

JULIANA CECCHETTO

Engenharia de superfícies para diagnóstico de dengue

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

C387e Cecchetto, Juliana
Engenharia de superfícies para diagnóstico de dengue /
Juliana Cecchetto. – Araraquara : [s.n.], 2019
111 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Paulo Roberto Bueno

1. Dengue. 2. Diagnóstico virológico. 3. Biossensores.
4. Espectroscopia de impedância. 5. Análise eletroquímica.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

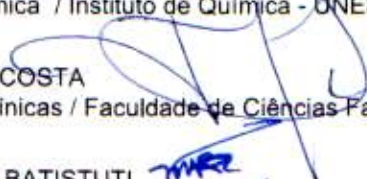
TÍTULO DA TESE: "Engenharia de superfícies para diagnóstico de dengue"

AUTORA: JULIANA CECCHETTO

ORIENTADOR: PAULO ROBERTO BUENO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO ROBERTO BUENO 
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA 
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. MARINA RIBEIRO BATISTUTI 
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. GUSTAVO TROIANO FELICIANO 
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI 
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 04 de outubro de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Juliana Cecchetto

Nome em citações bibliográficas: Juliana Cecchetto; CECCHETTO, JULIANA.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Unesp - Instituto de Química, Departamento de Físico-Química

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha

CEP: 14800-060, Araraquara, São Paulo, Brasil

Contato: (16) 99723.0525

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2004 – 2007. Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto.

Relatório de Estágio Supervisionado: Relatório referente ao estágio supervisionado realizado na Escola Estadual Professor Rafael Leme Franco.

2012 – 2015. Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química, Campus de Araraquara.

Dissertação: Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para diagnóstico de dengue.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Co-orientadora: Dr. Fernanda Carvalho

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

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

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

2008. Escolas Estaduais: Professora de Biologia e Química.

2011- 2012. Fundecitrus: Vínculo empregatício. Análise de pragas do Citrus (PCR, RT-PCR, Eletroforese e ELISA).

2017 – 2019. Drogaria Total - Unidade São Bruno. Vínculo empregatício. Gerente de farmácia. Gestão de todas as atividades da loja e a liderança da equipe.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. CECCHETTO, JULIANA; SANTOS, ADRIANO; FERNANDES, FLÁVIO C. B.; BUENO, PAULO R. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, v. 213, p. 150-154, 2015.
2. CECCHETTO, J.; FERNANDES, F.C.B.; LOPES, R.; BUENO, P.R. The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 87, p. 949-956, 2017.

PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

1ª Escola de Modelagem Molecular da UNESP (1ª EMMUNESP)

The 5th International Symposium on Sensor Science 27 – 29 September 2017
Barcelona, Spain.

ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

Estágio de docência realizado no segundo semestre de 2016

Curso de graduação: Farmácia Bioquímica

Disciplina: Biotecnologia

Período: Integral

Professora responsável pela disciplina: Profa. Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro

PEDIDO DE COMITÊ DE ÉTICA HUMANO (CEP)

Pedido de autorização ao Comitê de Ética Humano (CEP - Unesp - Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara), para uso de amostras biológicas de pacientes infectados com o vírus da dengue.

CAAE: 59590416.6.0000.5426

Situação da versão do projeto: Aprovado

*A Deus, pelo crescimento e
à meus pais, Maria Silvia Figueira Cecchetto e
José Marcos Cecchetto
pelo apoio incondicional e
por acreditarem no meu potencial.
A Alex Dantas,
pelo companheirismo e paciência
nos momentos de maior dificuldade.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno pela oportunidade oferecida, bem como sua orientação e apoio nos momentos difíceis do projeto.

Ao Prof. Dr. Adriano Mondini, pela parceria no projeto, disponibilizando todo seu laboratório e alunos, em particular, a doutoranda Bruna Mateus de Castilho, para utilização de amostras de pacientes infectados com dengue.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, pela parceria oferecida, com seu laboratório na etapa de síntese de peptídeos.

À Dr. Julia Piccoli e a doutoranda Elielma Araújo, pelo importante apoio na síntese de peptídeos.

Ao Dr. Adriano dos Santos, cuja participação ao longo do meu Mestrado e doutoramento, como aluno de doutorado e pós-doutorado, foi de extrema importância, tanto no âmbito do meu projeto, quanto na paciência de esclarecer as dúvidas geradas ao longo destes anos.

À Rose Portasio, pelo apoio nas questões técnicas e burocráticas que surgiram no transcorrer do trabalho.

Aos amigos e companheiros de laboratório Adriano dos Santos, Flávio Bedatty, Tiago Benites, Juliana Andrade, Elielma Araújo, Raphael Mazzine, Beatriz Luga e Laís Lopes, pela amizade, apoio, carinho e pelas discussões e contribuições geradas. Em especial, a Rute Lopes, pelo apoio e amizade incondicional nos momentos mais difíceis desta trajetória, e também nas horas boas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia.

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.

Ao CNPq (processo: 140963/2015-4) pela concessão da bolsa durante os primeiros dois anos de realização deste doutorado.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

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

“A inteligência é o farol que nos guia, mas é a vontade que nos faz caminhar.”

Érico Veríssimo (1905 - 1975)

RESUMO

Nesta tese foi desenvolvido um biossensor capacitivo redox para detecção e quantificação de diferentes concentrações do antígeno NS1 do vírus da dengue. Primeiramente, o sensor foi construído com eletrodos convencionais, em PBS e soro comercial com posterior validação do sistema, no qual, respondeu de maneira satisfatória. A próxima etapa foi a construção do biossensor realizado em eletrodos microfabricados, para possibilitar análises portáteis, porém este sistema não teve êxito, pela instabilidade da superfície dos mesmos. Em seguida, o sensoramento foi realizado com amostras de soro de pacientes infectados com o vírus da dengue. A abordagem foi baseada na construção da superfície receptora (contendo anticorpo anti-NS1), utilizando SAMs mistas de tióis, (16-mercaptohexadecanóico, 16-MHDA) e (11-ferrocenil-undecanotiol, 11Fc) com o grupo redox, para medições capacitivas, que possibilitam a automontagem no eletrodo, sendo que cada etapa do processo de construção do biossensor foi monitorada por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância/capacitância eletroquímica, com intuito de comparação com o sistema impedimétrico já analisado anteriormente. Pela técnica de espectroscopia de capacitância eletroquímica, a interface funcionalizada e sua interação com o analito, proteína NS1, geram uma variação do sinal de capacitância redox (C_r), servindo dessa forma como sinal transdutor. Uma vez que em sua configuração os sensores capacitivos redox não usam espécie eletroativa em solução (pois ela está confinada na monocamada), estes são potencialmente adequados ao desenvolvimento de diagnósticos do tipo *point-of-care* (exame rápido com apenas um passo para detecção). Fatores como sensibilidade, reprodutibilidade, repetibilidade, limite de detecção e de quantificação foram avaliados e para amostras de soro comercial sem diluição, apresentaram LoD $\sim 5 \text{ ng mL}^{-1}$. Após, a metodologia foi modificada utilizando monocamada peptídica redox, mais adequada para análises em matriz biológica complexas, no qual foi testada em biblioteca de amostras de sangue de pacientes infectados ou não com o vírus da dengue, o que permitiu avaliar a aplicação clínica da metodologia proposta, evidenciando respostas relativas RR% para amostras negativas inferiores ao *cut-off*, enquanto que para amostras positivas variaram de ~ 6 a 9%. Esta tese teve seu propósito alcançado, com isso, a avaliação de um maior número de amostras de pacientes, por parcerias em laboratórios e hospitais será fundamental para conseguir-se vislumbrar uma nova ferramenta diagnóstica para biomarcadores de interesse clínico em um futuro próximo.

Palavra chave: Dengue. Diagnóstico virológico. Biossensores. Espectroscopia de impedância. Análise eletroquímica.

ABSTRACT

In this thesis a redox capacitive biosensor was developed to detect and quantify different concentrations of dengue virus NS1 antigen. Firstly, the sensor was constructed with conventional electrodes in PBS and commercial serum with subsequent system validation, in which it responded satisfactorily. The next step was the construction of the biosensor made in microfabricated electrodes, to enable portable analysis, but this system was unsuccessful due to their surface instability. Then, the sensing was performed with serum samples from patients infected with dengue virus. The approach was based on the construction of the receptor surface (containing anti-NS1 antibody) using mixed thiol SAMs, (16-mercaptohexadecanoic, 16-MHDA) and (11-ferrocenyl undecanethiol, 11Fc) with the redox group for measurements capacitive which enable self-assembly on the electrode, and each step of the biosensor construction process was monitored by cyclic voltammetry and electrochemical impedance/capacitance spectroscopy, in order to compare it with the impedimetric system already analyzed previously. Using the electrochemical capacitance spectroscopy technique, the functionalized interface and its interaction with the analyte, protein NS1, generate a variation of the redox capacitance signal (C_r), thus serving as a transducer signal. Since redox capacitive sensors in their configuration do not use electroactive species in solution (as it is confined in the monolayer), they are potentially suitable for the development of *point-of-care* diagnostics (one-step rapid examination for detection). Factors such as sensitivity, reproducibility, repeatability, limit of detection and quantification were evaluated and for undiluted commercial serum samples presented LoD $\sim 5 \text{ ng mL}^{-1}$. Afterwards, the methodology was modified using redox peptide monolayer, more suitable for complex biological matrix analysis, which was tested in a library of blood samples from patients infected or not with dengue virus, which allowed to evaluate the clinical application of the methodology proposed, showing relative responses RR% for negative samples lower than the cut-off, while for positive samples ranged from ~ 6 to 9%. This thesis had its purpose achieved; therefore, the use of a greater number of samples by partnerships in laboratories and hospitals which will be fundamental for the development of a new diagnostic tool for biomarkers of clinical interest.

Keywords: Dengue. Virological diagnosis. Biosensors. Impedance spectroscopy. Electrochemical analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial de <i>Aedes aegypti</i> e potenciais infecções de dengue.....	20
Figura 2. Distribuição da incidência de casos prováveis de dengue (/100mil hab.), até a semana epidemiológica 12, Brasil, 2019.....	23
Figura 3. Organização estrutural do vírus da dengue. Vírus da dengue são envelopados, contendo três proteínas estruturais; proteína envelope (E) e membrana (M) (azul escuro e azul claro, respectivamente) são ancoradas na membrana viral (verde) e a proteína do capsídeo (C) (laranja) cobre o genoma viral (roxo).	25
Figura 4. Diagrama organizacional genômico e processamento da poliproteína dos DENV. a) organização das proteínas estruturais e não estruturais na poliproteína. b) topologia de sua membrana, prevista a partir de análises bioquímicas e celulares. As setas indicam o processamento por proteases celulares e virais. c) diferentes complexos que surgem durante e após processamento da poliproteína.	26
Figura 5. Diagrama esquemático diagrama esquemático com as principais funções das proteínas estruturais e não estruturais dos DENV.	28
Figura 6. Representação do ciclo de replicação dos DENV.	31
Figura 7. Cinética antígeno e anticorpo nas infecções por DENV.	32
Figura 8. Classificação dos casos de dengue de acordo com a OMS.	34
Figura 9. Disponibilidade e especificidade dos métodos diretos e indiretos para o diagnóstico das infecções por DENV.	35
Figura 10. Desenvolvimento de um biossensor. Representação esquemática de um biossensor. A amostra contendo o analito (biomarcador) entra em contato com o elemento de reconhecimento biológico (anticorpo, DNA, RNA, aptâmero, células, etc) imobilizado no transdutor (eletroquímico, piezoeletrico, óptico, térmico, etc.). Esta interação de reconhecimento biológico é convertida pelo transdutor num sinal elétrico mensurável.	38
Figura 11. Faixa de sensibilidade de diferentes métodos diagnósticos. Capacidade de detecção (valores aproximados) de biomarcadores através de diferentes técnicas analíticas. QCM: Quartz crystal microbalance (microbalança a cristal de quartzo) (SPEIGHT; COOPER, 2012); SPR: Surface plasmon resonance spectroscopy (Espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície) (REDDY et al., 2012); ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio de imunoabsorção enzimática) (ALCON et al., 2002); LSPR: Localised surface plasmon resonance spectroscopy (Espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície localizada)(ZHAO, JING et al., 2006); CNT FET: Carbon-nanotube field-effect transistor (Transistor de efeito de campo a base de nanotubos de carbono) (ALLEN; KICHAMBARE; STAR, 2007); FET: Field-effect transistor (Transistor de efeito de campo) (HIDESHIMA et al., 2013).	40

Figura 12. Peptídeo (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys). 45

Figura 13. 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. 47

Figura 14. 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, 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, $C_m \ll C_l$ de uma forma de R_l e C_l controlar a monocamada dielétrica (não faradaica). 53

Figura 15. Ilustração do eletrodo microfabricado da Micrux. 61

Figura 16. Voltamogramas para o processo de limpeza do eletrodo de ouro. (a) Voltamograma para o processo de limpeza do eletrodo de ouro. (a) Voltamograma típico obtido na etapa de dessorção eletroquímica utilizando solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Faixa de potencial $-1,7$ a $-0,7 \text{ V}$ ($\times \text{ Ag|AgCl}$), 100 mVs^{-1} , 400 ciclos. (b) Voltamograma obtido no processo de limpeza eletroquímica da superfície de ouro (25° ciclo), utilizando solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Faixa de potencial $-0,2$ a $1,5 \text{ V}$ ($\times \text{ Ag|AgCl}$), 100 mVs^{-1} , 25 ciclos. A área hachurada indica a região utilizada para o cálculo da área do eletrodo. 64

Figura 17. Representação comparativa para abordagens EIE (a, b, c) e ECE (d, e, f). Em (a) engenharia impedimétrica de uma superfície com solução mista de SAM (MUA + 6COH). Em (b) o sinal do transdutor é baseado na resistência de transferência de elétrons (R_{ct}) associado à sonda redox presente em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Em (c) a capacitância complexa derivada da impedância mostra uma contribuição da dupla camada elétrica e relaxamento iônico. (d) Engenharia da superfície capacitiva na superfície de ouro, com uma solução mista de SAM composta de 16-MHDA e 11-Fc com centros eletroativos (sonda redox acoplada). Em (e) a sonda redox dentro da monocamada fornece o sinal de capacitância redox, C_r , que é obtido a partir da conversão dos dados $Z' * (\omega)$ em $C' * (\omega)$. O componente real (C') e imaginário (C'') de capacitância são representados no gráfico capacitivo de Nyquist mostrado em (f). 66

Figura 18. Ensaio por imunoblot para avaliação da interação e atividade entre o par comercial antígeno-anticorpo das proteínas NS1/anti-NS1. 70

Figura 19. Interação do anticorpo anti-NS1 e o antígeno NS1 por ELISA. Microplacas de poliestileno foram revestidas com antígenos NS1 (5 ng mL^{-1} – 1000 ng mL^{-1}). A leitura procedida a 450 nm 71

Figura 20. Análise do eletrodo microfabricado de Au da Micrux sem tratamento prévio. (a) 5000 × (b) 10000 × (c) 150000 ×. 72

Figura 21. Imagem do eletrodo microfabricado, MicroEl-1 por FEG e consecutiva análise por EDS. . 72

Figura 22. Análise do eletrodo microfabricado de Au da Micrux com limpeza convencional. (a) 5000 × (b) 10000 × (c) 150000 ×. 73

Figura 23. Análise do eletrodo microfabricado de Au da Micrux com limpeza convencional + tratamento térmico. (a) 5000 × (b) 10000 × (c) 150000 ×. 74

Figura 24. Resposta da superfície do Au do eletrodo microfabricado. a) CV para limpeza eletroquímica. b) CV das medidas da superfície de Au. c) Diagrama de Nyquist para teste impedimétrico com medidas sucessivas para determinar a estabilidade do Au, realizadas na faixa de frequência de 0,01Hz a 100 KHz, usando como espécie eletroativa $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. 75

Figura 25. Resposta de superfície do eletrodo de Au da Metrohm. (a) CV para limpeza eletroquímica. (b) CV para medidas da superfície de Au. (c) Diagrama de Nyquist para teste impedimétrico com medidas sucessivas para determinar a estabilidade do Au, realizadas na faixa de frequência de 0,01Hz a 100 KHz, usando como espécie eletroativa $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. 76

Figura 26. Diagrama de Nysquist para funcionalização do eletrodo microfabricado. Construção do biossensor funcionalizado, com faixa de frequência de 0.01Hz a 100 kHz, usando como espécie eletroativa $1 \text{ mmol/L } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. A monocamada mista de tióis com diferentes proporções (11-MUA + 6COH) foi funcionalizada com anticorpo anti-NS1 ($1,000 \text{ ng mL}^{-1}$) e, em seguida, bloqueada com adição de BSA 0,1%. a) monocamada na proporção [1:1], denominada SUPERFÍCIE-1. b) proporção [1:5], SUPERFÍCIE-2. c) proporção [1:10], SUPERFÍCIE-3 e c) proporção [1:20], SUPERFÍCIE-4. 77

Figura 27. Voltametria cíclica do eletrodo de Au modificado com a monocamada mista de tióis 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 $1 \text{ mmol/L } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. O bloqueio significativo dos processos de oxidação e redução foram gerados a partir da imobilização da SAM mista de 11-MUA e C₆OH, 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. 79

Figura 28. Voltamograma cíclico da atividade redox existente na monocamada mista de 11-ferrocenil-undecanotiol + 16-mercaptohexadecanóico no potencial -0,2 a 0,8V com velocidade de varredura 100 mV s⁻¹ medido com eletrodo de referência de Ag|AgCl. Voltamograma realizado em solução TBAClO₄ dissolvido em acetonitrila: H₂O 20:80. 80

Figura 29. Curva de calibração analítica do imunossensor para proteína NS1, usando (ECE) como transdutor de sinal. 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 diluída em PBS em (a) e em soro comercial sem diluição em (b). O *r*² ~ 0,98. As barras de erro indicam o desvio padrão de medições em triplicata. Área do eletrodo de ouro ativa: a) 0,047 cm² e b) 0,048 cm² 81

Figura 30. Resposta do biossensor funcionalizado com o anticorpo anti-NS1, na presença da proteína inespecífica (fetuína). a) O inverso da resposta capacitiva $\Delta(1/C_r)$ a partir do bloqueio foi inferior a 8% em contraste com a variação $\Delta(1/C_r)$ de 48% para resposta da proteína NS1. b)

Resposta impedimétrica em R_{ct} foi 5% menor a partir do bloqueio, em contraste com uma variação de 43% do R_{ct} para a resposta com a proteína NS1. 82

Figura 31. Curva de calibração analítica do imunossensor para proteína NS1. Comparação dos valores da porcentagem (%) de variação da resistência de transferência de carga em função das diferentes concentrações do antígeno NS1. Em (a) a curva analítica se refere à proteína NS1 diluída em PBS e em (b) em soro comercial sem diluição. Eletrólito composto por $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução PBS pH 7,4. O r^2 foi 0,99 e as barras de erro indicam o desvio padrão de medições em triplicata. Área do eletrodo de ouro ativa: a) $0,047 \text{ cm}^2$ e b) $0,047 \text{ cm}^2$ 83

Figura 32. Diagrama capacitivo de Nyquist, representativo de três eletrodos distintos de Au da Metrohm. Em a), b) e c) sucessivas medições de ECS para monocamada peptídica redox. Área do eletrodo de ouro ativa: a) $0,046 \text{ cm}^2$, b) $0,048 \text{ cm}^2$ e c) $0,048 \text{ cm}^2$ 84

Figura 33. Eletrodo de ouro funcionalizado por SAM peptídica redox, anticorpo anti-NS1 e bloqueio com superblock. a) CV do eletrodo de Au modificado com SAM peptídica redox no potencial -0,2 a 0,7 V e faixa de varredura 100 mV s^{-1} . No gráfico, estão indicados os potenciais formal (**E_{in}**) e fora do potencial (**E_{out}**). b) Diagrama capacitivo de Nyquist para construção do biossensor funcionalizado, utilizando método ECE. Todas as medidas foram realizadas no **E_{in}**. Área do eletrodo de ouro ativa: $0,046 \text{ cm}^2$ 85

Figura 34. Interação par comercial Antígeno-Anticorpo (NS1-anti-NS1) utilizando método ECE. a) Diagrama de Nyquist para interação do par comercial antígeno-anticorpo (NS1/anti-NS1) utilizando método ECE. (b) Curva analítica do biossensor. 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. Área do eletrodo de ouro ativa: $0,046 \text{ cm}^2$ 86

Figura 35. Diagrama capacitivo de Nyquist para construção do biossensor funcionalizado, através da imobilização da SAM peptídica, incubação do anticorpo anti-NS1 e bloqueio com superblock. a) Resposta de C_r para incubação de soro comercial diluído 10% sem adição da proteína NS1. b) Resposta de C_r com incubação da proteína NS1 em soro comercial 10%. Área do eletrodo de ouro ativa: $0,044 \text{ cm}^2$ 87

Figura 36. Diagrama capacitivo de Nyquist para construção do biossensor funcionalizado, através da imobilização da SAM peptídica, incubação do anticorpo anti-NS1 e bloqueio com superblock. a) Resposta de C_r para incubação de amostra negativa de paciente diluído 10% em PB 12 mM, pH 7,4. b) Resposta de C_r com incubação de amostra positiva de paciente diluído 10%. Área do eletrodo de ouro ativa: a) $0,046 \text{ cm}^2$ e b) $0,044 \text{ cm}^2$ 88

Figura 37. Resposta relativa em boxplot para comparação da performance de vinte e seis sensores, com amostras de pacientes negativas e positivas com 10% de diluição em PB 12 mM, pH 7,4. : Respostas relativas $RR\%$ para amostras de pacientes negativas foi inferior ao Cut-off, enquanto que para amostras de pacientes positivas variou de ~ 6 a 9%. Agradeço ao Dr. Adriano dos Santos por ter me ajudado na construção desta figura. 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Número de casos prováveis, variação percentual e incidência de dengue (/100mil hab.), até a Semana Epidemiológica 12, por Unidade da Federação, Brasil, 2018 e 2019.....</i>	<i>24</i>
Tabela 2. <i>Substâncias, fórmula molecular e procedência.....</i>	<i>56</i>
Tabela 3. <i>Parâmetros analíticos para a determinação eletroquímica da proteína NS1 em tampão PBS pH 7,4 ou soro sem diluição.....</i>	<i>83</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a	Coeficiente linear das medições
Å	Angstrom
AC	Corrente alternada
anti-NS1	Anticorpo anti-NS1
b	Coeficiente angular da curva padrão
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Albumina do soro bovino
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
Ct	Capacitância total
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
e	Carga elementar
exp.	Exponencial
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
fM	Femtomolar
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

j	Componente imaginário cujo valor é $\sqrt{-1}$
Kb	Kilobase
k_B	Constante de Boltzmann
kDa	kiloDaltons
L	Litro
n	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
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> , Antígeno Prostático Específico
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
s	Segundo
sin	Seno
t	Tempo
T	Temperatura absoluta
TMB	Tetrametilbenzidina
μA	Microamper
μ_e	Potencial químico dos elétrons
~	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^*
γ^*	Admitância complexa
φ	Deslocamento de fase
Γ	Cobertura da superfície molecular redox

Sumário

1	Introdução	19
1.1	Dengue – Histórico epidemiológico mundial	20
1.1.1	Dengue no Brasil	22
1.3	Agente Etiológico	25
1.4	Proteínas virais dos DENV	26
1.4.1	Proteína NS1	28
1.4.2	Replicação dos DENV	29
1.5	Resposta Imune	31
1.6	Manifestações clínicas por infecções de DENV	32
1.7	Diagnósticos laboratoriais	34
1.8	Desenvolvimento de biossensores	37
1.9	Funcionalização do transdutor por monocamadas auto-organizadas (SAM)	43
1.10	Uso de monocamada peptídica	44
1.11	Voltametria Cíclica (CV)	45
1.12	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	46
1.13	Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECE)	49
2	Objetivos	54
3	Artigo	54
3.1	Discussão do artigo	54
4	Parte Experimental	55
4.1	Reagentes	55
4.2	Ensaio biológico para avaliação da proteína NS1	56
4.3	Ensaio imunológico	57
4.4	Ensaio ELISA	58
4.5	Ensaio biológico para amostras de pacientes	58
4.6	Equipamentos	59
4.7	Medidas Eletroquímicas	59
4.8	Limpeza e caracterização da superfície do Au por medidas eletroquímicas em eletrodos microfabricados (Micrux)	60
4.8.1	SAMs mistas para análise impedimétrica em eletrodos microfabricados	62
4.9	Limpeza e caracterização da superfície do Au para medidas eletroquímicas em eletrodos convencionais (Metrohm)	62
4.9.1	Formação SAMs mistas para análises impedimétricas e capacitivas em eletrodos convencionais	64

4.9.2 Construção das curvas analíticas para medidas de ECE e EIE	66
4.9.3 Cálculo da constante de afinidade utilizando o modelo da Isoterma de Langmuir	68
4.10 SAM peptídica redox para análise capacitiva	69
5 Resultados e discussão	70
5.1 Avaliação Imunológica	70
5.2 Avaliação Impedimétrica para construção do biossensor em eletrodos microfabricados	71
5.2.1 Avaliação da superfície dos eletrodos microfabricados	74
5.2.2 Avaliação da estabilidade da monocamada mista de tióis	76
5.3 Avaliação Impedimétrica e Capacitiva das SAMs mistas em eletrodos convencionais	78
5.3.1 Avaliação Impedimétrica e Capacitiva para detecção da proteína NS1 por eletrodos convencionais	80
5.4 Avaliação da monocamada peptídica redox para detecção da proteína NS1 em tampão PB em eletrodos convencionais.	84
5.4.1 Avaliação Capacitiva para detecção da proteína NS1 em tampão PB.....	85
5.4.2 Detecção da proteína NS1 em soro comercial diluído	86
5.4.3 Detecção da proteína NS1 em soro humano.....	87
6 Conclusões	90
7 Referências	92
APÊNDICE A.....	103
ANEXO A.....	111
ANEXO B.....	111

1 Introdução

Neste atual projeto, a plataforma de sensoriamento impedimétrica foi otimizada e após, comparada com a nova plataforma chamada espectroscopia de capacitância eletroquímica derivada da impedância, desenvolvida por meu orientador, professor Dr. Paulo Roberto Bueno, com intuito de otimização do sistema, retirando a necessidade da sonda redox em solução, agora aderida à superfície receptiva de sensoriamento. Após otimização da técnica, o projeto teve um novo obstáculo, a miniaturização do sistema vislumbrando o uso *point-of-care*, que não obteve êxito, porém, este resultado possibilitou a busca de monocamadas redox, mais estáveis, que demonstraram um ótimo resultado para detecção da proteína NS1 da dengue diluída primeiramente em PBS, após, em soro comercial e finalmente em amostras de soro de pacientes.

Mas nenhuma plataforma de sensoriamento seria tão importante se o contexto da detecção não fosse de extrema necessidade, tanto do ponto de vista biológico quanto socio-econômico. Com este intuito, meu projeto de doutorado foi detalhadamente desenhado, pois a rápida, barata e robusta detecção da proteína do vírus da dengue principalmente em países em desenvolvimento se faz a cada ano mais urgente.

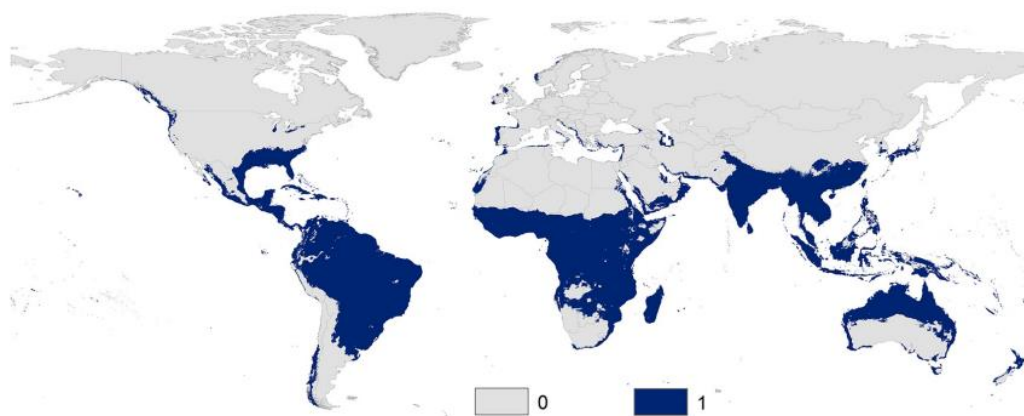
A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por um vírus chamado DENV, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, transmitida pela picada do mosquito *Aedes* infectado, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (GUZMAN *et al.*, 2010). A dengue é uma das arboviroses (virose transmitidas por artrópodes hematófagos) de maior impacto na saúde pública em termos de morbidade e mortalidade, 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 infecção (CAVALCANTI, L. P. DE G. *et al.*, 2017).

Na natureza os DENV são mantidos por um ciclo de transmissão envolvendo mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* e hospedeiros vertebrados. O homem é o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção (GUBLER, DUANE J, 2002).

O surgimento e disseminação dos quatro sorotipos no Sudeste da Ásia, África, Mediterrâneo Oriental e Américas, representam uma ameaça de pandemia

(figura 1) (KAMAL *et al.*, 2018). Um estudo, sobre a prevalência da dengue, estima que 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, estão em risco de infecção pelo vírus da dengue (BRADY *et al.*, 2012). Segundo Bhatt e colaboradores (2013), deve haver um aumento de 390 milhões de casos de infecções por dengue por ano em todo o mundo, dos quais 96 milhões se manifestam em qualquer nível de gravidade, uma discrepância que pode ser explicada por casos leves ou assintomáticos que podem não ter sido oficialmente notificados (BHATT *et al.*, 2013).

Figura 1. Distribuição mundial de *Aedes aegypti* e potenciais infecções de dengue.



Fonte: Adaptada de (KAMAL *et al.*, 2018).

1.1 Dengue – Histórico epidemiológico mundial

Os primeiros relatos de grandes epidemias de uma doença compatível com dengue datam de 1779 e 1780 e foram relatadas na Ásia, África e América do Norte, porém, há registros da ocorrência desta doença no século III (GUBLER, DUANE J, 1998). O termo dengue originou-se na Espanha e foi introduzido na literatura médica inglesa entre 1827 e 1828, durante uma epidemia de exantema com artralgia ocorrida no Caribe. Em 1869, o nome dengue foi estabelecido pelo *London Royal College of Physicians* para denominar esta enfermidade, até então referida na literatura como "febre articular", "febre quebra ossos", entre outros (HALSTEAD, 1979). A primeira publicação que relatava que transmissão de dengue se dava através de mosquitos foi feita por (GRAHAM, 1903).

Com o início da Segunda Guerra Mundial veio uma grande mudança ecológica, epidemiológica, e demográfica, o que culminou em uma nova relação entre DENV e humanos. Durante a mesma, em meados de 1944, as primeiras amostras dos DENV foram isoladas, a partir de soros de soldados infectados em Calcutá (Índia), Nova Guiné e Havaí (SABIN, 1952) e apresentaram semelhança antigênica, sendo denominados DENV-1. Atualmente, a cepa Havaí é considerada amostra protótipo. Na Nova Guiné outras cepas apresentaram características antigênicas diferentes, permitindo a identificação de outro sorotipo, que foi classificado como DENV-2, hoje considerado protótipo. Posteriormente, durante uma epidemia em Manila (1953) dois novos vírus foram isolados. Estes vírus foram classificados como DENV-3 e DENV-4 (HAMMON, W. M; RUDNICK, 1960) e as cepas H87 (DENV-3) e H241 (DENV-4) consideradas protótipos.

Nos anos seguintes, séries de epidemias ocorreram no sudeste asiático, porém, não houve notificações nas Américas, África e Oceania durante os 20 anos seguintes, principalmente devido ao programa de erradicação de *Aedes aegypti* por parte da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), que visava evitar epidemias de febre amarela urbana. No entanto, com a descontinuidade do programa no final dos anos 70, *Aedes aegypti* voltou a infestar a maioria dos países americanos (GUBLER, DUANE J, 2002; RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998).

Em 1963 a dengue reapareceu nas Américas, em Porto Rico e Jamaica, com a introdução do DENV-3 de origem asiática que causou várias epidemias no Caribe, Colômbia e Venezuela (EHRENKRANZ *et al.*, 1971; VENTURA, 1976).

No Caribe, em 1977, a reintrodução do DENV-1 ocasionou epidemias nas Américas Central, do Norte e do Sul (RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998). A cepa de DENV-2 do Sudeste Asiático, possivelmente do Vietnã em 1981 foi introduzida em Cuba, caracterizando um aumento da gravidade dos casos (GUZMÁN *et al.*, 2002).

A falta de medidas de vigilância epidemiológicas eficazes na África, na década de 1980, culminou em um evidente aumento da doença e circulação de todos os sorotipos, que curiosamente não foi associado com o aumento da gravidade da doença (GUBLER, D. J. *et al.*, 1986). Mas foi na década de 1990 que ocorreu a distribuição global de todos os sorotipos, principalmente devido à expansão populacional urbana, aumento da densidade do vetor devido a programas de controle não sustentados e o aumento de transportes aéreos comerciais, facilitando a rápida circulação de pessoas infectadas (COBRA *et al.*, 1995).

1.1.1 Dengue no Brasil

Os surtos iniciais de dengue no Brasil datam de 1864 no Rio de Janeiro (RJ) e que, provavelmente, também ocorreram nas regiões sul, sudeste e nordeste durante o século XIX (FIGUEIREDO, T. L. M., 2000). No entanto, a primeira epidemia com confirmação laboratorial ocorreu em 1981, em Boa Vista / Roraima, onde cerca de 11.000 pessoas foram infectadas por DENV-1 e 4 (OSANAI *et al.*, 1983). Entretanto, foi apenas a partir de 1986 que o dengue tornou-se um problema no país, com a introdução do DENV-1 no estado do RJ (SCHATZMAYR, *et. al.*, 1986) e sua disseminação para as regiões nordeste e centro-oeste (MARIA; NOGUEIRA; SCHATZMAYR, 2000).

O cenário ambiental permaneceu receptivo à circulação do DENV e alguns anos depois, em 1990, a situação foi agravada pela introdução do DENV-2, também no estado do RJ, com a ocorrência de casos autóctones de dengue clássico (DC) e os primeiros casos de febre hemorrágica do dengue (FHD) (NOGUEIRA *et al.*, 1993). Em meados de 1994, houve um aumento progressivo na incidência da doença no país, devido à circulação do vírus em mais de 600 municípios distribuídos em 18 estados brasileiros (NOGUEIRA *et al.*, 1995). E em 1998, o Brasil já era responsável por 85% do número de casos de dengue notificados nas Américas e em 1999, 50% dos 5.507 municípios brasileiros já haviam relatado casos de DC (MARIA; NOGUEIRA; SCHATZMAYR, 2000).

No Rio de Janeiro, em 2000, houve a introdução de DENV-3, com um aumento acentuado dos casos de DC (446.2 casos por 100 mil habitantes) e de FHD (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Este sorotipo se dispersou tão rapidamente pelo território brasileiro, que praticamente substituiu os DENV-1 e DENV-2 (TEIXEIRA *et al.*, 2005), modificando assim a epidemiologia do dengue no país e assumindo características de hiperendemicidade (NOGUEIRA, *et al.*, 2005).

Em 2010, o DENV-4 reemergiu e foi confirmado no estado de Roraima, na região norte do Brasil (TEMPORÃO *et al.*, 2011) e em 2011, no RJ (NOGUEIRA, 2011) e nas Regiões Nordeste e Sul (NOGUEIRA, 2011). Em 2013, foram registrados mais de 1.451.432 casos de dengue no Brasil, um aumento de 256,6% em relação ao ano de 2012. Deste total, 6.969 foram notificados como casos graves, com 545 óbitos e, a partir de 2012 o monitoramento da circulação viral tem

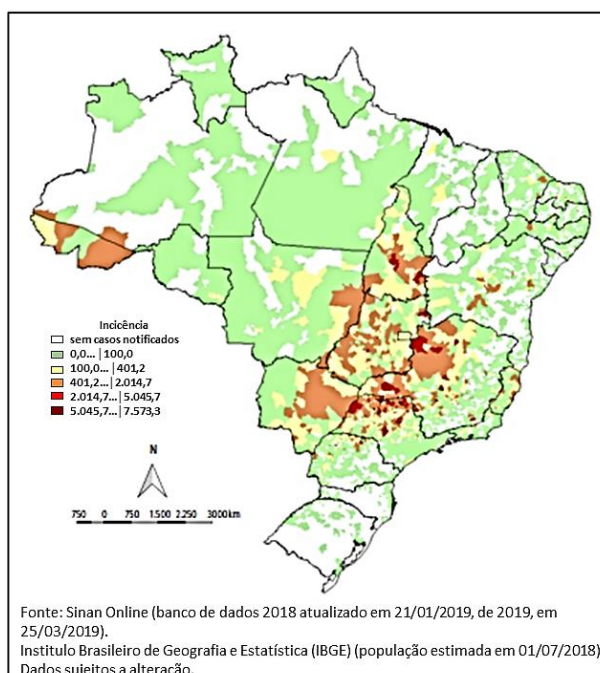
demonstrado o isolamento dos quatro sorotipos no país, com o predomínio do DENV-4 (OPAS, 2012).

Foram registrados em 2016 grandes surtos de dengue em todo mundo. Somente o Brasil contribuiu com pouco menos de 1,5 milhão de casos, com 1032 óbitos confirmados (WHO, 2016).

Já em 2018, até a semana (SE) 12 (30/12/2017 a 23/03/2018), foram registrados 71.525 casos prováveis de dengue. No mesmo período de 2019, foram 273.193 casos prováveis de dengue no país. A região Sudeste apresentando o maior número de casos prováveis de dengue (179.714 casos; 65,7%) em relação ao total do país, seguida das regiões Centro-Oeste (48.048 casos; 17,6%), Nordeste (20.543 casos; 7,5%) Norte (16.630 casos, 6,1%) e Sul (8.258 casos; 3,0%). No qual, as regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentam os maiores valores: 298,7 casos/100 mil hab. e 204,9 casos/100 mil hab., respectivamente (figura 2 e tabela 1) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA SAÚDE., 2019).

Somente em Araraquara (SP) a Vigilância Epidemiológica da cidade atualizou em 24/06/2019 os casos de dengue com 371 novos registros. O número chega a 13,2 mil casos da doença e cinco mortes confirmadas (BOLETIM, 2019).

Figura 2. Distribuição da incidência de casos prováveis de dengue (/100mil hab.), até a semana epidemiológica 12, Brasil, 2019.



Fonte: Adaptada de (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA SAÚDE., 2019).

Tabela 1. Número de casos prováveis, variação percentual e incidência de dengue (/100mil hab.), até a Semana Epidemiológica 12, por Unidade da Federação, Brasil, 2018 e 2019.

Unidade de Federação	Semanas Epidemiológicas 1 a 12				
	Casos (n)		Incidência (casos/ 100 mil hab.)		
	2018	2019	2018	Pop. (Est. IBGE)	2019
Norte	4.483	16.630	24,7	18.182.253	91,5
Nordeste	11.225	20.543	19,8	56.760.780	36,2
Sudeste	18.983	179.714	21,6	87.711.946	204,9
Sul	543	8.258	1,8	29.754.036	27,8
Centro-Oeste	36.291	48.048	225,6	16.085.885	298,7
Brasil	71.525	273.193	34,3	208.494.900	131,0

Fonte: Sinan Online (banco de dados de 2018 atualizado em 21/01/2019; de 2019, em 25/03/2019). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (população estimada em 01/07/2018). Dados sujeitos a alteração.

Fonte: Adaptada de (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA SAÚDE., 2019).

1.2 Vetor de transmissão do DENV

A transmissão do DENV ocorre principalmente através da picada de fêmeas hematófagas infectadas de mosquito *Aedes aegypti* durante o repasto sanguíneo para a maturação dos seus ovos (RAMOS *et al.*, 2008). O mosquito se infecta com o vírus quando ingeri sangue de um indivíduo que esteja em período de viremia, ou seja, no início da infecção (cerca de 5 dias), e assim, o ciclo de transmissão se completa, quando este mosquito infectado, pica um indivíduo susceptível depois de um período de incubação extrínseca de 8 a 12 dias. Uma vez infectado, o mosquito transmite o vírus ao longo de sua vida (em média 45 dias). É uma espécie doméstica de hábito diurno, que ovipõe, preferencialmente, em água limpa e estagnada, acumulada em recipientes, como pneus, latas, cisternas, vasos de plantas, entre outros. A transmissão do vírus pode ocorrer por fêmeas infectadas por meio da transmissão transovariana, à próxima geração de mosquitos, mas isso ocorre com pouca frequência e, provavelmente, não contribui significativamente com a transmissão humana (RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998).

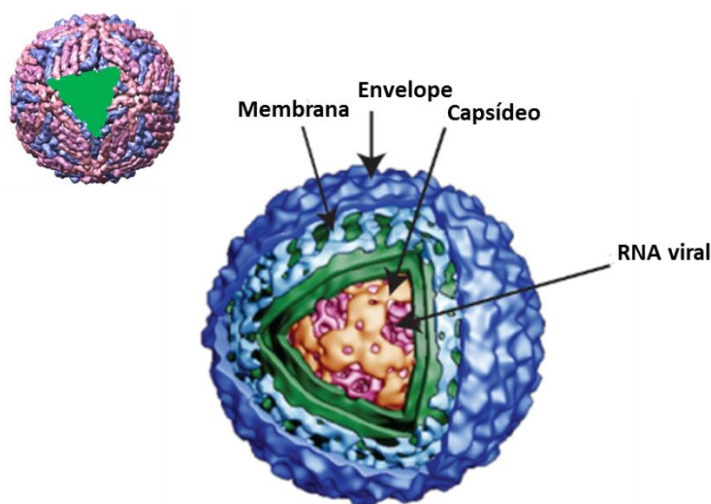
Casos raros de dengue são transmitidos a partir de órgãos transplantados ou transfusão de sangue de doadores infectados (RAMOS *et al.*, 2008). A transmissão do vírus não pode ocorrer pelo contato de um doente ou de suas secreções com uma pessoa sadia, nem por fontes de água ou alimentos (FIGUEIREDO, T. L. M., 2006). Já a transmissão vertical transplacentária constitui fator de risco para o

desenvolvimento de formas hemorrágicas em crianças em virtude da presença de anticorpos maternos de uma infecção primária (HUBERT; HALSTEAD, 2009).

1.3 Agente Etiológico

Os vírus DENV são esféricos, envelopados e com um diâmetro de aproximadamente 50 nm. O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica, derivada do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, tendo cópias das proteínas do envelope (E) e de membrana (prM/M) ancoradas (RODENHUIS-ZYBERT, 2010). Possui nucleocapsídeo, localizado internamente com formato icosaédrico composto pela proteína estrutural do capsídeo (C), complexada a uma molécula de ácido ribonucléico (RNA) (MURRELL, 2011). Figura 3 abaixo apresenta a estrutura organizada do vírus da dengue.

Figura 3. Organização estrutural do vírus da dengue. Vírus da dengue são envelopados, contendo três proteínas estruturais; proteína envelope (E) e membrana (M) (azul escuro e azul claro, respectivamente) são ancoradas na membrana viral (verde) e a proteína do capsídeo (C) (laranja) cobre o genoma viral (roxo).



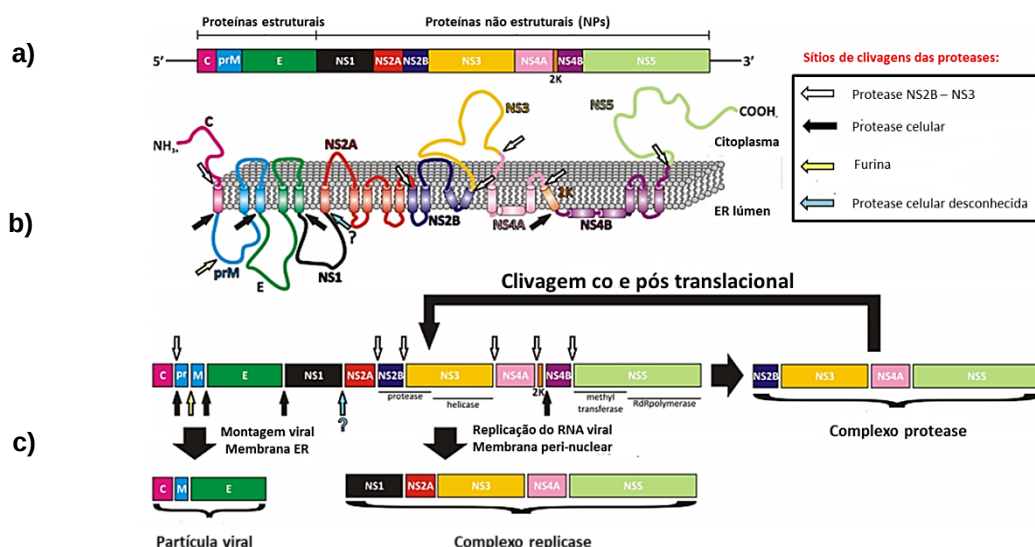
Fonte: PDB (protein data base), adaptada de (ANGEL; VALLE, 2013).

O genoma do vírus causador da dengue compreende aproximadamente 10.700 nucleotídeos e se apresenta como uma fita simples de RNA com polaridade positiva, comportando-se como um RNA mensageiro (RNAm). O RNA viral apresenta uma modificação em sua extremidade 5' UTR (do inglês: "untranslated region"), através da adição de uma estrutura *cap* (m7G5'ppp5'A). Entretanto, este RNA não contém uma cauda poliadenilada na extremidade 3' UTR. Sendo assim, a

tradução do RNA viral produz uma poliproteína precursora das dez proteínas virais (figura 4a), que é clivada em vários sítios por proteases celulares e pela protease viral, concomitante ao processo de tradução durante a translocação da proteína para o RE da célula hospedeira (figura 4b) (ASSENBERG *et al.*, 2009).

O processamento da poliproteína codifica três proteínas estruturais, capsídeo (C), pre-membrana (prM precursora da M) e envelope (E); e sete proteínas não estruturais (NS), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (figura 4c) (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH; RICE, 2003; MURRELL, 2011). Enquanto as proteínas estruturais dispõem a arquitetura da partícula viral, as proteínas NS estão envolvidas nos processos de replicação e montagem dos novos vírions (KINNEY; HUANG, 2001).

Figura 4. Diagrama organizacional genômico e processamento da poliproteína dos DENV. a) organização das proteínas estruturais e não estruturais na poliproteína. b) topologia de sua membrana, prevista a partir de análises bioquímicas e celulares. As setas indicam o processamento por proteases celulares e virais. c) diferentes complexos que surgem durante e após processamento da poliproteína.



Fonte: Adaptada de (ASSENBERG *et al.*, 2009).

1.4 Proteínas virais dos DENV

A estrutura da partícula viral, chamada proteína C possui uma massa molecular com ~ 11 kDa, que se liga fortemente à moléculas de RNA (CHAMBERS *et al.*, 1990). A glicoproteína prM (26 kDa) faz parte da estrutura dos virions imaturos

e sua clivagem por uma protease celular do tipo furina, como última etapa antes da liberação da partícula infecciosa pela via exocítica do Golgi, gera a proteína M (8 kDa), produzindo partículas virais maduras. Sítios de N-glicosilação potenciais e sua localização são conservados entre os sorotipos de DENV (CHAMBERS *et al.*, 1990).

A proteína E, com aproximadamente 60 kDa, é responsável pelas principais propriedades biológicas do vírus. Além de ser o principal componente antigênico viral, esta, age como hemaglutinina viral, apresentando capacidade fusogênica com membranas da célula hospedeira, induz resposta imune protetora e interage com receptores na superfície das células alvo (MODIS *et al.*, 2004). Evidências indicam que esta proteína desempenha um papel na patogenicidade de diversos flavivírus, não apenas pela definição do tropismo celular, como também pela entrada do vírus na célula-alvo (MODIS *et al.*, 2004). Sua estrutura consiste de um dímero e cada monômero têm 3 domínios, no qual, o domínio III, parece estar envolvido na ligação ao receptor (BHARDWAJ *et al.*, 2002) e indução de anticorpos neutralizantes (HALSTEAD *et al.*, 2005; PIERSON *et al.*, 2007).

As proteínas não estruturais do vírus da dengue estão envolvidas na modulação da resposta do hospedeiro e na replicação do RNA viral (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997) e podem desempenhar funções na montagem, organização e liberação do vírus (LINDENBACH *et al.*, 2007).

A proteína NS2A, de 24 kDa possui perfil hidrofóbico, sugerindo uma possível interação com as membranas (CHAMBERS *et al.*, 1990) e exerce funções na modulação do interferon antiviral produzido pelo hospedeiro (LIU; ULMER, 2005). A proteína NS2B, possui 14 kDa e desempenha um papel fundamental no sucesso da replicação viral. Sua sequência apresenta sete domínios hidrofóbicos que estão relacionados à interação com membranas como também, ao correto direcionamento do *core* hidrofílico central o qual serve de cofator da protease viral (NS3pro), para interação com a mesma, na fração citosólica do RE da célula hospedeira podendo assim, processar a poliproteína viral (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1990).

A proteína NS3 com 68 kDa é uma proteína multifuncional, altamente conservada entre os flavivírus e tem no mínimo três atividades bioquímicas distintas. Os primeiros 180 aminoácidos da região amino-terminal da NS3 (NS3pro), associados à proteína NS2B (cofator), apresentam atividade de serina protease. A região C-terminal apresenta atividade de helicase (NS3hel), envolvida na replicação

do RNA viral e RNA 5'-trifosfatase, envolvida na formação do cap na extremidade 5' do genoma viral (LINDENBACH; RICE, 2003).

As funções das proteínas NS4A e NS4B sugerem que a proteína NS4A está ancorada à membrana do retículo e interage com as proteínas NS1, NS3 e NS5 (WESTAWAY; MACKENZIE; KHRONYKH, 2003). Durante a replicação viral, a proteína NS4B pode estar localizada no núcleo da célula hospedeira, e parece estar envolvida na inibição da síntese de interferon, mas seu papel ainda não foi determinado (LINDENBACH; RICE, 2003).

A proteína NS5 com cerca de 100 kDa apresenta sequências altamente conservada entre todos os flavivírus. A análise dessas sequências possibilitou a determinação de dois sítios, o primeiro responsável pela atividade de RNA polimerase dependente de RNA (polimerase viral) e encontrado na região C-terminal do gene e o último, responsável pela atividade metiltransferase encontrada na região N-terminal (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH; RICE, 2003). Na figura 5 podemos observar um diagrama esquemático com as principais funções das proteínas estruturais e não estruturais dos DENV.

Figura 5. Diagrama esquemático diagrama esquemático com as principais funções das proteínas estruturais e não estruturais dos DENV.



Fonte: Adaptada de (HERRERO *et al.*, 2013).

1.4.1 Proteína NS1

A proteína NS1, alvo neste trabalho, é uma das glicoproteínas não estruturais do vírus, massa molecular em torno de 46 a 55 kDa, dependendo do seu estado de

glicosilação, com 12 resíduos de cisteína extremamente conservados (com exceção de DENV-4), sítios de glicosilação invariáveis, seis pontes de sulfetos intramoleculares, além de regiões de alta homologia entre os flavivírus (CHAMBERS *et al.*, 1990; EDELING; DIAMOND; FREMONT, 2014) e dentre os sorotipos dos DENV sua similaridade é superior a 70%. Uma proteína enigmática cuja estrutura e função permaneceram como incógnitas desde que foi identificada pela primeira vez em 1970 como um antígeno solúvel de fixação de complemento (SMITH; WRIGHT, 1985).

Encontra-se em várias formas oligoméricas, em diferentes localizações celulares. Associada à membrana da célula (mNS1) ou dentro da célula em compartimentos vesiculares. Sua forma dimérica parece interagir com outras proteínas não estruturais e com o RNA do vírus. Nesta localização a NS1 está envolvida na montagem do complexo da replicase viral (COSTA *et al.*, 2007; LINDENBACH; RICE, 2003). A produção de anticorpos contra esta proteína, detectada em soro de pacientes, na fase aguda da doença pode ser explicada, pois se encontra também numa hexamérica extracelular secretada (sNS1) (ALCON *et al.*, 2002; MACDONALD, 2005). Durante a infecção pelo DENV, a sNS1 pode ser encontrada em níveis muito elevados em alguns soros de pacientes, cuja detecção chega até 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (ALCON *et al.*, 2002; LIBRATY *et al.*, 2002).

1.4.2 Replicação dos DENV

Na infecção por DENV, mosquitos infectados durante o repasto sanguíneo, inoculam partículas virais no hospedeiro. Inicialmente, próximo ao local da picada, o DENV interage, através da proteína E, com receptores e co-receptores localizados na superfície de células permissivas à infecção, sendo propostos vários receptores em diferentes células de mamíferos, como sulfato de heparina, proteínas do choque térmico (Hsp70 e Hsp90), GRP78/Bip, CD14, receptor de laminina, entre outros (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; RODENHUIS-ZYBERT, 2010). Esta interação promove a adsorção e entrada da partícula viral por endocitose (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

As principais células alvo da infecção por DENV, em geral são células da linhagem dos fagócitos mononucleares, tais como monócitos, macrófagos e células

dendríticas (RODENHUIS-ZYBERT, 2010). Adicionalmente, estudos apontam outras células, como hepatócitos, linfócitos, células endoteliais, neuronais e de Langerhans, também como alvos para a replicação viral (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; PAES *et al.*, 2009).

A replicação dos DENV ocorre no citoplasma celular (figura 6). Uma vez realizada a endocitose da partícula viral, a glicoproteína E do DENV sofre eventos moleculares complexos, dependente de pH ácido, essenciais para o estabelecimento da infecção (RODENHUIS-ZYBERT, 2010). No citoplasma, o genoma viral livre do capsídeo, estabelece um processo infeccioso. Este genoma que codifica um RNA de fita simples com polaridade positiva se comporta como um RNAm, que liberado é traduzido, codificando para uma poliproteína, que é clivada *co e pós* traducionalmente por proteases virais e celulares. A NS5 produz cópias de RNA de polaridade negativa, a partir do RNA viral, as quais servem de molde para a síntese de novas fitas positivas, que serão incorporadas às novas partículas virais (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

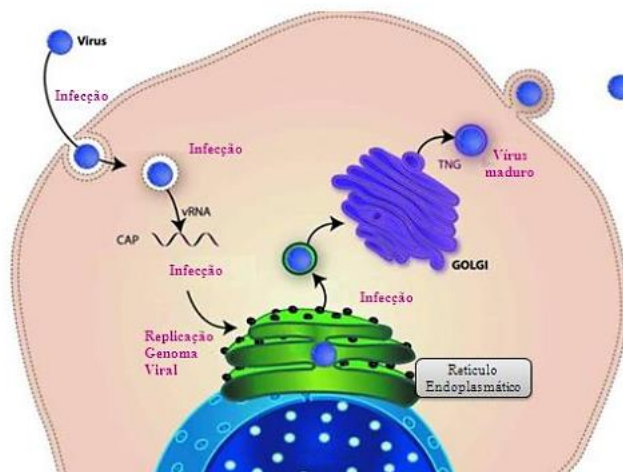
Ancorados na face interna do RE, como heterodímeros encontram-se as proteínas estruturais E e prM. Adicionalmente, na face externa das membranas do RE o complexo de replicação viral encontra-se ancorado. As novas fitas de RNA com polaridade positiva interagem com as proteínas C e juntas formam o nucleocapsídeo, que brota em direção ao lúmen do RE, adquirindo, assim uma bicamada lipídica, contendo heterodímeros prM/E (MACKENZIE, 2005).

A partícula viral imatura recém-formada segue pela via de secreção e completa seu processo de maturação na rede trans-Golgi, local onde ocorre a clivagem da prM pela furina. Tal processo promove um rearranjo na superfície do virion, rompendo os heterodímeros M/E e os homodímeros de E expõem o domínio de ligação (domínio III) formando, dessa forma, uma partícula viral infectiva (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; RODENHUIS-ZYBERT, 2010). Por outro lado, pode haver clivagem parcial da prM gerando, assim, partículas virais imaturas (PERERA; KUHN, 2008).

Por exocitose, as partículas virais de DENV são liberadas para o meio extracelular e ganham a corrente sanguínea do hospedeiro infectado. Portanto, nesse período de viremia, o mosquito transmissor pode se infectar durante o repasto

sanguíneo, dando continuidade o assim o ciclo replicativo do DENV (CHAMBERS *et al.*, 1990; TOMLINSON; MALMSTROM; WATOWICH, 2012).

Figura 6. Representação do ciclo de replicação dos DENV.



Fonte: Adaptada de (SHUM *et al.*, 2010).

1.5 Resposta Imune

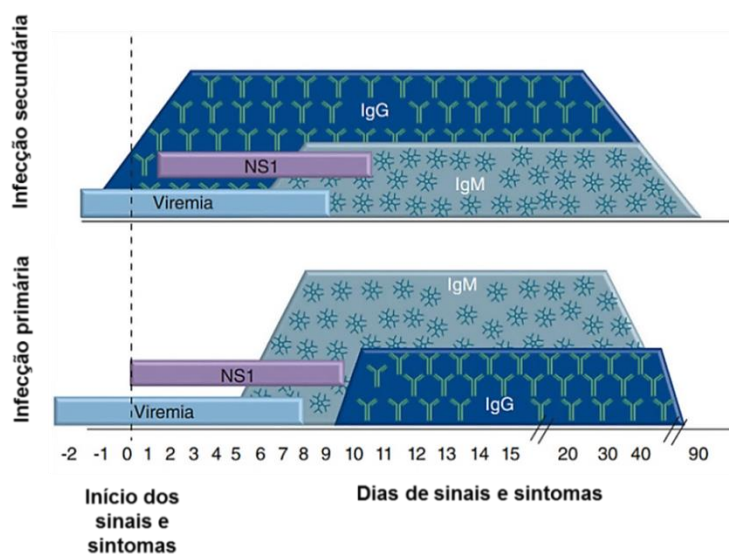
No hospedeiro (homem) a primeira linha de defesa contra os DENV, provavelmente tem início com a produção de interferons (IFNs) (GOMES *et al.*, 2010). Essas moléculas são de extrema importância para a proteção, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, frente à infecção por DENV (RODENHUIS-ZYBERT, 2010). Foi observada a ativação de células NK (*natural killer*), que podem secretar várias citocinas incluindo o IFN- γ em pacientes que apresentaram quadros leves de dengue, sobretudo durante os eventos iniciais da doença, antes do estabelecimento da resposta imune adaptativa (AZEREDO *et al.*, 2001).

Na infecção por dengue a resposta imune adaptativa consiste na produção de anticorpos principalmente dirigidos contra proteína do envelope. Na infecção primária pelo vírus há uma resposta lenta e com baixo título de anticorpos, aparecendo primeiramente os anticorpos da classe IgM (GUZMAN *et al.*, 2010). A maioria dos pacientes apresentam níveis detectáveis de IgM no sexto dia após o aparecimento dos sintomas, somente cerca de 8% encontram-se positivos já nos primeiros dias de doença. Os níveis de IgM atingem seu pico por volta de duas

semanas, mantendo-se detectáveis por 2 a 3 meses, diminuindo ao longo dos meses (NOGUEIRA *et al.*, 1992).

Na infecção primária, a partir do décimo dia de doença os anticorpos da classe IgG começam a aparecer (figura 7). Após um aumento a partir da primeira semana de infecção os títulos de IgG, continuam detectáveis por toda a vida. Já na infecção secundária há um alto nível de anticorpos IgG e este pode ser detectado mesmo na fase aguda, podendo apresentar alto grau de reação cruzada, mesmo contra outros flavivírus, apresentado por esses anticorpos (GUZMAN *et al.*, 2010). Já os níveis de IgM na resposta secundária são mais baixos do que na resposta primária (figura 7). Com isso, a relação entre os títulos de IgM e IgG e a especificidade dos anticorpos podem ser usados na caracterização da resposta imune em primária e secundária (HALSTEAD, 2007).

Figura 7. Cinética antígeno e anticorpo nas infecções por DENV.



Fonte: Adaptada de (LIMA; NOGUEIRA; SANTOS, 2014).

1.6 Manifestações clínicas por infecções de DENV

Doença de caracterização febril aguda, 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 (HALSTEAD, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a). O período de incubação pode

variar de 3 a 15 dias, mas em média, de 4 a 7 dias, após o qual a doença poderá evoluir para formas clínicas sintomática, DC e FHD/SCD (febre hemorrágica do dengue/síndrome do choque por dengue) (MORENS, 2009).

Infecções por DENV em alguns indivíduos podem não apresentar sinais e sintomas, em razão das características da baixa virulência do vírus, ou do estado imunológico do indivíduo. É a forma clínica mais comum e estima-se que durante as epidemias, ocorra um caso sintomático para cada cinco casos assintomáticos. Os sinais e sintomas no DC aparecem no período de incubação, com duração de dois a sete dias, com primeira manifestação clínica de febre alta (39° a 40°C), que começa abruptamente, posteriormente cefaleia, dor retro orbital, náuseas, vômito, prostração, artralgia, mialgia, prurido e exantema. Manifestações hemorrágicas podem ocorrer em alguns indivíduos, porém as mais frequentes são: petéquias, equimoses, hemorragia gengival e metrorragias, que surgem no final do período febril. A DC é autolimitada e normalmente há uma recuperação completa (NISHIURA; HALSTEAD, 2007).

Já a FHD, os primeiros sinais e sintomas são similares aos do DC, porém há um agravamento do quadro no terceiro ou quarto dia de doença, pela desregulação da coagulação com diminuição progressiva do volume plasmático intravascular, o que ocasiona hemoconcentração com aumento do hematócrito e aparecimento de manifestações hemorrágicas. Essas alterações provocam queda da pressão arterial e, havendo persistência, podem evoluir até o choque hipovolêmico, geralmente precedido por dor abdominal com evolução de morte do paciente em poucas horas (SIMMONS *et al.*, 2012).

A OMS, em 1997 classificou em quatro categorias as formas clínicas da FHD, de acordo com a gravidade. De acordo com a classificação todos os graus são considerados FHD, enquanto somente os graus III e IV são considerados SCD. A presença de trombocitopenia com hemoconcentração (aumento de 20% no hematócrito) diferencia os graus I e II a FHD do DC com manifestações hemorrágicas. A evolução para FHD com choque é resultante de uma grande perda de plasma, sinalizada por insuficiência circulatória, pele fria e pegajosa, cianose, pulso rápido < 20 mmHg e hipotensão que caracterizam os graus III e IV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Uma iniciativa apoiada pela OMS intitulada *Dengue Control* (DENCO), desenvolveu uma classificação clínica do dengue mais útil para o diagnóstico precoce, triagem e o manejo do paciente, realizando estudos de avaliação dos sinais e sintomas associados com a gravidade da doença e, em 2009, uma nova classificação foi divulgada (figura 8). Os casos foram divididos em dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave. A diferenciação para dengue grave ocorre quando se tem como manifestação hemorragia grave, envolvimento de órgãos ou extravasamento de plasma. A inclusão dos sinais de alerta foi de grande importância para a melhor avaliação do paciente, auxiliando no tratamento precoce (ORGANIZATION, 2009).

Figura 8. Classificação dos casos de dengue de acordo com a OMS.



Fonte: Adaptada de (ORGANIZATION, 2009).

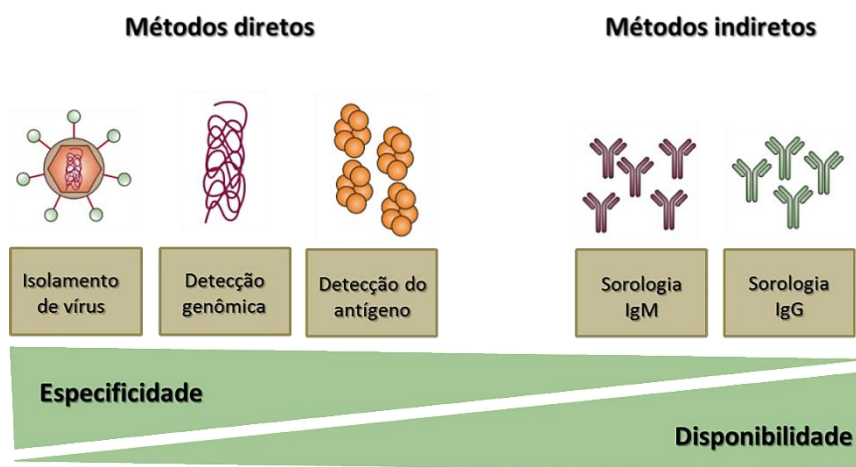
1.7 Diagnósticos laboratoriais

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 - do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) ou através de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR - do inglês, *reverse transcriptase - polymerase chain reaction*) (RODRIGUEZ-

MANZANO *et al.*, 2018). Outras técnicas também utilizadas são: isolamento e identificação do vírus (KLUNGTHONG *et al.*, 2007), pela detecção de antígenos, do ácido nucléico viral (SUBEDI; TAYLOR; ANDREW, 2014) e pela determinação de anticorpos específicos, das classes IgM e IgG (PEELING *et al.*, 2010; SUBEDI; TAYLOR; ANDREW, 2014).

A decisão apropriada do método a ser utilizado para diagnóstico depende do período da doença em que o paciente se encontra, para uma correta interpretação dos resultados obtidos, embora o tratamento não dependa do diagnóstico virológico (SIMMONS *et al.*, 2012). Métodos diretos de detecção, como o isolamento viral, detecção do genoma e do antígeno, que são mais específicos (figura 9), nem sempre estão disponíveis para o diagnóstico das infecções por DENV (PEELING *et al.*, 2010).

Figura 9. Disponibilidade e especificidade dos métodos diretos e indiretos para o diagnóstico das infecções por DENV.



Fonte: Adaptada de (PEELING *et al.*, 2010).

A detecção de NS1 ganhou considerável atenção para testes diagnósticos precoces de infecção por dengue, pois é encontrada em abundância no soro de pacientes em estágio inicial da doença (PARKASH; R., 2015), em pacientes com infecções primárias e secundárias as concentrações variam de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ podendo chegar até cerca de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ALCON *et al.*, 2002; LIBRATY *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 hemorrágica (PARANAVITANE *et al.*, 2014). Consequentemente, muitos trabalhos têm sido

propostos para avaliar os níveis de antígeno NS1 em tampão e em amostras de soro (CAVALCANTI, I. T. *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2013; FIGUEIREDO, A. *et al.*, 2015; SILVA, M. M. S. *et al.*, 2014; SU *et al.*, 2003). Em ensaios ELISA e 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, F. G. *et al.*, 2011). Segundo Alcon e colaboradores (2002), no diagnóstico de dengue, pela detecção de NS1 por ELISA, os limites de detecção desta proteína variam de 0,04 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em soro de pacientes em fase aguda na primeira infecção e de 0,01 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na segunda infecção (ALCON *et al.*, 2002). 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 *et al.*, 2010).

Embora alguns autores tenham relatado níveis mais elevados de NS1 em infecções secundárias devido ao aumento da viremia (DUSSART *et al.*, 2006), outros descrevem a diminuição da detecção desta proteína devido a complexos imunes de vírus-IgG pré-existentes (PEELING *et al.*, 2010). Independentemente das contradições da literatura, neste projeto de doutorado a faixa linear para detecção da proteína NS1 foi mantida baixa, buscando assim um ensaio diagnóstico capaz de quantificar a fase infecciosa da dengue (VAZQUEZ *et al.*, 2010).

Ressaltando a importância do tema, Forshey e colaboradores (2016) mostraram em seus estudos evidências de que a proteção contra a reinfeção homóloga por DENV pode estar incompleta em algumas circunstâncias, o que fornece um contexto para a eficácia limitada da vacina contra o DENV-2. Já a proposta de controle da dengue pela vacina Dengvaxia, tem sido utilizada com cautela, por recomendações do próprio laboratório Sanofi Pasteur que a produziu, pois o mesmo apresentou dados com reanálises para casos soronegativos, vacinados com Dengvaxia, observando um maior risco de hospitalização por dengue e dengue clinicamente grave ou com sinal de alarme, quando comparado aos participantes do grupo controle (“Nota técnica: vacina dengue”, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b).

Devido à ausência de vacinas e tratamentos específicos para a dengue, o início imediato de epidemias poderia ser atenuado usando métodos diagnósticos confiáveis e rápidos (Shu e Huang, 2004). O principal método de diagnóstico clínico envolve o isolamento do vírus, teste sorológico, detecção de genomas virais e antígenos (Darwish et al., 2015a; Kim et al., 2018 ; Campuzano et al., 2017).

O diagnóstico precoce com um sistema de detecção adequado é essencial para minimizar a proliferação de surtos de vírus para a sociedade. Assim, a tecnologia de biossensores tem sido amplamente explorada para a detecção, bem como a quantificação de pequenas moléculas de partículas virais (ANUSHA *et al.*, 2019). Portanto, métodos mais baratos, rápidos, simples e mais sensíveis para mapear todo o quadro da epidemia de dengue são de extrema importância, especialmente em países em desenvolvimento, como forma de fornecer um diagnóstico eficiente de dengue para prevenção e/ou manter o centro epidêmico sob controle e contenção. Na busca pelo desenvolvimento de novas metodologias, os potenciais testes *point-of-care* e altamente eficientes estão sendo propostos. Os métodos eletroanalíticos prometem sustentar o progresso da próxima geração de ensaios de biomarcadores para obter configurações de biossensores cada vez mais sensíveis, multiplexados e portáteis (PATIL *et al.*, 2015). Neste contexto, este trabalho de doutorado foi detalhadamente projetado para desenvolver biossensores impedimétricos/capacitivos, como uma potencial ferramenta para detecção da proteína NS1 da dengue.

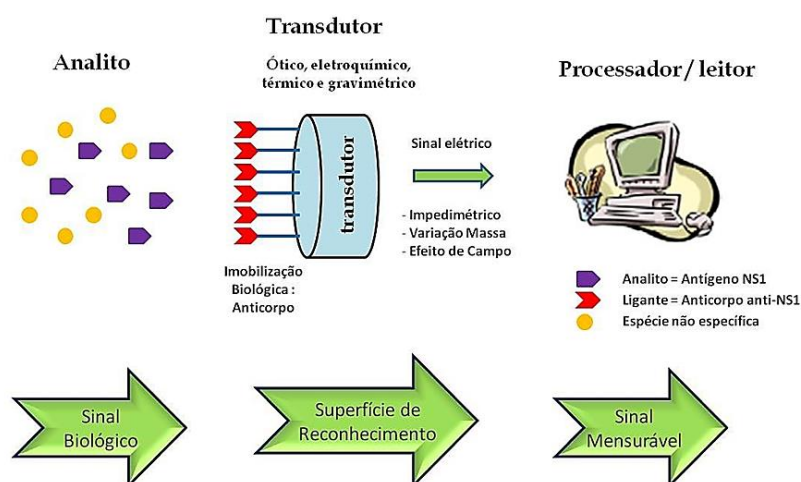
1.8 Desenvolvimento de biossensores

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras isoladas para detectar compostos químicos geralmente por sinais elétricos, térmicos ou ópticos (IUPAC, 2012). 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 (FILHO; CAPELATO, 1992).

Devido ao fato destas moléculas biológicas serem altamente específicas para seu ligante (analito), a interação gera um determinado tipo de sinal, que é identificado pelo transdutor no qual o material biológico está imobilizado. Neste trabalho, a molécula biológica imobilizada na superfície do sensor é o anticorpo anti-NS1 e seu ligante, a proteína NS1 do vírus da dengue. 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 alvo) em um sinal, como o elétrico (FILHO; CAPELATO, 1992; ZHAO, J. *et al.*, 1987), figura 10. Existem diferentes tipos de transdutores, sendo os eletroquímicos (uso de propriedades elétricas da interface eletrodo/solução) (SANTOS, 2014), piezelétricos (relaciona a variação de oscilação do cristal de quartzo com a massa adsorvida sobre ele), (SPEIGHT; COOPER, 2012) e ópticos (alteração do acoplamento de onda evanescente com os plásmons de superfície) os mais comuns (REDDY *et al.*, 2012).

Figura 10. Desenvolvimento de um biossensor. Representação esquemática de um biossensor. A amostra contendo o analito (biomarcador) entra em contato com o elemento de reconhecimento biológico (anticorpo, DNA, RNA, aptâmero, células, etc) imobilizado no transdutor (eletroquímico, piezelétrico, óptico, térmico, etc.). Esta interação de reconhecimento biológico é convertida pelo transdutor num sinal elétrico mensurável.

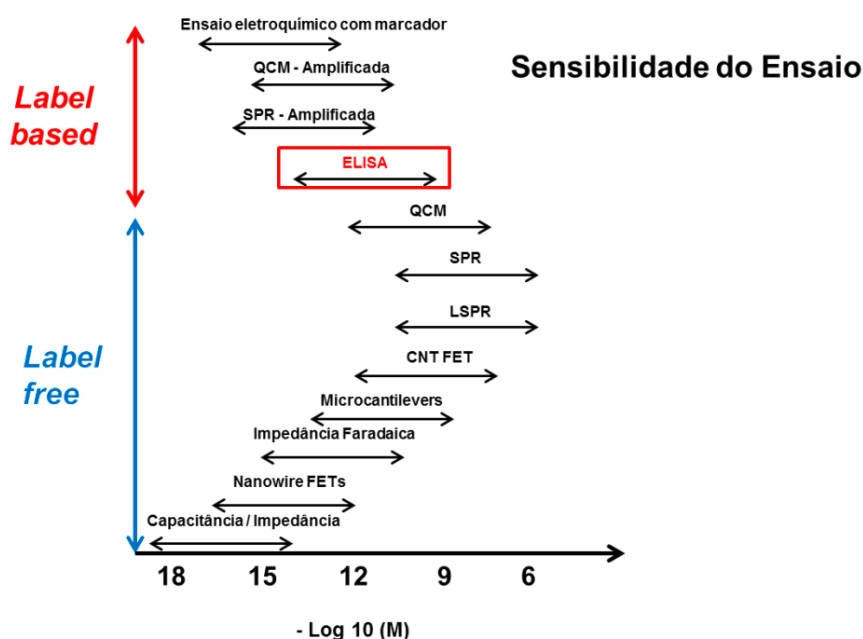


Fonte: Adaptada de (FILHO; CAPELATO, 1992).

Atualmente, dois grupos de métodos de sensoriamento para detecção de proteínas estão sendo utilizados: os *label-based* e *label-free*. Ambas as abordagens são capazes de detectar uma ampla faixa de concentrações de proteínas (biomarcadores) (figura 11). Na técnica *label-based* a proteína de interesse é marcada com corantes fluorescentes, radioisótopos, enzimas, etc., para gerar o sinal necessário para detecção (SANTOS, 2014). Esta metodologia é muito utilizada em rotinas laboratoriais para detecção de proteínas, pois há fácil disponibilidade de reagentes e instrumentação relativamente simples. Por outro lado, é morosa e requer inúmeras etapas de lavagens, como por exemplo, a técnica ELISA que utiliza anticorpos marcados para a detecção da proteína e alguns formatos, como o sanduíche, necessitam de, pelo menos, dois anticorpos para a detecção do antígeno (anticorpos de ancoragem e de reconhecimento), aumentando a complexidade da análise (HENAO-DIAZ *et al.*, 2019; TRAKAS; TZARTOS, 2018). Apesar dos métodos *label-based* de análises terem uma boa reprodutibilidade e sensibilidade geralmente suficiente para detecção de proteínas, esta técnica pode ser suscetível às interferências por substâncias corantes presentes naturalmente em algumas amostras como, sangue, urina e saliva (RAY; MEHTA; SRIVASTAVA, 2010). Podem apresentar ineficiência, em alguns casos, para detecção de proteínas em baixos níveis (TOMIZAKI; USUI; MIHARA, 2010).

Já nas técnicas *label-free*, não há necessidade de marcação, e o sinal de reconhecimento é obtido pelas propriedades inerentes da própria proteína alvo, como sua massa molecular e propriedade dielétrica (RAY; MEHTA; SRIVASTAVA, 2010), possibilitando o monitoramento em tempo real (PESQUERO *et al.*, 2010), importante para o estudo de cinética de interação do tipo receptor-ligante de proteínas e possibilitando análises do tipo *point-of-care*.

Figura 11. Faixa de sensibilidade de diferentes métodos diagnósticos. Capacidade de detecção (valores aproximados) de biomarcadores através de diferentes técnicas analíticas. QCM: Quartz crystal microbalance (microbalança a cristal de quartzo) (SPEIGHT; COOPER, 2012); SPR: Surface plasmon resonance spectroscopy (Espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície) (REDDY *et al.*, 2012); ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio de imunoabsorção enzimática) (ALCON *et al.*, 2002); LSPR: Localised surface plasmon resonance spectroscopy (Espectroscopia de ressonância plasmônica de superfície localizada)(ZHAO, JING *et al.*, 2006); CNT FET: Carbon-nanotube field-effect transistor (Transistor de efeito de campo a base de nanotubos de carbono) (ALLEN; KICHAMBARE; STAR, 2007); FET: Field-effect transistor (Transistor de efeito de campo) (HIDESHIMA *et al.*, 2013).



Fonte: Autora, adaptada de (TKAC; DAVIS, 2009).

Uma técnica amplamente utilizada para análises de marcadores biológicos, de forma *label-based* é o teste ELISA. Como o trabalho de Henao-Diaz (2019) que utilizou ELISA para detecção do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória (PRRSV) de amostras de fluído oral de porcos, evidenciando o desempenho de três kits comerciais, com sensibilidades e especificidades do diagnóstico ELISA 1 (100%, 100%), ELISA 2 (62%, 97%) e ELISA 3 (94%, 100%) (HENAO-DIAZ *et al.*, 2019). Já Trakas e colaboradores utilizaram a técnica por ELISA para o diagnóstico da doença autoimune adquirida, para distúrbio da junção neuromuscular, chamada Myasthenia gravis (MG), mostrando especificidade para anticorpos de 99,1% e sensibilidade de 91,1% ou 97,5 % (77/79), (TRAKAS; TZARTOS, 2018).

Diversas metodologias são utilizadas para detecção e quantificação de proteínas, de forma *label-free* dentre elas, a técnica QCM está sendo muito

explorada para detecção de proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA) (HOOK *et al.*, 1997; YAKOVLEVA; SAFINA; DANIELSSON, 2010) e para determinação de constante de afinidade entre biomoléculas (PEDROSO *et al.*, 2008). Segundo Sauerbrey (1959), nesta metodologia um decréscimo proporcional da frequência de oscilação do cristal de quartzo ocorre pelo aumento de massa sob o transdutor quando a espécie de reconhecimento é imobilizada na superfície do sensor (SAUERBREY, 1959). Tai e colaboradores detectaram a proteína NS1 (biomarcador da dengue) com limite de detecção na ordem de ng mL^{-1} (TAI *et al.*, 2006). Outro trabalho, realizado por Su *et al.*, (2000), foi desenvolvido um biossensor de cerâmica de titanato de zircônio para detectar baixos níveis (ng mL^{-1}) de biomarcadores de câncer de próstata (PSA, prostatic specific antigen e α -fetoproteína, AFT, de câncer de fígado e metástase) (SU; FOOK; FY, 2000).

A técnica de SPR (surface plasmonic resonance) monitora alterações no índice de refração da superfície funcionalizada por meio da análise do ângulo de ressonância ou SPR e pode ser utilizada para estudos termodinâmicos de interações biomoleculares e de biossensoriamento (MAO *et al.*, 2011). Um trabalho desenvolvido por Saberi e colaboradores (2016) desenvolveu através da técnica de SPR um imunossensor para detecção da bactéria *Brucella melitensis*, causadora de infecções muito comum compartilhada entre humanos e animais, com faixa de concentração de 10^3 a 10^7 células mL^{-1} ($R^2 = 0,998$) e limite de detecção de 100 células mL^{-1} . Adicionalmente, a dissociação do equilíbrio cinético constante (K_D) para avaliação da afinidade da interação foi calculada como $1,1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ pode ser considerado como interação de alta afinidade (SABERI *et al.*, 2016). Outro trabalho desenvolveu um biossensor por SPR para detecção do vírus da gripe aviária H5N1 altamente patogênico em animais e humanos em amostras de esfregaços de aves com um limite de detecção inferior de 0,128 HAU (quantidade mínima de vírus que causa aglutinação completa dos glóbulos vermelhos) em 1,5 h (BAI, 2012).

Técnicas eletroquímicas vêm recebendo grande destaque no meio acadêmico, incluindo a voltametria, amperometria, potenciometria, condutometria e impedância eletroquímica (BARD *et al.*, 2001). Técnicas de voltametria e amperometria têm como princípio a aplicação de um potencial em um eletrodo de trabalho previamente modificado versus um eletrodo de referência e a partir disso, medir a resposta em corrente elétrica, que surge devido a reações redox que

ocorrem no eletrodo de trabalho. Na voltametria, uma faixa de potencial é utilizada, para obtenção da resposta em corrente elétrica, enquanto na amperometria o potencial é mantido fixo e a resposta em corrente é registrada ao longo do tempo (RONKAINEN; BRIAN; HEINEMAN, 2010). Cheng e colaboradores, desenvolveram um biossensor voltamétrico para detecção de lisozima numa faixa linear de 0,5 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CHENG; GE; YU, 2007).

Utilizando a técnica de amperometria, foi desenvolvido um biossensor para detecção do antígeno-carcino embriogênico (CEA, um biomarcador para câncer) em uma faixa clinicamente útil de 0-200 ng mL^{-1} e limite de detecção de 0,2 ng mL^{-1} . (LABORIA *et al.*, 2010). Outro exemplo, foi a utilização da técnica amperométrica para detecção da proteína α -Enolase (ENO1, um biomarcador para câncer de pulmão) com limite de detecção de 2,38 pg mL^{-1} (HO *et al.*, 2010).

Já a abordagem para construção de sensores potenciométricos são baseados na medida do potencial em uma célula eletroquímica entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência em condições de equilíbrio. Nessa técnica, a superfície do eletrodo reconhece o alvo e, por meio da alteração do potencial da célula (devido à interação antígeno-anticorpo que causa alteração na distribuição de cargas na superfície do eletrodo) pode-se mensurar a quantidade de analito. Ismail *et al.*, (2014) desenvolveram um sensor potenciométrico para detectar concentrações micromolares de penicilina numa faixa linear de 7,5-146 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com limite de detecção de 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (ISMAIL; ADELOJU; MOLINE, 2014).

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), também é muito utilizada para construção de biossensores impedimétricos dos quais incluem os processos faradâicos e não faradâicos. Utilizada na caracterização de superfícies, transporte de carga e estudos de corrosão (BEN *et al.*, 2012; MONTALVILLO *et al.*, 2014), pois possui vantagens como capacidade de miniaturização, multiplexação e alta sensibilidade (LISDAT; SCHÄFER, 2008; SANTOS, 2014). Utilizando conceito faradaico, Jiménez *et al.*, (2015) desenvolveram uma abordagem para a detecção do hormônio da progesterona (P4, uma biomolécula envolvida em muitos efeitos negativos à saúde quando presente em altos níveis no organismo) numa faixa linear de 10-60 ng mL^{-1} com limite de detecção de 0,90 ng mL^{-1} (CONTRERAS *et al.*, 2015). Utilizando uma abordagem similar, Johnson *et al.*, (2012) desenvolveram um biossensor impedimétrico para quantificar proteína C-reativa (CRP, do inglês C-reactive protein, uma proteína

relacionada com doenças cardiovasculares) em soro com limite de detecção na faixa picomolar (300-500 pmol L⁻¹) (JOHNSON *et al.*, 2012). Diferentemente, impedância não-faradáica monitora alterações na impedimétricas do sistema relacionada com a ligação da molécula alvo e não requer o uso de espécie eletroativa em solução (uma característica importante para aplicações do tipo *point-of-care*). Basicamente, biossensores baseados em impedância não-faradáica medem alterações nas propriedades dielétricas e distribuições de carga do filme (eletrodo de trabalho) causado pela ligação da molécula alvo na superfície de reconhecimento (ESTEBAN, 2006). Um exemplo de abordagem de impedância não faradáica pode ser encontrado no trabalho de Teeparuksapun *et al.*, (2009). Neste trabalho, foi utilizado albumina de soro humano (HSA) como espécie alvo com limite de detecção de 8 fmol L⁻¹ (TEEPARUKSAPUN *et al.*, 2009).

No contexto geral, 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 (FERNANDES *et al.*, 2014; FIGUEIREDO, A. *et al.*, 2015).

1.9 Funcionalização do transdutor por monocamadas auto-organizadas (SAM)

Uma maneira de funcionalização de um transdutor se faz com a construção de monocamadas auto-organizadas (SAM: do inglês, *self-assembled monolayer*). As SAMs consistem de uma camada 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 preestabelecer 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 SAM.

Segundo Taniguchi e colaboradores (1982), as SAMs 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. Os sistemas mais utilizados têm sido os tióis e alcanotióis sobre as superfícies de ouro, devido à estabilidade da ligação Au-S-R, (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).

1.10 Uso de monocamada peptídica

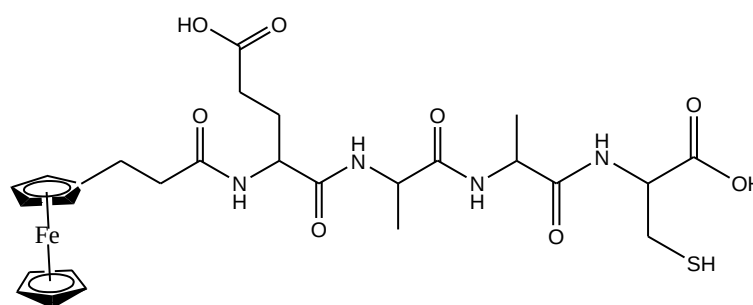
Monocamadas baseadas em peptídeos vêm sendo desenvolvidas, pois estão viabilizando a construção de sistemas cada vez mais específicos para ensaios de biossensoriamento capacitivos em sensores metálicos (SANTOS *et al.*, 2015). Estas apresentam vantagens na construção de superfícies receptivas, no caso, SAMs construídas por peptídeos, pois podem ser facilmente manipuladas para aplicações específicas (AMBLARD *et al.*, 2006). O ancoramento de peptídeos em sensores metálicos é possível pela construção de sua estrutura com um resíduo de cisteína (Cys) (GATTO; VENANZI, 2013) na superfície de ouro, facilitando diversificadas eletroanálises (LI *et al.*, 2011). Além disso, peptídeos podem ser sintetizados com características anti-incrustantes, ideal para o desenvolvimento de superfícies que repelem proteínas ou células, diminuindo o problema de interação inespecífica, quando se pretende utilizar amostra biológica, como soro sanguíneo evitando efeitos de retenção de outros materiais na superfície da matriz biológica (BRAULT *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2010).

Recentemente foi observado que monocamadas contendo grupos redox apresentam alteração de sinal capacitivo, quando utilizadas como transdução de sinal para reconhecimento de biomarcadores (FERNANDES *et al.*, 2013; PICCOLI, J. P. *et al.*, 2016). Para utilização de peptídeos na formação das SAMs e construção dos biossensores deste trabalho de doutorado, foi sintetizado pela aluna de doutorado Júlia Piccolo, orientada pelo prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, um peptídeo redox (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys), para ser ligado covalentemente a um eletrodo de Au pela cadeia lateral do resíduo de Cys,

localizado em uma de suas extremidades, e ao anticorpo anti-NS1 por meio da outra extremidade, sendo a molécula de ferroceno (Fc) usada como sonda para o biossensoriamento (PICCOLI, J. *et al.*, 2018). Na figura 12 está a formula da molécula de peptídeo redox sintetizado.

A avaliação do peptídeo redox, utilizado para reconhecimento de anticorpos foi realizada por Piccolo e colaboradores (2018). Neste, demonstraram o uso da molécula de ferroceno como sonda acoplada a um peptídeo para gerar um sinal capacitivo detectável, que se mostrou apropriado por ser uma molécula padrão ouro para eletroquímica (PICCOLI, J. *et al.*, 2018), o que a torna uma excelente escolha para integração em biossensores eletroquímicos, devido ao seu pequeno tamanho, boa estabilidade, fácil modificação química, relativa lipofilia e facilidade de comunicação redox (MARSH *et al.*, 2014; SATHYARAJ *et al.*, 2012). Estes sensores eletroquímicos, com a molécula redox diretamente ligada à superfície em vez de ser adicionada à solução, proporcionam vantagens adicionais para necessidade cada vez maior de sensores robustos e portáteis que viabilizem seu uso em diferentes locais de necessidades públicas (FERNANDES *et al.*, 2013, 2014; LEHR *et al.*, 2014).

Figura 12. Peptídeo (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys).



Fonte: Elaborado pela autora.

1.11 Voltametria Cíclica (CV)

A caracterização das SAMs pode ser realizada utilizando a técnica de voltametria cíclica (CV: do inglês, *cyclic voltametry*). 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 que têm como princípio aplicação de um potencial em um eletrodo de trabalho previamente modificado versus um eletrodo de referência e mede-se a resposta em corrente elétrica. A corrente surge devido a reações redox que ocorrem no eletrodo de trabalho. Na voltametria, uma faixa de potencial é utilizada, obtendo-se a resposta em corrente elétrica. 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 a 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 *et al.*, 2001).

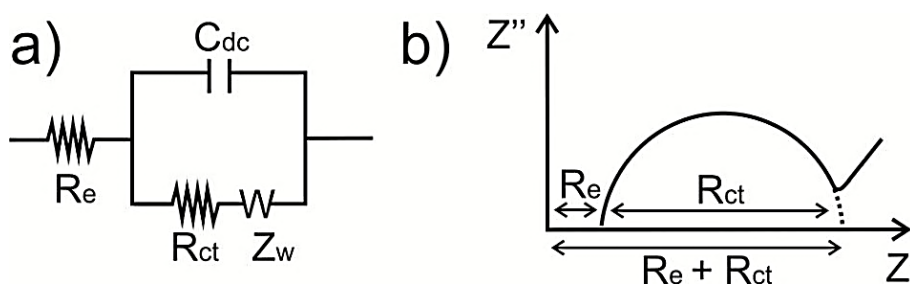
1.12 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE: do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*) fornece uma visão completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução, 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 (DE CARVALHO; DE ANDRADE; BUENO, 2006).

Reações eletroquímicas que envolvem o transporte eletrônico dos íons ferrocianeto em dispositivos semicondutores e condutores como o ouro, fazem o monitoramento do comportamento eletroquímico desta espécie redox (em solução) quando o sistema é perturbado por meio da aplicação de um potencial (tensão) senoidal de pequena amplitude que gera uma resposta de corrente no rastreamento da superfície (MACDONALD, 1992). A resposta de tensão-corrente linear é obtida tipicamente por uma pequena perturbação ~ 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) (ESTEBAN, 2006).

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 (C.E.E) do tipo Randles, que é um modelo que representa as equações cinéticas que levam às funções da impedância (DE CARVALHO; DE ANDRADE; BUENO, 2006). Um (C.E.E) (figura 13a) 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 13. 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.



Fonte: Elaborado pela autora.

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; DAVIS, 2013). A instrumentação para análise das respostas é composta essencialmente por um potenciostato/galvanostato e um analisador de resposta de frequência (FRA), que 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.

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 ($I(t) = I_0 \sin(\omega t + \varphi)$), ambas 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 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 ($Z^*(\omega)$), característica 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 ω , 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 é o gráfico de $\log |Z|$ e φ (ângulo de fase) em função de $\log f$, ou pelo diagrama de Nyquist, que mostra a relação de $-Z''$ em função de Z' (por convenção, em eletroquímica é referido como Z'' versus Z' e o sinal de menos na $-Z''$ é implícito), segundo Santos e colaboradores (2014a).

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, isto é funcionalização pela adição do anticorpo e adição de diferentes concentrações do analito (JOHNSON *et al.*, 2012). Essa abordagem vem sendo aplicada, por exemplo, para detecção de baixos níveis (de picomolar a femtomolar) de biomoléculas no organismo que indicam o início de certas patologias, permitindo diagnósticos mais sensíveis e do tipo *point-of-care* (XU; LUO; DAVIS, 2013).

1.13 Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECE)

Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica (ECE: do inglês, *electrochemical capacitance spectroscopy*) 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; FABREGAT-SANTIAGO; DAVIS, 2013). Se uma superfície metálica mergulhada é polarizada em uma solução eletrolítica, surge o que é conhecido como capacitância da dupla camada elétrica. Essa capacitância, que pode ser descrita pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern (GCS), modela o sistema como sendo um eletrodo imerso em uma solução contendo íons diluídos em um solvente com momento dielétrico. Quando se aplica um potencial elétrico neste eletrodo, os íons e moléculas do solvente respondem ao potencial por meio de alterações da orientação e proximidade da superfície do eletrodo, gerando a capacitância da dupla camada (C_{dl}). Matematicamente, essa capacitância pode ser modelada pela combinação em série de dois capacitores: capacitância difusa (C_D) que descreve a dispersão iônica da solução em relação com a distância do eletrodo; e a capacitância de Helmholtz (C_H) que constitui uma camada compacta de moléculas de íons e de solvente:

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_D} \quad (2)$$

Para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, a superfície do eletrodo geralmente é modificada por uma monocamada automontada (SAM, do inglês self-assembled monolayer) para posterior imobilização do material biológico. Assim, a imobilização desta SAM sobre o eletrodo modifica essa capacitância, introduzindo as características dielétricas intrínsecas do próprio filme, e também devido à possibilidade de inclusão de íons e solvente dentro da monocamada. Góes e colaboradores (GÓES *et al.*, 2012), descreveram esta perturbação por meio da adição de um capacitor em série (C_b), resultando na capacitância da monocamada (C_m):

$$\frac{1}{C_m} = \frac{1}{C_{dl}} + \frac{1}{C_b} \quad (3)$$

Desde que C_b é a capacitância esperada do filme sem o ingresso de íons/solvente, a migração de íons/solvente no filme origina um fenômeno de relaxação que pode ser quantificado por dois termos relacionados em série, C_t e R_t . A resposta complexa dessa combinação em termos de capacitância em função da frequência [$C^*(\omega)$] pode ser descrita idealmente pelo modelo de relaxação de Debye ou, de forma mais realística, Cole-Cole (GÓES *et al.*, 2012):

$$C^*(\omega) = C_m + \frac{C_t - C_m}{1 + (j\omega\tau_t)^{1-\alpha}} \quad (4)$$

sendo $j = \sqrt{-1}$, $\tau_t = R_t C_t$, sendo que $\alpha = 0$ para a condição ideal ou de Debye. Note que o circuito equivalente da equação (4) pode ser descrito como sendo C_m em paralelo com a combinação em série de C_t e R_t (o circuito de Debye) (GÓES *et al.*, 2012).

Para o eletrodo que é modificado com um filme que possui uma espécie eletroativa (i.e., uma entidade que pode ser carregada/descarregada) surge um termo de carregamento adicional, comumente conhecido como pseudocapacitância. Importante notar que ambas as contribuições de capacitância (capacitância da dupla camada e pseudocapacitância) estão presentes nesta configuração, mas a última é distintamente maior.

Foi demonstrado recentemente, que essa pseudocapacitância é uma manifestação da capacitância de ordem mesoscópica (i.e., dimensões atômicas/moleculares) (BUENO; FELICIANO; DAVIS, 2015). A esta capacitância é designado o nome de capacitância redox ou eletroquímica (C_r), e surge da sobreposição energética da densidade de estados (DOS) da entidade redox [$g_r(E)$] presente no filme e da densidade de estados do eletrodo metálico [$g_m(E)$] (BUENO; DAVIS, 2014b; BUENO; FELICIANO; DAVIS, 2015). Também foi demonstrado que esta capacitância é uma combinação em série de duas distintas capacitâncias:

$$\frac{1}{C_r} = \frac{1}{C_e} + \frac{1}{C_q} \quad (5)$$

sendo $C_e = dq/dV$, a capacitância eletrostática (ou geométrica) originada por meio da separação de cargas, e $1/J$ é a capacitância quântica, definida por Buttiker como: (BUENO; DAVIS, 2014b).

$$\frac{1}{C_q} = \frac{1}{e^2} \left(\frac{1}{g_m(E)} + \frac{1}{g_r(E)} \right) \quad (6)$$

sendo e a carga elementar. Importante notar que, desde que $g_m(E) \gg g_r(E)$, isto é, a densidade de estados eletrônica do metal é muito maior do que a densidade de estados da entidade redox, a capacitância quântica pode ser aproximada a:

$$C_q(E) = e^2 g_r(E) \quad (7)$$

Na equação 7, a capacitância quântica pode ser definida como uma função de distribuição dos estados (orbitais redox acessíveis) de um sistema energeticamente perturbável composto por, de um ponto de vista quântico, um finito DOS (entidade redox presente na SAM) associado a um infinito DOS (eletrodo). Essa função de distribuição segue a estatística de ocupação de Fermi-Dirac:

$$F_{FD}(E_r, \mu_e) = \frac{1}{1 + \exp[(E_r - \mu_e)/K_B T]} \quad (8)$$

sendo K_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, μ_e o potencial eletroquímico ($dE = -edV = d\mu_e$) e E_r o nível energético dos orbitais redox acessíveis. Note que F_{FD} é uma função de μ_e e E_r , i.e., o potencial do grupo redox controla a ocupação de acordo com o nível do potencial redox $\Delta G = E_r - \mu_e$. Para um nível específico de energia, $n(\mu_e) = F_{FD} g_r(\mu_e) = F_{FD} \Gamma$, e a capacitância eletroquímica pode ser definida como:

$$C_r(\mu_e) = \frac{dq}{dV} = \frac{edq}{edV} = \frac{e(edn)}{d\mu_e} = \frac{e^2 dn}{d\mu_e} = \frac{e^2 \Gamma df}{d\mu_e} = \frac{e^2 \Gamma}{K_B T} F_{FD} (1 - F_{FD}) \quad (9)$$

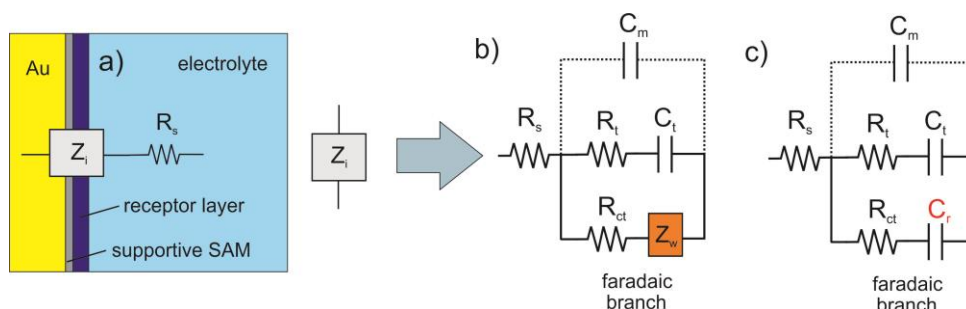
sendo n o número de centros redox ocupados e Γ o número de moléculas contendo grupos redox. Note que C_r é maximizado quando $F_{FD} = 1/2$ e $F_{FD}(1 - F_{FD}) = 1/4$, i.e., no potencial formal $E_{in} = E_{ox} + E_{red}/2$, sendo E_{ox} e E_r os potenciais de oxidação e redução, respectivamente, da espécie eletroquimicamente ativa. Neste caso, a equação 9 pode ser escrita como:

$$C_r(\mu_e) = \frac{e^2 \Gamma}{4K_b T} \quad (10)$$

Esta interface composta pelo filme contendo um grupo redox pode ser descrita por um circuito equivalente, como mostrado na figura 14 acima (BRYAN et al., 2014 e BUENO; FABREGAT e DAVIS, 2013). Este circuito é composto por dois braços: faradáico e não faradáico. A parte não faradáica está relacionada com a relaxação devido à migração iônica/solvente como discutido anteriormente. Por outro lado, a braço faradáico está exclusivamente relacionado com a redistribuição de elétrons por entre os orbitais energeticamente permitidos. Esse braço é composto por um termo resistivo (devido a perdas energéticas, R_{ct}) e capacitivo, C_r , que descreve a capacidade de armazenamento de energia elétrica do filme. Por meio da espectroscopia de capacitância, é possível resolver cada componente, simplesmente fornecendo energia ao sistema relacionado com o potencial E_{in} (potencial formal ou redox in) e outra com energia insuficiente para a transferência de elétrons (redox out). O valor de capacitância eletroquímica pode ser facilmente obtido por meio da aproximação do diâmetro do semicírculo das curvas nos gráficos de Nyquist.

A figura 14 mostra as diferenças entre EIE e ECE, que 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 ECE mede a mudança da capacitância redox (C_r) das interfaces receptivas redox confinadas (BUENO; DAVIS, 2014b, a; FERNANDES et al., 2013, 2014; LEHR et al., 2014). 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 figura 14, (BRYAN et al., 2014 e BUENO; FABREGAT e DAVIS, 2013).

Figura 14. 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.



Fonte: FERNANDES et al., 2014.

Se uma análise for realizada fora da janela de potencial faradaica (na região não-redox) é possível obter o termo C_r puramente, isto é, 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 seja significativamente mais sensível ao ambiente interfacial, como em eventos de biorreconhecimento (BUENO; MIZZON; DAVIS, 2012; LEHR *et al.*, 2014). A teoria 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 biorreconhecimento 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 doutorado, a técnica de ECE foi aplicada no monitoramento de interações específicas entre anticorpo-antígeno, demonstrando que o uso de superfícies de reconhecimento com atividade redox é útil no desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação de biomarcadores.

2 Objetivos

- 1) Construção de um biossensor impedimétrico para detecção da proteína NS1 da dengue, em eletrodos microfabricados da Micrux para avaliação dos parâmetros de mérito analíticos em PBS e soro comercial humano para possível viabilização das medidas em amostra de pacientes;
- 2) Construção de um biossensor capacitivo em eletrodos convencionais da Metrohm, para otimização e comparação com o método impedimétrico;
- 3) Construção de superfícies de reconhecimento utilizando monocamadas auto-organizadas, composta por um peptídeo redox, especialmente desenhada para acoplar o anticorpo anti-NS1 e a sonda redox, permitindo assim a medição da capacitância redox do sistema. Monocamadas constituídas de peptídeos anti-incrustantes com grupo redox serão sintetizadas com este fim específico;
- 4) Após otimização do processo em (3), empregar o método em banco de amostras de sangue com a finalidade de avaliação clínica da proposta, isto é, análise da resposta do biossensor frente a diferentes soros de pacientes.

2 Artigo

Os resultados utilizando monocamadas mistas de alcanotóis em plataformas de detecção impedimétricas e capacitivas, ambos em eletrodos convencionais, foram utilizados para submissão de um artigo na revista científica *Biosensors and Bioelectronics*, em 2017 (CECCHETTO *et al.*, 2017).

3.1 Discussão do artigo

Neste artigo a proteína NS1 do vírus da dengue (cód: ab64456) é utilizada como alvo para o anticorpo anti-NS1 (cód: ab138696) imobilizado no biossensor. Esta proteína foi quantificada seletivamente por um sensor capacitivo eletroquímico (metodologia de capacitância derivada de impedância onde a sonda redox está contida na monocamada receptiva) visando o diagnóstico da dengue em solução

fosfato salina tamponada e em soro sanguíneo (sem diluição). O sensor capacitivo foi comparado à abordagem impedimétrica concorrente tradicional (no qual a sonda redox é adicionada na solução) e outros métodos estabelecidos na literatura em relação a figuras de mérito como limite de detecção, faixa linear, desvio padrão relativo e constante de afinidade.

Ensaio capacitivos (baseados em monocamadas automontadas mistas (SAMs) compostas de ácido 16-mercaptohexadecanóico (16-MHDA), usado para ligação covalente do anticorpo NS1 (16-MHDA-Ab), e 11-ferrocenyl-undecanethiol (11-Fc), usado como espaçador eletroativo/sonda redox confinada) e impedimétricos (baseados em SAMs mistas não-eletroativas compostas de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) funcionalizado com anticorpo anti-NS1 (MUA-Ab) e 6-mercapto-1-hexanol (6COH) como espaçador) mostraram resultados equivalentes para faixa linear, repetibilidade, sensibilidade e constante de afinidade. No entanto, os testes capacitivos apresentaram melhor reprodutibilidade, com um desvio padrão relativo (RSD) de 3 ± 1 e 7 ± 4 (todos em porcentagem) em PBS e soro, respectivamente, enquanto que para ensaios impedimétricos os valores de RSD foram 9 ± 5 em PBS e 12 ± 6 no soro. Assim, utilizando ensaios capacitivos, observou-se uma melhora no desempenho analítico com o limite de detecção cerca de sessenta vezes menor no soro puro ($\sim 0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para capacitivo e $\sim 30 \text{ ng mL}^{-1}$ para ensaios impedimétricos) comparado a métodos eletroquímicos tradicionais em geral, demonstrando assim a sensibilidade de detecção superior para a proteína NS1.

4 Parte Experimental

4.1 Reagentes

A Tabela 2 resume os reagentes, fórmula molecular e procedência de cada substância utilizada neste projeto. Para o preparado das soluções aquosas foi utilizado água Milli-Q do equipamento da Millipore Corp. (Simplicity System, Bedford, MA, US) com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C .

Tabela 2. Substâncias, fórmula molecular e procedência.

Reagentes	Fórmula molecular	Procedência
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-Aldrich
Água Milli-Q (18,2 MΩ a 25°C)	H ₂ O	Millipore
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 OS	Sigma-Aldrich
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	Sigma-Aldrich
Acetonitrila	CH ₃ CN	Synth
Soro humano comercial	-	Sigma-Aldrich
Tween 20 (Monolaurato de polioxietilenosorbitan)	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich
Albumina do soro bovino (BSA)	-	Sigma-Aldrich
Superblock™	-	Sigma-Aldrich
Soro fetal bovino (Fetuína)	-	Sigma-Aldrich
Anticorpo anti-NS1	ab138696	Abcam
Antígeno NS1	ab64456	Abcam
N-hidroxisuccinimida (NHS) 97%	C ₄ H ₅ NO ₃	Sigma-Aldrich
N-etil N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)	C ₈ H ₁₇ N ₃	Sigma-Aldrich

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Ensaios biológicos para avaliação da proteína NS1

Neste trabalho o par comercial antígeno/anticorpo utilizado, foi a glicoproteína recombinante NS1 do vírus da dengue (cód: ab64456), anticorpo monoclonal anti-NS1, isotipo IgG1 (cód: ab138696), ambos da empresa Abcam. O soro humano comercial (cód: S7023) foi adquirido da Sigma-Aldrich.

O principal método utilizado para diagnóstico da dengue é o teste sorológico por ELISA, sendo considerado o método padrão ouro preconizado pela Organização Mundial da Saúde e adotado pelo Ministério da Saúde no Brasil (HALSTEAD, 2007). Um dos objetivos deste trabalho visa à detecção mais rápida e sensível da proteína NS1 quando comparados ao teste padrão. Para tanto, este trabalho foi iniciado com o uso de eletrodos microfabricados da Micrux, desenhados especialmente para

construção do biossensor, e após, com o uso de eletrodos convencionas da Metrohm, técnica já padronizada pelo grupo de pesquisa, para a construção do biossensor impedimétrico, com curva analítica obtida no Mestrado da aluna e resultados já publicados, comparado ao sistema capacitivo. A partir disso, este trabalho visa otimizar o sistema, utilizando monocamadas receptivas redox em eletrodos convencionais, com a finalidade de melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade dos biossensores em meio biológico complexo, como o soro.

Os ensaios imunológicos Immunoblot e ELISA foram realizados para a verificação da atividade do sistema antígeno-anticorpo da proteína viral NS1. Estes, foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, do laboratório de Imunologia Clínica da UNESP/FCFAR - Araraquara, São Paulo, e sua aluna de doutorado Rute Lopes.

Com a confirmação da atividade entre as proteínas, as mesmas foram empregadas para os ensaios de espectroscopia de impedância e capacitância eletroquímicas.

4.3 Ensaios Imunológicos

O procedimento foi realizado com o preparo de uma fita de nitrocelulose, pipetando 1 μL de antígeno NS1, na concentração 0,46 mg mL^{-1} ao lado do ponto de marcação. Após, a fita foi seca em estufa por 15 min a 37 °C em uma placa de petri, e transferida para canaleta específica de imunoblot. Adicionou-se na fita 2 mL de solução de bloqueio, constituída por leite desnatado 5% em PBS e Tween 20 0,05% (PBS-T), seguido de incubação por 2 h em T.A., sendo todas as etapas subsequentes realizadas em agitação constante. Após incubação, a solução foi descartada com o auxílio de bomba a vácuo e, em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-NS1 [3,1 mg mL^{-1}] diluído em solução de bloqueio (concentração 1:1000, volume final de 2 mL), incubado por 1 h em T.A. A fita foi então lavada 3 $\times$ por 5 min em solução de lavagem de PBS-T. A próxima etapa foi de incubação em anticorpo anti-IgG-HRP (Sigma, código A9044, anti-mouse IgG-peroxidase produzido em coelho), por 1 h em T.A, concentração 1:2000, em solução de bloqueio. Em seguida uma nova etapa de lavagem foi realizada, repetindo as mesmas condições. Por fim, a revelação foi realizada utilizando uma solução de diaminobenzidina (DAB) 0,05%

em tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 7,5, com 0,5% de H₂O₂ 30%, por aproximadamente 5 min em T.A. (no escuro).

4.4 Ensaio ELISA

O ensaio por ELISA foi realizado para avaliar a interação do par antígeno-anticorpo da proteína viral NS1. As microplacas foram revestidas com diferentes concentrações de antígeno NS1 (5 – 10,000 ng mL⁻¹) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,0 (50 µL/poço), por 16 h a 4°C. Os poços foram lavados quatro vezes com tampão PBS-T, 200 µL/poço. O bloqueio foi procedido com BSA 0,1% em PBS pH 7,4 (100 µL/poço) em T.A., por 1 h, seguido de nova lavagem. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de anticorpo anti-NS1 (1,000 ng mL⁻¹) por 2 h em T.A. Os poços foram lavados novamente e incubados com anticorpo anti-IgG-HRP durante 1 h. Após outra etapa de lavagem, o revelador tetrametilbenzidina (TMB) e H₂O₂ 0,05% em PBS foram adicionados à placa. A reação foi bloqueada com 2 mmol L⁻¹ H₂SO₄. A leitura foi realizada a 450 nm no leitor de microplacas.

4.5 Ensaios biológicos para amostras de pacientes

As amostras foram coletadas em unidades de Estratégia de Saúde da Família ESF e Unidades Básicas de Saúde UBS da cidade de Matão, de pacientes que receberam diagnóstico clínico de dengue ou outras infecções por *arbovírus*, os menores de 14 anos tiveram o TCLE preenchido e assinado pelos pais ou responsável, juntamente com o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) e após, as amostras foram encaminhadas para análises de detecção de *arbovírus*, no Laboratório de Saúde Pública, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, campus Araraquara, São Paulo, coordenado pelo Professor Dr. Adriano Mondini, que após processamento e análise biológica das mesmas, aprovadas pelo Comitê de Ética Humano CAAE: 73098317.0.0000.5426, nos cedeu gentilmente às amostras para nosso trabalho, no qual foram cuidadosamente manipuladas em seu laboratório, para análises eletroquímicas, também aprovadas pelo Comitê de Ética Humano CAAE: 59590416.6.0000.5426.

Para o diagnóstico de dengue nas amostras clínicas, foram realizados PCR. O material genético foi extraído usando método comercial (QIAmp Kits, QUIAGEN). Em seguida procedeu-se a reação de RT-PCR-NESTED de acordo com (BRONZONI *et al.*, 2005), no qual foram usados primers espécie-específico para os 4 sorotipos da Dengue (DENV 1 – 4), confirmando a titularidade das amostras, aqui nomeadas em verdadeiramente positivas e verdadeiramente negativamente. Por fim, foi submetido à corrida por eletroforese em gel de Agarose.

4.6 Equipamentos

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 (KCl saturado) como eletrodo de referência, uma placa de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de ouro (2,0 mm de diâmetro e área real de 0,03142 cm²) obtido da Metrohm, modificado com os filmes automontados como eletrodo de trabalho. Todos os potenciais descritos neste texto são relativos ao eletrodo Ag|AgCl (KCl saturado).

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.

Para análises em eletrodos microfabricados da Micrux, foi utilizado o mesmo sistema convencional de 3 eletrodos. A célula eletroquímica foi desenhada pelo nosso grupo de pesquisa Nanobionics, no qual, apresentava volume de ~ 500 µL e o eletrodo de trabalho consistiu em um eletrodo microfabricado de ouro por eletrodeposição, fabricado pela Micrux.

4.7 Medidas Eletroquímicas

Medidas eletroquímicas por ECE foram realizadas em uma célula contendo 20 mM perclorato de tetrabutilamônio (TBAClO₄) dissolvido em acetonitrila como eletrólito suporte e água (20:80, v/v). Para medidas por EIE, foi utilizado a mesma célula eletroquímica, porém com 1 mmol L⁻¹ de ferrocianeto de potássio [Fe(CN)₆]^{3-/4-} como sonda redox, dissolvido em PBS (pH 7,4) como eletrólito de suporte. CV foi

realizada na faixa de potencial entre 0,0 - 0,7 V e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas na faixa de frequência de 10 mHz a 100 kHz no potencial formal (região com atividade redox), que foi de ~ 38 V, obtidos pela média aritmética do potencial de oxidação e redução; com amplitude de perturbação de 10 mV (pico a pico). Medidas de EIE também foram realizadas no potencial de 0,1 V (região de potencial sem atividade redox). Todas as medidas foram realizadas em replicata (no mínimo quatro vezes).

Nas análises de capacitância ($c^*(\omega)$) derivada da impedância os resultados foram obtidos convertendo os dados da impedância complexa em função da frequência ($Z^*(\omega)$) utilizando a relação $c^*(\omega) = 1/j\omega Z^*(\omega)$, onde ω é a frequência angular e $j = \sqrt{-1}$. A parte real c' e imaginária da capacitância, c'' , foi obtida utilizando as relações (PATIL *et al.*, 2015):

$$c'(\omega) = \frac{z''}{\omega |z|^2} \quad (3)$$

$$c''(\omega) = \frac{z'}{\omega |z|^2} \quad (4)$$

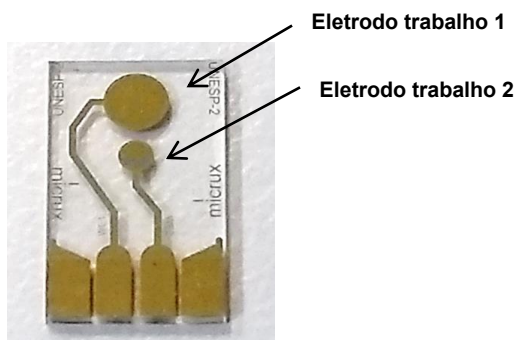
4.8 Limpeza e caracterização da superfície do Au por medidas eletroquímicas em eletrodos microfabricados (Micrux)

Para facilitar a leitura, optou-se por descrever toda metodologia utilizada para análise em eletrodos microfabricados e após, a descrição utilizada para análises em eletrodos convencionais.

Com intuito de miniaturização do sistema, visando medidas *point-of-care*, o trabalho foi conduzido para utilização de eletrodos miniaturizados, aqui chamados eletrodos microfabricados. Para utilização dos eletrodos microfabricados ainda nunca testados pelo grupo, e assegurar que o sistema seria confiável, estável e reprodutível, este inicialmente passou por análises de sua superfície. A figura 15

representa o modelo dos eletrodos microfabricados utilizados neste trabalho e o sistema de análise utilizado foi impedimétrico.

Figura 15. Ilustração do eletrodo microfabricado da Micrux.



Fonte: Micrux. www.micruxfluidic.com

A princípio foi realizada a avaliação detalhada da superfície dos eletrodos microfabricados, com estudos baseados na análise da superfície do Au por microscopia eletrônica de varredura com alta resolução e emissão de elétrons por um canhão de aplicação de um campo elétrico "Field Emission Gun" (MEV/FEG), que fornece rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida e microanálise química quantitativa por espectrometria de energia dispersiva por raios X (EDS). Técnica utilizada dentre muitas avaliações, para análise de superfície para construção de sensores (DARWISH; ALIAS; KHOR, 2015).

Etapas da caracterização do MicroEI:

As características topológicas da superfície de Au dos eletrodos microfabricados foram caracterizadas pelo uso de MEV/FEG, seguido por análise de EDS, que possibilita a identificação e mapeamento dos elementos químicos presentes no material. Enquanto a estabilidade eletroquímica das monocamadas de alcanotóis foi caracterizada pelo uso de CV e EIE. Abaixo segue o fluxograma com as etapas realizadas nos eletrodos.

1ª etapa: Caracterização da superfície do eletrodo de Au, por FEG e EDS, sem tratamento prévio.

2ª etapa: Os eletrodos microfabricados foram limpos por tratamento convencional, seguido de caracterização da superfície do Au por FEG.

3º etapa: Após a etapa de limpeza convencional, os eletrodos microfabricados foram expostos a tratamento térmico em 400 °C por 30 min em nitrogênio.

4.8.1 SAMs mistas para análise impedimétrica em eletrodos microfabricados

Os eletrodos limpos eletroquimicamente (UV/Ozônio + CV em H_2SO_4 0,05 mol L^{-1} , 0,3 V e 1,5 V com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , como descrito na sessão de resultados 5.2 abaixo) foram utilizados para construção das diferentes monocamadas testadas por meio de imersão do mesmo durante 16 h (faixa de frequência de 0,01Hz a 100 kHz, usando como espécie eletroativa 1 mmol L^{-1} $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução, para medidas de análises impedimétricas, proporção [1:1], contendo (1,0 mmol L^{-1} de 11-MUA + 1,0 mmol L^{-1} de 6COH), denominada aqui SUPERFÍCIE-1, proporção [1:5], contendo 1,0 mmol L^{-1} de MUA, e 5,0 mmol L^{-1} de 6COH, SUPERFÍCIE-2, proporção [1:10], contendo 1,0 mmol L^{-1} de MUA, e 10,0 mmol L^{-1} de 6COH, SUPERFÍCIE-3 e também a proporção [1:20] contendo 1,0 mmol L^{-1} de MUA e 20,0 mmol L^{-1} de 6COH, SUPERFÍCIE-4. Para construção do biossensor funcionalizado, isto é, com o filme obtido anteriormente (pela imobilização das monocamadas), acoplamento do anticorpo anti-NS1, específico para o antígeno NS1. O acoplamento foi realizado via o protocolo EDC/NHS (FISCHER, 2010) por 30 min para a ativação do grupo carboxílico terminal do MUA, formando éster NHS. Após o período mencionado, o eletrodo foi lavado com água e mergulhado numa solução contendo 1,000 ng mL^{-1} de anticorpo por 1 h. Para bloquear os sítios remanescentes, não ocupados pela anti-NS1, foi utilizada solução de BSA 0,1% ou superblocTM, mergulhando o eletrodo nesta solução por 30 min. Os processos de imobilização do anticorpo e bloqueio foram avaliados pela espectroscopia de impedância eletroquímica.

4.9 Limpeza e caracterização da superfície do Au para medidas eletroquímicas em eletrodos convencionais (Metrohm)

Para a limpeza dos eletrodos convencionais e posterior formação da monocamada automontada de tióis (SAM), a superfície do ouro foi realizada por meio de polimento mecânico com pasta de óxido de alumínio (1,0 μm , 0,3 μm e 0,05

μm) com a diminuição do tamanho das partículas. A sonicação em água para remover partículas aderidas foi realizada entre as etapas de polimento. Após esta etapa, processo de dessorção eletroquímica em meio básico era realizado utilizando NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ potencial de $-1,7$ a $-0,7 \text{ V}$ a 100 mV s^{-1} (x $\text{Ag}|\text{AgCl}$), 400 ciclos e, subsequentemente, em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ aquecido ($-0,2 \text{ V}$ e $1,5 \text{ V}$ com uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} (x $\text{Ag}|\text{AgCl}$)) até que a estabilização do pico de redução no ouro, (CV) seja atingida (cerca de 50 ciclos). Após os passos de dessorção e limpeza eletroquímica, a área eletroativa foi calculada de acordo com o trabalho de Trasatti e colaboradores, que considera a carga de $410 \mu\text{C cm}^{-2}$ como sendo a necessária para reduzir uma monocamada de óxido de ouro quimicamente adsorvida na proporção de 1:1 entre ouro:oxigênio (TRASATTI; PETRI, 1992). Para o cálculo da área ativa do eletrodo, utilizou-se a área do pico de redução em $\sim 1,1 \text{ V}$ x $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (figura 16b), sendo que a carga Q é dada pela relação:

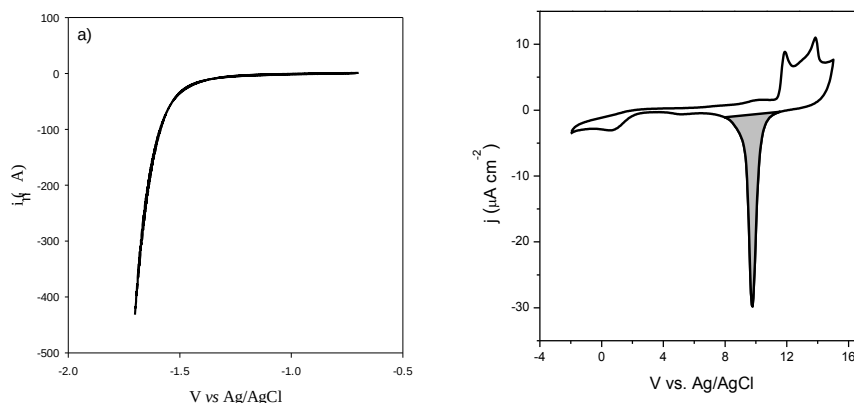
$$Q = \frac{1}{V} \int i \cdot V' \cdot dV' \quad (11)$$

Sendo, i a corrente, V' o potencial do eletrodo versus o de referência, e V a velocidade de varredura (100 mV s^{-1}). A área do eletrodo (A_e , em cm^2) foi calculada utilizando a relação:

$$A_e = \frac{Q}{410 \times 10^{-6}} \quad (12)$$

O fator de rugosidade (F_r) foi obtido dividindo-se a área obtida na relação (6) pela área geométrica do eletrodo ($0,03142 \text{ cm}^2$). Apenas os eletrodos com fatores de rugosidade entre 1,1 e 1,4 foram utilizados neste trabalho, uma vez que a construção de monocamadas compactas e de maior reprodutibilidade são obtidas utilizando superfícies com poucos defeitos ou de menor rugosidade (BENITES *et al.*, 2014). Por fim, o eletrodo de ouro polido foi caracterizado por CV, EIE e ECE.

Figura 16. Voltamogramas para o processo de limpeza do eletrodo de ouro. (a) Voltamograma para o processo de limpeza do eletrodo de ouro. (a) Voltamograma típico obtido na etapa de dessorção eletroquímica utilizando solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Faixa de potencial $-1,7$ a $-0,7 \text{ V}$ (x Ag|AgCl), 100 mVs^{-1} , 400 ciclos. (b) Voltamograma obtido no processo de limpeza eletroquímica da superfície de ouro (25º ciclo), utilizando solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Faixa de potencial $-0,2$ a $1,5 \text{ V}$ (x Ag|AgCl), 100 mVs^{-1} , 25 ciclos. A área hachurada indica a região utilizada para o cálculo da área do eletrodo.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.9.1 Formação SAMs mistas para análises impedimétricas e capacitivas em eletrodos convencionais

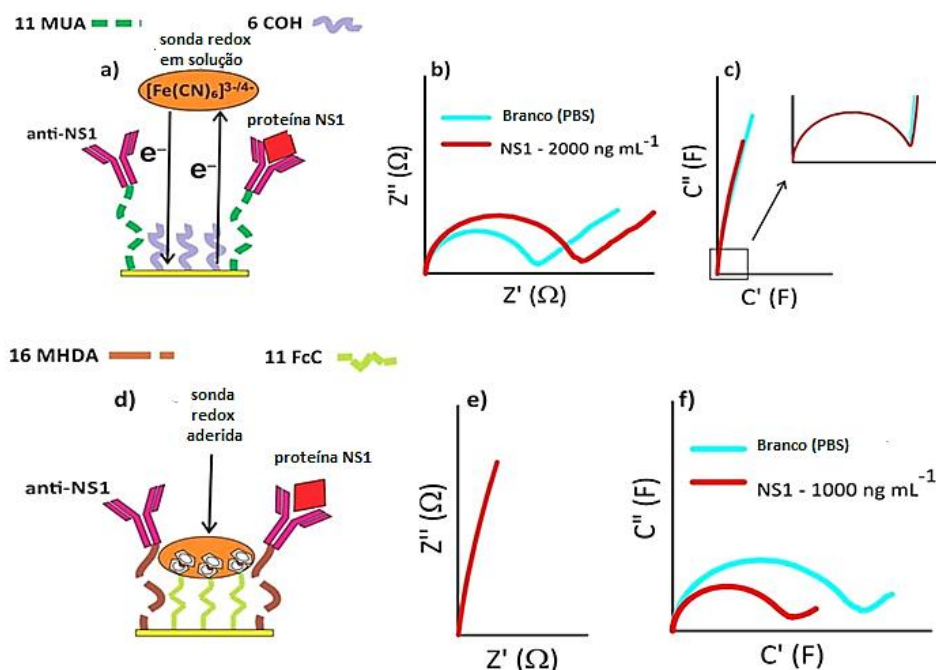
Um eletrodo de ouro (Metrohm) limpo e eletroquimicamente polido, como descrito na sessão 4.8 acima, foi imerso durante 16 h, numa solução contendo os tióis apropriados em etanol, para cada tipo de MODELO. O MODELO-1 foi montado por imersão do eletrodo Au numa solução mista que contém $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 11-mercaptoundecanoico (MUA), para ligação covalente com o anti-NS1, e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 6-mercapto-1-hexanol (6COH), como um espaçador (entre o tiol de ancoramento), em etanol anidro. No MODELO-2, o eletrodo de Au foi imerso numa solução mista de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 16-ácido-mercapto-hexadecanoico (16-MHDA), para ligação covalente com o anti-NS1 e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 11-ferrocenil-undecanetiol (11-Fc), usado como espaçador eletroativo. Vale a pena ressaltar que, para o MODELO-2, o grupo ferroceno foi utilizado como sonda redox confinada, necessária para a análise de ECE (FERNANDES *et al.*, 2013). Em ambos os casos, após a formação da SAM, os eletrodos foram lavados com etanol, água Milli-Q ($18,2 \text{ M}\Omega$ a 25°C ; Millipore, Sistema Simples, Bedford, MA, EUA) e secos com gás nitrogênio.

Em seguida, para funcionalização do biossensor, as superfícies receptivas foram ativadas, como descrito na sessão 4.8.1. Todos os passos de construção da superfície de recrutamento para NS1 foram caracterizadas pelas respectivas análises de ECE e comparadas com as respostas em EIE (CECCHETTO *et al.*, 2015).

EIE e ECE têm conceitos diferentes, tendo cada abordagem uma arquitetura de superfície específica de acordo com o sinal resistivo ou capacitivo do transdutor. Independentemente do mecanismo operacional, foram construídas interfaces de recrutamento para a proteína NS1 do vírus da dengue. Assim, as arquiteturas de superfícies, denominadas MODELO-1 e MODELO-2, (figura 17a e b) foram estrategicamente montadas para estudar comparativamente a EIE e ECE, respectivamente. O MODELO-1 foi construído no trabalho de mestrado (CECCHETTO *et al.*, 2015), enquanto que o MODELO-2 para análises de ECE foi realizado na primeira fase do trabalho de doutorado.

A caracterização eletroquímica no MODELO-1 foi realizada usando medidas de CV e EIE, em 1 mmol L⁻¹ de ferrocianeto de potássio [Fe(CN)₆]^{3-/4-} como sonda redox, dissolvido em PBS (pH 7,4), como eletrólito de suporte. Para o MODELO-2, as medidas eletroquímicas por ECE foram efetuadas em eletrólito de suporte contendo 20 mmol L⁻¹ de TBAClO₄ (perclorato de tetrabutilamônio) dissolvido em acetonitrila: H₂O 20:80, sem qualquer sonda redox em solução. Para todos os métodos, a CV foi realizada com taxa de varredura de 100 mV s⁻¹ entre -0,2 V a 0,7 V e entre 0,0 V e 0,7 V em relação ao eletrodo de Ag|AgCl, para a abordagem impedimétrica e capacitiva, respectivamente.

Figura 17. Representação comparativa para abordagens EIE (a, b, c) e ECE (d, e, f). Em (a) engenharia impedimétrica de uma superfície com solução mista de SAM (MUA + 6COH). Em (b) o sinal do transdutor é baseado na resistência de transferência de elétrons (R_{ct}) associado à sonda redox presente em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Em (c) a capacitância complexa derivada da impedância mostra uma contribuição da dupla camada elétrica e relaxamento iônico. (d) Engenharia da superfície capacitiva na superfície de ouro, com uma solução mista de SAM composta de 16-MHDA e 11-Fc com centros eletroativos (sonda redox acoplada). Em (e) a sonda redox dentro da monocamada fornece o sinal de capacitância redox, C_r , que é obtido a partir da conversão dos dados $Z^*(\omega)$ em $C^*(\omega)$. O componente real (C') e imaginário (C'') de capacitância são representados no gráfico capacitivo de Nyquist mostrado em (f).



Fonte: Elaborado pela autora CECCHETTO et al., 2017.

4.9.2 Construção das curvas analíticas para medidas de ECE e EIE

Para avaliar a estabilidade dos sistemas na detecção da proteína NS1, as superfícies receptivas por ECE e EIE, após o bloqueio dos sítios remanescentes do eletrodo com solução a 0,1% de BSA ou superbloc, os eletrodos eram expostos a soluções de diferentes concentrações de analito por 30 min. e, após, medidas de impedância no potencial formal eram realizadas.

Após, as superfícies foram incubadas em alíquotas de 40 µL de PBS pH 7,4 ou soro humano comercial sem diluição (*neat serum*) sem a proteína NS1 (resposta inespecífica). Os espectros de impedância foram registrados após 30 min de incubação, seguido pelo procedimento de lavagem em solução de PBS antes da

análise eletroquímica; este procedimento foi repetido três vezes. Posteriormente, as superfícies para EIE e ECE foram testadas para detecção de diferentes concentrações da proteína alvo (NS1) diluída em PBS pH 7,4 e soro puro (alíquotas de 40 µL). A faixa linear para os métodos ECE, foi realizada usando concentrações de proteína (em PBS e soro sem diluição) variando de 5 ng mL⁻¹ a 1,000 ng mL⁻¹. Para o método impedimétrico (EIE) a faixa linear variou de 10 ng mL⁻¹ a 2,000 ng mL⁻¹ respectivamente. Um intervalo de confiança de 95% foi adotado e a curva analítica foi construída usando a relação entre o percentual de resposta (RR%) e o logaritmo da concentração-alvo, em toda a faixa de concentração, calculado como $RR_{[NS1]} \% = 100 * (R_{[NS1]} - R_{branco}) / R_{branco}$, em que $R = 1/C_r$ para medidas capacitivas e $R = R_{ct}$ para medidas impedimétricas, R_{branco} é a resposta do branco e R_{NS1} é essa resposta após a incubação com o alvo. A caracterização eletroquímica em ECE foi registrada em solução de 20 mmol L⁻¹ de TBAClO₄ sem qualquer sonda redox adicionada na amostra biológica. Para o EIE, as medidas eletroquímicas foram realizadas em solução de 1 mmol L⁻¹ de par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} dissolvido em PBS pH 7,4. Para todos os métodos, foi realizado CV para identificar o potencial formal a uma taxa de 100 mV s⁻¹ entre -0,2 V e 0,7 V e entre 0,0 V e 0,7 V em relação a Ag|AgCl, para abordagens impedimétricas e capacitivas, respectivamente.

Os limites de detecção (LoDs) correspondentes foram calculados de acordo com Long e Winefordner (1983), isto é, $LoD = [(3,3 \times SD) - a] / b$, onde SD é o desvio padrão obtido por $RR\%$, a é o coeficiente linear e b é o coeficiente angular (considerando $RR\%$ vs logaritmo da concentração). Além disso, a fetuína, que é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado e secretada na corrente sanguínea (NIE, 1992; TRIFFITT *et al.*, 1976) foi usada como controle da especificidade da interface anti-NS1 na concentração máxima de NS1 testada, conforme descrito acima.

Os resultados foram utilizados para avaliar a constante de afinidade (K_a) entre NS1/anti-NS1 e a similaridade das respostas foi estimada aplicando-se o teste t para ambas as abordagens espectroscopia de capacitância eletroquímica (ECS) ou por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), conforme descrito na literatura (SANTOS; BUENO, 2016).

4.9.3 Cálculo da constante de afinidade utilizando o modelo da Isoterma de Langmuir

A constante de afinidade de ligação (K_a) pode ser calculada a partir da variação da resposta (ΔR) (PESQUERO *et al.*, 2010) do sinal do transdutor (R_{ct}) para EIE ou capacitivo (C_r) para ECE (FERNANDES *et al.*, 2014). Utilizando o (anti-NS1), sítios livres e (anti-NS1.NS1), sítios ocupados. A dinâmica de equilíbrio entre o anticorpo (anti-NS1) e o complexo anticorpo-antígeno (anti-NS1.NS1) de acordo com os pressupostos da isoterma de Langmuir é descrito pela Eq. (7) (PESQUERO *et al.*, 2010):



A constante de afinidade (K_a) é dada pela Eq. (13):

$$K_a = \frac{[anti-NS1.NS1]}{[anti-NS1][NS1]} \quad (13)$$

Onde [] representa a concentração. Assumindo uma porcentagem de ocupação de cobertura de superfície dada por θ e uma porcentagem de locais disponíveis como $1 - \theta$, Eq. (13) pode ser reescrito como:

$$K_a[NS1] = \frac{\theta}{1-\theta} \quad (14)$$

Resolvendo Eq. (14) para θ , é possível obter a expressão:

$$\theta = \frac{K_a[NS1]}{1+K_a[NS1]} \quad (15)$$

Eq. (15) pode ser linearizado por:

$$\frac{[NS1]}{R} = \frac{[NS1]}{R_m} + \frac{1}{K_a R_m} \quad (16)$$

Pelo anti-NS1 ser ocupado pelo NS1 e formas *anti* – NS1.NS1, de acordo com a Eq. (12), o R_{ct} aumenta pelo impedimento da passagem de carga e número de centros redox ocupados diminui proporcionalmente à medida que os valores de C_r diminuem. Além disso, a Eq. (12) pode ser reescrito em termos de variação do sinal como:

$$\frac{[NS1]}{\Delta R} = \frac{[NS1]}{R_m} + \frac{1}{K_a R_m} \quad (17)$$

onde ΔR é ΔR_{ct} para EIE e $\Delta(1/C_r)$ para ECE.

4.10 SAM peptídica redox para análise capacitiva

Vislumbrando maior sensibilidade e reprodutibilidade nas medidas para detecção da proteína NS1 da dengue, uma superfície receptiva, composta por um peptídeo proposto por (PICCOLI, J. *et al.*, 2018) foi utilizado. A síntese do peptídeo redox foi produzida manualmente em fase sólida usando o protocolo Fmoc em resina rink com 2 x de excesso em relação ao componente amino na resina. O acoplamento da sequência de aminoácidos (Fc-Glu-Ala-Ala-Cys) foi realizado e após, a sequência foi introduzida a sonda redox no N terminal. O produto final foi purificado por HPLC em sistema ouro Beckman usando uma fase inversa semipreparativa. Detalhes adicionais da síntese estão relatados na referência (PICCOLI, J. *et al.*, 2018).

O peptídeo redox foi desenhado e sintetizado, para ser ligado covalentemente a um eletrodo de Au, sendo este, eletrodo convencional da Metrohm, pela cadeia lateral do resíduo de Cys, localizado em uma de suas extremidades, já a outra extremidade, para ligação do anticorpo anti-NS1 através do protocolo EDC/NHS (FISCHER, 2010), no grupo carboxílico livre na estrutura peptídica, sendo a molécula de ferroceno (Fc) usada como sonda para o biossensoriamento. CV foi realizada com taxa de varredura de 100 mV s^{-1} entre -0,2 V a 0,7 V e ECE entre 0,0 V e 0,7 V em relação ao eletrodo de Ag|AgCl respectivamente. Após, o sistema foi bloqueado por um composto chamado superblocTM, sendo este já pronto para uso, no lugar do BSA 0,1% utilizado nos experimentos anteriores.

5 Resultados e discussão

5.1 Avaliação Imunológica

A interação do anticorpo anti-NS1 com o antígeno NS1, ambos comerciais, foi inicialmente avaliada por Imunoblot e posteriormente por ensaio ELISA. O resultado obtido por Imunoblot (figura 18) reagiu fortemente, comprovando a atividade e interação do par comercial antígeno-anticorpo.

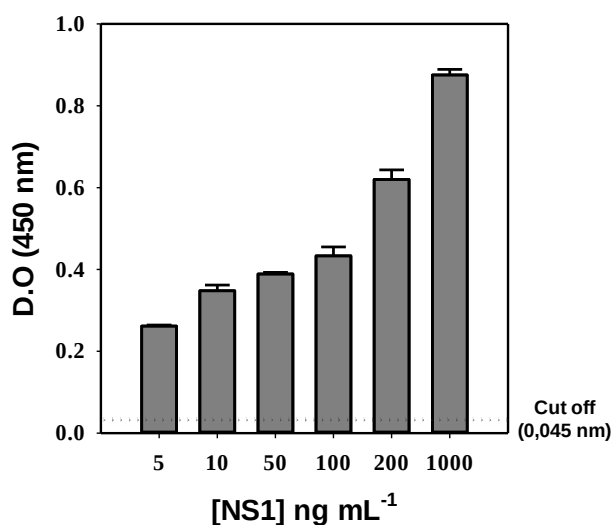
Figura 18. Ensaio por imunoblot para avaliação da interação e atividade entre o par comercial antígeno-anticorpo das proteínas NS1/anti-NS1.



Fonte: Elaborado pela autora.

No ensaio ELISA a figura 19 confirma a atividade do par comercial antígeno-anticorpo para ser usado das medidas posteriores, com uma forte resposta de interação, quando comparada ao branco, realizado utilizando a proteína BSA (Albumina bovina, do inglês, *bovine serum albumin*), que varia com o aumento da concentração do antígeno gerando uma dose resposta. Além disso, o anticorpo é capaz de reconhecer concentrações de antígeno em níveis similares ao obtido por Alcon e colaboradores 2002 (ALCON *et al.*, 2002).

Figura 19. Interação do anticorpo anti-NS1 e o antígeno NS1 por ELISA. Microplacas de poliestileno foram revestidas com antígenos NS1 (5 ng mL^{-1} – 1000 ng mL^{-1}). A leitura procedida a 450 nm.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Avaliação Impedimétrica para construção do biossensor em eletrodos microfabricados

Vislumbrando a construção de um dispositivo sensor portátil, robusto e acessível do ponto de vista econômico, foi proposto a construção de um biossensor em eletrodos microfabricados da Micrux, para comparação com o sistema já padronizado com eletrodos da Metrohm.

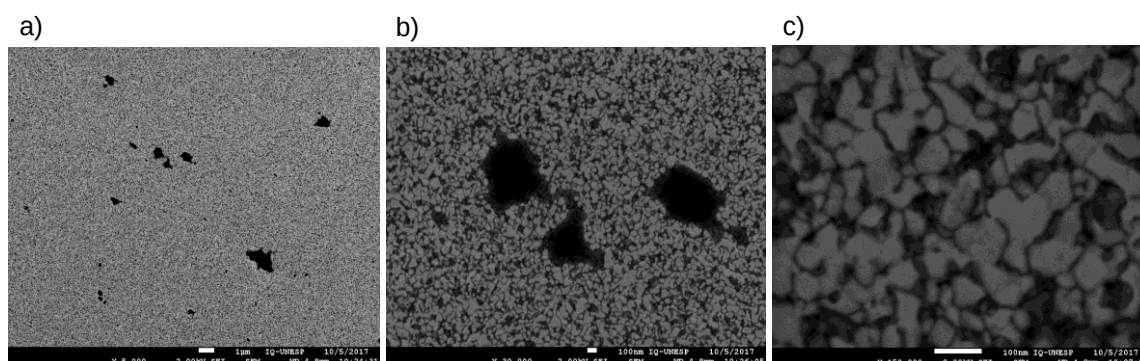
Procedimento de Análise - MicroEI:

- 1° Etapa: MicroEI – 1 → FEG → EDS (sem trat. prévio)
 2° Etapa: MicroEI – 2 → UV/Ozônio + CV → FEG
 3° Etapa: MicroEI – 3 → UV/Ozônio + CV → trat. Térmico → FEG

1ª etapa: Caracterização da superfície do eletrodo microfabricado de Au, por FEG e EDS, sem tratamento prévio:

MicroEI-1 – eletrodo de trabalho

Figura 20. Análise do eletrodo microfabricado de Au da Micrux sem tratamento prévio. (a) 5000 × (b) 10000 × (c) 150000 ×.

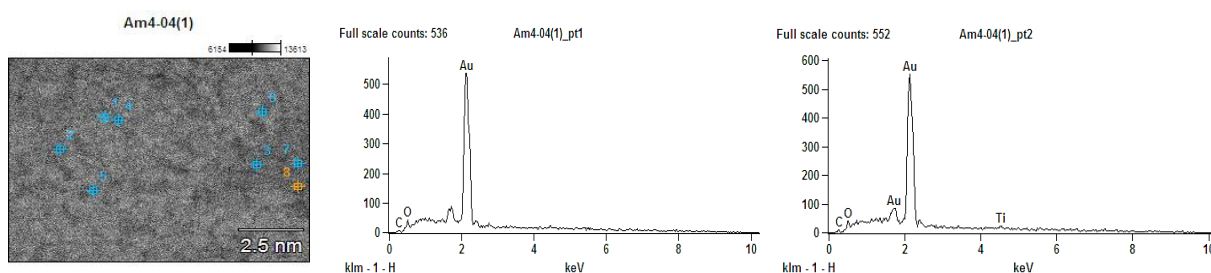


Fonte: Elaborado pela autora.

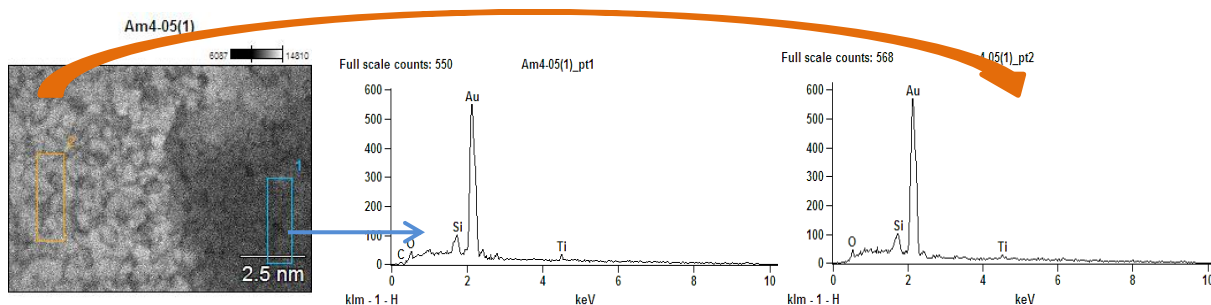
A análise da superfície de todos os eletrodos microfabricados de Au apresentaram gradientes e granulações em toda a sua extensão. Posteriormente, a caracterização da superfície Au foi realizada por EDS.

Figura 21. Imagem do eletrodo microfabricado, MicroEI-1 por FEG e consecutiva análise por EDS.

a)



b)



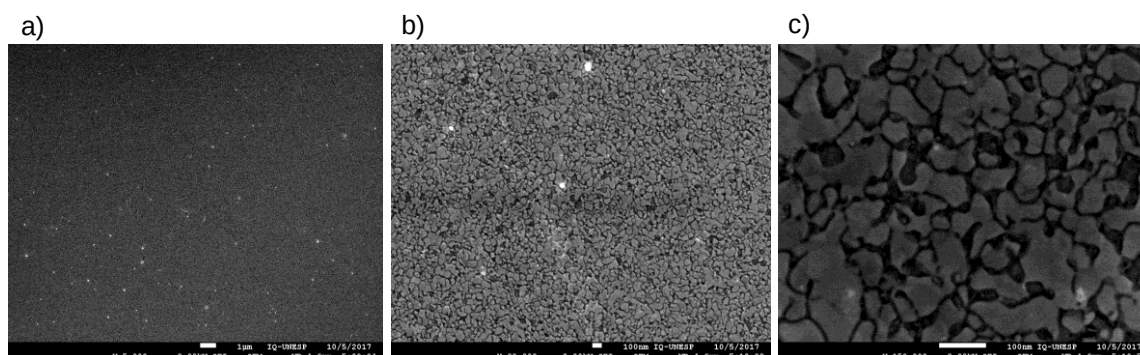
Fonte: Elaborado pela autora.

Através da análise por EDS, pôde-se observar que a composição da superfície de Au, sem qualquer procedimento de limpeza, é composta por traços de silício, titânio, oxigênio e carbono, coerentes ao material utilizado para fabricação dos microeletrodos. A próxima etapa foi o uso do tratamento por UV/Ozônio + CV em H_2SO_4 , que consistiu no uso de ozônio por 30 min para limpeza dos mesmos e após, foi realizada CV em H_2SO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (0,3 V e 1,5 V com velocidade de varrimento de 100 mV s^{-1}), com metodologia descrita por (MALVANO *et al.*, 2016), na qual o mesmo tipo de eletrodo microfabricado foi utilizado, e após, utilização do FEG na superfície de Au.

2ª etapa: Os eletrodos microfabricados foram limpos por tratamento convencional, seguido de caracterização da superfície do Au por FEG.

MicroEI-2

Figura 22. Análise do eletrodo microfabricado de Au da Micrux com limpeza convencional. (a) $5000 \times$ (b) $10000 \times$ (c) $150000 \times$.



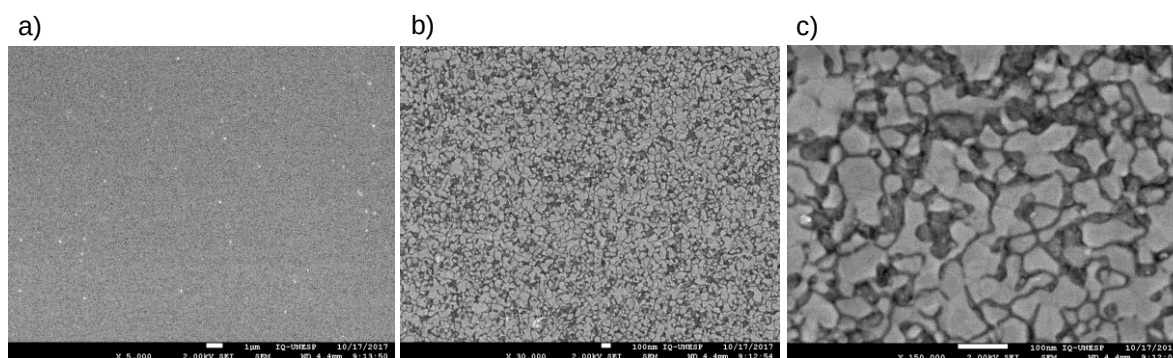
Fonte: Elaborado pela autora.

O MicroEI-2 mostrou respostas semelhantes ao padrão anteriormente visto, sem nenhum pré-tratamento, apenas com uma aparente melhoria na segunda etapa, na qual a superfície apresenta-se com maior homogeneidade.

3ª etapa: Após a etapa de limpeza convencional, os eletrodos microfabricados foram expostos a tratamento térmico em $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min em nitrogênio. Após o tratamento térmico, o eletrodo microfabricado foi exposto ao FEG para visualização dos resultados.

MicroEI-3

Figura 23. Análise do eletrodo microfabricado de Au da Micrux com limpeza convencional + tratamento térmico. (a) 5000 × (b) 10000 × (c) 150000 ×.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após todas as etapas de limpeza (UV/Ozônio + CV em H_2SO_4), tratamento térmico e FEG, não houve mudança significativa na superfície dos eletrodos, mostrando que o tratamento térmico não apresenta vantagem no protocolo de limpeza. Portanto, foi adotada apenas a limpeza convencional (UV/Ozônio + CV em H_2SO_4) como etapa de preparação dos eletrodos para a funcionalização dos mesmos. Todas as etapas (1^a, 2^a e 3^a) foram realizadas em triplicata. A partir destas observações foi possível padronizar o procedimento de preparação da superfície do eletrodo microfabricado da Micrux. A próxima atividade envolveu a funcionalização e a avaliação do desempenho do mesmo.

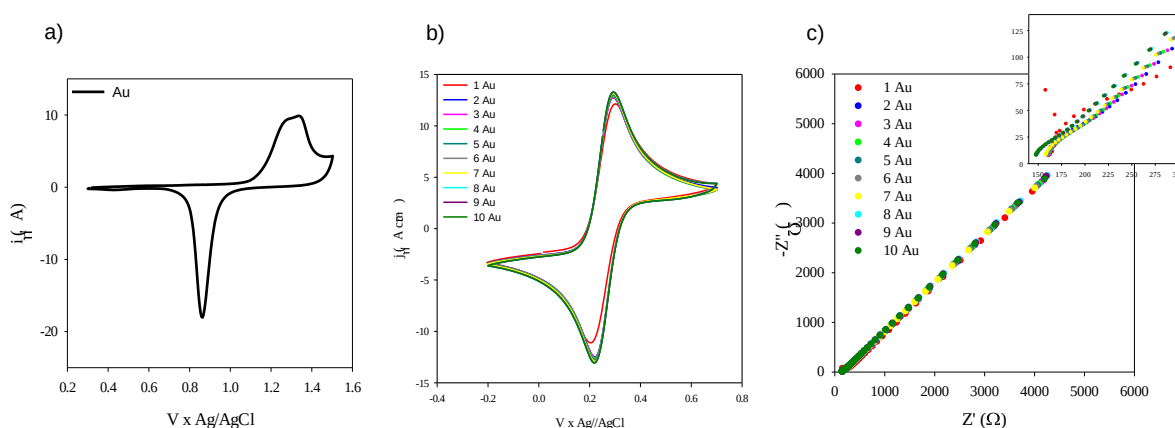
5.2.1 Avaliação da superfície dos eletrodos microfabricados

Por se tratar de eletrodos nunca trabalhados pelo grupo, a avaliação de sua superfície é necessária, primeiramente, testes de estabilidade da superfície do Au foram realizados. Estes foram comparados com o sistema padrão (eletrodos da Metrohm), já utilizados anteriormente pelo grupo, o qual evidencia uma excelente estabilidade de superfície.

Optou-se por iniciar todos os testes em eletrodos microfabricados da Micrux, na abordagem impedimétrica, já bem caracterizada e estudada, para após, utilização

do mesmo na abordagem capacitiva. Abaixo (figura 24), segue o teste de estabilidade da superfície do eletrodo microfabricado da Micrux.

Figura 24. Resposta da superfície do Au do eletrodo microfabricado. a) CV para limpeza eletroquímica. b) CV das medidas da superfície de Au. c) Diagrama de Nyquist para teste impedimétrico com medidas sucessivas para determinar a estabilidade do Au, realizadas na faixa de frequência de 0,01Hz a 100 KHz, usando como espécie eletroativa $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução.

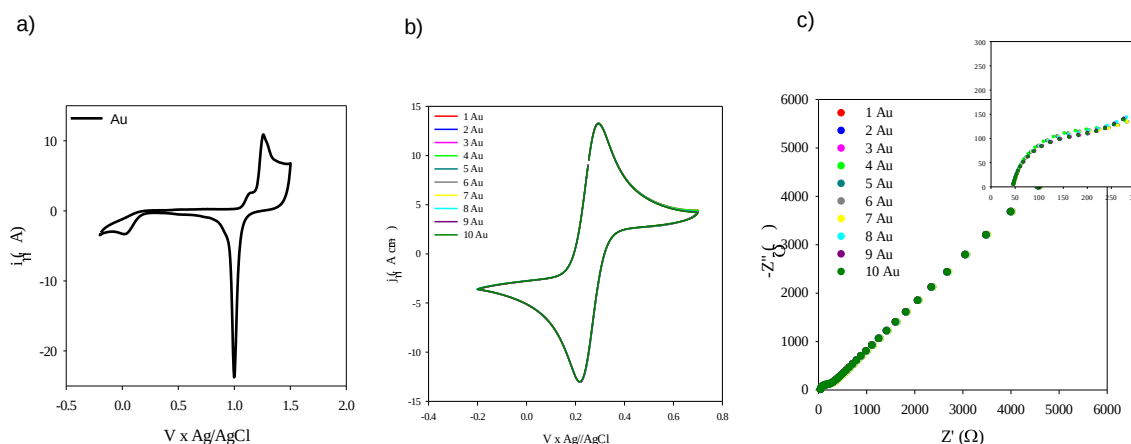


Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados mostrados na figura 24a, b e c, da superfície do eletrodo microfabricado, mostram uma boa estabilidade nas medidas de EIE, mesmo levando em consideração as medidas do 1-Au, 8-Au, 9-Au e 10-Au, com pequena variação, sendo que na medida 1-Au, moléculas podem estar adsorvidas na superfície do Au. Já as três últimas medidas podem ser justificadas pela evaporação da solução eletrolítica, devido ao pequeno volume utilizado ($\sim 500 \mu\text{L}$) na célula eletroquímica para medidas em eletrodos microfabricados, consequentemente afetando a concentração das espécies eletroativas, gerando um aumento na condutividade da solução.

O próximo passo foi a comparação das respostas de estabilidade da superfície do eletrodo microfabricado (figura 24), com o sistema já bem caracterizado em eletrodo da Metrohm (figura 25).

Figura 25. Resposta de superfície do eletrodo de Au da Metrohm. (a) CV para limpeza eletroquímica. (b) CV para medidas da superfície de Au. (c) Diagrama de Nyquist para teste impedimétrico com medidas sucessivas para determinar a estabilidade do Au, realizadas na faixa de frequência de 0,01Hz a 100 KHz, usando como espécie eletroativa $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados indicados pela figura 25a, b e c, evidenciam um comportamento característico da superfície dos eletrodos de Au da Metrohm, com um ótimo padrão de limpeza e estabilidade indicadas nas medidas de CV e EIE.

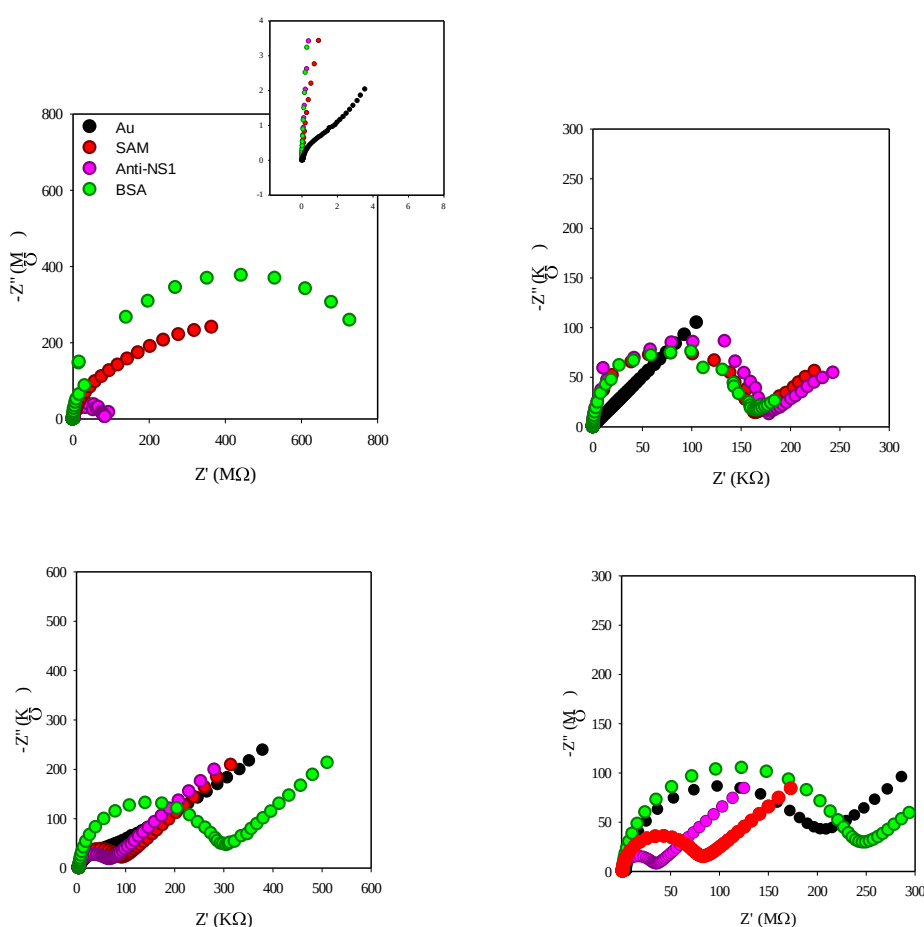
Com a aparente estabilidade da superfície de Au do eletrodo microfabricado, a próxima etapa foi o estudo da estabilidade da monocamada (SAM) no mesmo, pois apenas através da estabilidade da SAM é possível funcionalizar o sensor, para captura da proteína alvo.

5.2.2 Avaliação da estabilidade da monocamada mista de tióis

O eletrodo microfabricado limpo eletroquimicamente (como anteriormente descrito) foi utilizado para construção da monocamada por meio de imersão do mesmo durante 16 h na mesma solução mista de alcanotióis que a utilizada na primeira etapa do trabalho, porém em concentrações distintas, como mencionado na sessão (6.5.2), proporção [1:1], contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 11-MUA + $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 6COH), denominada aqui SUPERFÍCIE-1, para comparação do sistema convencional em eletrodos da Metrohm, porém não houve a formação adequada da monocamada (figura 26a). Pela falta de reprodutibilidade, testou-se a proporção [1:5], contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de MUA, e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 6COH, SUPERFÍCIE-2,

proporção [1:10], contendo 1,0 mmol L⁻¹ de MUA, e 10,0 mmol L⁻¹ de 6COH, SUPERFÍCIE-3 e também a proporção [1:20] contendo 1,0 mmol L⁻¹ de MUA e 20,0 mmol L⁻¹ de 6COH, SUPERFÍCIE-4 (figura 26b, c e d).

Figura 26. Diagrama de Nysquist para funcionalização do eletrodo microfabricado. Construção do biossensor funcionalizado, com faixa de frequência de 0.01Hz a 100 kHz, usando como espécie eletroativa 1 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em solução. A monocamada mista de tióis com diferentes proporções (11-Mua + 6COH) foi funcionalizada com anticorpo anti-NS1 (1,000 ng mL⁻¹) e, em seguida, bloqueada com adição de BSA 0,1%. a) monocamada na proporção [1:1], denominada SUPERFÍCIE-1. b) proporção [1:5], SUPERFÍCIE-2. c) proporção [1:10], SUPERFÍCIE-3 e c) proporção [1:20], SUPERFÍCIE-4.



Fonte: Elaborado pela autora.

A imobilização das monocamadas e demais etapas de incubações no eletrodo microfabricado não apresentaram estabilidade necessária, com respostas de R_{ct} desiguais, independente da proporção da monocamada e demais incubações, possivelmente pelo fato do eletrodo ser composto por uma fina película de Au. Uma possível explicação para este fenômeno seria de que esta poderia estar sendo

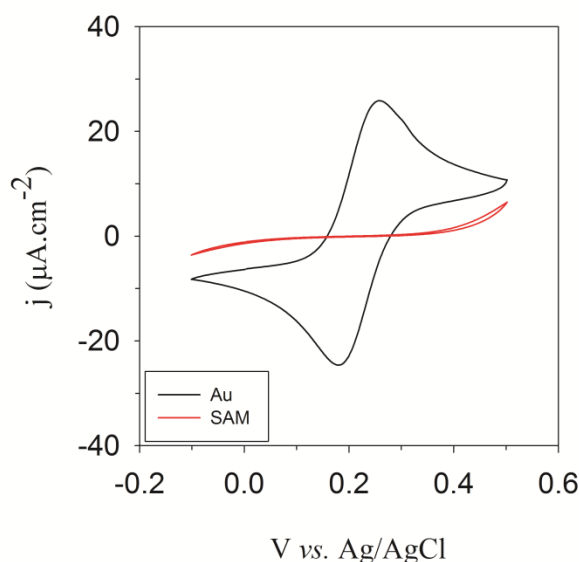
removida devido à utilização do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, pois este pode adsorver e crescer na superfície do eletrodo, e desorver e decompor-se reversivelmente, para formar o complexo ferricianeto e ferrocianeto (HCF) em solução tampão PBS, em função do potencial. Como descrito por Lazar e colaboradores (2016), os sinais de impedância eletroquímica geralmente exibem um desvio não linear nos sistemas de eletrólitos que contêm o par redox de HCF, ao longo das sucessivas medidas eletroquímicas, o que pode mascarar a precisão das análises (LAZAR *et al.*, 2016). Por este motivo, optou-se pela não construção de curvas analíticas utilizando eletrodos microfabricados e a modificação no uso de tampão PB 12mM pH 7,4 no lugar de PBS pH 7,4, quando os biossensores fossem testados em matriz biológica complexas desejando minimizar os possíveis interferentes.

5.3 Avaliação Impedimétrica e Capacitiva das SAMs mistas em eletrodos convencionais

Em uma parte deste trabalho tióis foram escolhidos para confecção das SAMs. Estes 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 tióis: 11-MUA e C_6OH 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 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 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 27. 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. A figura 27 abaixo é representativa de uma monocamada mista, proporção [1:1].

Figura 27. Voltametria cíclica do eletrodo de Au modificado com a monocamada mista de tióis 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 C₆OH, 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.

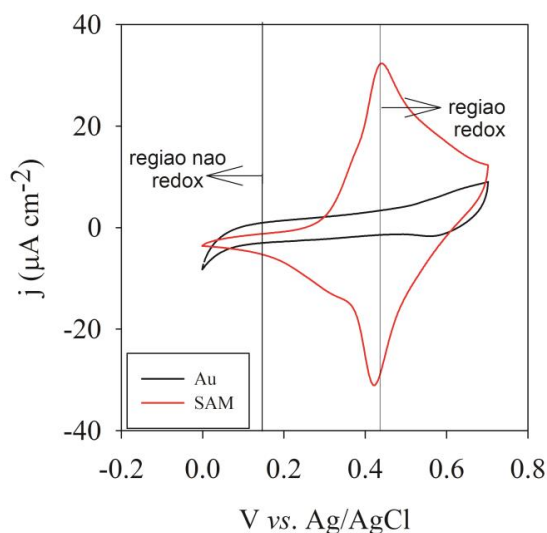


Fonte: Elaborado pela autora.

Para o experimento em ECE a construção de monocamadas mistas foi realizada através de uma mistura na proporção 1:1 composta por 1,0 mmol L⁻¹ de ácido 16-mercaptohexadecanoico (16-MHDA) e 1,0 mmol L⁻¹ de 11-ferrocenilundecanotiol (11Fc). Aqui foi considerado que o sinal do transdutor é derivado de capacitância redox (C_r) de uma sonda faradaica confinada (11Fc) na monocamada acoplada na superfície metálica de um eletrodo (BUENO; FABREGAT-SANTIAGO; DAVIS, 2013). Assim, o comportamento eletroquímico das monocamadas auto-organizadas sobre eletrodo de ouro foi investigado por meio da CV na ausência de espécie eletroativa em solução, ou seja, foi utilizado somente solução TBA.

Na figura 28, observa-se um voltamograma característico, em que no eletrodo limpo, sem moléculas imobilizadas em sua superfície, observa-se um voltamograma com picos de oxidação e redução pequenos curva (—) Au da figura 21. Nesta mesma figura a curva (—) SAM, correspondente a monocamada apresentou picos de redução e oxidação mais intensos quando comparados ao perfil observado em Au, corroborando com (FERNANDES et al., 2013).

Figura 28. Voltamograma cíclico da atividade redox existente na monocamada mista de 11-ferrocenil-undecanotiol + 16-mercaptohexadecanóico no potencial -0,2 a 0,8V com velocidade de varredura 100 mV s⁻¹ medido com eletrodo de referência de Ag|AgCl. Voltamograma realizado em solução TBAClO₄ dissolvido em acetonitrila: H₂O 20:80.



Fonte: Elaborado pela autora.

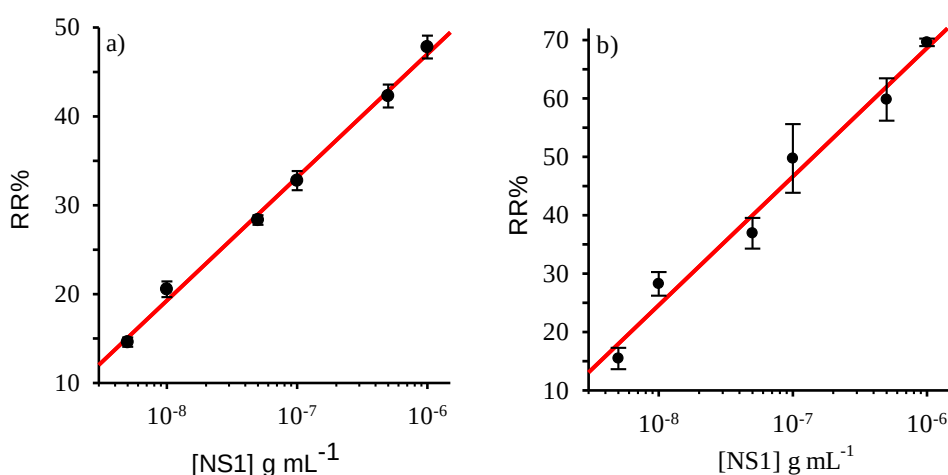
5.3.1 Avaliação Impedimétrica e Capacitiva para detecção da proteína NS1 por eletrodos convencionais

Para a detecção da proteína NS1 usando a abordagem capacitiva redox (figura 29), todo o processo de funcionalização do biossensor foi realizado de forma similar ao ensaio impedimétrico. O biossensor mostrou uma resposta linear para concentrações NS1 entre 5,0 ng mL⁻¹ e 1,000 ng mL⁻¹ em PBS, indicando um bom desempenho analítico ($r^2 \sim 0,99$). O LoD foi $\sim 0,2$ ng mL⁻¹, que é aproximadamente 16 vezes menor do que a abordagem impedimétrica (3,0 ng mL⁻¹).

Quando se utilizou soro sem diluição a abordagem capacitiva mostrou o mesmo intervalo linear obtido em PBS (5,0 ng mL⁻¹ e 1,000 ng mL⁻¹) com bom desempenho analítico, em que o r^2 foi $\sim 0,98$, e LoD foi $\sim 0,5$ ng mL⁻¹ (cerca de 66 vezes inferior do que os resultados obtidos pela abordagem impedimétrica). Os LoDs para proteína NS1 diluída em PBS e soro sem diluição se mostraram similares ou superiores quando comparados a outras metodologias eletroquímicas (ANUSHA *et al.*, 2019; DARWISH *et al.*, 2016; LIM *et al.*, 2018; SINAWANG *et al.*, 2016). Este é um resultado promissor para futuras aplicações clínicas, sendo que pacientes

infectados geralmente apresentam concentrações de 40 – 2,000 ng mL⁻¹ de NS1 na corrente sanguínea (ALCON *et al.*, 2002).

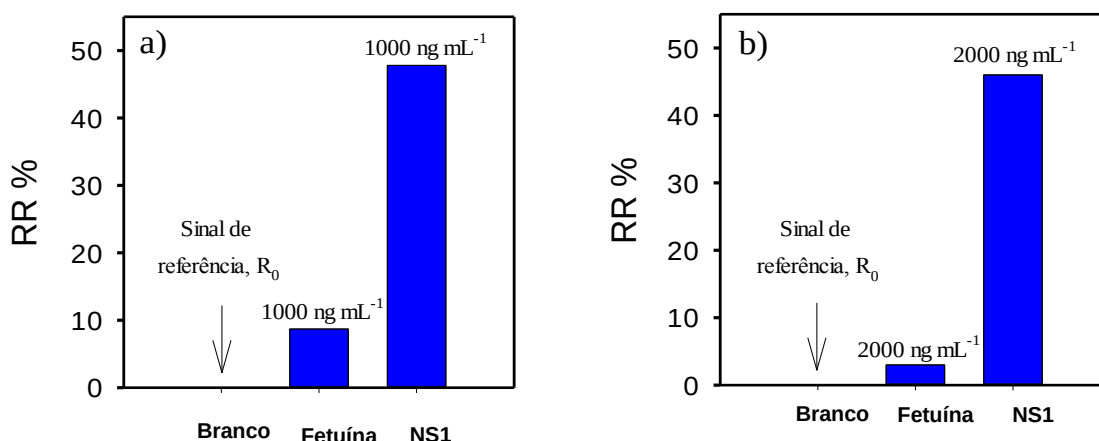
Figura 29. Curva de calibração analítica do imunossensor para proteína NS1, usando (ECE) como transdutor de sinal. Comparação do percentual de variação da parte real da capacitância redox em função da variação da concentração da proteína alvo, relatando o C_r para proteína NS1 diluída em PBS em (a) e em soro comercial sem diluição em (b). O $r^2 \sim 0,98$. As barras de erro indicam o desvio padrão de medições em triplicata. Área do eletrodo de ouro ativa: a) 0,047 cm² e b) 0,048 cm².



Fonte: Elaborado pela autora CECCHETTO *et al.*, 2017.

A fim de testar o controle da especificidade do anticorpo anti-NS1, foi utilizada uma proteína encontrada na corrente sanguínea humana (fetuína) diluída em PBS pH 7,4, em substituição ao antígeno NS1, como controle negativo. A concentração utilizada desta foi 1,000 ng mL⁻¹, correspondente à concentração máxima de NS1, como descrito acima. Como mostrado na figura 30a, a resposta não específica foi inferior a 5% de R_{ct} a partir do bloqueio, por sistema impedimétrico, em contraste à resposta de 43% de R_{ct} a partir do bloqueio para a resposta específica à proteína NS1 em nível clinicamente relevante (ALCON *et al.*, 2002). Para o sistema capacitivo, como mostrado na figura 30b, a resposta não específica foi tipicamente inferior a 8% de variação $\Delta(1/C_r)$, em contraste à resposta de variação $\Delta(1/C_r)$ de 48%, para a resposta específica da proteína NS1.

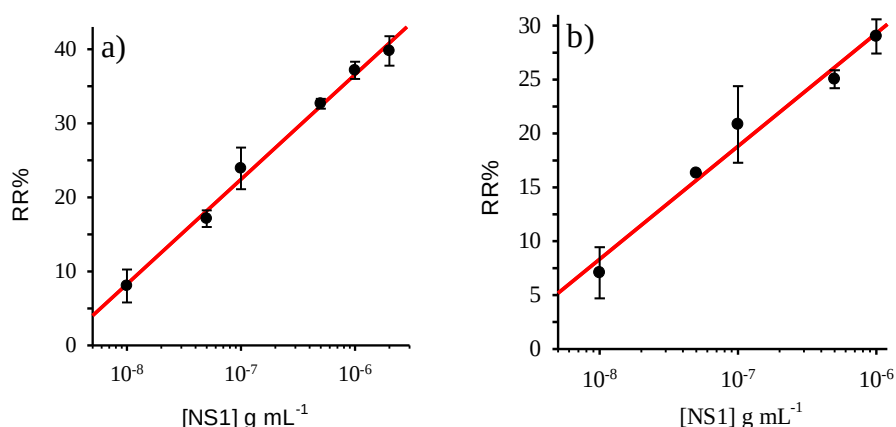
Figura 30. Resposta do biossensor funcionalizado com o anticorpo anti-NS1, na presença da proteína inespecífica (fetuína). a) O inverso da resposta capacitiva $\Delta(1/C_r)$ a partir do bloqueio foi inferior a 8% em contraste com a variação $\Delta(1/C_r)$ de 48% para resposta da proteína NS1. b) Resposta impedimétrica em R_{ct} foi 5% menor a partir do bloqueio, em contraste com uma variação de 43% do R_{ct} para a resposta com a proteína NS1.



Fonte: Elaborado pela autora CECCHETTO et al., 2017.

Na abordagem impedimétrica (figura 31), a detecção da proteína NS1 diluída em PBS pH 7,4, foi realizada com faixa linear de 10,0 ng mL⁻¹ e 2,000 ng mL⁻¹, evidenciando um $r^2 \sim 0,99$, com LoD = 3 ng mL⁻¹. Ao utilizar soro sem diluição, o biossensor mostrou uma resposta linear para concentrações de NS1 entre 10 ng mL⁻¹ e 2,000 ng mL⁻¹, com bom desempenho analítico ($r^2 \sim 0,98$). O LoD foi de aproximadamente 30 ng mL⁻¹ em soro comercial sem diluição. Usando soro sem diluição em vez de PBS o biossensor apresentou LoD superior ao descrito na diluição da proteína NS1 em PBS e o último ponto da curva foi desconsiderado por extrapolar a linearidade, pela saturação do sinal, possivelmente, pela complexa composição do soro, ou efeito de matriz (CECCHETTO et al., 2015). Mas ainda sim, o LoD apresentado foi satisfatório, quando comparado a outras metodologias impedimétricas (CAVALCANTI, I. T. et al., 2012; DARWISH et al., 2016; PIMENTA et al., 2018; SHIN et al., 2016).

Figura 31. Curva de calibração analítica do imunossensor para proteína NS1. Comparação dos valores da porcentagem (%) de variação da resistência de transferência de carga em função das diferentes concentrações do antígeno NS1. Em (a) a curva analítica se refere à proteína NS1 diluída em PBS e em (b) em soro comercial sem diluição. Eletrólito composto por $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução PBS pH 7,4. O r^2 foi 0,99 e as barras de erro indicam o desvio padrão de medições em triplicata. Área do eletrodo de ouro ativa: a) $0,047 \text{ cm}^2$ e b) $0,047 \text{ cm}^2$.



Fonte: Elaborado pela autora CECCHETTO et al., 2015.

O K_a (constante de afinidade) em EIE foi $(2,0 \pm 1,0) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ em PBS e $(3,0 \pm 2,0) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ em soro, apresentando uma semelhança estatística com a obtida pela ECS $(4,0 \pm 2,0) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ em PBS e $(4,0 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ em soro. Os valores comparativos para MODELO-1 (impedimétrico) e MODELO-2 (capacitivo) em PBS e soro não diluído estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros analíticos para a determinação eletroquímica da proteína NS1 em tampão PBS pH 7,4 ou soro sem diluição.

	Abordagem impedimétrica		Abordagem capacitiva	
	PBS (ng mL ⁻¹)	Soro (ng mL ⁻¹)	PBS (ng mL ⁻¹)	Soro (ng mL ⁻¹)
Faixa linear	10,0 – 2000,0	10,0 – 1000,0	5,0 – 1000,0	5,0 – 1000,0
r^2	0,990	0,980	0,996	0,978
L.O.D	3,0	30,0	0,2	0,5
R.S.D*	$9,5 \pm 5,6$	$11,9 \pm 6,3$	$3,14 \pm 0,8$	$7,4 \pm 4,1$
K_a (mol L ⁻¹)	$(2,0 \pm 1,0) 10^7$	$(3,0 \pm 2,0) 10^7$	$(4,0 \pm 2,0) 10^7$	$(4,0 \pm 0,4) 10^7$

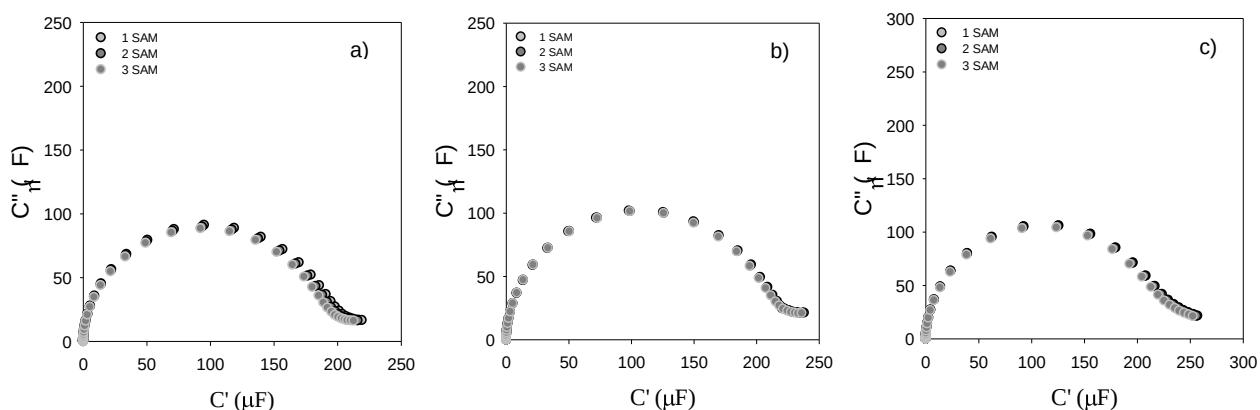
* Média e desvio padrão calculados para todos os pontos na curva analítica

Fonte: Elaborado pela autora CECCHETTO et al., 2017.

5.4 Avaliação da monocamada peptídica redox para detecção da proteína NS1 em tampão PB em eletrodos convencionais.

A próxima etapa do trabalho, envolveu a pesquisa e otimização da uma monocamada peptídica redox, em eletrodos da Metrohm, vislumbrando uma melhor estabilidade e reprodutibilidade para permitir a análise e monitoramento da proteína NS1 do vírus da dengue. Os eletrodos de Au limpos (mecânica e eletroquimicamente polidos) foram incubados com a SAM peptídica. Esta, foi ancorada no eletrodo de Au pela cisteína, os demais aminoácidos ficaram expostos para o reconhecimento do anticorpo anti-NS1. A figura 32a e b mostra a monocamada peptídica (100% [1 mmol L⁻¹]), incubada *overnight* em T.A. Abaixo, seguem os diagramas de Nysquist da resposta de variação das diferentes medidas de estabilidade da SAM peptídica redox, em três eletrodos diferentes que apresentaram variação menor que 1%, mostrando ótima estabilidade.

Figura 32. Diagrama capacitivo de Nyquist, representativo de três eletrodos distintos de Au da Metrohm. Em a), b) e c) sucessivas medições de ECS para monocamada peptídica redox. Área do eletrodo de ouro ativa: a) 0,046 cm⁻², b) 0,048 cm⁻² e c) 0,048 cm⁻².

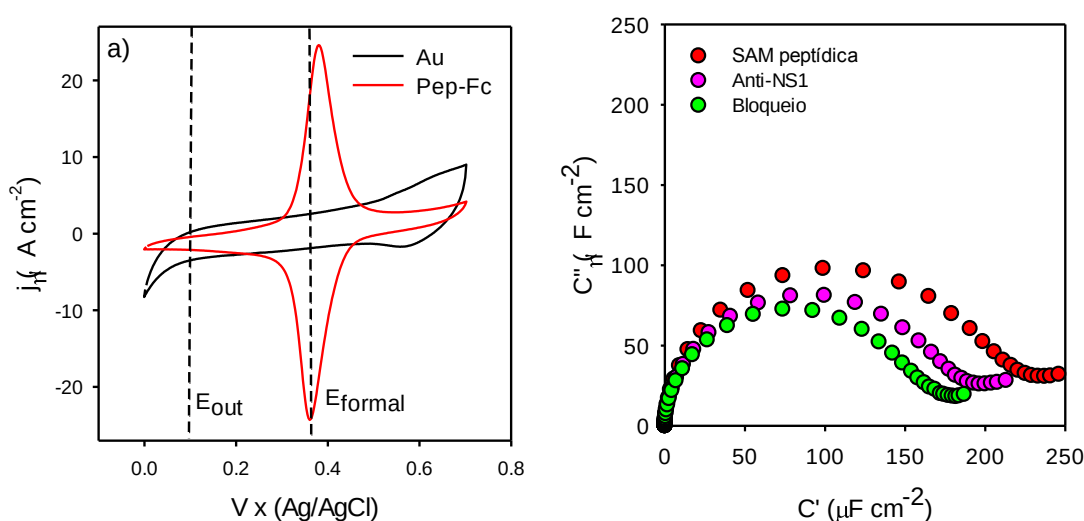


Fonte: Elaborado pela autora.

Em seguida, para funcionalização do biossensor, o eletrodo foi lavado com PB, e as superfícies foram caracterizadas (10 varreduras de CV em -0,2 V para 0,7 V a uma faixa de varredura de 100 mV s⁻¹ (figura 33a) e EIS em uma faixa de frequência de 100 mHz – 100 KHz, dentro do potencial in (i.e., potencial formal $E_{formal} \sim 0,38V$), repetido três vezes (figura 33b) em TBA dissolvido em PB pH 7,4 e

incubadas em anticorpo anti-NS1 ($1,000 \text{ ng mL}^{-1}$). O bloqueio foi procedido com solução superblock já pronto para uso e a figura 33 abaixo é representativa de dez eletrodos medidos em dias diferentes.

Figura 33. Eletrodo de ouro funcionalizado por SAM peptídica redox, anticorpo anti-NS1 e bloqueio com superblock. a) CV do eletrodo de Au modificado com SAM peptídica redox no potencial -0,2 a 0,7 V e faixa de varredura 100 mV s^{-1} . No gráfico, estão indicados os potenciais formal (E_{in}) e fora do potencial (E_{out}). b) Diagrama capacitivo de Nyquist para construção do biossensor funcionalizado, utilizando método ECE. Todas as medidas foram realizadas no E_{in} . Área do eletrodo de ouro ativa: $0,046 \text{ cm}^2$.

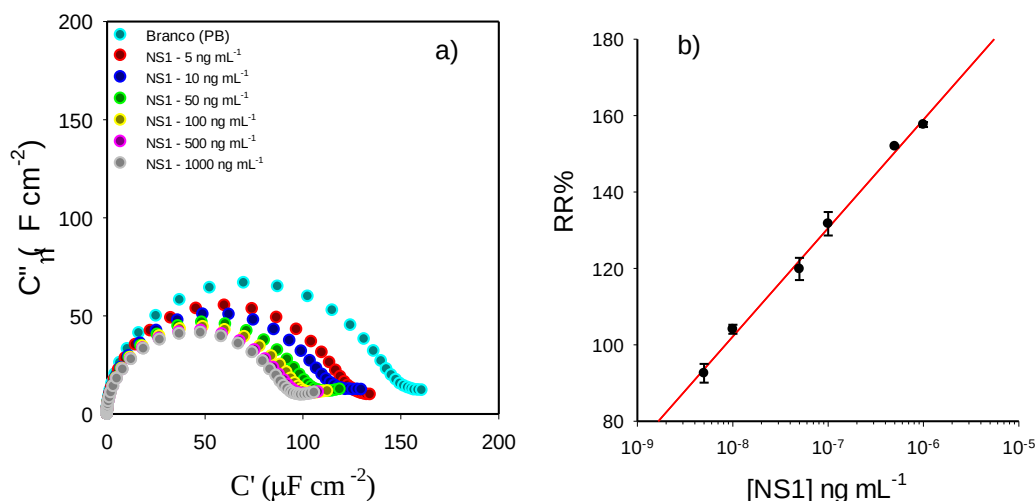


Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.1 Avaliação Capacitiva para detecção da proteína NS1 em tampão PB

Logo após, o eletrodo funcionalizado como descrito anteriormente, foi imobilizado a proteína NS1 diluída em PB 12mM pH7,4 em concentrações crescentes e os valores de C_r foram extraídos para construção da curva analítica (figura 34b), referente a três medidas de um mesmo eletrodo. A resposta relativa RR em função da concentração alvo ($RR (\%) = 100 * (1/C_{r,[NS1]} - 1/C_{r,branco}) / (1/C_{r,branco})$), onde $C_{r,[NS1]}$ é o sinal de capacitância redox para a concentração de NS1 especificada e $C_{r,branco}$ é o sinal do branco. A curva analítica indicou $r^2 \sim 0,992$, $LoD = 0,0012 \text{ ng mL}^{-1}$, aproximadamente 100 vezes mais sensível que o experimento utilizando monocamada mista de alcanotóis, cujo $LoD = 0,2 \text{ ng mL}^{-1}$. Esta resposta mostra que o uso de monocamada peptídica redox é um caminho promissor para análises posteriores, que pode oferecer maior reprodutibilidade entre medidas.

Figura 34. Interação par comercial Antígeno-Anticorpo (NS1-anti-NS1) utilizando método ECE. a) Diagrama de Nyquist para interação do par comercial antígeno-anticorpo (NS1/anti-NS1) utilizando método ECE. (b) Curva analítica do biossensor. 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. Área do eletrodo de ouro ativa: $0,046 \text{ cm}^2$.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.2 Detecção da proteína NS1 em soro comercial diluído

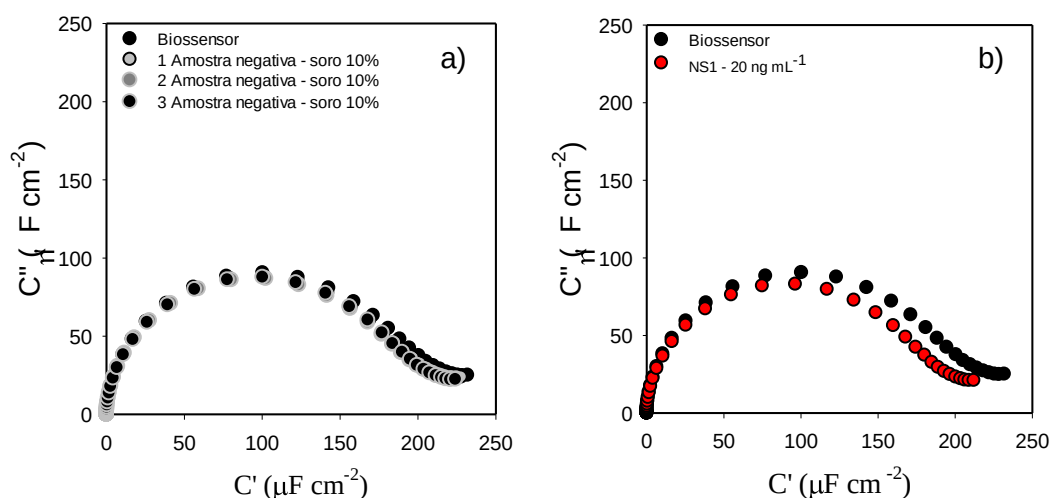
Para o ensaio de NS1, a proteína alvo foi diluída em soro comercial 10% em PB 12 mM pH 7,4. Como o intuito deste teste era a comparação com o sistema em amostras de soro de pacientes infectados ou não com dengue, i.e., a detecção qualitativa, avaliando se o biossensor respondia corretamente, não foi realizado uma curva analítica, e sim, apenas a imobilização de uma concentração de NS1 (no ensaio em soro comercial) clinicamente relevante ($[20 \text{ ng mL}^{-1}]$) (ALCON *et al.*, 2002). Alíquotas de $50 \mu\text{L}$ de solução de NS1 foram usadas com um tempo de incubação de 30 min. A figura 35b mostra o gráfico de Nyquist de capacitância subsequentemente obtido.

As figuras 35a e b são representativas de um eletrodo medido no mesmo dia, utilizando em a) amostras de soro comercial diluído 10% negativa, isto é, sem a proteína NS1, que mostra variação do sensor inferior a 1% e em b) amostra de soro comercial diluído 10% com a proteína NS1 na concentração 20 ng mL^{-1} , com variação superior a 8%.

A diminuição no sinal de capacitância redox (C_r) (diâmetro semicírculo) $\sim 164 \mu\text{F cm}^{-2}$ foi observada com adição da proteína NS1 $[20 \text{ ng mL}^{-1}]$, corroborando com

os dados de FERNANDES et al., 2014; SANTOS et al., 2014. Enquanto que para amostras negativas não houve variação considerável ($\sim 184 \mu\text{F cm}^{-2}$) quando comparado ao sinal do biossensor funcionalizado ($\sim 190 \mu\text{F cm}^{-2}$).

Figura 35. Diagrama capacitivo de Nyquist para construção do biossensor funcionalizado, através da imobilização da SAM peptídica, incubação do anticorpo anti-NS1 e bloqueio com superbloc. a) Resposta de C_r para incubação de soro comercial diluído 10% sem adição da proteína NS1. b) Resposta de C_r com incubação da proteína NS1 em soro comercial 10%. Área do eletrodo de ouro ativa: $0,044 \text{ cm}^2$.

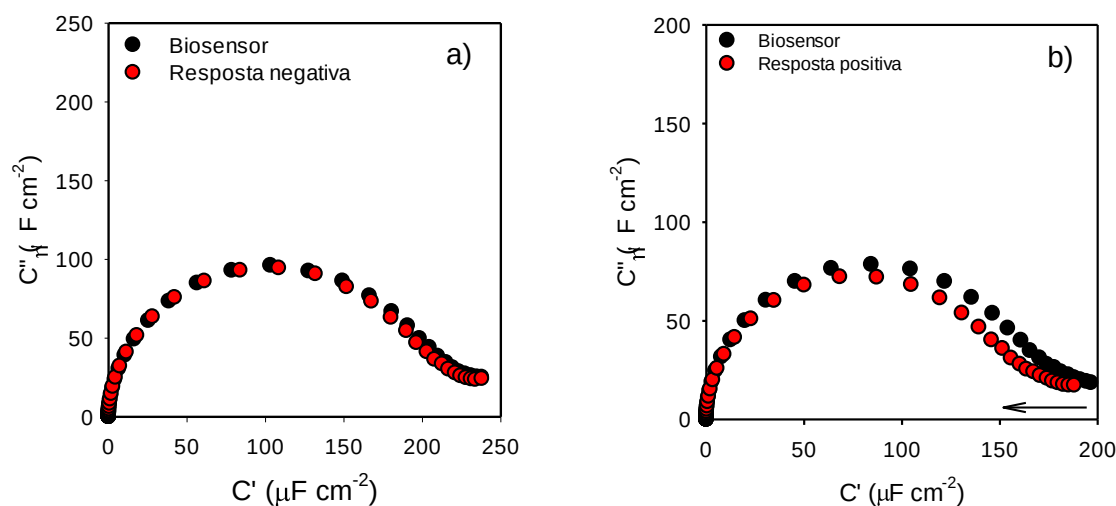


Fonte: Elaborado pela autora.

5.4.3 Detecção da proteína NS1 em soro humano

Sendo comprovado que o sistema funcionava para detecção de amostras negativas (sem a proteína NS1) e positivas (com adição da proteína NS1) em soro comercial, o próximo passo foi a construção do biossensor para avaliação de amostras de pacientes. Estas foram apenas numeradas para preservar a identidade dos voluntários, como regulamento da autorização do Comitê de Ética Humano (CAAE: 59590416.6.0000.5426) aprovado no ano de 2017 em meu nome, para este projeto. A figura 36a é representativa de 12 eletrodos com amostras verdadeiramente negativas do vírus da dengue de pacientes e a figura 36b representativa de 12 eletrodos com amostras verdadeiramente positivas do vírus da dengue de pacientes.

Figura 36. Diagrama capacitivo de Nyquist para construção do biossensor funcionalizado, através da imobilização da SAM peptídica, incubação do anticorpo anti-NS1 e bloqueio com superblock. a) Resposta de C_r para incubação de amostra negativa de paciente diluído 10% em PB 12 mM, pH 7,4. b) Resposta de C_r com incubação de amostra positiva de paciente diluído 10%. Área do eletrodo de ouro ativa: a) $0,046 \text{ cm}^2$ e b) $0,044 \text{ cm}^2$.

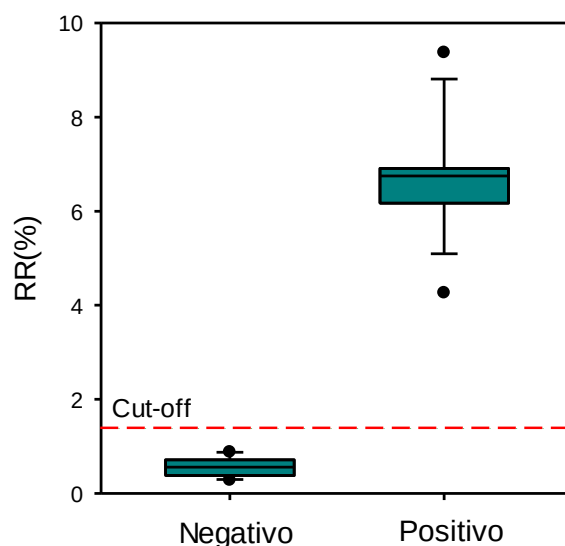


Fonte: Elaborado pela autora.

Como observado nos diagramas de Nysquist, figura 36a e b, pode-se observar que a plataforma de detecção para amostras verdadeiramente negativas de pacientes não apresentou variação de C_r , porém quando utilizada para amostras verdadeiramente positivas, foi observada uma variação de sinal com o decréscimo de C_r , $\sim 162 \mu\text{F cm}^{-2}$, quando comparado ao sinal de C_r do biossensor $\sim 180 \mu\text{F cm}^{-2}$, corroborando com os resultados de (SANTOS; BUENO; DAVIS, 2018), mostrando que este sensor é desejável para análise de amostras humanas.

Além do biossensoriamento com amostras verdadeiramente positivas e negativas, o sistema também foi testado com amostras aleatórias, não rotuladas, i.e, às escuras, sem saber se eram positivas ou negativas, e somente após as medições, as amostras foram reveladas pela aluna de doutorado Bruna, que nos auxiliou em todo trajeto para segurança das análises. No total de 26 amostras utilizadas (negativas, positivas e aleatórias), todas responderam coerentemente em sua titularidade. Abaixo a figura 37, mostra a resposta relativa RR de todos os eletrodos, evidenciando que o sensor é adequado para detecção do vírus da dengue em amostras reais de pacientes.

Figura 37. Resposta relativa em boxplot para comparação da performance de vinte e seis sensores, com amostras de pacientes negativas e positivas com 10% de diluição em PB 12 mM, pH 7,4. Respostas relativas RR% para amostras de pacientes negativas foi inferior ao *Cut-off*, enquanto que para amostras de pacientes positivas variou de ~ 6 a 9%.



Fonte: Elaborado pela autora.

As respostas deste biossensor frente a amostras de pacientes positivas e negativas encontram-se dentro do esperado quando comparadas a outros trabalhos que utilizaram técnicas eletroquímicas de análise (DARWISH, 2016; FIGUEIREDO, A. *et al.*, 2015) e também monocamadas peptídicas (LIM *et al.*, 2018). No qual, evidenciaram respostas relativas RR% para amostras de pacientes negativas inferiores ao *Cut-off*, enquanto que para amostras de pacientes positivas variaram de ~ 6 a 9%, confirmando a confiabilidade de resposta deste biossensor para análises com amostras reais.

6 Conclusões

Nesta tese foi utilizada a técnica de capacitância eletroquímica, sensível a eventos de ligação do tipo receptor-ligante em sua proximidade, e tem sido utilizada com sucesso em eletroanalítica na detecção de biomarcadores de interesse clínico. A capacitância foi utilizada como sinal transdutor na construção de biossensores para detecção e quantificação da proteína NS1 do vírus da dengue em soro comercial diluído e após, em amostras de pacientes verdadeiramente negativas e positivas para o vírus da dengue. O tema desta doença necessita de novas abordagens de detecção uma vez que os métodos convencionais, como o ELISA, necessitam de pessoal treinado e impossibilitam a análise *point-of-care*, além de serem morosos e de custo elevado.

O início deste projeto foi marcado pela otimização de engenharia de superfície através de uma monocamada mista de alcanotóis com grupo redox acoplado, para medidas de capacitância eletroquímica, utilizando eletrodos de ouro da Metrohm, e as mesmas foram utilizadas como receptoras do anticorpo anti-NS1. Seu desempenho foi promissor, mostrando curvas analíticas para detecção capacitiva da proteína NS1 com $LoD = 0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ diluída em PBS e $LoD = 0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ diluída em soro comercial não diluído. Estes resultados renderam um artigo científico publicado em 2017.

Com intuito de miniaturização do sistema, para possibilitar a diminuição de custos, obtenção de um dispositivo mais robusto, do tipo *point-of-care*, o próximo passo foi a construção do biossensor em eletrodos microfabricados da Micrux, primeiramente utilizando a técnica impedimétrica, já bem estabelecida, para estabilização da superfície destes eletrodos com monocamadas mistas de alcanotóis em diversas proporções, com a espécie eletroativa $1 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução. Os eletrodos microfabricados não apresentaram estabilidade eletroquímica, com variações nos valores de R_{ct} em função do tempo, por isso os resultados não foram utilizados para construção de curvas analíticas. Isto pode ter ocorrido em decorrência da fina deposição do Au na superfície dos mesmos, em conjunto com a necessidade de se realizar inúmeras medidas de EIE para o desenvolvimento da análise completa na construção de uma curva analítica,

o que, conseqüentemente, pode danificar ou remover as finas e instáveis películas de Au.

A próxima etapa do projeto foi a volta da utilização dos eletrodos de ouro da Metrohm para uso da técnica de capacitância eletroquímica, com a otimização das monocamadas mistas de alcanotóis por peptídeos redox, que mostraram uma estabilidade de superfície através de curvas analíticas 100 vezes mais sensíveis quando comparadas as monocamadas de alcanotóis, pela mesma técnica de capacitância, em tampão PBS. O sistema apresentou variações no sinal de C_r para proteína NS1 diluída em soro comercial diluído e também em amostras verdadeiramente positivas de pacientes. Já para amostras negativas em soro comercial e amostras verdadeiramente negativas de pacientes, o sistema respondeu de maneira esperada, i.e., não houve variação no sinal de C_r .

Por meio dos resultados obtidos, foi possível observar que o uso de monocamada peptídica redox é devidamente promissor para construção de biossensores para detecção de dengue. Para inferir este biossensor como uma nova ferramenta diagnóstica, um número maior de testes de repetições em amostras de pacientes deverá ser realizado. Porém, para uma tese de doutorado os resultados evidenciam o potencial uso da capacitância eletroquímica para o desenvolvimento de dispositivos biossensores aplicados ao diagnóstico clínico (proteína NS1 da dengue), com a possibilidade de vislumbrar num futuro próximo, a utilização deste biossensor como ferramenta fundamental para combate da doença da dengue, com uma detecção mais rápida, barata, robusta, do tipo *point-of-care*, tendo grande valor de promoção e aplicação entre as instituições de atenção primária à saúde.

Referências

- 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. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 2, p. 376–381, 2002.
- ALLEN, B. L.; KICHAMBARE, P. D.; STAR, A. Carbon nanotube field-effect-transistor-based biosensors. *Adv. Biomater.*, v. 19, n. 11, p. 1439–1451, 2007.
- AMBLARD, M. *et al.* Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.*, v. 33, n. 3, p. 239–254, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1385/MB:33:3:239>>. Acesso em: 9 ago. 2018.
- ANGEL, R. M.; VALLE, J. R. Dengue vaccines : strongly sought but not a reality just yet. *PLoS Pathog.*, v. 9, n. 10, 2013.
- ANUSHA, J. R. *et al.* Electrochemical biosensing of mosquito-borne viral disease, dengue: A review. *Biosens. Bioelectron.*, v. 142, n. June, p. 111511, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566319305901>>. Acesso em: 6 ago. 2019.
- ASSENBERG, R. *et al.* Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein : implications for polyprotein processing and viral replication □. *J. Virol.*, v. 83, n. 24, p. 12895–12906, 2009.
- AZEREDO, E. L. *et al.* Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns with dengue fever. *Immunobiology*, v. 204, n. 4, p. 494–507, 2001.
- BAI, H. A SPR aptasensor for detection of avian influenza virus H5N1. *Sensors*, p. 12506–12518, 2012.
- BARD, A. J. *et al.* *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*. 2nd. ed. ed. New York: 864 p, 2001.
- BEN, H. D. *et al.* Studies on the inhibitive effect of potassium ferrocyanide on the corrosion of steel in phosphoric acid. *Res. Chem. Intermed.*, v. 39, n. 8, p. 3475–3485, 2012.
- BENITES, T. A. *et al.* Efeitos da rugosidade superficial nas propriedades de passivação de monocamadas orgânicas automontadas. *Quim. Nova*, v. 37, n. 9, p. 1533–1537, 2014.
- BHARDWAJ, S. *et al.* Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein. *J. Virol.*, v. 75, n. 8, p. 4002–4007, 2002.
- BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>>. Acesso em: 2 ago. 2018.
- BISORDI, I. *et al.* Evaluation of dengue NS1 antigen detection for diagnosis in public health laboratories, São Paulo State, 2009. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 53, n. 6, p. 315–320, dez. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652011000600003&lng=en&tIng=en>. Acesso em: 9 ago. 2018.
- BRADY, O. J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Neglected Trop. Dis.*, v. 6, n. 8, 2012.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e zika) até a semana epidemiológica 12 de 2019 e levantamento rápido de índices para Aedes aegypti (LIRAA). *Bol. Epidemiol.*, v. 50, n. 13, p. 1–18, 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2019.

BRAULT, N. D. *et al.* Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO₂ via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media. *Biosens. Bioelectron.*, v. 25, n. 10, p. 2276–2282, 2010.

BRONZONI, R. V. M. *et al.* Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 2, p. 696–702, 2005.

BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Elucidating redox-level dispersion and local dielectric effects within electroactive molecular films. *Anal. Chem.*, v. 86, n. 4, p. 1997–2004, 2014a.

BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Measuring quantum capacitance in energetically addressable molecular layers. *Anal. Chem.*, v. 86, p. 1337–1341, 2014b. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac403135b>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

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

BUENO, P. R.; FELICIANO, G. T.; DAVIS, J. J. Capacitance spectroscopy and density functional theory. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 17, n. 14, p. 9375–9382, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4CP06015F>>.

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. *J. Phys. Chem. B*, v. 116, n. 30, p. 8822–8829, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jp303700f>>. Acesso em: 10 maio 2019.

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

CAVALCANTI, I. T. *et al.* A label-free immunosensor based on recordable compact disk chip for early diagnostic of the dengue virus infection. *Biochem. Eng. J.*, v. 67, p. 225–230, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X12001866>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

CAVALCANTI, L. P. DE G. *et al.* Surveillance of deaths caused by arboviruses in Brazil: From dengue to Chikungunya. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 8, p. 583–585, 2017.

CECCHETTO, J. *et al.* An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. *Sens. Actuators, B*, v. 213, p. 150–154, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400515002427>>. Acesso em: 9 ago. 2018.

CECCHETTO, J. *et al.* The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. *Biosens. Bioelectron.*, v. 87, p. 949–956, jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566316308533>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 44, n. 1, p. 649–688, 1990.

CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: Identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology*, v. 177, n. 1, p. 159–174, 1990.

CHEN, S. *et al.* Surface hydration: principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer*, v. 51, n. 23, p. 5283–5293, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2010.08.022>>. Acesso em: 6 ago. 2019.

CHENG, A. K. H.; GE, B.; YU, H. Aptamer-based biosensors for label-free voltammetric detection of lysozyme. *Anal. Chem.*, v. 79, n. 14, p. 5158–5164, 2007.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.*, v. 80, n. 23, p. 11418–11431, 2006. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01257-06>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

COBRA, C. *et al.* Symptoms of dengue fever in relation to host immunologic response and virus serotype, Puerto Rico, 1990-1991. *Am. J. Epidemiol.*, v. 142, n. 11, p. 1204–1211, 1995.

CONTRERAS, J. G. *et al.* Aptamer-based label-free impedimetric biosensor for detection of progesterone. *Anal. Chem.*, v. 87, n. 2, p. 1075–1082, 2015.

COSTA, S. M. *et al.* DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*, v. 358, n. 2, p. 413–423, 2007.

DARWISH, N. T. *An electrochemical immunobiosensor for dengue virus NS1 protein detection*. 2016. University of Malaya Kuala Lumpur, 2016.

DARWISH, N. T. *et al.* Electrochemical immunosensor based on antibody-nanoparticle hybrid for specific detection of the dengue virus NS1 biomarker. *J. Electrochem. Soc.*, v. 163, n. 3, p. B19–B25, 2016. Disponível em: <<http://jes.ecsdl.org/content/163/3/B19.abstract>>. Acesso em: 9 ago. 2018.

DARWISH, N. T.; ALIAS, Y.; KHOR, S. M. Indium tin oxide with zwitterionic interfacial design for biosensing applications in complex matrices. *Appl. Surf. Sci.*, v. 325, n. C, p. 91–99, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.10.167>>. Acesso em: 6 ago. 2019.

DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedancia eletroquímica aplicada ao estudo das áreas heterogeneas em eletrodos dimensionalmente estáveis. *Quim. Nova*, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

DIAS, A. C. M. S. *et al.* A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. *Biosens. Bioelectron.*, v. 44, p. 216–221, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566312008895>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

DUSSART, P. *et al.* Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin. Vaccine Immunol.*, 10.1128/CVI.00229-06, v. 13, n. 11, p. 1185–1189, 2006. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/content/13/11/1185.abstract>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

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. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1322036111>>. Acesso em: 6 abr. 2019.

EHRENKRANZ, N. J. *et al.* Pandemic dengue in Caribbean countries and the Southern United States - past, present and potential problems. *N. Engl. J. Med.*, v. 283, n. 26, p. 1460–1469, 1971.

ESTEBAN, J. M. On the application of the kramers-kronig relations to evaluate the consistency of electrochemical impedance data. *J. Electrochem. Soc.*, v. 138, n. 1, p. 67, 2006.

FERNANDES, F. C. B. *et al.* Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. *Biosens. Bioelectron.*, v. 57, p. 96–102, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.044>>. Acesso em: 9 ago. 2018.

FERNANDES, F. C. B. *et al.* Label free redox capacitive biosensing. *Biosens. Bioelectron.*, v. 50, p. 437–440, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.043>>. Acesso em: 12 out. 2018.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. *et al.* Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host & Microbe*, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

FIGUEIREDO, A. *et al.* Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. *Sci. Rep.*, v. 5, p. 1–5, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep07865>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

FIGUEIREDO, T. L. M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, n. 2, p. 203–210, 2006.

FIGUEIREDO, T. L. M. The brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.*, v. 2, p. 1643–1649, 2000.

FILHO, O. F.; CAPELATO, M. D. Biossensores. *Quim. Nova*, v. 15, n. 1, p. 28–39, 1992. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1992/vol15n1/v15_n1_\(6\).pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1992/vol15n1/v15_n1_(6).pdf)>. Acesso em: 20 nov. 2018.

FISCHER, M. J. E. Amine coupling through EDC/NHS: A practical approach. *Mol. Biomethods Handb.*, v. 3, p. 809–820, 2010.

FORSHEY, B. M. *et al.* Incomplete protection against dengue virus type 2 re-infection in Peru. *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 26848841[pmid]PNTD-D-15-01344[PII]PLoS Negl Trop Dis, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746126/>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

GATTO, E.; VENANZI, M. Self-assembled monolayers formed by helical peptide building blocks: A new tool for bioinspired nanotechnology. *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)*, v. 45, p. 468–480, 27 mar. 2013.
GÓES, M. S. *et al.* A dielectric model of self-assembled monolayer interfaces by capacitive spectroscopy. *Langmuir*, v. 28, n. 25, p. 9689–9699, 2012.

GOMES, A. L. V. *et al.* Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. *PLoS ONE*, v. 5, n. 6, p. 1–7, 2010.

GRAHAM, H. The dengue: a study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med*, p. 209–214, 1903.

GUBLER, D. J. *et al.* Dengue 3 virus transmission in Africa. *AJTMH*, v. 35, n. 6, p. 1280–1284, 1 nov. 1986. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1986.35.1280>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

GUBLER, DUANE J. Dengue / dengue haemorrhagic fever : history and current status. v. 277, p. 3–22, 1998.

GUBLER, DUANE J. The global emergence / resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.*, v. 33, p. 330–342, 2002.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: A continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 8, n. 12supp, p. S7–S16, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2460>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

GUZMÁN, M. G. *et al.* Enhanced severity of secondary dengue-2 infections : death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam. Salud Publica*, v. 11, n. 4, p. 223–227, 2002.

HALSTEAD, S. B. Dengue. *Lancet*, v. 370, n. 9599, p. 1644–1652, 2007.

HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever - A public health problem and a field for research. *Bull. W. H. O.*, v. 58, n. 1, p. 1–21, 1979.

HALSTEAD, S. B. *et al.* Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 june 2003, Vienna, Austria. *Vaccine*, v. 23, n. 7, p. 849–856, 2005.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: dawn of a new era. *F1000Research*, v. 4, n. 0, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://f1000research.com/articles/4-1353/v1>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A. S. G. E. Hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*, v. 131, n. 5, p. 1102–1103, 1960.

HENAO-DIAZ, A. *et al.* Evaluation of three commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) oral fluid antibody ELISAs using samples of known status. *Res. Vet. Sci.*, v. 125, p. 113–118, 2019.

HERRERO, L. J. *et al.* Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol. Ther.*, v. 137, n. 2, p. 266–282, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.10.007>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

HIDESHIMA, S. *et al.* Attomolar detection of influenza A virus hemagglutinin human H1 and avian H5 using glycan-blotted field effect transistor biosensor. *Anal. Chem.*, v. 85, n. 12, p. 5641–4, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675869>>. Acesso em: 11 maio 2019.

HO, J. A. *et al.* Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical. *Anal. Chem.*, v. 82, n. 14, p. 5944–5950, 2010.

HOOK, F. *et al.* Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance. *Langmuir*, v. 7463, n. 1356, p. 729–734, 1997.

HUBERT, B.; HALSTEAD, S. B. Dengue 1 virus and dengue hemorrhagic fever, French Polynesia, 2001. *Emerging Infect. Dis.*, v. 15, n. 8, p. 1265–1270, 2009.

ISMAIL, F.; ADELOJU, S. B.; MOLINE, A. N. Fabrication of a single layer and bilayer potentiometric biosensors for penicillin by galvanostatic entrapment of penicillinase into polypyrrole films. *Electroanalysis*, v. 26, n. 12, p. 2607–2618, 2014.

IUPAC. The gold book - Compendium of chemical terminology. v. 2.3.1, p. 1670, 2012.

JOHNSON, A. *et al.* Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for C-reactive protein. *Anal. Chem.*, v. 84, n. 15, p. 6553–6560, 2012.

KAMAL, M. *et al.* Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* under changing climate. *PLoS ONE*, v. 13, n. 12, p. 1–21, 2018.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J. Virol.*, v. 71, n. 2, p. 1497–505, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995675>>0A<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC191206>>. Acesso em: 24 jun. 2019.

KINNEY, R. M.; HUANG, C. Y. Development of new vaccines against dengue fever and japanese encephalitis. *Intervirology*, v. 44, p. 176–197, 2001.

KLUNGTHONG, C. *et al.* Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *J. Clin. Microbiol.*, From Duplicate 1 (Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation - Chonticha, K)10.1128/JCM.00305-07From Duplicate 2 (Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation - Chonticha, K)10.1128/JCM.00305-07, v. 45, n. 8, p. 2480–2485, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00305-07>>. Acesso em: 9 ago. 2018.

LABORIA, N. *et al.* Amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen in colon cancer samples based on monolayers of dendritic bipodal scaffolds. *Anal. Chem.*, v. 82, n. 5, p. 1712–1719, 2010.

LAZAR, J. *et al.* Hampering of the stability of gold electrodes by ferri-/ferrocyanide redox couple electrolytes during electrochemical impedance spectroscopy. *Anal. Chem.*, v. 88, n. 1, p. 682–687, 2016.

LEHR, J. *et al.* Label-free capacitive diagnostics: exploiting local redox probe state occupancy. *Anal. Chem.*, v. 86, n. 5, p. 2559–2564, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ac403727h>>.

- LI, J. *et al.* Peptide aptamers with biological and therapeutic applications. *Curr. Med. Chem.*, v. 18, n. 27, p. 4215–4222, 2011.
- 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. *J. Infect. Dis.*, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/343813>>. Acesso em: 9 ago. 2018.
- LIM, J. M. *et al.* An electrochemical peptide sensor for detection of dengue fever biomarker NS1. *Anal. Chim. Acta*, v. 1026, p. 109–116, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.005>>. Acesso em: 24 jul. 2019.
- LIMA, M. R. Q.; NOGUEIRA, R. M. R.; SANTOS, F. B. *Dengue diagnosis: commercially available kits and laboratory support*. 2. ed. Rio de Janeiro: Future Medicine, 2014.
- LINDENBACH, B. D. *et al.* The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J. Virol.*, v. 81, n. 17, p. 8905–8918, 2007.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.*, v. 59, p. 23–61, 1 fev. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352703590029>>. Acesso em: 9 ago. 2018.
- LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 391, n. 5, p. 13, 2008.
- LIU, M. A.; ULMER, J. B. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv. Genet.*, v. 55, n. 05, p. 25–40, 2005.
- LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.*, v. 55, n. 7, p. 712A–724A, 1983.
- LUO, X.; DAVIS, J. J. Electrical biosensors and the label free detection of protein disease biomarkers. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, n. 13, p. 5944–5962, 2013.
- MACDONALD, J. R. Impedance spectroscopy. *Ann. Biomed. Eng.*, v. 20, n. 3, p. 289–305, 1992.
- MACDONALD, N. Immunization update 2005: Stepping forward. *Aust. Paediatr. J.*, v. 10, n. 6, p. 315–316, 2005.
- MACKENZIE, J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic*, v. 6, n. 11, p. 967–977, 2005.
- MALVANO, F. *et al.* A highly sensitive impedimetric label free immunosensor for Ochratoxin measurement in cocoa beans. *Food Chem.*, v. 212, p. 688–694, 2016.
- MAO, Y. *et al.* Development and application of time-resolved surface plasmon resonance spectrometer. *Am. J. Anal. Chem.*, v. 2011, n. September, p. 589–604, 2011.
- MARIA, R.; NOGUEIRA, R.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil epidemiologia molecular dos vírus dengue no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 16, n. 1, p. 205–211, 2000.
- MARSH, B. J. *et al.* Fine-tuning of ferrocene redox potentials towards multiplex DNA detection. *New J. Chem.*, v. 38, n. 11, p. 5260–5263, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4NJ01050G>>. Acesso em: 14 jul. 2019.
- MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, v. 427, n. 6972, p. 313–319, 2004.

- MONTALVILLO, M. *et al.* Charge and dielectric characterization of nanofiltration membranes by impedance spectroscopy. *J. Membr. Sci.*, v. 454, p. 163–173, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2013.12.017>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- MOREIRA, C. S. *et al.* Biosensores: tecnologia e Aplicações. *Universidade Federal da Paraíba*, p. 1–18, 2010. Disponível em: <<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/biotecnologia/biosensores.pdf>>. Acesso em: 9 ago. 2018.
- MORENS, D. M. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 28, n. 7, p. 635–636, 2009.
- MURRELL, S.; WU, S.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol. Adv.*, v. 29, n. 2, p. 239–247, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.008>>. Acesso em: 9 jul. 2019.
- NIE, Z. Fetus: its enigmatic property of growth promotion. *Am. J. Plant. Physiol.*, v. 263, n. 3 Pt 1, p. C551–62, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384344>>. Acesso em: 6 jul. 2019.
- NISHIURA, H.; HALSTEAD, S. B. Natural history of dengue virus (DENV)–1 and DENV-4 Infections: reanalysis of classic studies. *J. Infect. Dis.*, v. 195, n. 7, p. 1007–1013, 2007.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro , Brazil , 1990-1 : co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. p. 163–170, 1993.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue type 2 outbreak in the south of the State of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 37, n. 6, p. 507–510, 1995.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerging Infect. Dis.*, v. 11, n. 9, p. 1376–1381, 2005.
- NOGUEIRA, R. M. R. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 3, p. 255–256, 2011.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res. Virol.*, v. 143, n. C, p. 423–427, 1992.
- Nota técnica: vacina dengue. SBIM.* [S.l: s.n.], 2017. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/nt-conjunta-sbim-sbp-sbi-sbmt-febrasgo-dengvaxia-171219.pdf>>.
- ORGANIZATION, W. H. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.* . Geneva: WHO/HTM/NTD/DEN. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2019.
- OSANAI, C. H. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 25, n. 1, p. 53–54, 1983.
- PAES, M. V. *et al.* Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab. Invest.*, v. 89, n. 10, p. 1140–1151, 2009.
- PARANAVITANE, S. A. *et al.* Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. *BMC Infect. Dis.*, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.
- PARKASH, O.; R., H. S. Diagnosis of dengue infection using conventional and biosensor based techniques. *Viruses*, 26492265[pmid]viruses-07-02877[PII]Viruses, v. 7, n. 10, p. 5410–5427, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632385/>>. Acesso em: 9 ago. 2018.
- PATIL, A. V. *et al.* Immittance electroanalysis in diagnostics. *Anal. Chem.*, v. 87, n. 2, p. 944–950, 2015.

- PEDROSO, M. M. *et al.* Quartz crystal microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. *Microchem. J.*, v. 89, n. 2, p. 153–158, 2008.
- PEELING, R. W. *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Micro*, v. 8, n. 12supp, p. 8, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2459>>.
- PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 11, n. 4, p. 369–377, 2008.
- PESQUERO, N. C. *et al.* Real-time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidase glycoprotein by the electrogravimetric technique. *Biosens. Bioelectron.*, v. 26, n. 1, p. 36–42, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566310002381>>. Acesso em: 12 jul. 2019.
- PICCOLI, J. *et al.* Redox capacitive assaying of C-reactive protein at a peptide supported aptamer interface. *Anal. Chem.*, 2018.
- PICCOLI, J. P. *et al.* The self-assembly of redox active peptides: Synthesis and electrochemical capacitive behavior. *Biopolymers*, v. 106, n. 3, p. 357–367, 2016.
- PIERSON, T. C. *et al.* The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of west nile virus infection. *Cell Host and Microbe*, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2007.
- PIMENTA, T. C. *et al.* Impedimetric immunosensor for dengue diagnosis using graphite screen-printed electrodes coated with poly (4-aminophenylacetic acid). *Biomed. Microdevices*, v. 20, n. 78, p. 1–9, 2018.
- RAMOS, M. M. *et al.* Epidemiological and clinical observations on patients with dengue in Puerto Rico: results from the first year of enhanced surveillance - june 2005 - may 2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, n. 1, p. 123–127, 2008.
- RAY, S.; MEHTA, G.; SRIVASTAVA, S. Label-free detection techniques for protein microarrays: Prospects, merits and challenges. *Proteomics*, v. 10, n. 4, p. 731–748, 2010.
- REDDY, P. J. *et al.* Cancer biomarker detection by surface plasmon resonance biosensors. *Clin Lab Med*, v. 32, n. 1, p. 47–72, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2011.11.002>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- RIGAU-PÉREZ, J. G. *et al.* Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*, v. 352, p. 971–977, 1998.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A. W. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell. Mol. Life Sci. (2010)*, v. 67, p. 2773–2786, 2010.
- RODRIGUEZ-MANZANO, J. *et al.* Improving dengue diagnostics and management through innovative technology. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, v. 20, n. 8, p. 25, 2018.
- RONKAINEN, N. J.; BRIAN, H.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.*, v. 39, p. 1747–1763, 2010.
- SABERI, F. *et al.* Development of surface plasmon resonance-based immunosensor for detection of *Brucella melitensis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 27, n. 11, p. 1960–1965, 2016.
- SABIN, A. B. Research on dengue during world war II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 1, p. 30–50, 1952.
- SANTOS, A. Fundamentals and applications of impedimetric and redox capacitive biosensors. *J. Anal. Bioanal. Tech*, v. S7, n. 012, p. 308926, 2014. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/fundamentals-and-applications-of-impedimetric-and-redox-capacitive-biosensors-2155-9872.S7-016.php?aid=28343>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

SANTOS, A. *et al.* Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin-glycoprotein binding affinity. *Biosens. Bioelectron.*, v. 62, p. 102–105, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.034>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

SANTOS, A. *et al.* Redox-tagged peptide for capacitive diagnostic assays. *Biosens. Bioelectron.*, v. 68, p. 281–287, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.059>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

SANTOS, A.; BUENO, P. R. Glycoprotein assay based on the optimized immittance signal of a redox tagged and lectin-based receptive interface. *Biosens. Bioelectron.*, v. 83, p. 368–378, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566316303189>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

SANTOS, A.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. A dual marker label free electrochemical assay for Flavivirus dengue diagnosis. *Biosens. Bioelectron.*, v. 100, p. 519–525, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.014>>. Acesso em: 17 jul. 2018.

SATHYARAJ, G. *et al.* Ferrocene conjugated imidazolephenols as multichannel ditopic chemosensor for biologically active cations and anions. *J. Organomet. Chem.*, v. 716, p. 150–158, 2012.

SAUERBREY, G. Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung. *Physik*, v. 155, n. 2, p. 206–222, 1959.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue virus at Rio de janeiro - 1986. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 2, p. 245–246, 1986.

SHIN, K. *et al.* Biosensors and bioelectronics sensitivity enhancement of bead-based electrochemical impedance spectroscopy (BEIS) biosensor by electric field-focusing in microwells. *Biosens. Bioelectron.*, v. 85, p. 16–24, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.086>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

SHUM, D. *et al.* High-content assay to identify inhibitors of dengue virus infection. *Assay Drug. Dev. Technol.*, v. 8, n. 5, p. 553–570, 2010.

SILVA, F. G. *et al.* Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue – São Paulo. *Bepa*, v. 8, n. 91, p. 14–26, 2011.

SILVA, M. M. S. *et al.* A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. *Talanta*, v. 128, p. 505–510, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014004652>>. Acesso em: 2 ago. 2018.

SIMMONS, C. P. *et al.* Dengue. *N. Engl. J. Med.*, v. 60, n. 4, p. 516–522, 2012.

SINAWANG, P. D. D. *et al.* Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. *Biosens. Bioelectron.*, v. 77, p. 400–408, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566315304449>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

SMITH, G. W.; WRIGHT, P. J. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and Aedes albopictus cells. *J. Gen. Virol.*, v. 66, n. 3, p. 559–571, 1985.

SPEIGHT, R. E.; COOPER, M. A. A Survey of the 2010 quartz crystal microbalance literature. *J. Mol. Recognit.*, v. 25, n. 9, p. 451–473, 2012.

SU, C. C. *et al.* Development of immunochips for the detection of dengue viral antigens. *Anal. Chim. Acta*, v. 479, n. 2, p. 117–123, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267002015295>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

- SU, X.; FOOK, T.; FY, S. Design and application of piezoelectric quartz crystal-based immunoassay. *Anal. Sci.*, v. 16, n. February, p. 107–114, 2000. Disponível em: <<http://japanlinkcenter.org/JST.JSTAGE/analsci/16.107?from=Google%5Cnhttp://www.jsac.or.jp/analsci/fulltext.php/16/2/107/>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- SUBEDI, D.; TAYLOR, R.; ANDREW, W. Laboratory diagnosis of dengue infection : Current techniques and future strategies. *O.J.C.D.*, v. 4, p. 63–70, 2014.
- TAI, D. F. *et al.* Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. *Clin. Chem.*, 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) disulfide-modified gold electrode. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, n. 1032, p. 1032–1033, 1982.
- TEEPARUKSAPUN, K. *et al.* Disposable electrodes for capacitive immunosensor. *Electroanalysis*, v. 21, n. 9, p. 1066–1074, 2009.
- TEIXEIRA, M. G. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences. *Cad. Saúde Pública*, v. 21, n. 5, p. 1307–1315, 2005.
- TEMPORÃO, J. G. *et al.* Dengue virus Roraima State , Brazil. *Emerging Infect. Dis.*, v. 17, n. 5, p. 938–940, 2011.
- TKAC, J.; DAVIS, J. J. Engineering the bioelectronic interface. *Mater. Today*, v. 12, n. 6, p. 46, 2009.
- TOMIZAKI, K. Y.; USUI, K.; MIHARA, H. Protein-protein interactions and selection: Array-based techniques for screening disease-associated biomarkers in predictive/early diagnosis. *FEBS J.*, v. 277, n. 9, p. 1996–2005, 2010.
- TOMLINSON, S.; MALMSTROM, R.; WATOWICH, S. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Inf. Dis.- Drug. Targ.*, v. 9, n. 3, p. 327–343, 2012.
- TRAKAS, N.; TZARTOS, S. J. Immunoostick ELISA for rapid and easy diagnosis of Myasthenia gravis. *J. Immunol. Methods*, p. 1–27, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.06.016>>. Acesso em: 11 jul. 2019.
- TRASATTI, S.; PETRI, O. A. Real surface area measurements in electrochemical. *Pure & Appl. Chem.*, v. 63, n. 5, p. 711–734, 1991.
- TRIFFITT, J. T. *et al.* Origin of plasma α 2HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature*, v. 262, n. 5565, p. 226–227, 1976.
- ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.*, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, 1996.
- VAZQUEZ, S. *et al.* Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 68, n. 1, p. 46–49, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073288931000129X>>. Acesso em: 9 ago. 2018.
- VENTURA, A. K. Endemic dengue virus infection in Hispaniola. I. Haiti. *J. Infect. Dis.*, v. 134, n. 5, p. 436–441, 1976.
- WESTAWAY, E. G.; MACKENZIE, J. M.; KHRAMYKH, A. A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *Adv. Virus Res.*, v. 59, p. 99–140, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva: WHO, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global strategy for dengue prevention and control: 2012-2020*. Geneva: WHO, 2016a. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Global+strategy+for+dengue+prevention+and+control#8>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Weekly Epidemiological Report*. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf?ua=1>>. Acesso em: 20 jul. 2019b.
XU, M.; LUO, X.; DAVIS, J. J. The label free picomolar detection of insulin in blood serum. *Biosens. Bioelectron.*, v. 39, n. 1, p. 21–25, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.014>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

YAKOVLEVA, M. E.; SAFINA, G. R.; DANIELSSON, B. A study of glycoprotein-lectin interactions using quartz crystal microbalance. *Anal. Chim. Acta*, v. 668, n. 1, p. 80–85, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.004>>.

ZHAO, J. *et al. Biosensors: fundamentals and applications*. 1 ed. ed. United States: Oxford University Press, New York, 1987. v. 201.

ZHAO, JING *et al.* Localized surface plasmon resonance biosensors. *Nanomedicine*, v. 1, n. 2, p. 219–228, 2006.



The capacitive sensing of NS1 *Flavivirus* biomarker



Juliana Cecchetto, Flávio C.B. Fernandes, Rute Lopes, Paulo R. Bueno*

Institute of Chemistry, Univ. Estadual Paulista (UNESP, São Paulo State University), Nanobionics group (www.nanobionics.pro.br) CP 355, CEP 14800-900, Araraquara, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Electrochemical capacitance spectroscopy
Electrochemical impedance spectroscopy
Flavivirus
Dengue
NS1

ABSTRACT

NS1 is a biomarker for different *Flavivirus* diseases such as dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) and was herein selectively quantified by electrochemical capacitive sensing (an impedance-derived capacitance methodology wherein the redox probe is contained in the receptive layer) mainly aiming dengue diagnosis in phosphate buffer saline and blood serum environments (up to the neat level). The capacitive sensing was compared to traditional concurrent impedimetric approach (in which the redox probe is added in the biological solution) and other transient methods stated in the literature regarding figures of merit such as limit of detection, linear range, relative standard deviation and affinity constant. Capacitive and impedimetric assays showed equivalent results for linear range, repeatability, sensitivity and constant of affinity. Nonetheless capacitive assays presented better reproducibility with a relative standard deviation (RSD) of 3 ± 1 and 7 ± 4 (all in percentage) in PBS and serum, respectively, meanwhile for impedimetric assays the RSD values were 9 ± 5 in PBS and 12 ± 6 in serum. Thus, by using capacitive assays, an improvement on the analytical performance was observed with the limit of detection about sixty-fold lower in neat serum ($\sim 0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ for capacitive over $\sim 30 \text{ ng mL}^{-1}$ for impedimetric assays) compared to traditional electrochemistry methods in general hence demonstrating the superior detection sensitivity for NS1 protein. Accordingly, redox tagged capacitive assays are suitable for the development of multiplex point-of-care neglected diseases sensing applications.

1. Introduction

Dengue is a non-contagious infectious disease caused by a virus (DENV), classified under the *Flavivirus* genus, transmitted by the bite of infected *Aedes* genus mosquito, mainly in tropical and subtropical regions (Guzman et al., 2010). There are different serotypes of the virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4), all of them have the ability to produce infections (Bhatt et al., 2013). Climate changes with increasing temperatures in temperate regions of the globe are enhancing the risk of re-emergence of dengue in Europe, in the manner of the outbreak in 2012 in Madeira, Portugal, the first since the 1920s (Liu-Helmerson et al., 2016). Other factors associated with globalization, such as trade and air travel, have caused an impact on the increasing number of dengue cases in the United States as well (Fredericks and Fernandez-Sesma, 2014). In recent decades the global incidence of dengue has grown dramatically, implicating it to be considered the most important arboviral disease (World Health Organization., 2016). According to Bhatt et al. (2013), there should be an increase of 390 million cases of dengue infections per year worldwide, of which 96 million manifest at any level of severity, and that is more than three times the burden estimate of the World Health Organization for the

year of 2009 (Bhatt et al., 2013); a discrepancy that might be explained by asymptomatic or mild cases that may not have been officially notified. In Brazil alone, over a million cases of dengue were registered from January to May of 2015 (Pan American Health Organization., 2015).

Laboratory methodologies for diagnosis of dengue comprise essentially virus isolation, which provides a direct, specific and conclusive response, however it requires high level equipment, technical expertise, it is a lengthy procedure and, in addition, it does not provide a differentiation between first and second infections (Klungthong et al., 2007). Viral nucleic acid detection, which is based on molecular techniques such as real time reverse transcription polymerase chain reaction (rt-PCR) and nucleic acid sequence based amplification (NASBA), provides a rapid identification and diagnosis of DENV serotypes, nevertheless the disadvantages include false positive results due to sample contamination, relatively high cost and also it does not allow to distinguish between first and second infections (Subedi and Taylor-Robinson, 2014). Serological analyses of the antigen/antibody responses, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), are efficient methods that additionally present great sensitivity. Nonetheless, ELISA has disadvantages regarding the difficulty of

* Corresponding author.

E-mail address: prbueno@iq.unesp.br (P.R. Bueno).

interpretation between serotypes since low levels of IgM are sometimes undetectable in secondary infections, and past or recent infections can produce cross-reactivity to different *Flavivirus* antigens (Peeling et al., 2010; Shu and Huang, 2004; Subedi and Taylor-Robinson, 2014).

Diagnosis of diseases can also be achieved by the quantification of specific biomolecules (biomarkers), or else their simple presence might be an indication of some related pathological event (Sadana and Sadana, 2015; Sahab et al., 2007). For instance, the non-structural protein NS1 is encoded by the *Flavivirus* genome, and it is considered a biomarker for several of them (Muller and Young, 2013). NS1 exists in multiple oligomeric forms with molecular weight ranging from 46 to 55 kDa, depending on its glycosylation patterns, that are dependent on the infecting *Flavivirus* and on the host cells they infect and their different cellular locations (Muller and Young, 2013). Indeed, NS1 detection has gained considerable attention for early diagnostic tests of dengue infection, as it is found in abundance in the serum of patients through early stages of the disease (Parkash and Hanim Shueb, 2015) and consequently many works have been proposed to evaluate the levels of NS1 antigen in buffer and in serum samples (Cavalcanti et al., 2012; Dias et al., 2013; Figueiredo et al., 2015; Silva et al., 2014; Su et al., 2003). Although some authors have reported higher levels of NS1 in secondary infections due to increased viremia (Dussart et al., 2006), others describe the detection of this protein due to low pre-existing virus-IgG immune complexes (Peeling et al., 2010). Independently of the contradictions (Vazquez et al., 2010), these works are sustained on low detection limits of NS1, thus seeking for a diagnostic assay able to qualify the dengue infectious phase.

Similarly, according to the Centers for Disease Control and Prevention, zika virus (ZIKV) infection can be diagnosed during the first week of the appearance of the first symptoms, and the usual methods performed up to date are rt-PCR and zika MAC-ELISA, the latter based on the capture of IgM in serum or cerebrospinal fluid specimens (Centers for Disease Control and Prevention, 2016; Lanciotti et al., 2008). The symptoms for DENV, ZIKV and chikungunya (CHIKV) virus infections are very similar; they may include fever, headache, myalgia, conjunctivitis, pruritus, vomiting, diarrhea, anorexia and abdominal pain. Therefore, the clinical analysis isolated may lead to a misdiagnose, and the laboratorial diagnose is paramount to define the course of treatment and for epidemiological purposes (Estofolete et al., 2016).

Cheaper, faster, simpler, more specific and sensitive methods to map the entire picture of dengue or zika epidemic are thus of utmost importance, especially in developing countries as a way to provide an efficient diagnosis of dengue or zika, for prevention and/or to keep the epidemic center under control and containment. In the quest to develop new methodologies, the ones potentially point-of-care (or bedside), miniaturized and highly efficient are crucial. Electroanalytical methods are promising to underpin progress concerning the next generation of biomarker assays toward obtaining increasingly sensitive, multiplexed and portable biosensing configurations (Patil et al., 2014). Electrical assays support an easy integration with standard microfabrication and microfluidic formats, and yield electroanalysis designs with low cost, high throughput, high innate sensitivity and capability for simultaneously quantifying multiple biomarker targets on a chip (Bryan et al., 2013; Chikkaveeraiah et al., 2012, 2011; Luo and Davis, 2013).

Across the board, electroanalytical assays use voltage and current input/output signals. In other words, a current/voltage is applied on a target-receptive electrode (input) and a correspondent voltage/current is measured as the output signal. Voltage input setup (with current output signal) is the most used configuration for biomarker detection, e.g. in voltammetric methods that include linear sweep (Yan et al., 2010), differential pulse (Pournaghi-Azar et al., 2009) square wave (Li et al., 2011), amperometry (Telsnig et al., 2012) etc. In this sense, many existing output techniques combined to different nanostructure of the receptive surfaces have been applied in the development of

methodologies for monitoring NS1 antigen levels. For example, Cavalcanti et al. (Cavalcanti et al., 2012) proposed an electrochemical immunosensor with anti-NS1 monoclonal antibodies immobilized via protein A to detect NS1 protein in serum using differential pulse voltammetry (DPV) as the current output signal technique. The measurements used $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ in solution as signal amplifier and the obtained limit of detection (LoD) was 0.33 ng mL^{-1} (Cavalcanti et al., 2012). Dias and collaborators (Dias et al., 2013) developed an indirect and label-based method for NS1 protein detection using carbon nanotube-screen printed electrodes (CNT-SPE) with amperometric measurements. The amperometric responses were generated by hydrogen peroxide reaction with peroxidase (HRP) conjugated to anti-NS1 with limit of detection with LoD in the order of 12 ng mL^{-1} (Dias et al., 2013). Voltage output techniques, where the open circuit potential (OCP) was used as signal transducer, were also applied to detect NS1 protein by disposable Au electrodes containing immobilized anti-NS1. Although the method is label-free and requires no signal amplifiers it showed a limited LoD of 90 ng mL^{-1} and correlation coefficient (R^2) of 0.96 (Figueiredo et al., 2015). Despite of the advantages of the above mentioned methods, the use of signal amplifiers in the biological sample/solution (Cavalcanti et al., 2012), the use of protein labeled components as well as indirect detection (Dias et al., 2013) or limited sensitivity (Figueiredo et al., 2015) certainly leaves room for improvements.

Therefore, spectroscopic electroanalytical methods are particularly noteworthy because it is uniquely non-destructive, topologically flexible, and sensitive to changes at a receptive interface without requiring any amplification or the labeling of the target or the receptive species (Daniels and Pourmand, 2007; Lin et al., 2013; Ohno et al., 2013; Sahoo et al., 2013; Venkatanarayanan et al., 2013).

Furthermore, electroanalytical spectroscopy can provide an interesting alternative aiming NS1 detection and can be classified as impedimetric (EIS) (Patil et al., 2014) and capacitive (ECS) (Bueno et al., 2012), in which ECS is a relatively different approach compared to EIS regarding the interfacial properties of modified electrodes (Bueno et al., 2012; Fernandes et al., 2014). EIS can still be divided into faradaic (with a redox probe present in the analytical solution) (Bryan et al., 2013; Cecchetto et al., 2015; Patil et al., 2014) and non-faradaic (without any redox probe in solution) (Daniels and Pourmand, 2007; Yang et al., 2004). During electroanalytical spectroscopic measurements (faradaic or non-faradaic), the modified receptive interface of the electrode undergoes a constant DC bias which is perturbed by a relatively small amplitude voltage (normally 5–10 mV peak to peak). When the selective target is recruited by the interface (Bedatty Fernandes et al., 2015; Patil et al., 2014) it causes changes on electrical impedance which is sensitively detected and quantified. In its ubiquitous faradaic form the analytical solution is pre-doped with a large excess of “redox probe” (Fig. 1a) and an associated charge transfer resistance (R_{ct}) is typically obtained by fitting the acquired impedance data (Fig. 1b) to a Randles equivalent circuit model. The R_{ct} is traditionally used as a transducer sensing parameter (Bhavsar et al., 2009; Elshafey et al., 2013; Ionescu et al., 2010; Ramón-Azcón et al., 2008).

The complex capacitance data $[C^*(\omega)]$ derived from complex impedance $[Z^*(\omega)]$, in such EIS faradaic fashion, indicates the existence of dielectric (associated with double layer and other non-faradaic effects) contribution at higher frequencies (Fig. 1c inset), which is better evidenced in the absence of a solution phase redox probe, where normally non-faradaic traditional analyses utilize the modulus of impedance ($|Z|$), double layer capacitance (C_{dl}) or phase (ϕ) as sampling transducer terms (Bart et al., 2005; Chuang et al., 2011; Daniels and Pourmand, 2007; Lin et al., 2010; Qureshi et al., 2010). In an opposite manner to faradaic EIS, ECS approach applies the redox reporter within the biological receptive layer as illustrated in Fig. 1d (e.g. by using mixed self-assembled monolayers containing both ferrocenethiol redox and biological receptor centers) and the measured

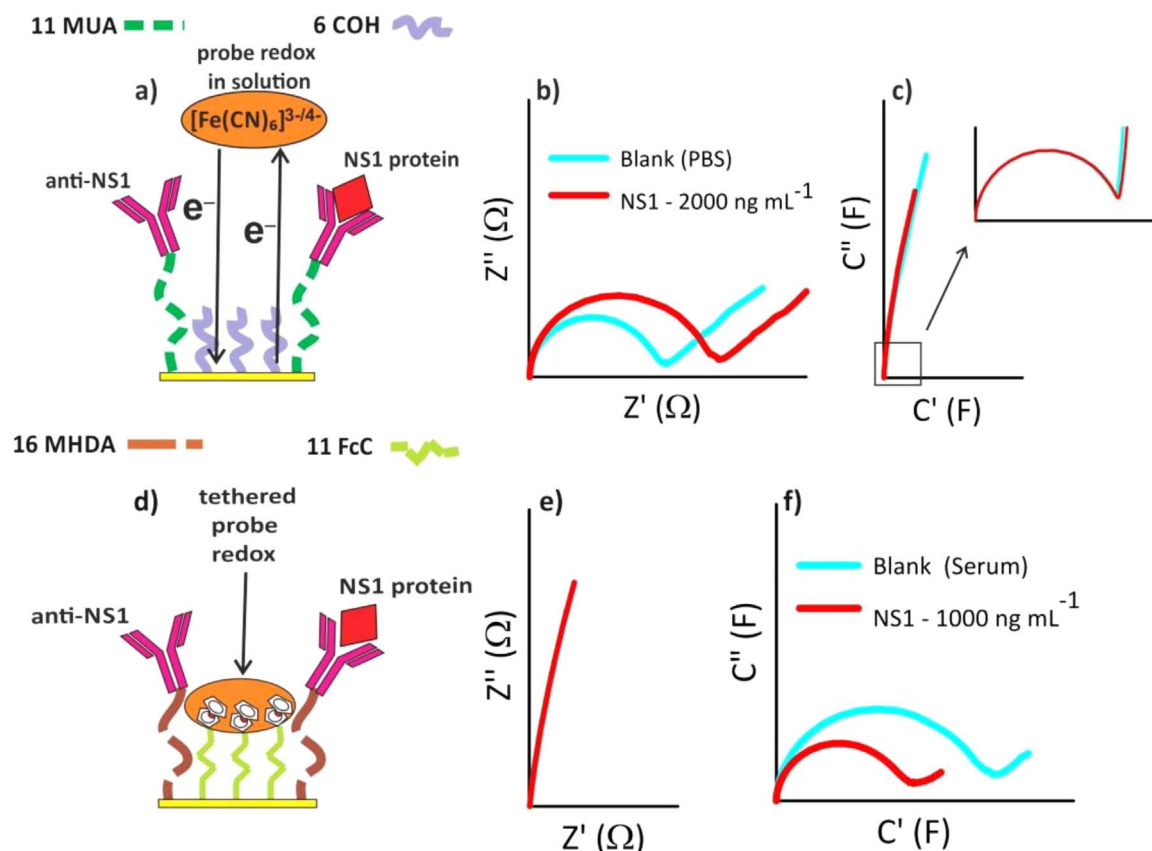


Fig. 1. Comparative representation for (a,b,c) EIS faradaic and (d,e,f) ECS sensorial approaches. In (a) the traditional impedimetric surface engineering of a gold electrode surface by mixed SAM molecular structures in which MUA serves as a receiver backing layer and 6COH as a spacer layer and the transducer signal is based on electron transfer resistance (R_{et}) associated with the redox probe present in solution, exemplified here as $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. (b) Usually R_{et} is obtained by fitting the impedance data to an “equivalent” Randles-like circuit. In (c) the complex capacitance derived from impedance $C^* = [1/j\omega Z^*]$ shows minimal ionic dielectric contribution as evidenced at higher frequency as observed in the inset, where the diagram of the semi-circle, that is the existence of real components of capacitance C' , is the concrete evidence of dielectric ionic contribution. In (d) the engineering of capacitive surface in the gold surface is schematically shown, with mixed thiol SAM molecular structures composed of 16-MHDA as an anchor layer and 11-FcC as electroactive centers (tethered redox probe). The redox probe within the layers provides the redox capacitance signal, C_r , which is obtained from the conversion of $Z^*(\omega)$ data (e) into $C^*(\omega)$. The real (C') and imaginary (C'') components of capacitance are represented in the Nyquist capacitive plot showed in (f).

impedance data $[Z^*(\omega)]$ is converted into complex capacitance by the relationship $C^*(\omega) = 1/[j\omega Z^*(\omega)]$ (Figs. 1e and f, respectively). Additional information is available in regard to redox capacitive signal/term. Thus in redox tagged receptive interfaces a supercapacitance phenomenon is observed associated with the confined redox centers (named as electrochemical or redox capacitance, C_r). The values of C_r depend mostly on the redox density of states concentration associated with the redox molecular coverage. When target binding events occur, there is a perturbation on the electrochemical activity associated with the C_r signal, as illustrated in Fig. 1f, thus enabling sensitive analytical curves to be constructed using C_r as an effective transduction signal (Fernandes et al., 2015, 2013; Lehr et al., 2014; Marques et al., 2015; Santos and Bueno, 2016; Santos et al., 2014, 2015a, 2015b). In other words, capacitive approach has the advantage of not requiring the redox probe pre-doping of the biological samples, making it particularly appealing for point-of-care applications (Patil et al., 2014). Hence the use of ECS in diagnostic assays has been effectively demonstrated within label-free standards and being highly specific to target biomarkers, presenting good reproducibility and high sensitivity (at nano to picomolar ranges) (Fernandes et al., 2015, 2013; Lehr et al., 2014; Marques et al., 2015; Santos and Bueno, 2016; Santos et al., 2014, 2015a, 2015b).

The main focus of the present work is to compare the analytical performance of the impedimetric and capacitive methodologies for the detection of *Flavivirus* NS1 glycoprotein in different environments, such as phosphate buffer saline (PBS) and neat serum. We have used specifically NS1 dengue virus glycoprotein as the biological model. The

appropriate application of capacitive or impedimetric sensing approaches was demonstrated to be dependent on how the redox probe amplifier signal is used concomitantly with the designing of the biological target receptive layers. Electrochemical capacitive assays were based on mixed self-assembled monolayers (SAMs) composed of 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHDA), used for covalent binding of NS1-antibody, and 11-ferrocenyl-undecanethiol (11-FcC), used as electroactive spacer (confined redox probe), whereas non-electroactive mixed SAM composed of 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) functionalized with NS1-antibody (MUA-Ab) and 6-mercapto-1-hexanol (6COH) as spacer was applied in impedimetric assays. Parameters as sensitivity, limit of detection (LoD), relative standard deviation (RSD), repeatability, linear range and affinity constant (K_a) between target and the receptive layer were also calculated and compared amongst the signal transduction methods (capacitive and resistive). It will be further demonstrated that capacitive assays display advantages beyond surface chemistry configurations as those regarding analytical performance, even in neat serum.

1.1. Theoretical concepts and background

EIS and ECS are sustained on the same mathematical principles, i.e. on the measurement of interfacial electrical transfer function that is obtained by the ratio between the oscillatory perturbation of voltage input and current output signals. From the applied modulating potential $[V(t) = \bar{V} + \bar{V}e^{j\omega t}]$ and the resulting sinusoidal current response $[I(t) = \bar{I} + \bar{I}e^{j(\omega t - \phi)}]$ the electrical transfer function known as

complex impedance function $Z^*(\omega)$ is obtained as the quotient of $V(t)$ and $I(t)$ signals. From $Z^*(\omega)$ “interdependent” complex functions are acquired, such as the particular examples of complex capacitance $C^*(\omega)$, complex modulus $M^*(\omega)$ and complex admittance $Y^*(\omega)$ (all these termed as immittance functions) with their phasorial relationships derived without any reference to an assumed equivalent circuit or physical chemistry picture (Fernandes et al., 2015; Patil et al., 2014). The immittance function approach was successfully applied for biosensing using either redox confined (Fernandes et al., 2015) or redox free (Patil et al., 2014) interfacial architectures. Although immittance function spectroscopy is highly general, just the parameters within a clear physical meaning such as R_{ct} and $1/C_r$ will be herein evaluated in order to carry out the comparison of the analytical performance between ECS and traditional EIS approaches, respectively.

When analyzing the corresponding transfer function by ECS, $Z^*(\omega)$ signal (Fig. 1e) is mathematically converted to $C^*(\omega)$ from where the redox capacitive signal, C_r , can be readily obtained by Nyquist or Bode diagram analysis (Bueno et al., 2012) (Fig. 1f). Experimental details of capacitive assay approach are described in the SI document Section S1.

2. Experimental procedures

All reagents described in this work were purchased from Sigma-Aldrich, except the recombinant dengue virus NS1 glycoprotein (ab64456), monoclonal antibody anti-NS1, IgG1 isotype (ab138696) that were purchased from Abcam.

2.1. Surface engineering of impedimetric and capacitive biosensors

Firstly, the electrodes were mechanically and electrochemically polished as described in the SI document Section S2. EIS and ECS spectroscopies are different as analytical approaches. Each needs specific surface architectures according to the use of resistance or capacitance as the transducer signal. Regardless of the operational mechanism, we have constructed NS1 recruiting interfaces. In this work the surface strategically engineered to ECS analysis was named ECS-ES and the surface constructed to EIS analysis was named EIS-ES (see Fig. 1 for illustrative information).

The freshly cleaned Au electrodes were immersed in a mixed solution containing the appropriate thiols in ethanol P.A. for 16 h, for each type of engineered surface. On one hand, EIS-ES was assembled by immersing Au electrode in a solution containing 1.0 mmol L⁻¹ MUA (for covalent anti-NS1 attachment) and 1.0 mmol L⁻¹ 6COH (as a spacer). The experimental details for EIS-ES are described in previous work (Cecchetto et al., 2015). On the other hand, ECS-ES was assembled by immersing Au electrode in a mixed solution of 1.0 mmol L⁻¹ 16-MHDA (for covalent anti-NS1 attachment) and 1.0 mmol L⁻¹ 11-FcC (used as electroactive spacer). It is worth noting that for ECS-ES, the ferrocene group was employed as a confined redox probe (Bueno et al., 2012). In both cases, after SAM formation, the electrodes were washed with alcohol, Milli-Q water (18.2 MΩ at 25 °C; Millipore, Simplicity System, Bedford, MA, USA) and dried under nitrogen gas. Then, the receptive surfaces were activated using the standard EDC/NHS bioconjugation chemistry method (by immersion in a solution of 0.4 mol L⁻¹ EDC and 0.1 mol L⁻¹ NHS for 30 min) prior to the covalent attachment of the antibody. Afterwards, aiming at blocking unspecific sites, the anti-NS1 functionalized electrodes were immersed in BSA 0.1% solution in PBS, pH 7.4, for 1 h at 25 °C. All steps to construct the dengue NS1 recruiting surface were characterized by its respective ECS-ES or EIS-ES analysis as showed in SI document Sections S3 and S4, respectively.

In order to evaluate the stability of the systems, ECS-ES receptive molecular nanostructures were incubated in 40 μL aliquots of PBS (pH 7.4) or neat serum without the target (blank response). The impedance spectra were recorded after 30 min of incubation, followed by washing

procedure in PBS solution before electrochemical analysis; this procedure was repeated ten times over. Subsequently, the prepared ECS-ES and EIS-ES receptive nanostructures were tested for target detection by incubation in 40 μL aliquots of different dilutions of dengue NS1 protein in PBS (pH 7.4) or neat serum. In order to find the linear range for both ECS-ES and EIS-ES methods, the incubation was performed using protein concentrations (in both PBS and neat serum biological samples) ranging from 5 ng mL⁻¹ to 1,000 ng mL⁻¹ and from 10 ng mL⁻¹ to 2,000 ng mL⁻¹ in ECS-ES and EIS-ES measurements, respectively. A 95% confidence interval was adopted and the analytical curve was constructed using the relationship between the relative response percentages (RR%) and the logarithm of the target concentration, across the full concentration range, calculated as $RR_n\% = (R_n - R_0)/R_0 \times 100$, where R_0 is the specific interfacial response for zeroed target concentration (R_0) or the blank response reference and R_n is this response after incubation with target. The results were used to evaluate the affinity constant (K_d) between anti-NS1/NS1 and the similarity of responses was estimated applying t-test for both approaches (ECS-ES and EIS-ES), as described in the literature (Mason et al., 2003; Santos and Bueno, 2016). Electrochemical characterization in ECS-ES was recorded in a supporting electrolyte of 20 mmol L⁻¹ TBAClO₄ (tetrabutylammonium perchlorate) dissolved in acetonitrile and H₂O (20:80) without any redox probe added in the biological sample. For EIS-ES, the electrochemical measurements were conducted with supporting electrolyte containing 1 mmol L⁻¹ of [Fe(CN)₆]^{3-/4-} redox pair dissolved in PBS of pH 7.4. For all the methods, CV was performed to identify the formal potential at a scan rate of 100 mV s⁻¹ between -0.2 V and 0.7 V and between 0.0 V and 0.7 V relative to Ag|AgCl, for impedimetric and capacitive approaches, respectively.

The correspondent LoDs were calculated according to Long and Winefordner (Long and Winefordner, 1983), that is $LoD = [(3.3 \times SD) - a]/b$, where SD is the standard deviation obtained by $RR\%$, a is the linear coefficient, and b is the angular coefficient (considering $RR\%$ vs. logarithm of the concentration). The repeatability was assessed using five inter-day and five intra-day replicate measurements of a 50 ng mL⁻¹ standard solution in neat serum (in five different electrodes). In addition, Fetuin, which is a glycoprotein synthesized by the liver and secreted into the bloodstream, was used as control of the specificity of anti-NS1 interface at the maximum NS1 concentration tested, as described above.

2.2. Electrochemical measurements

An AUTOLAB potentiostat model PGSTAT30 with FRA module controlled by NOVA program was used for all electrochemical measurements. A three electrode setup was employed, consisting of a 2.0 mm diameter gold working electrode from METROHM, a platinum mesh counter electrode and an Ag|AgCl 3 mol L⁻¹ KCl reference electrode. ECS-ES and EIS-ES assays were conducted in a frequency range of 10 mHz to 1 MHz with a RMS amplitude of 3 mV (or 10 mV peak to peak). The formal potential used in capacitance and impedance measurements were ~0.44 V and ~0.22 V, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Stability control

The stability of the redox tagged NS1-receptive interfaces was preliminarily tested as described in Section 2.1 (Surface Engineering of Impedimetric and Capacitive Biosensors). After ten measurements the receptive surface presented variation in percentage of 4 ± 2 and 5 ± 2 for assays in PBS and in neat serum, respectively (see SI document Section S5). The test in serum also provided an important control of interfering substances generally present in the bloodstream. For example, ascorbate is an endogenous electroactive species appearing

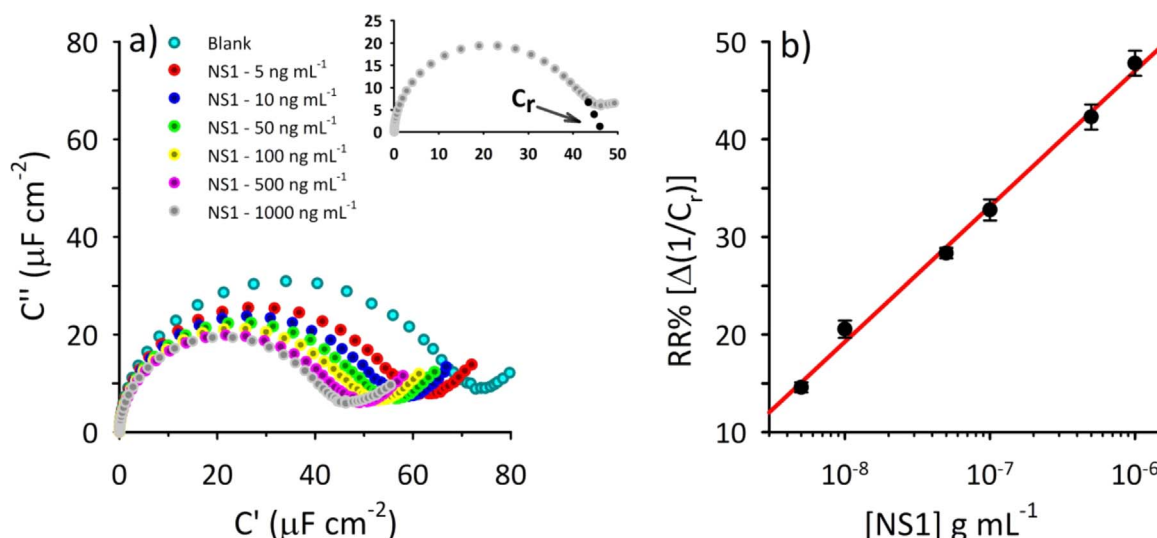


Fig. 2. ECS-ES approach for NS1 protein detection in PBS using the anti-NS1 functionalized electrode. (a) Example of Nyquist capacitive plots (C'' is the imaginary and C' is the real part of capacitance) recorded as a function of different concentrations of NS1 in PBS. C_r was measured by the projection of the semicircle diameter in the axis C' , corresponding to the frequency value where C'' is minimized (at low frequencies) as shown in the inset. (b) Calibration curve using logarithm of different concentrations of NS1 in PBS ($R^2 \sim 0.996$) wherein the RSD showed for each concentration (errors bars) represents three repetitions of the same functionalized electrode. Note that this analytical curve was obtained by plotting $RR\% \Delta[1/C_r] = 100 \times (1/C_r(\text{NS1}) - 1/C_r(\text{blank})) / 1/C_r(\text{blank})$, where $1/C_r(\text{blank})$ is the inverse of the capacitance of the biosensor after exposing its surface to PBS solution without a target. Subsequently the surface was evaluated against different concentrations of NS1 (plotted in logarithm).

in concentrations from 0.3 to 2 mg dL^{-1} (McCORMICK, 1994) that could interfere during ECS measurements. Nonetheless, the stability controls clearly confirm that additional components from serum have no significant effects upon ECS results.

3.2. NS1 protein detection in PBS

The redox tagged NS1-receptive interfaces used in ECS-ES measurements were exposed to increasing concentrations of NS1 in PBS from 5 ng mL^{-1} to 1,000 ng mL^{-1} as shown in Fig. 2. Note that the C_r signal decreases as NS1 concentration increases (Fig. 2a), which is associated with a decrease on the density of the electronic occupation of redox states (Bueno and Davis, 2014; Bueno et al., 2015) in the molecular receptive layer. The inverted value ($1/C_r$) of this transducer parameter is analytically useful as demonstrated in Fig. 2b. Comparing ECS-ES to EIS-ES (details are given in Section 2 and in reference Cecchetto et al., 2015), it can be observed that R_{ct} (transducer parameter of EIS-ES) increases together with the target concentration as showed in Fig. 3a, due to an increase in the steric blockage of the surface caused by NS1 binding, resulting in a suppression of the electron transfer kinetics (Bryan et al., 2013). Analytically EIS-ES responsiveness to NS1 is comparable to ECS-ES in terms of relative percentage response, $RR\%$ (Fig. 3b), whereupon a linear range from 10 ng mL^{-1} to 2,000 ng mL^{-1} was obtained when considering the logarithm of such concentrations. The accuracy of the NS1 biosensors was tested by performing measurements for both EIS-ES and ECS-ES using three different electrodes, each of them was measured three times, statistically providing relative standard deviation (RSD) for the measurement for each NS1 concentration used.

When evaluating the analytical parameters meticulously across the observed linear range for NS1 protein detection by using ECS-ES and EIS-ES approaches, we have found sensitivities of 13.8% and 14.1% decade $^{-1}$, respectively. The LoD values obtained by ECS-ES and EIS-ES were 0.2 and 3.0 ng mL^{-1} respectively. Note that the LoD obtained by ECS-ES is approximately fifteen-fold lower. Additionally, this LoD is better than previously reported (Dias et al., 2013; Figueiredo et al., 2015) and yet similar to the electrochemical lateral flow immunosensor (ELFI) previously described by Sinawang et al. (2016) (0.5 ng mL^{-1}) (Sinawang et al., 2016). The average RSDs (%) were 3 ± 1 using ECS-ES against 9 ± 6 for EIS-ES (error bars in Figs. 2b and 3b) which is

within the acceptable range for biological assays (limit of 20%). Based on the linear regression, coefficients of determination (R^2) of ~ 0.996 and 0.990 were obtained, which means that a directly proportional relationship between signal $\times$ logarithm of the target concentration exists within 99.6% and 99.0% certainty for ECS-ES and EIS-ES subsequently.

The binding affinity constant (K_a) is a useful parameter in order to compare the biocompatibility of different surfaces acting as receptors for specific biomarkers. K_a can be calculated by the quotient of the slope and the linear coefficient obtained from the calibration curve (Fernandes et al., 2014) (from the variation of $1/C_r$ or R_{ct} as signal, as a function of logarithm of the target/biomarker concentration). By applying a statistic test of similarity (t-Student) in which $p = p$ value and $\alpha =$ level of significance, the K_a were found to be similar within an interval of 95% of confidence, ($p = 0.10$, $\alpha = 0.05$). The K_a calculated values were $(4 \pm 2) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$ and $(2 \pm 1) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$, respectively, for ECS-ES and EIS-ES approaches in PBS. Therefore, the biological affinities of anti-NS1/NS1 are equivalent in both assays, so that they are independent of the surface engineering and chemistry applied herein.

In order to evaluate the specificity of the anti-NS1 interface by ECS-ES methodology, a negative control experiment was carried out by testing the interaction with a non-specific protein (Fetuin). As shown in Fig. 4, the nonspecific variation was typically less than 5% of $\Delta(1/C_r)$ at the concentration of 1,000 ng mL^{-1} (a clinically relevant level (Alcon et al., 2002)), in contrast to a response of 43% of $\Delta(1/C_r)$ for the specific NS1 protein. Equivalently, the specificity of anti-NS1 interface by EIS-ES measurements demonstrated a nonspecific response at the concentration of 2,000 ng mL^{-1} (Cecchetto et al., 2015) less than 6%, in contrast to 41% for the NS1 protein response at the same concentration. In summary, the analytical results obtained for dengue NS1 detection in PBS for both ECS-ES and EIS-ES assays exhibited high sensitivity, clinically useful LoDs and linear ranges within very satisfactory selectivity. Considering the robustness presented so far, other assays were compared in serum as the biological target matrix as described in next section.

3.3. NS1 protein detection in serum

When performing dengue NS1 protein detection in serum the

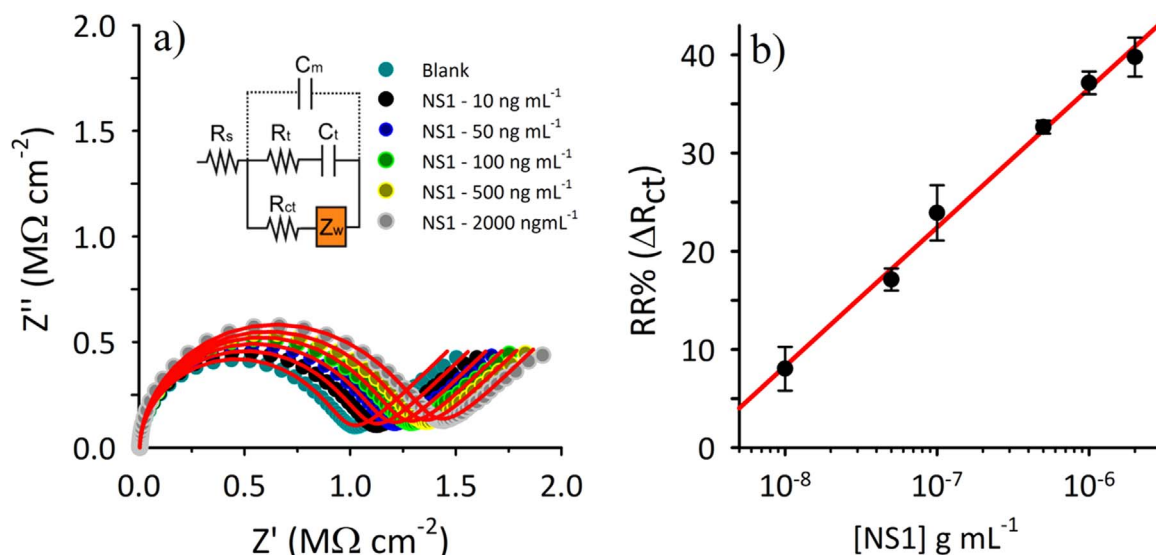


Fig. 3. EIS-ES assay for NS1 protein in PBS. (a) Nyquist impedimetric plots recorded at different concentrations of NS1; the applied potential was $\sim 0.22 \text{ V}$. R_{ct} was calculated by fitting the data to the Randle-like equivalent circuit model as illustrated in the inset in (a). The red lines are the adjusted curves to the equivalent circuit model. (b) Analytical calibration curve ($R^2 \sim 0.990$) using $RR\%$ against logarithm of NS1 at different concentrations with RSD (%) represented by error bars. Results extracted and adapted with permission from Cecchetto et al. (2015).

capacitive assay showed equivalent linear range as that observed in PBS ($5\text{--}1,000 \text{ ng mL}^{-1}$), meanwhile the impedimetric assay demonstrated a decrease from $10\text{--}2,000 \text{ ng mL}^{-1}$ (in PBS) to $10\text{--}1,000 \text{ ng mL}^{-1}$ (in serum). The linear response for ECS-ES exhibited a coefficient of determination (R^2) of ~ 0.98 (Fig. 5a) with a sensitivity of $\sim 22\%$ decade⁻¹, a RSD (%) of 7 ± 4 (Fig. 5a) and a LoD of 0.5 ng mL^{-1} , thus approximately sixty-fold lower than those obtained by EIS-ES and ten-fold lower than an immunosensor based on EIS reported in the literature by others (Darwish et al., 2016). In addition, the repeatability of the NS1 biosensors was assessed using five inter-day and five intra-day replicate measurements of a 50 ng mL^{-1} standard solution in neat serum wherein the coefficients of variation obtained were 7% and 8%, for ECS, while values of 6% and 3% were achieved by EIS. These levels of precision can be considered acceptable for biological assays (Valentin et al., 2011). The obtained K_a was $(4.0 \pm 0.4) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$. Comparatively for EIS-ES assays in serum, R^2 was 0.98 (Fig. 5b) with a sensitivity of 10.4% decade⁻¹, a RSD (%) of 12 ± 6 , LoD of 30 ng mL^{-1} and K_a of $(3 \pm 2) \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}$, the latter (binding

affinity) presenting a statistical similarity to that obtained by ECS-ES (p of 0.4 and α of 0.05). Independently of capacitive or impedimetric assays, the linear ranges and LoDs obtained in serum are promising for clinical applications. In primary infection patients usually present a concentration of NS1 in the bloodstream ranging from 40 to $2,000 \text{ ng mL}^{-1}$ and in a secondary infection between 10 and $2,000 \text{ ng mL}^{-1}$, as described by Alcon et al. (2002). All figures of merit evaluated for capacitive and impedimetric assays in PBS and in serum are summarized in Table 1. It is worth mentioning that capacitive and impedimetric assays had similar performances as evaluated by the proximity of the figures of merit.

In summary, both capacitive and impedimetric assays are suitable for the detection of NS1 to diagnose dengue based on the figures of merit such as linearity, sensitivity, RSD and negative control (selectivity), being mainly similar regarding linearity, sensitivity and affinity. Capacitive approach has the advantage of not requiring the redox probe pre-doping of the biological samples, making it particularly appealing for point-of-care testing (Bedatty Fernandes et al., 2015; Patil et al.,

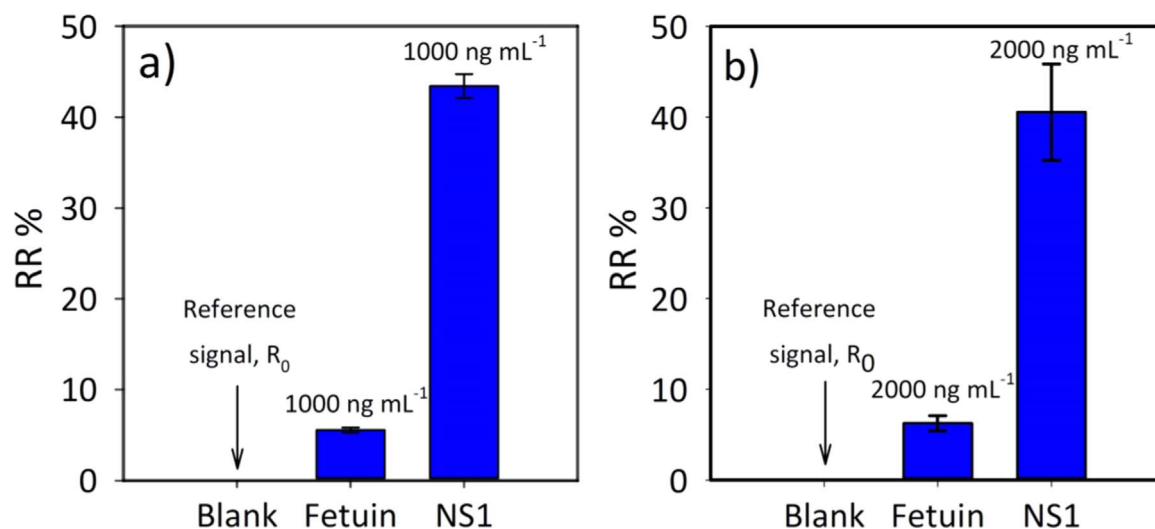


Fig. 4. Response of anti-NS1 interface in the presence of a nonspecific protein (Fetuin). a) Inverse of the capacitive response was typically less than 5% of $\Delta(1/C_r)$, in contrast to a variation of 43% of $\Delta(1/C_r)$ for the specific response. b) Impedimetric response was typically less than 6% of R_{ct} blockage, in contrast to a variation of 41% of R_{ct} blockage for the specific response.

Figure (b) reproduced with permission from Cecchetto et al. (2015).

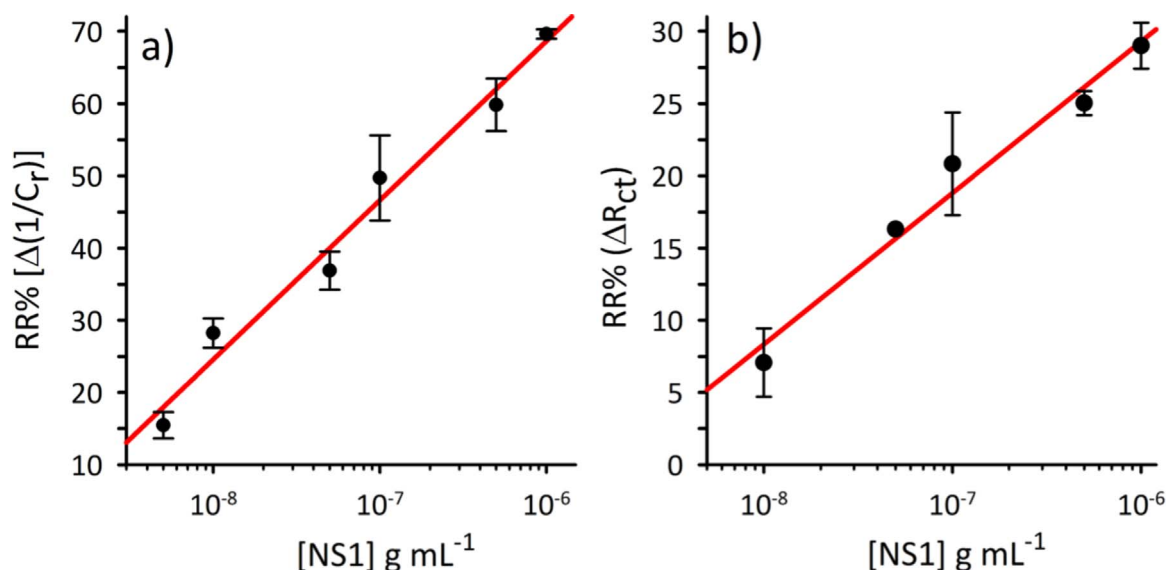


Fig. 5. Detection of NS1 protein in neat serum by anti-NS1 functionalized electrode using ECS and EIS sensorial approaches. (a) Calibration curve using $1/C_r$ (ECS-ES) as signal transducer (R^2 of 0.98) as a function of logarithm of NS1 at different concentrations, where $RR\% \Delta(1/C_r) = 100 \times (1/C_r(NS1) - 1/C_r(blank)) / 1/C_r(blank)$. The error bars indicate the standard deviation of triplicate measurements. (b) Calibration curve using R_{ct} (EIS-ES) as signal transducer (R^2 of 0.98 as a function of logarithm of NS1 at different concentrations Figure “b” adapted with permission from Cecchetto et al. (2015).

Table 1

Comparison of dengue NS1 protein sensing figures of merit in PBS (pH 7.4) and neat serum.

	EIS		ECS	
	PBS (ng mL ⁻¹)	Neat serum (ng mL ⁻¹)	PBS (ng mL ⁻¹)	Neat serum (ng mL ⁻¹)
Linear range	10 – 2,000	10 – 1,000	5.0 – 1,000	5.0 – 1,000
R ²	0.990	0.980	0.996	0.978
LoD	3.0	30.0	0.2	0.5
RSD ^a	9 ± 6	12 ± 6	3 ± 1	7 ± 4
S (%)	14.1	10.4	13.8	22.0
decade ⁻¹				
K _a (L mol ⁻¹)	(2 ± 1) × 10 ⁷	(3 ± 2) × 10 ⁷	(4 ± 2) × 10 ⁷	(4.0 ± 0.4) × 10 ⁷
intra-day (%)	–	3.5	–	5.9
inter-day (%)	–	7.1	–	8.1

^a Average of standard deviation calculated for all points in the analytical curve.

2014).

Considering that the symptoms are very similar amongst the *Flavivirus* infections, it is essential to advance to a differential analysis, so that the appropriate course of treatment can be followed. By using the capacitance spectroscopy platform, there is a plethora of arrays that can be engineered, including multiplexed analyses, in order to gather the excellent sensibility inherent to this electroanalytical tool together with an increased specificity provided by the biomarker itself.

4. Conclusions

Dengue NS1 protein biomarker was detected in PBS and serum samples using electrochemical capacitive label-free approach and compared with its counterpart (in terms of surface engineering), the traditional impedimetric methodology. In terms of figures of merit, it was demonstrated that capacitive assays are suitable even in serum biological matrix, demonstrating superior limit of detection (0.5 ng mL^{-1} against 30 ng mL^{-1} in impedimetric assays). The constant of affinity, K_a , was shown to be independent (i.e. statistically equivalent, as per t-Student analysis) regardless of different molecular surface engineering applied in both impedimetric and capacitive assays in which the biological affinities of anti-NS1/NS1 are equivalent in both assays. Although capacitive and impedimetric assays were clearly

suitable for dengue NS1 detection in complex biological samples, capacitive assay presents an advantage, that is there is no necessity to add a redox probe to the biological samples, prior to electro analysis, which is particularly useful in minimizing (or completely avoiding) patient samples manipulation.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.097>.

References

- Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., Flamand, M., 2002. *J. Clin. Microbiol.* 40 (2), 376–381.
- Bart, M., Stigter, E.C.A., Stapert, H.R., de Jong, G.J., van Bennekom, W.P., 2005. *Biosens. Bioelectron.* 21 (1), 49–59.
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R.W., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J., Hay, S.I., 2013. *Nature* 496 (7446), 504–507.
- Bhavsar, K., Fairchild, A., Alonas, E., Bishop, D.K., La Belle, J.T., Sweeney, J., Alford, T.L., Joshi, L., 2009. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2), 506–509.
- Bryan, T., Luo, X., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 39 (1), 94–98.
- Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014. *Anal. Chem.* 86 (3), 1337–1341.
- Bueno, P.R., Mizzon, G., Davis, J.J., 2012. *J. Phys. Chem. B* 116 (30), 8822–8829.
- Bueno, P.R., Feliciano, G.T., Davis, J.J., 2015. *Phys. Chem. Chem. Phys.*
- Cavalcanti, I.T., Guedes, M.I.F., Sotomayor, M.D.P.T., Yamanaka, H., Dutra, R.F., 2012. *Biochem. Eng. J.* 67, 225–230.
- Cecchetto, J., Carvalho, F.C., Santos, A., Fernandes, F.C.B., Bueno, P.R., 2015. *Sens. Actuators B: Chem.* 213 (0), 150–154.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2016. Diagnostic Testing: Molecular Test for Zika Virus.
- Chikkaveeraiah, B.V., Mani, V., Patel, V., Gutkind, J.S., Rusling, J.F., 2011. *Biosens. Bioelectron.* 26 (11), 4477–4483.
- Chikkaveeraiah, B.V., Bhird, A.A., Morgan, N.Y., Eden, H.S., Chen, X., 2012. *ACS Nano* 6 (8), 6546–6561.
- Chuang, Y.-H., Chang, Y.-T., Liu, K.-L., Chang, H.-Y., Yew, T.-R., 2011. *Biosens. Bioelectron.* 28 (1), 368–372.
- D.B.G., McCORMICK, H.L., 1994 *Vitamins: Ascorbic Acid*, 2. ed. W.B. Saunders Filadélfia.
- Daniels, J.S., Pourmand, N., 2007. *Electroanalysis* 19 (12), 1239–1257.
- Darwish, N.T., Alrawi, A.H., Sekaran, S.D., Alias, Y., Khor, S.M., 2016. *J. Electrochem. Soc.* 163 (3), B19–B25.
- Dias, A.C.M.S., Gomes-Filho, S.L.R., Silva, M.M.S., Dutra, R.F., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 44, 216–221.
- Dussart, P., Labeau, B., Lagathu, G., Louis, P., Nunes, M.R.T., Rodrigues, S.G., Storck-Herrmann, C., Cesaire, R., Morvan, J., Flamand, M., Baril, L., 2006. *Clin. Vaccin. Immunol.* 13 (11), 1185–1189.

- Elshafey, R., Tlili, C., Abulrob, A., Tavares, A.C., Zourob, M., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 39 (1), 220–225.
- Estofetele, C.F., Terzian, A.C.B., Parreira, R., Esteves, A., Hardman, L., Greque, G.V., Rahal, P., Nogueira, M.L., 2016. *J. Clin. Virol.* 81, 25–30.
- Fernandes, F.C.B., Góes, M.S., Davis, J.J., Bueno, P.R., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 50 (0), 437–440.
- Fernandes, F.C.B., Santos, A., Martins, D.C., Góes, M.S., Bueno, P.R., 2014. *Biosens. Bioelectron.* 57 (0), 96–102.
- Fernandes, F.C.B., Patil, A.V., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2015. *Anal. Chem.* 87 (24), 12137–12144.
- Figueiredo, A., Vieira, N.C.S., dos Santos, J.F., Janegitz, B.C., Aoki, S.M., Junior, P.P., Lovato, R.L., Nogueira, M.L., Zucolotto, V., Guimarães, F.E.G., 2015. *Sci. Rep.* 5, 7865.
- Fredericks, A.C., Fernandez-Sesma, A., 2014. *Ann. Glob. Health* 80 (6), 466–475.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martinez, E., Nathan, M.B., Pelegriño, J.L., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R.W., 2010. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 9.
- Ionescu, R.E., Gondran, C., Bouffier, L., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Cosnier, S., 2010. *Electrochim. Acta* 55 (21), 6228–6232.
- Klungthong, C., Gibbons, R.V., Thaisomboonsuk, B., Nisalak, A., Kalayanaroj, S., Thirawuth, V., Nutkumhang, N., Mammen, M.P., Jarman, R.G., 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45 (8), 2480–2485.
- Lanciotti, R.S., Kosoy, O.L., Laven, J.J., Velez, J.O., Lambert, A.J., Johnson, A.J., Stanfield, S.M., Duffy, M.R., 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (8), 1232–1239.
- Lehr, J., Fernandes, F.C.B., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014. *Anal. Chem.* 86 (5), 2559–2564.
- Li, L., Zhao, H., Chen, Z., Mu, X., Guo, L., 2011. *Biosens. Bioelectron.* 30 (1), 261–266.
- Lin, J., Wei, Z., Zhang, H., Shao, M., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 41 (0), 342–347.
- Lin, K.-C., Kunduru, V., Bothara, M., Rege, K., Prasad, S., Ramakrishna, B.L., 2010. *Biosens. Bioelectron.* 25 (10), 2336–2342.
- Liu-Helmersson, J., Quam, M., Wilder-Smith, A., Stenlund, H., Ebi, K., Massad, E., Rocklöv, J., 2016. *EBioMedicine*.
- Long, G.L., Winefordner, J.D., 1983. *Anal. Chem.* 55 (7), 712A–714A, 716A, 718A, 720A, 722A, 724A.
- Luo, X., Davis, J.J., 2013. *Chem. Soc. Rev.* 42 (13), 5944–5962.
- Marques, S.M., Santos, A., Gonçalves, L.M., Sousa, J.C., Bueno, P.R., 2015. *Electrochim. Acta* 182, 946–952.
- Mason, R.L., Gunst, R.F., Hess, J.L., 2003. *Statistical Design and Analysis of Experiments with Applications of Engineering and Science* 2 ed. ed. John Wiley & Sons, Inc, Canada.
- Muller, D.A., Young, P.R., 2013. *Antivir. Res.* 98 (2), 192–208.
- Ohno, R., Ohnuki, H., Wang, H., Yokoyama, T., Endo, H., Tsuya, D., Izumi, M., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 40 (1), 422–426.
- Pan American Health Organization, 2015. *Description of the Current Epidemiological Trends of Dengue in the Americas*.
- Parkash, O., Hanim Shueb, R., 2015. *Viruses* 7 (10), 5410–5427.
- Patil, A.V., Bedatty Fernandes, F.C., Bueno, P.R., Davis, J.J., 2014. *Anal. Chem.*.
- Peeling, R.W., Artsob, H., Pelegriño, J.L., Buchy, P., Cardoso, M.J., Devi, S., Enria, D.A., Farrar, J., Gubler, D.J., Guzman, M.G., Halstead, S.B., Hunsperger, E., Kliks, S., Margolis, H.S., Nathanson, C.M., Nguyen, V.C., Rizzo, N., Vazquez, S., Yoksan, S., 2010. *Nat. Rev. Microbiol.* 8.
- Pournaghi-Azar, M.H., Ahour, F., Hejazi, M.S., 2009. *Electroanalysis* 21 (16), 1822–1828.
- Qureshi, A., Gurbuz, Y., Kallemputti, S., Niazi, J.H., 2010. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (32), 9176–9182.
- Ramón-Azcón, J., Valera, E., Rodríguez, Á., Barranco, A., Alfaro, B., Sanchez-Baeza, F., Marco, M.P., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23 (9), 1367–1373.
- Sadana, A., Sadana, N., 2015. *A Fractal Analysis of Biomarkers for Different Diseases on Biosensor Surfaces. Biomarkers and Biosensors (Chapter 12)*. Elsevier, Amsterdam, 559–595.
- Sahab, Z.J., Semaan, S.M., Sang, Q.-X.A., 2007. *Biomark. Insights* 2, 21–43.
- Sahoo, P., Suresh, S., Dhara, S., Saini, G., Rangarajan, S., Tyagi, A.K., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 44 (0), 164–170.
- Santos, A., Bueno, P.R., 2016. *Biosens. Bioelectron.* 83, 368–378.
- Santos, A., Davis, J.J., Bueno, P.R., 2015a. *J. Anal. Bioanal. Tech.*, S07–016.
- Santos, A., Carvalho, F.C., Roque-Barreira, M.-C., Bueno, P.R., 2014. *Biosens. Bioelectron.* 62 (0), 102–105.
- Santos, A., Piccoli, J.P., Santos-Filho, N.A., Cilli, E.M., Bueno, P.R., 2015b. *Biosens. Bioelectron.* 68 (0), 281–287.
- Shu, P.-Y., Huang, J.-H., 2004. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11 (4), 642–650.
- Silva, M.M.S., Dias, A.C.M.S., Cordeiro, M.T., Marques, E., Jr, Goulart, M.O.F., Dutra, R.F., 2014. *Talanta* 128, 505–510.
- Sinawang, Prima D., Rai, V., Ionescu, R.E., Marks, R.S., 2016. *Biosens. Bioelectron.* 77, 400–408.
- Su, C.-C., Wu, T.-Z., Chen, L.-K., Yang, H.-H., Tai, D.-F., 2003. *Anal. Chim. Acta* 479 (2), 117–123.
- Subedi, D., Taylor-Robinson, A., 2014. *Open J. Clin. Diagn.* 4, 8.
- Telsnig, D., Kassarnig, V., Zapf, C., Leitinger, G., Kalcher, K., Ortner, A., 2012. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (11), 10476–10486.
- Valentin, M.-A., Ma, S., Zhao, A., Legay, F., Avrameas, A., 2011. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (5), 869–877.
- Vazquez, S., Ruiz, D., Barrero, R., Ramirez, R., Calzada, N., del Rosario Peña, B., Reyes, S., Guzman, M.G., 2010. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68 (1), 46–49.
- Venkatarayanan, A., Keyes, T.E., Forster, R.J., 2013. *Anal. Chem.* 85 (4), 2216–2222.
- World Health Organization, 2016. *Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020*.
- Yan, S., He, N., Song, Y., Zhang, Z., Qian, J., Xiao, Z., 2010. *J. Electroanal. Chem.* 641 (1–2), 136–140.
- Yang, L., Li, Y., Erf, G.F., 2004. *Anal. Chem.* 76 (4), 1107–1113.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética Humano (CEP) – Juliana Cecchetto

The screenshot shows the 'Plataforma Brasil' interface for a researcher named Juliana Cecchetto. The main section is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA'. Under the 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA' tab, the following information is displayed:

- Título da Pesquisa:** Engenharia de superfícies para diagnóstico de doenças negligenciáveis
- Pesquisador Responsável:** Juliana Cecchetto
- Área Temática:** Versão: 2
- CAAE:** 59590416.6.0000.5426
- Submetido em:** 05/04/2017
- Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP
- Situação da Versão do Projeto:** Aprovado
- Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável
- Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

A circular stamp from the 'COORDENADOR' is visible on the right side of the project details. Below the details, a 'Comprovante de Recepção' (Receipt Proof) is shown with the file name 'PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_748161'. At the bottom, a table titled 'DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA' is partially visible, showing a document named 'Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2'.

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética Humano (CEP) – Bruna Mateus de Castilho

The header of the document includes the logo of the 'Comitê de Ética em Pesquisa' (CEP) of the 'Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Câmpus de Araraquara - UNESP'. To the right, the text reads 'UNESP - FACULDADES DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE'. The 'Plataforma Brasil' logo is also present on the right. Below the header, a grey bar contains the title 'PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP'.

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diagnóstico de arbovírus em humanos e culicídeos em Matão, São Paulo.

Pesquisador: Bruna Mateus de Castilho

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 73098317.0.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio