

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 04/10/2020.

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

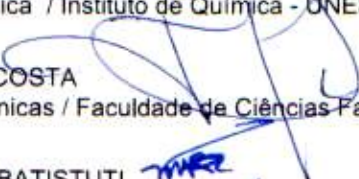
TÍTULO DA TESE: "Engenharia de superfícies para diagnóstico de dengue"

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 *Friesiometlitta 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}** » **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** « **C_i** de uma forma de **R_i** e **C_i** 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 mol L⁻¹ de NaOH. Faixa de potencial -1,7 a -0,7 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 H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹. Faixa de potencial -0,2 a 1,5 V (x 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 [Fe(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** * (**ω**) em **C** * (**ω**). 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 Cr 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) $0,047 \text{ cm}^2$ e b) $0,048 \text{ cm}^2$ 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.

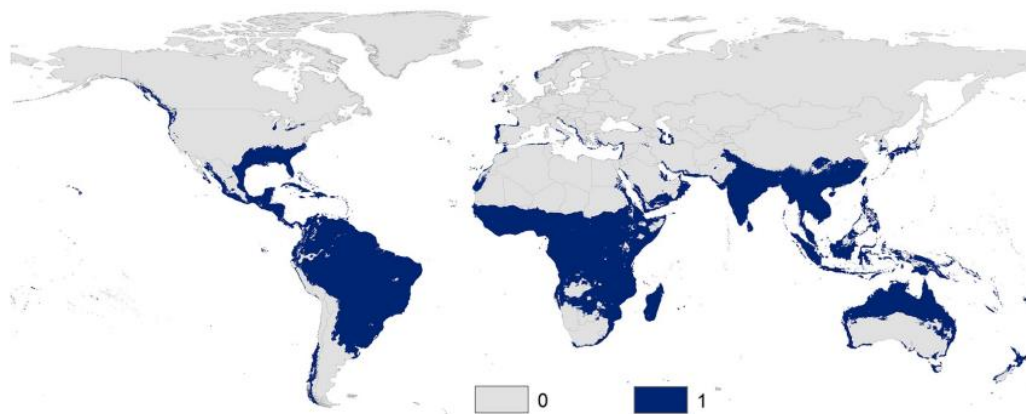
A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por um vírus chamado DENV, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, transmitida pela picada do mosquito *Aedes* infectado, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (GUZMAN *et al.*, 2010). A dengue é uma das arboviroses (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).

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>><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.; KHROMYKH, 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.