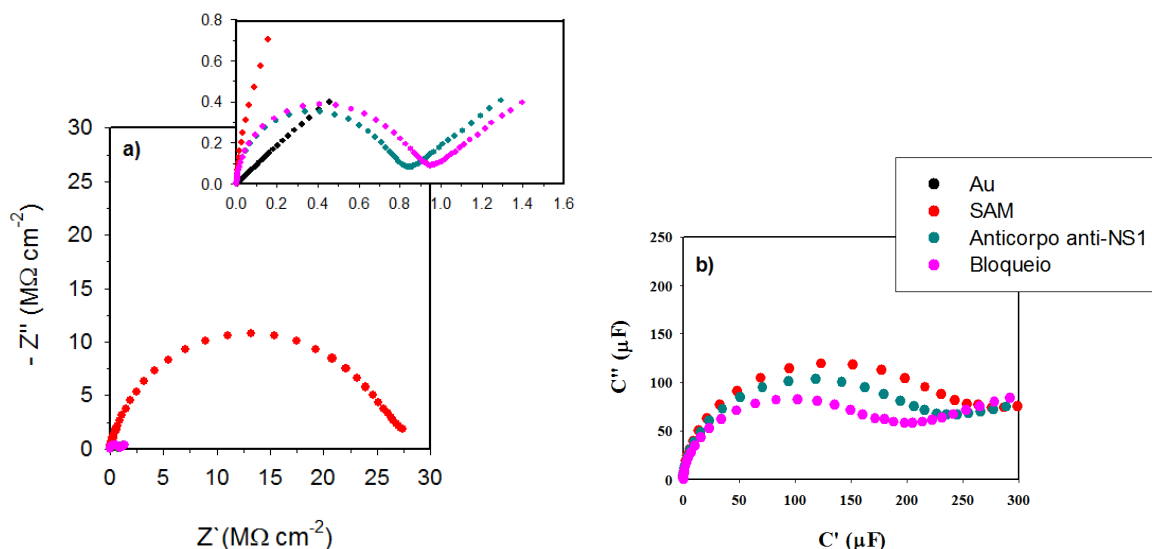


Figura 16. Diagrama de Nyquist, em (a) para os eletrodos utilizados nos testes impedimétricos e (b) para testes capacitivos. **(a)** Ilustração da construção do biossensor funcionalizado, com faixa de frequência de 0.01Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. A camada mista de alcanotióis (11- Mua + 6COH) foi funcionalizada com anticorpo anti-NS1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e, em seguida, bloqueada com adição de BSA 0,1% e **(b)** Resposta capacitiva para o eletrodo funcionalizado como em (a), com faixa de frequência de 0.01 Hz a 100.000 Hz, as medidas foram realizadas em solução de TBAClO_4 em acetonitrila: H_2O 20:80. A camada mista de alcanotióis (11-ferrocenil-undecanotiol + ácido 16-mercaptohexadecanoico) foi funcionalizada com anticorpo anti-NS1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e, em seguida, bloqueada com adição do Bloqueio (BSA 0,1%), e $E_{1/2} \approx 0.44$.

4.2.3. Interação do Anticorpo anti-NS1 com diferentes concentrações de NS1 em PBS

Após a funcionalização dos eletrodos com anticorpo anti-NS1, e bloqueio com BSA, as interfaces preparadas para EIE foram utilizadas para detectar a proteína NS1 diluídas em PBS. Para tanto, estes eletrodos foram incubados com concentrações crescentes do antígeno NS1. Na Figura 17 observa-se a resistência crescente a transferência de carga à medida que as concentrações de antígeno foram adicionadas no eletrodo funcionalizado, corroborando com os dados de Bryan e colaboradores (BRYAN et al., 2013) e Hennessey e colaboradores (HENNESSEY et al., 2009).

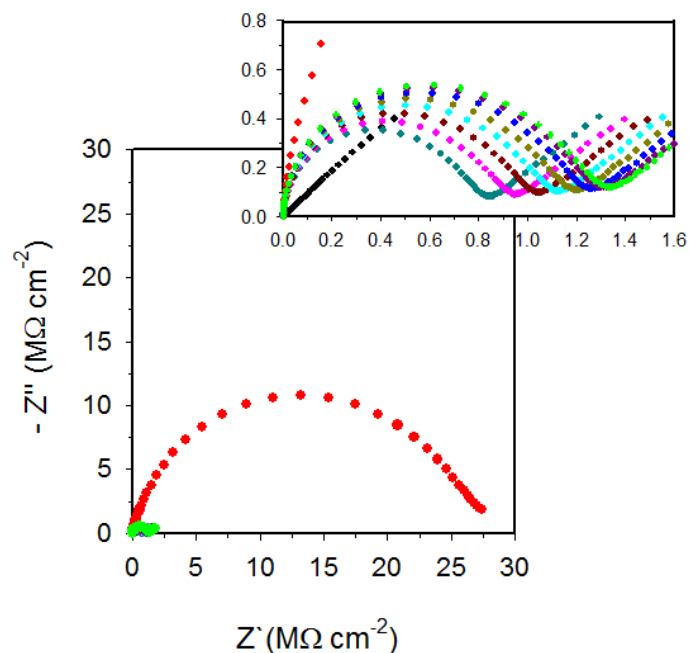


Figura 17. Interação por comercial Antígeno-Anticorpo (NS1 - anti-NS1) por EIE. O eletrodo funcionalizado (SAM + Anticorpo + Bloqueio) recebeu adição sucessiva de diferentes concentrações do analito (NS1: 0,01 - 2 $\mu\text{g/mL}$), a faixa de frequência variou de 0.01 Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução.

Os valores de R_{ct} estimado foram extraídos para construção da curva analítica. Esta curva foi construída utilizando o percentual de variação da resistência à transferência de carga, aqui nomeado $\Delta R\%$ variação da resposta, construída da seguinte forma $(R_{ct,a} - R_{ct,b})/R_{ct,b}$, sendo $R_{ct,a}$ a resistência de transferência de carga obtida na amostra e $R_{ct,b}$ a medida no branco. A Figura 18 apresenta um gráfico que correlaciona $\Delta R\%$ versus concentração do analito, evidenciando uma boa linearidade entre os pontos com coeficiente de regressão linear ($r^2 = 0,99$).

Os limites de detecção (LOD = 0,003 $\mu\text{g/mL}$ ou $6,25 \times 10^{-11}$ mol/L) e quantificação (LOQ = 0,006 $\mu\text{g/mL}$ ou $1,25 \times 10^{-10}$ mol/L) mostrados na Tabela 4 foram bons para a detecção da proteína NS1, quando comparados com valores encontrados anteriormente na literatura, visualizados na Tabela 2 (LONG e WINEFORDNER, 1983).

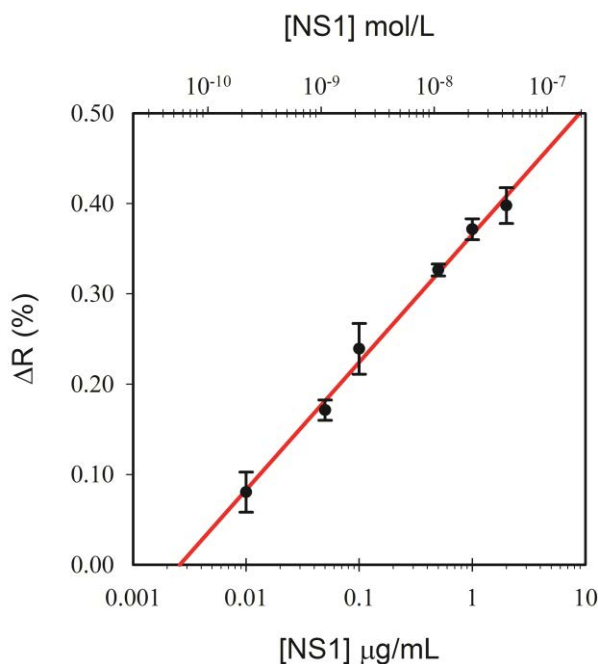


Figura 18. Curva padrão do imunossensor para proteína NS1 do vírus da dengue em PBS. Comparação dos valores da porcentagem (%) de variação da resistência de transferência de carga em função das diferentes concentrações do antígeno NS1. Eletrólito composto por 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução PBS pH 7.4. O coeficiente de regressão linear obtido foi 0,99.

Para o controle da especificidade do anticorpo anti-NS1, foi utilizado uma proteína irrelevante (Fetuína) em substituição a NS1 (Fig. 19a). A concentração utilizada de Fetuína foi 2 µg/mL, correspondente a concentração máxima de NS1 como descrito acima.

Neste sistema não houve interação significativa entre o anticorpo anti-NS1 e Fetuína, visto que os valores da alteração em percentual da resistência à transferência de carga encontrado foi baixo ($\Delta R = 2,2\%$), quando comparados com a interação do NS1 ($\Delta R = 46,0\%$) como ilustrados na Figura 19b.

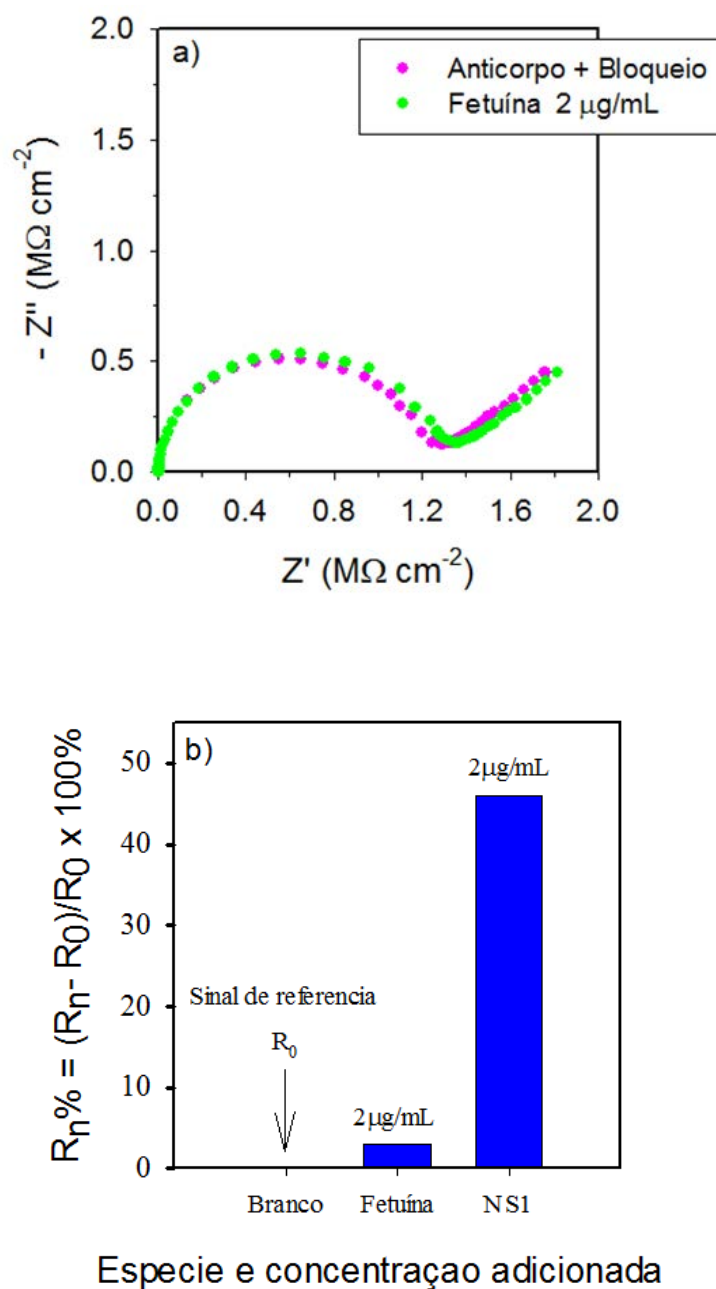


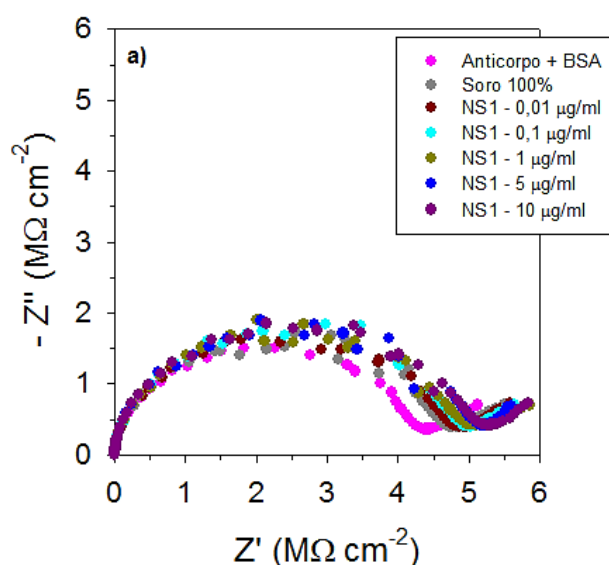
Figura 19. Interação do anticorpo anti-NS1 e fetuína sobre o eletrodo funcionalizado. **(a)** Análise por EIE, com faixa de frequência de 0.01Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1 mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. A camada mista de alcanotóis (11-Mua + C6OH) foi funcionalizada com anticorpo anti-NS1 (1 $\mu\text{g/mL}$), bloqueado com BSA 0,1% e incubada com Fetuína na concentração 2 $\mu\text{g/mL}$. **(b)** Gráfico de barras representativo para resposta do biossensor frente á incubação de diferentes espécies (anticorpo anti-NS1 (Branco), Fetuína e antígeno NS1). R_n corresponde ao R_{ct} do sensor após a incubação das espécies e R_0 corresponde ao R_{ct} do sensor após a incubação do anticorpo anti-NS1.

4.2.4. Curvas eletroanalíticas em Soro

Uma vez construída a curva analítica em PBS, o próximo passo foi a construção da curva utilizando adição sucessiva do analito NS1 (0,01 - 10 $\mu\text{g/mL}$) diluídas em Soro comercial sem diluição, visando uma aplicação diagnóstica futura da dengue. Para tanto os eletrodos funcionalizados com anticorpo anti-NS1 e bloqueados com BSA foram utilizados para detectar a proteína NS1 em Soro. O primeiro ponto da curva foi feito com a incubação somente com o Soro, na ausência do NS1.

Na Figura 20a, observa-se que a resistência à transferência de carga não variou com as concentrações sucessivas do NS1, impossibilitando a extração dos valores de R_{ct} estimado.

A substituição do bloqueio com BSA por Gelatina (Fig. 20b) foi realizado com o intuito de espaçar os valores de R_{ct} de cada concentração, uma vez que a gelatina induz menos adsorção inespecífica comparada ao BSA. Contudo, essa troca de bloqueio não gerou uma alteração significativa do padrão anteriormente observado.



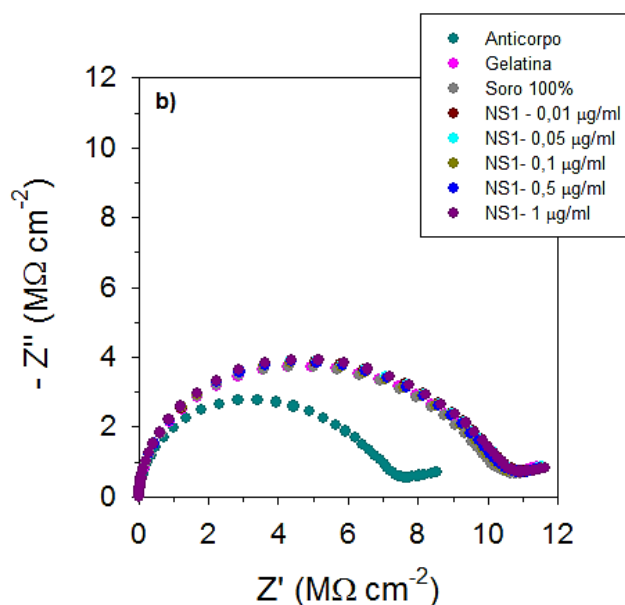


Figura 20. Interação par comercial Antígeno-Anticorpo (NS1 - anti-NS1) por EIE. **(a)** O eletrodo funcionalizado (SAM + Anticorpo + Bloqueio + Soro sem diluição) recebeu adição sucessiva de diferentes concentrações do analito (NS1: 0,01 µg/mL - 1 µg/mL), a faixa de frequência variou de 0.01Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. **(b)** Mesmas condições usando Bloqueio com Gelatina 0,1% em substituição ao BSA.

Por não ter sido observado variações nos valores de R_{ct} estimado nas diferentes concentrações de NS1, mesmo substituindo o bloqueio com BSA por gelatina 0,1%, optou-se por realizar a curva analítica, utilizando apenas o soro sem diluição (1º ponto) como bloqueio do sistema. Pois possivelmente tanto na utilização do BSA quanto Gelatina podem ter gerado o bloqueio total da superfície do eletrodo, impossibilitando a retirada dos valores de R_{ct} , como observado nas Figuras 20a e 20b.

Por EIE, pode-se verificar a capacidade impedimétrica à transferência de carga promovida pela monocamada funcionalizada e pelas sucessivas imobilizações das concentrações da proteína NS1 diluídas em soro, pelo aumento da resistência à transferência de carga após cada incubação do eletrodo (Fig. 21), como observado em outros trabalhos (CAVALCANTI et al., 2012).

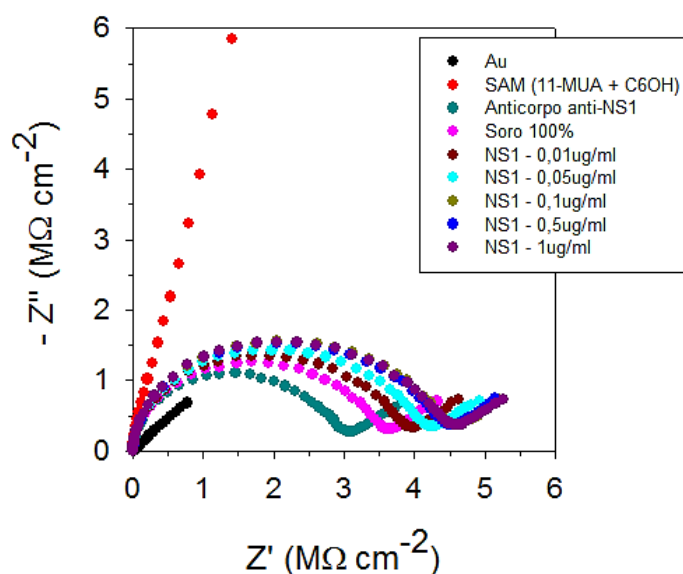


Figura 21. Interação par comercial Antígeno-Anticorpo (NS1 - anti-NS1 utilizando método EIE. O eletrodo funcionalizado (SAM + Anticorpo + Bloqueio) recebeu adição sucessiva de diferentes concentrações do analito (NS1: 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluídas em Soro, a faixa de frequência variou de 0.01Hz a 1 MHz, usando como espécie eletroativa 1mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução PBS pH 7.4. O bloqueio foi realizado com o próprio soro.

Os valores de R_{ct} estimado foram extraídos para construção do gráfico que correlaciona a resistência à transferência de carga e a concentração do analito (Fig. 22). A reta deste gráfico forneceu um $r^2 \cong 0,97$ e o último ponto da concentração (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi excluído pela falta de reprodutibilidade.

Na presença de soro não diluído LOD e LOQ apresentam valores com limites de detecção de 0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($6,25 \times 10^{-10}$ mol/L) em soro e os limites de quantificação foram 29,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($6,16 \times 10^{-7}$ mol/L) em soro (Tabela 4) (LONG e WINEFORDNER, 1983).

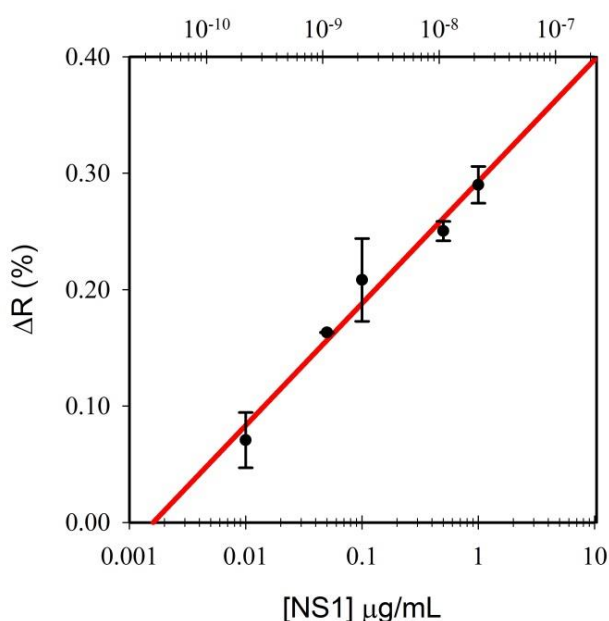


Figura 22. Curva padrão obtida por EIE do imunossensor para proteína NS1 do vírus da dengue em presença de Soro sem diluição. Comparação dos valores da % de variação da resistência à transferência de carga em função das diferentes concentrações do antígeno NS1. Eletrólito composto por 1mmol/L $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. O coeficiente de regressão linear obtido foi 0,97.

Os resultados de LOD foram maiores que o da NS1 diluída em PBS, porém favoráveis, quando comparados a outras metodologias para detecção da proteína NS1 (SU et al., 2003; WU et al., 2005; TAI et al., 2006 e DIAS et al., 2013), mesmo levando em consideração que todas as referências utilizaram soro diluído e neste trabalho foi utilizado soro sem diluição. O alto resultado obtido de LOQ (29,56 µg/mL) pode estar relacionado com a ocorrência de interferências no sistema, possivelmente devido à complexa composição do soro. Embora exista um número elevado de métodos para diagnóstico da dengue em meio biológico, como detecção da proteína NS1 utilizando EIE (CAVALCANTI et al., 2012) e detecção da proteína NS1 do vírus da dengue por Microbalança a cristal de quartzo (DIAS et al., 2013), não existe nenhum relato prévio de método *label free* impedimétrico para detecção de dengue que tenha fornecido uma boa linearidade na resposta utilizando meio biológico complexo não diluído (TELES, 2011), com claros impactos positivos no desenvolvimento de métodos *point of care*.

4.2.5. Curvas analíticas: anti-NS1 com diferentes concentrações de NS1 em PBS utilizando a técnica ECE

Com o intuito de construir um dispositivo de detecção ainda mais sensível, o método analítico utilizando a técnica ECE foi proposto. Para tanto, após a funcionalização dos eletrodos com anticorpo anti-NS1, e bloqueio com BSA, as interfaces preparadas para ECE foram utilizadas para detectar a proteína NS1 diluídas em PBS.

Estes eletrodos foram incubados com concentrações crescentes do antígeno NS1. As medidas foram realizadas na ausência de espécie eletroativa na solução e realizadas no $E_{1/2}$. Pela Figura 23 é possível observar variação significativa da capacitância entre cada ponto, sugerindo interação dose-resposta do antígeno-anticorpo, corroborando com os dados de Fernandes et al., 2013; Lehr et al., 2014; Fernandes et al., 2014; Santos et al., 2014, para resposta de interação de biomarcadores relevantes. C_r pôde ser detectado como consequência da capacidade de armazenamento de energia eletroquímica desta interface e o sinal analítico pôde ser convertido em capacitância redox (C_r), (BUENO et al., 2013).

Os valores da variação do sinal de capacitância C_r foram extraídos para construção da curva analítica. Esta curva foi construída utilizando o percentual de variação da capacitância redox, aqui nomeado $1/\Delta C_r\%$ variação da resposta, construída da seguinte forma $(1/C_{r,a} - 1/C_{r,b})/(1/C_{r,b})$, sendo $C_{r,a}$ a capacitância redox obtida na amostra e $C_{r,b}$ a medida no branco. A Figura 24 apresenta um gráfico que correlaciona $1/\Delta C_r\%$ versus concentração do analito, evidenciando uma boa linearidade entre os pontos com coeficiente de regressão linear ($r^2 = 0,983$).

Os limites de detecção (LOD = 0,0005 $\mu\text{g/mL}$ ou $1,04 \times 10^{-11}$ mol/L) e quantificação (LOQ = 0,003 $\mu\text{g/mL}$ ou $6,25 \times 10^{-11}$ mol/L) mostrados na Tabela 4 (LONG e WINEFORDNER, 1983) colocam a técnica de ECE como favorável para a detecção da proteína NS1, quando comparada aos valores encontrados anteriormente na literatura (Tabela 2). Os resultados de LOD e LOQ foram satisfatórios, quando comparados a outros biossensores utilizando a técnica de ECE para detecção de biomarcadores relevantes (LEHR et al., 2014 e FERNANDES et al., 2014).

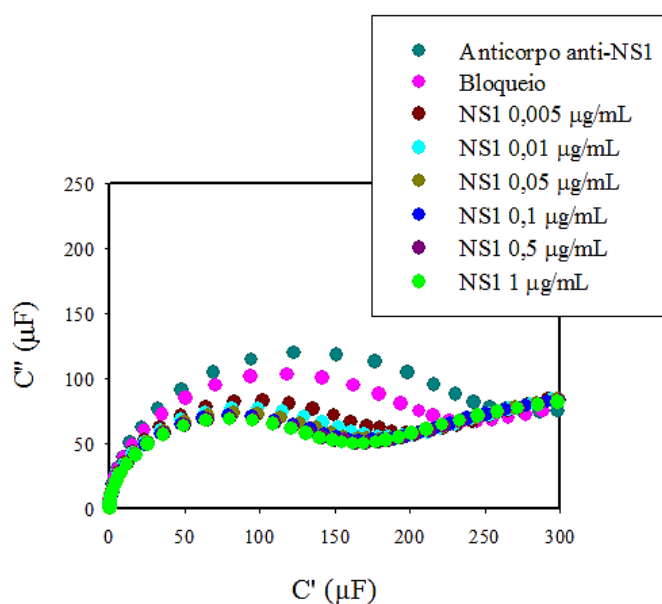


Figura 23. Diagrama de Nyquist. Interação por comercial Antígeno-Anticorpo (NS1 - anti-NS1) utilizando método ECE. O eletrodo funcionalizado (SAM + Anticorpo + Bloqueio) recebeu adição sucessiva de diferentes concentrações do analito (NS1: 0,005 $\mu\text{g/mL}$ - 1 $\mu\text{g/mL}$) diluídas em PBS, a faixa de frequência variou de 0.01 Hz a 100.00 Hz, as medidas de capacitância foram realizadas em TBAClO_4 dissolvido em acetonitrila: H_2O 20:80. C_r foi obtido a partir dos diâmetros dos semicírculos.

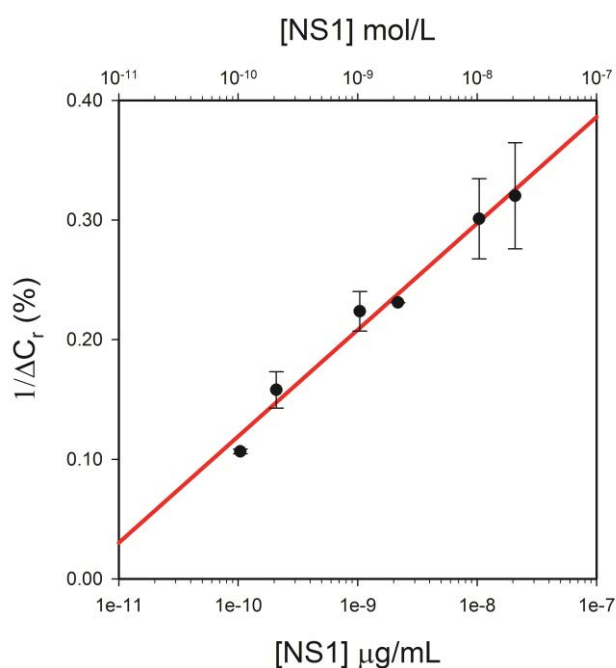


Figura 24. Curva padrão obtida por ECE. Comparação do percentual de variação da parte real da capacitância redox em função da variação da concentração da proteína alvo, relatando o C_r , para proteína NS1 do vírus da dengue diluído em PBS. O coeficiente de regressão linear obtido foi 0,983.

4.2.6. Análise comparativa dos limites de detecção e quantificação obtidos por EIE e ECE

A Tabela 4 resume os valores de limites de detecção e quantificação para detecção da proteína NS1 utilizando as técnicas EIE e ECS. Os limites foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC (LONG e WINEFORDNER, 1983): $LOD = [(3,3 \times y) - a] / b$ e $LOQ = [(10 \times y) - a] / b$ sendo "y" o desvio padrão das medições do ensaio em branco, "a" o coeficiente linear das medições e "b" o coeficiente angular da curva padrão obtido para cada metodologia.

De acordo com os resultados obtidos, para EIE a diluição de NS1 em PBS apresentou bons limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para NS1, porém, quando adicionadas em soro total os valores foram um pouco menores, pois apresentaram (LOD) de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ ou $6,25 \times 10^{-10}$ mol/L e (LOQ) de 29,56 $\mu\text{g/mL}$ ou $6,16 \times 10^{-7}$ mol/L.

Comparando os resultados obtidos para os experimentos de detecção da proteína NS1 em PBS, o experimento em ECE se mostrou mais sensível, com LOD de 0,0005 $\mu\text{g/mL}$ e LOQ de 0,003 $\mu\text{g/mL}$, quando comparados ao experimento em EIE, com LOD de 0,003 $\mu\text{g/mL}$ e LOQ de 0,006 $\mu\text{g/mL}$. Com uma diferença de LOD de 6 vezes mais sensível e LOQ de 2 vezes mais sensível para os ensaios em ECE.

Tabela 4. Parâmetros analíticos para detecção da proteína NS1						
	NS1 em PBS (EIE)		NS1 em Soro (EIE)		NS1 em PBS (ECE)	
	$\mu\text{g/mL}$	mol/L	$\mu\text{g/mL}$	mol/L	$\mu\text{g/mL}$	mol/L
Faixa Linear	0,01 - 2	$2,1 \times 10^{-10}$ - $4,2 \times 10^{-8}$	0,01 - 1	$2,1 \times 10^{-10}$ - $2,1 \times 10^{-8}$	0,005 - 1	$1,04 \times 10^{-10}$ - $2,1 \times 10^{-8}$
L.O.D	0,003	$6,25 \times 10^{-11}$	0,03	$6,25 \times 10^{-10}$	0,0005	$1,04 \times 10^{-11}$
L.O.Q	0,006	$1,25 \times 10^{-10}$	29,56	$6,16 \times 10^{-7}$	0,003	$6,25 \times 10^{-11}$

A detecção direta de biomarcadores relevantes em fluidos biológicos é altamente desejável, no entanto, do ponto de vista prático, esta perspectiva requer exigências e cuidados, pois as medições são dificultadas em amostras biológicas, como o soro (especialmente 100% como no caso realizado aqui por EIE). Porém, em condições diluídas (10% até 50%) as respostas foram promissoras na construção da curva de padrão como descrito por (XU; LUO e DAVIS, 2013 e BRYAN et al., 2013).

Independente do estado de diluição da amostra, o emprego de tecnologia microfluídica em dispositivos *point-of-care* e em análises laboratoriais poderá permitir inferir a positividade da doença já que é possível controlar o nível de diluição *in situ* na análise, permitindo a possibilidade de detectar moléculas numa faixa de concentração ampla com pequeno volume de amostra e de forma rápida e eficiente. A microfluídica permite manipular com precisão quantidades muito pequenas de fluidos em micro escala. Ela permite rápida execução e resposta, apresenta boa eficiência, sensibilidade e portabilidade, economia de amostras e reagentes, possibilidade de escalonamento, multiplexação e automação (NAHAVANDI et al., 2014).

4.2.7. Considerações Finais

Os resultados obtidos mostram um bom desempenho na aplicação da técnica eletroquímica impedimétrica e capacitiva para o desenvolvimento de biossensores funcionalizados capazes de detectar antígenos NS1 da dengue. Neste trabalho foi desenvolvido um método *label free* para diagnóstico da proteína NS1, da dengue, pela técnica EIE e ECE, apresentando boa sensibilidade para rastreamento de NS1 diluído em PBS. Para aplicação da técnica diretamente em Soro não diluído ajustes na engenharia de superfície poderão oferecer melhores resultados em um breve futuro, bem como propiciará a avaliação de amostras de soros não diluídas pela técnica ECE, i.e. com grande potencial para aplicações em diagnósticos do tipo *point of care*. O diagnóstico mais rápido e preciso poderá propiciar um tratamento mais específico, além de contribuir para as avaliações epidemiológicas e controle da doença.

Referências

- AASKOV, J. G. Infectious diseases: dengue. **ADF Health Journal**, v. 4, p. 66-71, 2003. Disponível em: <http://www.defence.gov.au/health/infocentre/journals/ADFHJ_sep03/ADFHealth_4_2_66-71.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2014.
- ACHESON, N. H. **Fundamental of molecular virology**. New York: Academic Press, 2007.
- ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.
- BAEUMNER, A. J. et al. Biosensor for dengue virus detection: sensitive, rapid, and serotype specific. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 6, p. 1442-1448, 2002.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- BARTON, A. C; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Labelless immunosensor assay for prostate specific antigen with picogram per milliliter limits of detection based upon an ac impedance protocol. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 16, p. 6198-6205, 2008.
- BISORDI, I. et al. Evaluation of dengue NS1 antigen detection for diagnosis in public health laboratories, São Paulo State, 2009. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 6, p. 315-320, 2011.
- BLACKSELL, S. D. et al. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 775-784, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: descrição da doença**. 2002. Disponível em: <www.portalsaude.saude.gov.br/index.php/descricao-da-doenca-dengue>. Acesso em: 23 jul. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília, 2005. (Série A: normas e manuais técnicos). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3463ca004745920f9a61de3fbc4c6735/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 23 jul. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v44n1/23.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue**: informações gerais. 2013. Disponível em: <www.portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-gerais-dengue>. Acesso em: 23 jul. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Dengue: monitoramento até a semana epidemiológica (SE) 27 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, n. 16, p. 16, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/17/BE-2014-45--16---Dengue--SE27-.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2014.

BRYAN, T. et al. An optimised electrochemical biosensor for the label free detection of C-reactive protein in blood. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, p. 94-98, 2013.

BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Measuring quantum capacitance in energetically addressable molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 1337-1341, 2014a.

BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Elucidating redox-level dispersion and local dielectric effects within electroactive molecular films. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 1997-2004, 2014b.

BUENO, P. R.; FABREGAT-SANTIAGO, F.; DAVIS, J. J. Elucidating capacitance and resistance terms in confined electroactive molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 411- 417, 2013.

BUENO, P. R.; MIZZON, G.; DAVIS, J. J. Capacitance spectroscopy: a versatile approach to resolving the redox density of states and kinetics in redox-active self-assembled monolayers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 30, p. 8822-8829, 2012.

BUENO, P. R. et al. A facile measurement of heterogeneous electron transfer kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 10920-10926, 2013.

CAMPUZANO, S. et al. Characterization of alkanethiol self assembled monolayers modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 586, n. 1, p. 112-121, 2006.

CANCINO, J. C. **Eletrodos modificados com monocamadas auto-organizadas de alconotíóis**: uma abordagem sobre transferência eletrônica. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CARVALHO, L. A. D; ANDRADE, A. R. D.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em anodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, p. 796-804, 2006.

CATÃO, R. D. C. **Dengue no Brasil**: abordagem geográfica na escala nacional. São Paulo: Ed. UNESP, 2011.

- CAVALCANTI, I. T. et al. A label-free immunosensor based on recordable compact disk chip for early diagnostic of the dengue virus infection. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 225-230, 2012.
- CHAWLA, P.; AMRITA, Y.; VINEY, C. Clinical implications and treatment of dengue. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 3, p. 169-178, 2014.
- CHENG, M. S. et al. Development of an electrochemical membrane-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of dengue virus. **Analytica Chimica Acta**, v. 725, p. 74-80, 2012.
- CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus: genome organization, expression and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.
- CHEN, S. H. et al. A method of layer-by-layer gold nanoparticle hybridization in a quartz crystal microbalance DNA sensing system used to detect dengue virus. **Nanotechnology**, v. 20, n. 21, 2009. doi: 10.1088/0957-4484/20/21/215501.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.
- CROOKS, A. J. et al. The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 3453-3460, 1994.
- DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIE e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.
- DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.
- DAS D.; MONGKOLAUNGKON, S.; SURESH, M. R. Super induction of dengue virus NS1 protein in E. coli. **Protein Expression and Purification**, v. 66, p. 66-72, 2009.
- DIAS, A. C. M. S. et al. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 216-221, 2013.
- EDELING, M. A.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **PNAS**, v. 111, n. 11, p. 4285-4290, 2014.
- ELLERBEE, A. K. et al. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 8447-8452, 2009.
- ELSHAFEY, R. et al. Label-free impedimetric immunosensor for ultrasensitive detection of cancer marker Murine double minute 2 in brain tissue. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, p. 220-225, 2013.

- ESTEBAN, J. M.; ORAZEM, M. E. On the application of the kramers-kronig relations to evaluate the consistency of electrochemical impedance data. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 138, n. 1, p. 67-76, 1991.
- FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Quimica Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.
- FERNANDES, F. C. B. et al. Label free redox capacitive biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 437-440, 2013.
- FERNANDES, F. C. B. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 96-102, 2014.
- FLAMAND, M. et al. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of Virology**, v. 73, n. 7, p. 6104-6110, 1999.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.
- GUTSCHE, I. et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. **PNAS**, v. 108, n. 19, p. 8003-8008, 2011.
- GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **The Lancet**, v. 8, p. 69-80, 2004.
- HALSTEAD, S. B. Seminar. Dengue. **The Lancet**, v. 370, p. 1644-1652, 2007.
- HENNESSEY, H. et al. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, p. 45-53, 2009.
- JACOBS, S. C.; STEPHENSEN, J. R.; WILKINSON, G. W. High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: protection elicited in a murine model. **Journal of Virology**, v. 66, p. 2086-2095, 1992.
- JOHNSON, A. et al. Sensitive and specific label-free detection of clinical biomarkers. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6553-6560, 2012.
- K'OWINO, I. O.; SADIK, O. A. Impedance spectroscopy: a powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring. **Electroanalysis**, v. 17, n. 23, p. 2101-2113, 2005.
- KUMARASAMY, V. et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 75-79, 2007.
- KUMBHAT, S. et al. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 255-259, 2010.

- KWAKYE, S.; BAEUMNER, A. A microfluidic biosensor based on nucleic acid sequence recognition. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 1062-1068, 2003.
- LEHR, J. et al. Label-free capacitive diagnostics: exploiting local redox probe state occupancy. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 2559-2564, 2014.
- LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165-1168, 2002.
- LINDENBACH B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.
- LISDAT, F.; SCHAFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555-1556, 2008.
- LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712-724, 1983.
- LUO, X.; DAVIS, J. J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 5944-5962, 2013.
- MacDONALD, J. R. Impedance spectroscopy. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Encyclopedia of physical science and technology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2003. p. 703-715.
- MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, n. 1, p. 232-240, 1996.
- MOREIRA, C. S. et al. **Biosensores: tecnologia e aplicações**. Disponível em: <<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/biotecnologia/biosensores.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2014.
- MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, v. 98, n. 2, p. 192-208, 2013.
- NAHAVANDI, S. et al. Microfluidic platforms for biomarker analysis. **Lab on a Chip**, v. 14, p. 1496-1514, 2014.
- NOISAKRAN, S. et al. Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. **Journal of Virological Methods**, v. 142, n. 1, p. 67-80, 2007.
- OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 728-732, 2009.

- ORGANIZACION PAN-AMERICANA DE SAUDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Descripción de la situación epidemiologica actual del dengue en las Américas**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494:descripcion-situacion-epidemiologica-actual-dengue-americas&Itemid=2481&lang=pt>. Acesso em: 23 jul. 2014.
- PEREIRA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.
- RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Virology**. New York: Raven Press, 1996. p. 931-960.
- SANTOS, A. **Estudo da afinidade das proteínas rTgMIC1 E rTgMIC4 da *Toxoplasma Gondii* com glicoproteínas utilizando técnica piezométrica**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- SANTOS, A.; DAVIS, J. J.; BUENO, P. R. Fundamentals and applications of impedimetric and redox capacitive biosensors. **Journal Analytical Bioanalytical Chemistry Techniques**, 2014. doi:10.4172/2155-9872.S7-016
- SANTOS, A. et al. Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin-glycoprotein binding affinity. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 62, p. 102-105, 2014.
- SILVA, F. G. et al. Evaluation of commercial kits for detecting the antigen NS1-dengue - São Paulo. **Bepa**, v. 8, n. 91, p. 14-26, 2011.
- SIMMONS, C. P. Dengue. **Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, 2012.
- SRIKIATKHCHORN, A. Plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, n. 6, p. 1042-1049, 2009.
- SU, C. C. et al. Development of immunochips for the detection of dengue viral antigens. **Analytica Chimica Acta**, v. 479, n. 2, p. 117-123, 2003.
- TAI, D. F. et al. Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1486-1491, 2006.
- TANIGUCHI, I. et al. Reversible electrochemical reduction and oxidation of cytochrome c at a bis (4-pyridyl) disulphide-modified gold electrode. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 18, p. 1032-1033, 1982.
- TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, p. 7-18, 2009. Suplemento 1.
- TKAC, J.; DAVIS, J. J. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, n. 1, p. 117-120, 2008.

TORRES, L. **Epidemia de dengue chega a 32,3 mil notificações e 3 mortes em Campinas**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/2014/05/epidemia-de-dengue-chega-323-mil-notificacoes-e-3-mortes-em-campinas.html>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.

VILLAVERDE, A. Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis. **Febs Letters**, v. 554, n.1, p. 169-172, 2003.

VO, D. T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 336, p. 540-551, 2000.

WINKLER, G. et al. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. **Virology**, v. 171, n. 1, p. 302-305, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Distribution of countries or areas at risk of dengue transmission, 2008**. Disponível em: <http://www.gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_dengue_2008.png>. Acesso em: 23 jul. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases, hidden successes, emerging opportunities**. Geneva: WHO, 2009.

WU, T. Z. et. al. Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 689-695, 2005.

XU, M.; LUO, X.; DAVIS, J. J. The label free picomolar detection of insulin in blood serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, p. 21-25, 2013.

ZHANG, Y. et al. Toward the detection of single virus particle in serum. **Analytical Biochemistry**, v. 356, p. 161-170, 2006.

ZHANG, X. Z. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus in 3.5 Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 105-110, 2013.