



DESENVOLVIMENTO DE KITS PARA RÁPIDO DIAGNÓSTICO DA DENGUE UTILIZANDO NANOPARTICULAS DE OURO

CAROLINE RODRIGUES BASSO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa
Co-orientadora: Dra. Claudia de Camargo Tozato
Colaborador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

BOTUCATU-SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**DESENVOLVIMENTO DE KITS PARA RÁPIDO DIAGNÓSTICO DA
DENGUE UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO**

CAROLINE RODRIGUES BASSO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutora no Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

BOTUCATU-SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Basso, Caroline Rodrigues.

Desenvolvimento de kits para rápido diagnóstico da dengue utilizando nanopartículas de ouro / Caroline Rodrigues Basso. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa

Coorientador: Claudia de Camargo Tozato

Capes: 90400003

1. Biossensores. 2. Dengue. 3. Nanopartículas.

Palavras-chave: biossensores; dengue; nanopartículas.

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a Deus, por ter permitido que tudo isso acontecesse, dando-me saúde e força na conclusão deste trabalho.

À minha família, meus pais Pedro Carlos e Maria Aparecida, por terem acreditado em mim, dando-me incentivo e não medindo esforços para que eu pudesse concluir essa etapa de minha vida.

À minha irmã Fernanda, pelo apoio incondicional.

Ao meu noivo Anderson pelo incentivo e paciência, sempre do meu lado me apoiando nas horas mais difíceis.

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”
(Arthur Schopenhauer)*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof^o Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa pela amizade, paciência, ensinamento e incentivo, estando presente em todos os momentos, tornando possível a conclusão desta monografia.

À minha co-orientadora Dr^a Claudia Tozato, pela ajuda na parte experimental de todo trabalho e interpretações dos dados, além da amizade que levarei para o resto da vida.

Ao Prof^o Dr. João Pessoa Araújo Júnior por toda ajuda na parte experimental do trabalho, fornecendo todas as amostras de vírus fundamentais para sua execução.

Ao Professor Fabio Vianello pela recepção e toda ajuda no período de estágio na Itália.

Aos colegas do Laboratório de Biomateriais e Técnicas Eletroquímicas, João Paulo, Lucas, Bruno, Naira e Jéssica, pelas risadas, aprendizados e amizade que levarei para o resto da vida.

Aos colegas da Universidade de Padova, Jéssica, Max, Davide e Vitorino pela ajuda no laboratório e amizade em todos os momentos.

As amigas que a Itália me deu, Pilar e Sushimitta.

Aos colegas do programa de Pós Graduação em Biotecnologia, por todos os momentos que passamos juntos, em especial a Mariana Ferreira por todos *happy hours*, desabafos e por ter se tornado uma amiga querida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química e Bioquímica, UNESP-Botucatu, pela amizade.

A todos os funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica, UNESP-Botucatu, pela ajuda dedicada.

A CAPES pelo auxílio financeiro para realização do projeto e concessão da bolsa PDSE, que possibilitou a realização do estágio no exterior.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vírus da dengue. A) Partícula viral infecciosa com diâmetro médio de 50 nm. B) Poliproteínas virais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) presentes em todos Flavivírus.	17
Figura 2: Ciclos de transmissão do vírus da dengue, do silvestre ao urbano, afetando populações de grandes cidades.	21
Figura 3: Custos diretos e indiretos causados pelo impacto econômico decorrente do vírus da dengue.	24
Figura 4: Esquema de funcionamento da SPR e da LSPR. A) Na SPR a luz polarizada atravessa um meio óptico denso alcançando um meio menor, sendo então refletida para o meio menos denso com uma redução na intensidade da luz, detectada por um arranjo de fotodiodos. B) Na LSPR a luz incidente atinge a NP que oscila entrando em ressonância e se propagando em um único eixo.....	29
Figura 5: Estrutura do aptâmero para dengue, analisado pela plataforma IDT OligoAnalyzer.	32
Figura 6: Garrafas do cultivo celular infectadas com os sorotipos 1, 2, 3 e 4.....	33
Figura 7: Imagens de MET obtidas das garrafas infectadas com os sorotipos da dengue e seus respectivos controles.....	35
Figura 8: Síntese das nanopartículas de ouro. A solução amarela é referente ao sal HAuCl_4 passando para coloração vermelha quando reduzido com citrato de sódio, formando as nanopartículas.	37
Figura 9: Espectro UV-Vis. A) Solução de HAuCl_4 não interagindo com a luz. B) Solução de AuNPs absorvendo a luz em 520nm.....	38
Figura 10: Representação esquemática da detecção do vírus da dengue. A imagem mostra a superfície das AuNPs modificadas com a formação das monocamadas auto- organizadas e a conjugação com os anticorpos para detecção do vírus no espectro UV- Vis.	39
Figura 11: (A) Imagens de MET das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ em escala de 200 nm, apresentando diâmetro médio de 11 ± 2 nm. B) Espectro UV-Vis.....	40
Figura 12: Espectros de UV-Vis das soluções de AuNPs ajustados a diferentes pHs e armazenadas em geladeira (linha vermelha) e temperatura ambiente (linha preta). Análises realizadas em março de 2015 (A, C, E e G) e em março de 2016 (B, D, F e H).....	45
Figura 13: Espectro de absorção para as amostras de AuNPS em diferentes pHs armazenadas em geladeiras e medidas ao longo de um ano com seus respectivos coeficientes de determinação. As imagens C, G, K e O demonstram o diâmetro médio das AuNPS analisadas pelas técnicas de MET e DLS em 03/2015. As imagens D, H, L e P mostram a formação de agregados e o diâmetro médio das AuNPS analisados pelas técnicas de MET e DLS em 03/2016.	47
Figura 14: (A) Imagens de MET para amostras de AuNPs sintetizadas com Tween20 durante a síntese e B) CTAB.	51

Figura 15: Espectro de absorção UV-Vis para diferentes sínteses das AuNPs. H₂AuCl₄, sem formação de nanopartículas (linha preta), AuNPs sem Tween20 (linha vermelha), AuNPs adicionadas de Tween20 no momento da síntese (linha verde) e AuNPs adicionadas de Tween20 após resfriamento em temperatura ambiente (linha azul).52

Figura 16: Espectros de UV-Vis das soluções de AuNPs ajustados com diferentes concentrações de Tween20 e armazenadas em geladeira (linha vermelha) e temperatura ambiente (linha preta). Análises realizadas em março de 2015 (A, C, E, G e I) e em março de 2016 (B, D, F, H e J).54

Figura 17: Espectro de absorção para as amostras de AuNPs com diferentes concentrações de Tween20 armazenadas em geladeiras e medidas ao longo de um ano com seus respectivos coeficientes de determinação. As imagens C, G, K, O e S demonstram o diâmetro médio das AuNPs analisadas pelas técnicas de MET e DLS em 03/2015. As imagens D, H, L, P e T mostram o diâmetro médio das AuNPs analisados pelas técnicas de MET e DLS em 03/2016.57

Figura 18: Espectro de UV-Vis mostrando a absorção de todas as etapas de modificação: AuNPs (linha preta), MUA (linha vermelha), EDC-NHS (linha verde), anticorpo (linha azul) e pool do vírus da dengue (linha rosa).61

Figura 19: Variações das concentrações de anticorpos. 0,5 µg/mL (linha preta), 1,5 µg/mL (linha vermelha), 2,5 µg/mL (linha verde), 5,0 µg/mL (linha azul) e 10,0 µg/mL (linha rosa), todas as diluições foram feitas em tampão PBS. Inserida na figura a curva de calibração com R²: 0,91.62

Figura 20: Imagens de MET com as modificações das AuNPs em uma escala de 100 nm. A) AuNPs, B) AuNPs modificadas com MUA e EDC-NHS, C) AuNPs modificadas com MUA/EDC-NHS/anticorpos e (D) AuNPs modificadas com MUA/EDC-NHS e anticorpos ligados ao DENV...64

Figura 21: Gráfico de SPR para detecção do DENV e seus interferentes. A) EDC-NHS (ponto A), anticorpo (ponto B), BSA (ponto C), pool DENV (pontos D, E e G), controle negativo com ZIKV (pontos F e H). Todas as etapas de lavagem do experimento foram feitas utilizando tampão PBS pH 7,4, representado pelas flechas azuis para baixo e as etapas de regeneração da superfície do sensor foram feitas utilizando solução glicina- HCl representadas pelas flechas rosas para cima. B) Teste para confirmar a não influência de possíveis ligações moleculares presentes no meio de cultura. Solução de cultura de células C636 em meio L-15 (ponto A) e lavagem com tampão PBS pH 7,4 (flecha azul).66

Figura 22: A) Variação da concentração do pool de DENV. O pool de DENV com título de 10⁷ DICT₅₀/mL diluído para 0,0 µl de PBS (linha preta), 1/10 µl de PBS (linha vermelha), 1/50 µl de PBS (linha verde), 1/100 µl de PBS (linha azul), 1/150 µl de PBS (linha rosa) e 1/200 µl de PBS (linha azul clara). Inserida na figura a curva de calibração para o pool de DENV. B) Espectro de absorbância UV-Vis para o controle negativo. AuNPs (linha preta), MUA (linha vermelha), EDC-NHS (linha verde), anticorpo (linha azul) e ZIKV (linha laranja).68

Figura 23: Gráficos de espectroscopia das modificações na superfície do eletrodo recoberto com ouro. MUA (a), ativação com EDC-NHS (b), imobilização do anticorpo (c), bloqueio com BSA (d) e ligação do DENV (e). DENV 1 (A), DENV 2 (B), DENV 3(C) e DENV 4 (D). Potencial aplicado de 0,005 V em 10 mM PBS (pH 7,4) contendo 0,5 mM de Fc.69

Figura 24: Gráfico de LSPR mostrando as etapas de modificações ocorridas no nanomaterial híbrido. γ-Fe₂O₃ (linha preta), AuNPs (linha rosa), γ-Fe₂O₃/MPA/AuNPs (linha vermelha), γ-Fe₂O₃/MPA/AuNPs/aptâmero (linha verde) e γ-Fe₂O₃/MPA/AuNPs/aptâmero/pool DENV (linha

azul).....71

Figura 25: Representação esquemática da detecção do vírus da dengue. A imagem mostra a superfície das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ modificadas com MPA, AuNPs e aptâmeros, para detecção do vírus da dengue.71

Figura 26: Teste colorimétrico para detecção do DENV. As cubetas mostram: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (A), AuNPs (B), o complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero (C), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero/DENV (D), testes de vírus interferentes com o ZIKV (E) e o vírus da febre amarela (F).72

Figura 27: Espectro UV-Vis. A) Variações das concentrações de aptâmeros. 1,0 μM (linha preta) 3,0 μM (linha rosa), 5,0 μM (linha verde), 7,0 μM (linha azul) e 10,0 μM (linha vermelha), todas as diluições foram feitas com água deionizada. B) Curva de calibração para concentrações de aptâmeros com R^2 : 0,99.....73

Figura 28: Imagens de MET e análises de EDX para todas as etapas de modificação do imunossensor. A) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ na escala de 200 nm. B) Gráfico de EDX das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. C) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs com escala de 100 nm. D) Gráfico de EDX para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs. E) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero em escala de 100 nm. F) Gráfico de EDX para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero. G) $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero ligados ao DENV na escala de 200 nm. H) Gráfico de EDX para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero/DENV.....75

Figura 29: Gráfico SPR para detecção DENV. MPA formando as SAMs (ponto A), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (ponto B), MPA (ponto C), AuNPs (ponto D), aptâmeros (ponto E) e pool DENV (ponto F). Todas as etapas de lavagem foram realizadas usando água deionizada e estão demonstradas pelas setas pretas para baixo.....77

Figura 30: Espectro UV-Vis para os controles negativos e o DENV. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA (linha preta), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs (linha vermelha), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero (linha rosa), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero/febre amarela (linha amarela), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero/ZIKV (linha azul) e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero/DENV (linha verde).....78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Balanço geral dos casos notificados de dengue no Brasil até a semana epidemiológica 49 de 2018.....	20
Tabela 2: Alterações do pH das soluções de AuNPs influenciado pela forma de armazenamento....	50
Tabela 3: pH das soluções de AuNPs com diferentes métodos de sínteses.....	52
Tabela 4: Valores de pH obtidos em março de 2016 para soluções de AuNPs em diferentes concentrações de Tween20.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag/AgCl- Prata/cloreto de prata

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AuNPs- Nanopartículas de ouro

BSA- Albumina sérica bovina

C- Proteína de capsídeo

C636- Linhagem de células provenientes de intestino de mosquito

CDV- Vírus da cinomose canina

CTAB- Brometo de cetiltrimetilamonio

°C- Graus celcius

DENV- Vírus da dengue

DENV 1- Sorotipo 1

DENV 2- Sorotipo 2

DENV 3- Sorotipo 3

DENV 4- Sorotipo 4

DICT₅₀- 50% de dose infecciosa na cultura de tecidos

DLS- Espalhamento dinâmico de luz

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DRX- Difração de Raio X

E- Glicoproteína de envelope viral

EDC- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EDX- Espectroscopia de raios X por dispersão em energia

ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática

EIS- Espectroscopia de impedância eletroquímica

Fc- Ferroceno

FTIR- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

g- Força gravitacional

g- Gramas

H- Hidrogênio

HAuCl₄- Cloreto de ouro trihidrato

HCl- Ácido clorídrico

Hz- Hertz

IgM- Imunoglobulina M
IgG- Imunoglobulina G
K_a- Constante de dissociação
KΩ- kiloohm
L- Litro
LSPR- Ressonância plasmônica de superfície localizada
L-15- Meio de cultura Leibovitz's
M- Proteína de membrana
MET- Microscopia eletrônica de transmissão
mg- Miligrama
mim- minuto
mL- Mililitro
mm²- Milímetro quadrado
MPA- 3-ácido mercaptopropionico
MS- Ministério da Saúde
MUA- 11-ácido mercaptoundecanóico
N₂- Nitrogênio
NaOH- Hidróxido de sódio
ng- Nanograma
NHS- N-hidroxissuccinimida
nM- Nanomol
nm- Nanometros
NPs- Nanopartículas
NS1- proteína não-estrutural
OH- Hidroxila
PBS- Tampão fosfato salino
pH- Potencial hidrogeniônico
POC- Point-of-care
Pool- Mistrura dos sorotipos
R²- Coeficiente de determinação
Rcf- Força centrífuga relativa
Ret- Resistencia de transferência de elétrons
RNA- Ácido ribonucleico
RSD- Desvio padrão relativo

RT-PCR- Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

s- Segundos

SPR- Ressonância plasmônica de superfície

SAMs- Monocamadas auto-organizadas

SH- Tiol

V- Volts

UR- Unidades ressonantes

UV-Vis- Ultravioleta visível

ZIKV- Zika vírus

Zim- Z-imaginário

Zre- Z-real

μL - Microlitro

μg - Micrograma

λ - Lambida

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ - Nanopartícula maghemita

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Doenças Tropicais	16
1.2 Vírus da Dengue	16
1.2.1 Aspectos Epidemiológicos e Geográficos do Vírus da Dengue	17
1.2.2 Ciclo de Transmissão, Sintomas, Diagnóstico e Impacto Econômico Causado pelo Vírus da Dengue.....	20
1.3 Biossensores e Nanomateriais	24
1.4 Nanopartículas de Ouro	26
1.5 Nanopartículas de Óxido de Ferro.....	27
1.6 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada	28
2. OBJETIVOS.....	30
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
3.1 Reagentes Utilizados	31
3.2 Amostras de Dengue, Zika e Vírus da Febre Amarela	32
3.3 Cultivo Celular e Expansão do Vírus da Dengue	33
3.4 Análise de RT-qPCR	36
3.5 Metodologia.....	37
3.5.1 Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Ouro.	37
3.5.2 Preparação e Caracterização das Monocamadas Auto-Organizadas sobre as Nanopartículas de Ouro.	38
3.5.3 Modificação da Superfície das AuNPs	39
3.5.4 Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Óxido de Ferro.	40
3.5.5 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR)	40
3.5.6 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	41

3.5.7 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).....	41
3.5.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDX).....	41
3.5.9 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	42
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	43
4.1 Etapa 1: Nanopartículas de Ouro.....	43
4.1.1 Preparação das AuNPs e estabilização por redução aquosa (diferentes pHs)	43
4.1.2 Influência do pH e do Armazenamento na Dispersão das AuNPs	43
4.1.3 Estabilização das AuNPs em Diferentes pHs ao Longo do Tempo	46
4.1.4 Preparação das AuNPs e Estabilização Utilizando Surfactante.....	50
4.1.5 Influência da Temperatura no Armazenamento das AuNPs/Tween20.....	52
4.1.6 Acompanhamento da Dispersão entre as AuNPs na Presença de Diferentes Concentrações de Tween20 ao Longo do Tempo	55
4.2 Etapa 2: Produção do Imunossensor para Detecção do Vírus da Dengue Utilizando AuNPs e Anticorpos	60
4.2.1 Caracterização da Microestrutura	60
4.2.2 Experimentos de Ressonância Plasmônica de Superfície	64
4.2.3 Desempenho Analítico.....	66
4.2.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).....	68
4.3 Etapa 3: Produção do Imunossensor para Detecção do Vírus da Dengue Utilizando Nanopartículas Maghemita, Nanopartículas de Ouro e Aptâmeros	69
4.3.1 Performance do Imunossensor	70
4.3.2 Otimização do Imunossensor	72
4.3.3 Análises dos Interferentes.....	77
5. CONCLUSÃO	79
6. ARTIGOS PUBLICADOS, CAPÍTULO DE LIVRO E PETENTES	81
7. REFERÊNCIAS.....	83

RESUMO

Doenças tropicais são aquelas causadas por agentes infecciosos ou parasitas e consideradas endêmicas em populações na sua maioria de baixa renda, residente em países tropicais e subtropicais. Dentre essas doenças temos a dengue, que acomete milhares de pessoas levando a mortes todos os anos. A dengue é transmitida através da picada do mosquito contaminado e a movimentação populacional a torna de fácil disseminação em todo o território nacional. Atualmente, os exames para diagnóstico desta doença são realizados em laboratórios, principalmente testes sorológicos. Porém, esta metodologia apresenta como limitação o custo elevado além dos resultados levarem dias para que fiquem prontos. Por isso, se faz necessário o desenvolvimento de uma nova metodologia confiável e de baixo custo para um rápido diagnóstico. Atualmente, nanobiossensores vem se destacando como uma ferramenta analítica que pode identificar a presença de patógenos utilizando como base nanoestruturas. Logo, o objetivo do presente projeto foi desenvolver e padronizar uma nova metodologia para o diagnóstico rápido e eficaz do vírus da dengue, utilizando diferentes nanoestruturas modificadas com a deposição de anticorpos específicos e aptâmeros. As metodologias foram comparadas mediante as técnicas de ressonância plasmônica de superfície localizada, ressonância plasmônica de superfície, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de impedância eletroquímica, espalhamento dinâmico de luz e análise do software ImageJ. Os resultados obtidos com as técnicas apresentaram algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais de detecção, como rápido tempo de análise e baixo custo, mostrando ser altamente eficaz na detecção dos quatro sorotipos da dengue, com uma abordagem simples, levando em média 30 minutos para obtenção dos resultados. Mudanças colorimétricas nas etapas de modificações utilizando nanopartículas maghemita, proporcionaram rápida detecção visual do vírus sem o uso de equipamento, tornando possível o diagnóstico em locais distantes dos laboratórios. O valor final do kit foi de cerca de R\$ 9,00 por amostra.

Palavras-chave: biossensores, dengue e nanopartículas.

ABSTRACT

Tropical diseases are those caused by infectious agents or parasites and are considered endemic in mostly low-income populations residing in tropical and subtropical countries. Among these diseases we have the dengue that causes thousands of deaths each year. Dengue is transmitted through the bite of the contaminated mosquito and the population movement makes it easily spread throughout the national territory. Currently, the diagnostic test of this disease is performed in laboratories, being serological tests. However this methodology presents as a limitation the higher cost and the delay for the result come out. Therefore, it is necessary to develop a new, reliable and low-cost methodology for rapid diagnosis. Nowadays, nanobiosensors have been highlighted with analytical tool that can identify the presence of pathogens using as base nanostructures. The objective of the present project was to develop and standardize a new methodology for a fast and effective diagnosis of dengue virus using using different nanostructures modified with the deposition of specific antibodies and aptamers. The methodology was compared by localized surface plasmon resonance, surface plasmon resonance, transmission electron microscopy, electrochemical impedance spectroscopy, dynamic light scattering techniques and ImageJ software analysis. The results obtained with the techniques presented some advantages over the traditional methods of detection, such as fast analysis and low cost, showing to be highly effective in the detection of the four dengue serotypes with a simple approach, taking an average of 30 minutes to obtain the results. Colorimetric changes in the steps of modifications using maghemite nanoparticles provided fast visual detection of the virus without the use of equipment, making it possible diagnosis in remote locations of the laboratories. The final value of the kit was about R\$ 9.00 per sample.

Key words: biosensors, dengue and nanoparticles.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais

Segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de 1 bilhão de pessoas no mundo são acometidas por um conjunto de doenças que afetam principalmente populações pobres que vivem em áreas remotas como: florestas, favelas urbanas, áreas rurais e zonas de conflitos de países tropicais em desenvolvimento (1). Cerca de 70% dos países que apresentam estas doenças possuem economias de rendimento médio inferior ou são de baixa renda, representando 1/6 da população mundial (1, 2).

Algumas das doenças incluídas nesse grupo são: dengue, malária, doença de Chagas, doença do sono, leishmanioses, filariose, esquistossomose, hanseníase, tuberculose, raiva, febre amarela, ascariase, tricuriase, necatoríase, ancilostomíase, tracoma, dracunculíase e a úlcera de buruli, que juntas causam entre 500 mil e 1 milhão de óbitos anualmente (3). Essas doenças são causadas principalmente por água contaminada, condições precárias de habitação e saneamento deficiente, tendo como público mais vulnerável as crianças. Embora haja um investimento financeiro para pesquisas relacionadas a estas doenças, o conhecimento produzido ainda está desenvolvendo avanços para os pacientes, como por exemplo, novas drogas, vacinas e métodos mais rápidos de análises, apresentando um amplo campo a ser explorado (1).

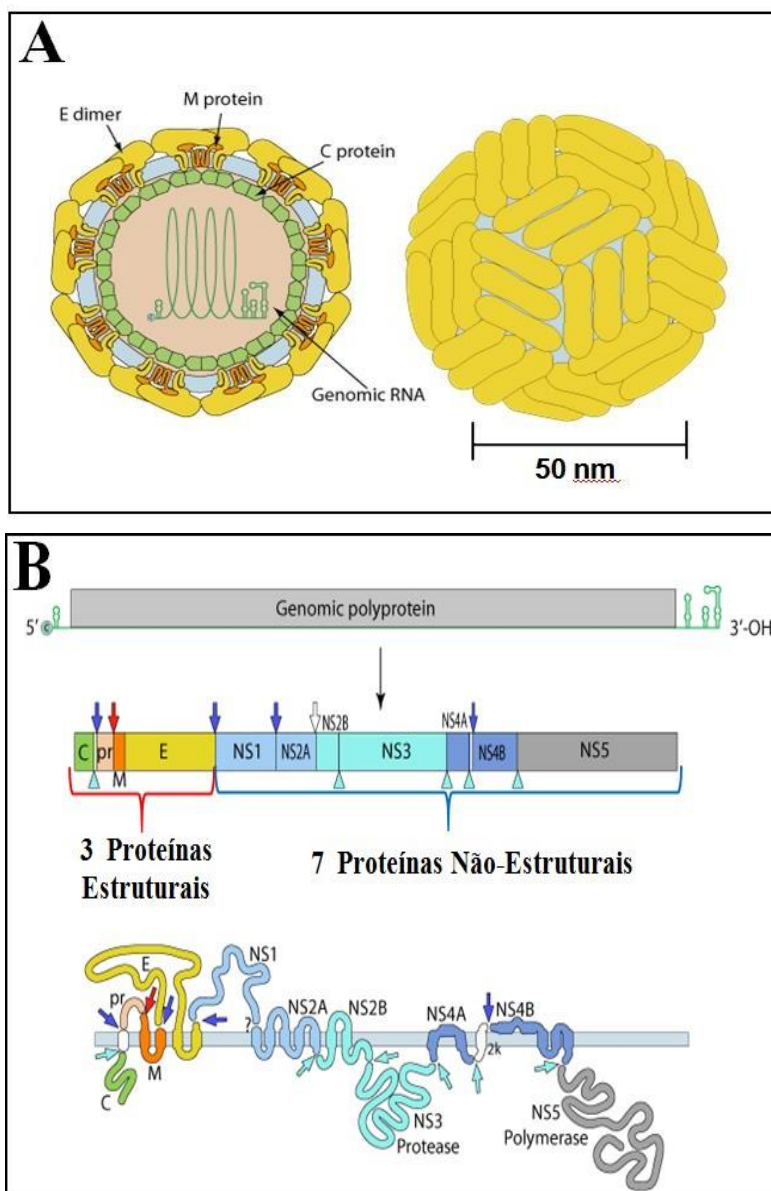
Hoje no Brasil a doença tropical que mais afeta a população é a dengue, considerada pelo governo como um problema de saúde pública. Nos últimos quatro anos, cerca de 4 milhões de casos de dengue foram notificados, com milhares de mortes, demonstrando a gravidade da doença (2).

1.2 Vírus da Dengue

A dengue é uma doença arboviral (transmitida por artrópodes) causada por um vírus do gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviviridae* que apresenta quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), classificados com base nas suas características antigênicas, ainda que epidemiologicamente muito semelhantes são geneticamente muito distintas. A transmissão do vírus ocorre pela picada de mosquitos fêmeas contaminadas do gênero *Aedes*, principalmente *A. albopictus* e *A. aegypti*, considerado principal vetor da doença (4, 5). O vírus apresenta genoma de RNA simples de sentido positivo, com aproximadamente 10.700 bases, envolto no capsídeo recoberto por uma bicamada lipídica. O vírion (partícula viral infecciosa) apresenta um tamanho médio de 50 nm de diâmetro e codifica três proteínas estruturais (capsídeo (C), proteína de membrana (M) e glicoproteína de envelope viral (E)) (**Fig. 1A**) e sete proteínas não estruturais (NS1,

NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) que estão dispostas em uma simetria icosaédrica. Essa semelhança estrutural é compartilhada entre todos os *Flavivírus* (**Fig. 1B**) (6-8).

Figura 1: Estrutura do vírus da dengue. A) Partícula viral infecciosa com diâmetro médio de 50 nm. B) Poliproteínas virais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) presentes em todos Flavivírus.



Fonte: viralzone.expasy.org

1.2.1 Aspectos Epidemiológicos e Geográficos do Vírus da Dengue

No mundo, milhares de pessoas ficam expostas à infecção causada pelo vírus da dengue (DENV). A transmissão ocorre principalmente em áreas pobres urbanas, subúrbios e zona rural,

mas atualmente também afeta bairros mais ricos em países tropicais e subtropicais. Estima-se que nos dias de hoje a doença se apresente de forma endêmica em mais de 100 países (9).

Relatos na literatura indicam que uma doença chamada “water poison” em tradução livre veneno de água, com características semelhantes ao da dengue, foi relatada no século III na China durante a Dinastia Chin e também nos séculos VII durante a Dinastia Tang e no século X pela Dinastia Sung do Norte. O nome da doença foi relacionado a insetos voadores que se reproduziam na água e transmitiam a doença aos seres humanos (6, 10). As expedições marítimas daquela época utilizando navios de vela, bem como o comércio de escravos, podem ter contribuído para a disseminação da doença para outros países do mundo no século XVII. A doença foi registrada em países como as Índias Ocidentais Francesas (antigas possessões coloniais francesas no sub continente indiano) no ano de 1365, Panamá em 1699, e um século depois na Indonésia, Egito, Estados Unidos e Espanha. A doença que afligiu povos de diversas etnias no passado apresentou sintomas similares ao da dengue, mas é possível que também tenha sido causada por outros tipos de vírus, como o chikungunya que apresenta sintomas muito parecidos ao da dengue (6, 11). Nas Américas, registros mostram relatos da doença no ano de 1600, com surtos epidêmicos no México em 1635 e no Panamá em 1699.

Foi no período de 1939-1945, durante a Segunda Guerra Mundial, mais precisamente em 1943, que os quatro sorotipos da dengue foram isolados e identificados por pesquisadores americanos e japoneses, de acordo com seu genótipo e nomeados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (12, 13). No Brasil, o vírus passou a circular no ano de 1982 com registros na cidade de Roraima (14). A primeira epidemia do vírus ocorreu quatro anos depois no estado do Rio de Janeiro, onde o sorotipo 1 (DENV-1) foi relatado em mais de 60.000 pessoas vindo a aumentar nos anos seguintes, atingindo a marca de 204.000 casos entre os anos de 1999-2000, com casos registrados em 22 dos 26 estados brasileiros. A disseminação do vírus pelo território brasileiro está associada com a proliferação descontrolada do seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, uma vez que as condições climáticas do país como altas temperaturas e a alta umidade fornecem condições ideais para sua reprodução (14, 15).

O vírus da dengue inclui quatro sorotipos distintos geneticamente e antígenoicamente. Hoje, no Brasil temos a circulação dos quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) em todo território nacional. A introdução de cada sorotipo se deu da seguinte maneira:

- DENV-1: na década de 80, ocorreu a prevalência desse sorotipo e após estudos, foi verificado que pertencia ao genótipo V de origem americana/africana. A diversidade genética desse sorotipo

foi resultado da introdução de novas cepas em um mesmo período ou em períodos distintos (14, 16).

- DENV-2: a prevalência desse segundo sorotipo ocorreu na década de 90, com cepas de dois grupos distintos, uma proveniente do sudoeste asiático e outra da Jamaica (17).
- DENV-3: nos anos 2000, o sorotipo predominante foi o 3, com registro de uma grande epidemia no estado do Rio de Janeiro em 2002. Houve um grande surto de casos de dengue com inúmeras mortes em todo o território brasileiro nesse período, estudos apontaram que a introdução desse sorotipo no Brasil foi decorrente de casos registrados no Caribe (17, 18).
- DENV-4: a detecção desse sorotipo no território brasileiro ocorreu também na década de 80, mas foi em 2010 que genótipos distintos para esse sorotipo foram identificados, o genótipo I proveniente do sul da Ásia e o genótipo II vindo da Venezuela e da Colômbia (18).

A introdução de um novo sorotipo/genótipo em um país é bem sucedida na maioria das vezes, pois vem acompanhada de surtos na região de sua introdução. No Brasil, surtos da dengue ocorreram em épocas distintas, mas em todos os casos com um grande aumento no número de casos registrados. A maior epidemia de DENV no Brasil até esta data ocorreu no ano de 2015 com 1.688.688 casos prováveis de dengue, causados predominantemente pelo sorotipo 1 (16, 19-20).

Um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em conjunto com estados e municípios, registrou 589.107 casos notificados de dengue no ano de 2014, 1.688.688 casos em 2015, 1.500.535 casos em 2016, 232.372 casos em 2017 e 247.393 casos em 2018 (21, 22). Embora dados estatísticos apresentem uma queda significativa no número de casos notificados, é importante ressaltar que ao longo da história, a dengue apresentou surtos esporádicos da doença com intervalo de anos, causado provavelmente pela inserção de um único sorotipo (20, 21).

O último boletim epidemiológico do ano de 2018 divulgado pela Secretaria de Vigilância em Saúde-Ministério da Saúde mostra que até a semana epidemiológica 49 (31/12/2017-10/12/2018) a região Centro-Oeste registrou 37,7% dos casos, seguida pelas regiões Nordeste com 26,8%, Sudeste com 27,7%, Norte com 6,6% e Sul com 1,2%, com um total de 141 óbitos. Esses dados mostram que mesmo com toda campanha de prevenção a dengue ainda é encontrada em todo território nacional, por isso, se faz necessário um controle cada vez mais rígido dos focos de criadouro do mosquito. Os resultados são demonstrados na **Tabela 1** (22).

Tabela 1: Balanço geral dos casos notificados de dengue no Brasil até a semana epidemiológica 49 de 2018.

Região/Unidade da Federação	Casos Prováveis (n)	Incidência (/100 mil hab.)
Norte	16.288	89,6
Rondônia	519	29,5
Acre	5.817	669,2
Amazonas	2.401	58,8
Roraima	173	30,0
Pará	3.928	46,1
Amapá	711	85,7
Tocantins	2.739	176,1
Nordeste	66.401	117,0
Maranhão	2.069	29,4
Piauí	1.783	54,6
Ceará	4.424	48,7
Rio Grande do Norte	23.264	668,7
Paraíba	10.937	273,7
Pernambuco	12.364	130,2
Alagoas	2.127	64,0
Sergipe	234	10,3
Bahia	9.199	62,1
Sudeste	68.460	78,1
Minas Gerais	27.241	129,5
Espírito Santo	9.162	230,6
Rio de Janeiro	14.352	83,6
São Paulo	17.704	38,9
Sul	2.900	9,7
Paraná	2.478	21,8
Santa Catarina	289	4,1
Rio Grande do Sul	133	1,2
Centro-Oeste	93.344	580,3
Mato Grosso do Sul	3.129	113,9
Mato Grosso	6.789	197,2
Goiás	81.341	1.175,3
Distrito Federal	3.849	70,1
Brasil	247.393	118,7

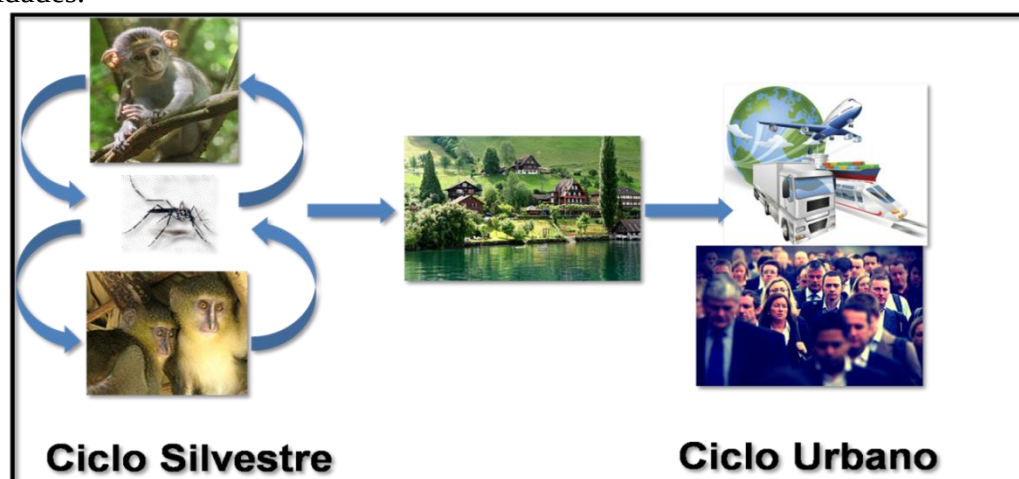
Fonte: Ministério da Saúde.

1.2.2 Ciclo de Transmissão, Sintomas, Diagnóstico e Impacto Econômico Causado pelo Vírus da Dengue.

A transmissão do vírus da dengue pode ocorrer através de duas formas: o ciclo silvestre e ciclo urbano. No ciclo silvestre, a transmissão do vírus ocorre entre primatas não-humanos residentes de florestas tropicais, principalmente da África Ocidental e do Sudeste Asiático. A transmissão no ciclo silvestre ocorre principalmente por mosquitos *Aedes SSP* e em alguns casos pelo *Aedes furcifer* e os primatas não- humanos são os únicos hospedeiros. Os principais macacos presentes nesse ciclo são os macacos-pata, macaco-verde africano, babuíno da guiné, macaca fascicularis, macaco de cauda de porco e macaco de folha prateada (23, 24).

A transmissão através do ciclo urbano, que envolve os seres humanos, ocorre quando o mosquito pica uma pessoa infectada com o vírus e posteriormente pica outra pessoa, transmitindo a doença. Os principais mosquitos que fazem parte do ciclo urbano são os *Aedes aegypti* (principal vetor), o *Aedes albopictus* e o *Aedes polynesiensis* que atuam como vetores secundários (25). Estudos demonstram que para ocorrer a transmissão do vírus da dengue é necessário que a titulação viral seja de 10^9 cópias de RNA viral/mL de sangue (26). Estudos filogenéticos mostraram que os seres humanos contraíram o vírus da dengue de primatas não-humanos, em um processo de transmissão cruzada que provavelmente deve ter sido ocasionado pelo mosquito *Aedes albopictus* que após picar o macaco infectado, transmitiu para populações de zonas rurais e estes por sua vez para o perímetro urbano, conforme demonstrado na **Figura 2** (27).

Figura 2: Ciclos de transmissão do vírus da dengue, do silvestre ao urbano, afetando populações de grandes cidades.



Fonte: Adaptado de Chen, R.; Vasilakis, N. 2011.

O crescente aumento de casos de dengue nos últimos anos pode estar relacionado principalmente à disseminação e falta de controle do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor do vírus na zona urbana (8). Para o controle da doença é necessário a eliminação dos focos de

reprodução do mosquito, que ocorre em qualquer recipiente que possa acumular água. Quatro fases compreendem o ciclo de vida do mosquito, sendo elas: ovo, larva, pupa e adulto. Após a deposição dos ovos pela fêmea do mosquito na parede dos recipientes, estes em contato com a água podem vir a eclodir em minutos, mas também podem permanecer por até 400 dias sem eclodir quando em condições não favoráveis como falta de água por exemplo (28). A reprodução do mosquito ocorre com maior frequência em regiões com alta temperatura, umidade e água limpa e parada para depositar seus ovos, mas caso essas condições não sejam encontradas, estudos mostram a deposição dos ovos em águas com muita matéria orgânica, como esgotos. Uma única fêmea do mosquito pode ovipor cerca de 100 ovos por ciclo em recipientes diferentes, dificultando o controle dos criadouros. Se a fêmea do mosquito estiver contaminada com um dos quatro sorotipos da dengue pode ser que as larvas já nasçam portando o vírus, isso é chamado de transmissão vertical. O ciclo de desenvolvimento do mosquito até a fase adulta sofre algumas interferências como clima, presença de água, quantidade de larvas e disponibilidade de alimento no criadouro, mas em média de oito a doze dias com todas as condições favoráveis o mosquito se apresenta na forma adulta (28-30).

Os mosquitos machos alimentam-se de substâncias açucaradas, como néctar e seiva de plantas, já as fêmeas na necessidade de produzir os ovos alimentam-se de sangue, vindo a picar os seres humanos e se esta estiver contaminada com algum sorotipo do vírus, irá transmiti-lo (31). A hematofagia (alimentação com sangue) ocorre com maior intensidade a partir do segundo dia que a fêmea emerge do criadouro e sua preferência é por hábitos diurnos, preferencialmente ao amanhecer e no final da tarde, mas também pode apresentar em alguns casos hábitos noturnos (32). A eliminação e controle populacional do mosquito estão diretamente relacionados aos seus criadouros, por isso, campanhas nacionais e municipais de conscientização da população em não deixar água parada, cobrir os possíveis locais de reprodução e lavar os objetos que possam acumular água com sabão e esponja são noticiados comumente na mídia eletrônica e impressa. Outra opção adotada pelo governo para tentar reduzir o número de mosquitos é a utilização de inseticidas aplicados por carro-fumacê ou nebulização, mas essa medida atinge apenas mosquitos adultos e não seus ovos (32, 33).

O desenvolvimento da vacina para dengue é outra alternativa para diminuir a circulação do vírus. Hoje, disponível no mercado temos a vacina tetravalente CYD-TDV (Dengvaxia[®]) desenvolvida e produzida pelos laboratórios da Sanofi-Pasteur, sendo licenciada recentemente na Ásia e na América Latina. Outras duas vacinas na fase 3 de desenvolvimento estão prestes a entrar no mercado, a TDV produzida pela Takeda Farmacêutica e a LAV Delta 30 desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH)/Instituto Butantan (34). Embora a Dengvaxia[®] ofereça proteção contra os quatro sorotipos, um boletim divulgado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA), recomenda que a vacina não seja tomada por pessoas que nunca tiveram contato com o vírus da dengue anteriormente. Isso porque, informações preliminares e não conclusivas indicam que pacientes soronegativos vacinados que forem expostos posteriormente ao vírus, podem vir a desenvolver a forma mais grave da doença. Segundo a ANVISA, essas informações foram apresentadas pelo próprio fabricante Sanofi-Pasteur, esclarecendo que a vacina em si não desencadeia o quadro da doença, mas se em contato com vírus pode vir a desenvolvê-la (35). A vacinação inclui a administração de três doses no paciente, com intervalo de seis meses entre elas. O valor de cada dose varia de R\$ 132,76 à R\$ 138,53 referentes às alíquotas do ICMS vigentes nas regiões do Brasil (36).

Os principais sintomas causados pela doença são: febre alta (40°C), dor de cabeça, dores musculares e nas articulações, dores no fundo dos olhos, náuseas, vômitos, manchas na pele, erupção cutânea característica e em alguns casos, pode ocorrer uma evolução da doença iniciando um quadro mais grave (37, 38). Esses sintomas são relatados aproximadamente 10 dias após a incubação do vírus no paciente, período clínico-epidemiológico que pode variar de 4 a 10 dias. A infecção com um dos quatro sorotipos da dengue DENV 1-4, proporciona imunidade ao longo da vida contra esse sorotipo, mas apenas uma proteção parcial contra os outros sorotipos. Por exemplo, se o paciente contrair o DENV 1, ele ainda pode ser infectado com os sorotipos 2, 3 e 4 ao longo de sua vida (39).

O diagnóstico da doença é primeiramente realizado a partir dos sintomas clínicos apresentados pelo paciente associado com alterações do exame físico, mas ambos não são específicos, podendo resultar em um diagnóstico equivocado e errado, pois outras doenças podem apresentar sinais em comum com a dengue (40). Após avaliação médica e suspeita que o paciente esteja com dengue, testes laboratoriais são requisitados para confirmar os grupos específicos. Testes sorológicos como Imunoglobulina M (IgM) e Imunoglobulina G (IgG) (7), bem como ensaio de imunoabsorção enzimática [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)] (41), transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase [reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)] (42) e detecção da proteína não estrutural 1 (NS1) por testes rápidos [*point-of-care* (POC)] (43) são os exames comumente realizados. Contudo, não combinam ainda com alta sensibilidade, especificidade e rapidez para serem utilizados como ferramentas únicas de diagnóstico e em alguns casos, podem levar dias para obtenção dos resultados, além de um alto custo de análise e pessoas capacitadas para realização (7, 41-45). Sabemos que hoje a dengue é considerada pelo MS um grande problema de saúde pública no Brasil. Além do prejuízo e debilitação na saúde da pessoa que contrai a doença, também causa um grande impacto econômico no país e no mundo, fazendo com que os governos invistam tempo e dinheiro no desenvolvimento de ferramentas para o

diagnóstico da doença. Podemos citar como custos diretos aos cofres públicos gastos com medicamentos, hospitais, campanhas de prevenção, eliminação do mosquito, pagamentos trabalhistas, entre outros. Já os custos indiretos abrangem baixa produtividade no ambiente de trabalho pelo paciente levando a um baixo rendimento da empresa, baixa qualidade de vida e outros fatores como mostra a **Figura 3** (25). Por isso, faz-se cada vez mais necessário, o desenvolvimento de metodologias analítica que possuam características como: rapidez de análise, baixo custo, não invasiva e fácil aplicabilidade para melhorar o atendimento aos pacientes.

Figura 3: Custos diretos e indiretos causados pelo impacto econômico decorrente do vírus da dengue.



Fonte: Adaptado de Mayer, S.V.; Tesh, R.B.; Vasilakis, N. 2017.

1.3 Biossensores e Nanomateriais

Levando em conta os métodos diagnósticos, suas limitações e impacto econômico, faz necessário o desenvolvimento de uma nova metodologia para o diagnóstico rápido, simples e eficaz dessa doença, proporcionando dessa maneira um tratamento adequado aos pacientes. Nos últimos anos, a utilização de biossensores para testes diagnósticos vem ganhando cada vez mais espaço no mercado comercial, pois proporciona uma análise rápida e continua das amostras *in vivo* e em tempo real (46). Um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (também chamado de elemento de reconhecimento biológico) como: enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, aptâmeros, entre outros, ligado a um transdutor que irá converter o sinal biológico em sinal elétrico, óptico, gravimétrico, ou térmico gerando um sinal mensurável para leitura (47, 48). O

desenvolvimento e utilização de biossensores começou a partir dos anos 60, quando o bioquímico Leland C. Clark Jr. e o microbiologista Champ Lyons conseguiram medir quantitativamente glicose em meio aquoso mediante um sensor eletroquímico de oxigênio (eletrodo de Clark) acoplado a enzima glicose oxidase, vindo a ser comercializado anos depois pela empresa Yellow Springs Instruments (46, 49).

Na construção dos biossensores, a escolha do material biológico a ser usado, que ficará na superfície do transdutor, é de extrema importância, pois a amostra a ser analisada precisa reagir seletivamente com o material biológico escolhido. Uma variedade de amostras pode ser analisada pelos biossensores variando de amostras animais (50), ambientais (51), alimentícias (42, 53), amostras humanas (54) e de cultivo celular (55). Para a detecção, a amostra desejada é imobilizada na superfície do transdutor que irá monitorar o produto dessa reação.

Duas classes distintas classificam os biossensores sendo elas de afinidade e catalíticas. Na classe catalítica a amostra desejada irá interagir com o material biológico que está imobilizado na superfície do transdutor gerando um substrato. Nessa classe, destaca-se principalmente o uso de enzimas como material biológico. Na classe dos biossensores de afinidade, a amostra desejada irá ligar-se com o material biológico que está imobilizado na superfície do transdutor, destacando-se o uso de anticorpos. Para a produção de um imunossensor (sensor que detecta a reação imunológica) a imunoglobulina IgG é o anticorpo mais utilizado, apresentando alta especificidade e seletividade com o antígeno de interesse (56).

A empregabilidade e construção dos biossensores no mercado comercial e na área de pesquisa ocorrem principalmente pela simplicidade, baixo custo de análise, versatilidade e pela possibilidade de detecção de amostras dos mais variados interesses (57, 58). Nos últimos anos, a utilização de nanomateriais (escalas que variam de 1 a 100 nm) na construção de biossensores vem sendo relatada por diversos autores em pesquisas nas áreas de biotecnologia e nanociência, como por exemplo: na detecção de pesticidas, hormônios, vírus e bactérias, pois apresentam características singulares, como: alta compatibilidade, otimização significativa no volume de amostra utilizada, tempo de análise, limite de detecção, possível detecção de analitos em amostras inutilizáveis em métodos clássicos, estabilidade e fácil funcionalização com proteínas, o que os tornam ideais na produção de kits de análises (59-61). Dentre os nanomateriais utilizados na produção dos biossensores, podemos destacar o uso de nanotubos de carbono (62-64), polímeros (65, 66), nanofibras (67) e nanopartículas (68).

1.4 Nanopartículas de Ouro

Nanopartículas metálicas vem sendo utilizadas com uma variedade de aplicações em sistemas de detecção, para produzir novos tipos de biossensores como plataforma de detecção. O desenvolvimento de ensaios baseados em nanopartículas metálicas tem sido amplamente utilizado para diagnosticar doenças humanas (69). As propriedades únicas das nanopartículas as diferem de outros materiais se tratando de atividade catalítica, boa condutividade, área de superfície altamente ativa e estabilidade química melhorada.

Segundo *Selvakumar et al.* (70), as nanopartículas de ouro (AuNPs) são materiais ideais na produção de biossensores, pois apresentam entre tudo, propriedades ópticas e eletrônicas únicas, tornando-as adequadas na aplicação de imunoensaios, além disso, diversos autores têm utilizados AuNPs, pois os resultados apresentados mostram que a metodologia é simples e estável de se trabalhar, quando comparadas com outros métodos que utilizam um sistema convencional com fluorescência (70, 71). Quando falamos em AuNPs na produção de biossensores, podemos destacar sua alta compatibilidade com outros materiais, fácil síntese, baixa citotoxicidade, fácil funcionalização com amostras biológicas, simplicidade, facilidade, tamanho, forma e possibilidade de acoplamento com vários ligantes (ácidos nucleicos, aptâmeros, enzimas e anticorpos). Além disso, as AuNPs apresentam propriedades eletrônicas e ópticas únicas, tornando-as uma plataforma adequada para serem utilizada em imunoensaios, testes para detecção de hormônios e pesticidas (72, 73).

A utilização das AuNPs para métodos diagnósticos é muito vantajosa e eficaz, devido a uma combinação de baixo custo, facilidade de conjugação e propriedades ópticas singulares (74). A formação de AuNPs ocorre quando o ouro no complexo HAuCl_4 com íons Au^{3+} são reduzido a átomos de ouro neutro (Au^0), utilizando um agente redutor. A metodologia de redução química utilizando como agente redutor citrato de sódio foi amplamente descrita, porque pode ser preparada em grandes quantidades de uma maneira simples e com baixo custo (75). Uma forma simples de observar a formação de AuNPs é através da sua coloração, que muda do amarelo para vermelho escuro quando as partículas são menores que 100 nm, proporcionando realizar análises colorimétricas a partir de mudanças na densidade da cor de acordo com o analito analisado, resultando em um diagnóstico visual e rápido, uma vez que a solução irá mudar sua tonalidade em apenas alguns minutos após a adição do analito (76).

Contudo, a grande limitação na produção e utilização das AuNPs se dá pelo fato da agregação natural que ocorre entre elas em um período de tempo relativamente curto, o que não torna possível

sua empregabilidade para produção comercial, pois aumentará a forte força de atração de van der Waals entre AuNPs (75), o que pode causar perda de atividade catalítica, condutividade reduzida e diminuição da estabilidade química, tornando-as não adequadas para o desenvolvimento de biossensores. Para evitar a formação de aglomerados, metodologias diversas foram descritas, tais como, o uso de polímeros, líquidos iônicos, tensioativos, método de redução aquosa a diferentes pHs e uso de surfactantes, porém nem todos são eficientes para experimentos de longo prazo (77, 78).

O uso das AuNPs na produção de imunoenaios diferem-se do uso de outros materiais devido as suas propriedades colorimétricas, onde a formulação das AuNPs é projetada para absorver e dispersar comprimentos de onda específicos de luz e gerar um padrão de cor específico, que pode ser ajustado alterando o tamanho, a forma e a composição do material, medidos por meio de ressonância plasmônica de superfície (SPR) e ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) (78, 79).

1.5 Nanopartículas de Óxido de Ferro

A utilização de nanopartículas como plataforma na construção de biossensores apresentam uma ampla vantagem em relação a outros materiais, devido aos seus diversos tamanhos (80), morfologia (81), área de superfície, baixa citotoxicidade (82), propriedades ópticas (83) e manipulação magnética em estudos clínicos. Dentre diversas nanopartículas descritas na literatura, as nanopartículas de óxido de ferro vêm sendo expansivamente exploradas devido a suas propriedades magnéticas, custo, síntese e fácil bioconjugação com outros elementos, originando nanomateriais híbridos (84). Recentemente, nossos colaboradores desenvolveram uma nanopartícula superparamagnética constituída de maghemita estequiométrica ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), apresentando algumas características que as difere de outras sínteses de métodos clássicos, proporcionando uma alta estabilidade coloidal, ligações de superfície reversíveis a moléculas orgânicas, alta afinidade em sua superfície com proteínas e peptídeos e propriedades de eletrocatalises (85).

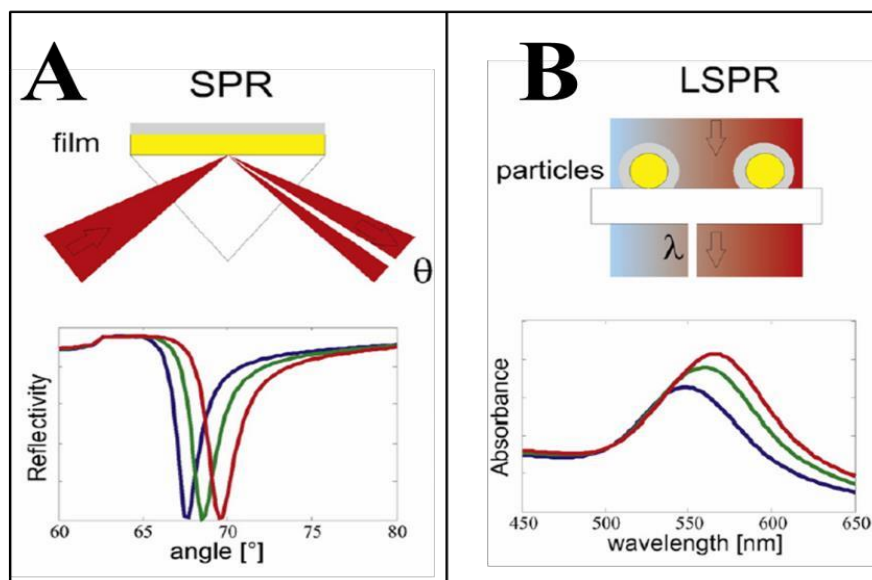
Devido a alta estabilidade das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ em água e a possibilidade de separação magnética fornecendo propriedades físicas e químicas únicas, diferentes trabalhos utilizando as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ foram descritos, como análise de proteínas corona em amostras de leite (86), detecção de toxinas (87), experimentos eletroquímicos (85), imobilização de biomoléculas destacando a formação do complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{DNA}$ (88) e diagnóstico de doenças (89).

1.6 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada

A ressonância plasmônica de superfície (SPR) que detecta mudança na intensidade da reflectância ou ângulo de filmes finos de alguns metais, já vem sendo comercializada por quase duas décadas e é comumente usada para se estudar a cinética e força das interações de ligação (7). Essa técnica baseia-se em estudos de propriedades ópticas, onde a oscilação da densidade de uma carga longitudinal no decorrer da interconexão entre dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos geram uma medida mensurável para leitura. O sensor de metal utilizado no equipamento como plataforma de detecção deve ser um bom condutor apresentando propriedades de elétrons livres, destacando-se a utilização de filmes de ouro e prata (7, 90). Porém, atualmente nanopartículas (NPs) de metal nobre são cada vez mais utilizadas como alternativa a sensores SPR, porque os campos eletromagnéticos altamente localizados que ocorrem na superfície das nanopartículas permitem uma melhor detecção de analitos biológicos, uma vez que permite a detecção de interações moleculares próximas de sua superfície, através de mudanças no pico do espectro da ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR).

A LSPR é um fenômeno que ocorre quando a frequência do fóton de luz incidente entra em ressonância com os elétrons da banda de condução (elétrons livres) (91). A diferença entre SPR e LSPR, é que na SPR os elétrons livres da camada de valência presentes na superfície do sensor de ouro entram em ressonância com a luz incidida, vindo a emitir luz, essa emissão ocorre em ambos os eixos x e y da superfície, se propagando continuamente (**Fig. 4A**). Já na LSPR, essa ressonância fica confinada na superfície das NPs e a propagação ocorre em apenas um eixo com número de elétrons consideravelmente maior, contribuindo para que ocorra o fenômeno de ressonância (**Fig. 4B**). Suspensões de NPs de metais nobres como o ouro, interagem fortemente com a luz, dando origem a soluções coloridas, causada pela absorção de luz na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (92).

Figura 4: Esquema de funcionamento da SPR e da LSPR. A) Na SPR a luz polarizada atravessa um meio óptico denso alcançando um meio menor, sendo então refletida para o meio menos denso com uma redução na intensidade da luz, detectada por um arranjo de fotodiodos. B) Na LSPR a luz incidente atinge a NP que oscila entrando em ressonância e se propagando em um único eixo.



Fonte: Jatschka, J. 2016.

Diversas metodologias têm sido usadas para detectar uma grande variedade de processos, incluindo a formação de monocamada auto-organizável (SAMN) (93), ligação metal proteína e interações anticorpo-proteína (94), hibridação de DNA (95), mudança conformacional de proteína (72) e detecção de vírus e patógenos (73). O índice de refração do pico de excitação das AuNPs é altamente dependente do material biológico acoplado a ela. Logo, qualquer mudança na parte biológica atreladas as AuNPs provoca alterações no comprimento de onda (96, 77).

Nesse contexto, a produção de biossensores utilizando nanopartículas de ouro para a produção de kits para detecção da dengue aparece como uma alternativa, pois poderá proporcionar a realização de testes em localidades afastadas de laboratórios, além de proporcionar um menor custo de análise e tempo. Portanto, as tarefas desafiantes desta tese foram: 1) Realizar a síntese e caracterização das AuNPs que servirão como suporte para a produção dos kits. 2) Estudar os processos de ligações do vírus aos anticorpos imobilizados na superfície das AuNPs. 3) Promover a detecção do vírus da dengue.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia para elaboração de kits no tocante ao diagnóstico rápido e simples dos quatro sorotipos da dengue, utilizando como plataforma de detecção nanopartículas de ouro e de maghemita.

Objetivos específicos:

- *Preparação e caracterização das nanopartículas de ouro.*
- *Caracterização dos anticorpos imobilizados através de monocamadas auto- organizadas na superfície das nanopartículas.*
- *Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação em amostras.*
- *Validação das metodologias propostas.*

3. PARTE EXPERIMENTAL

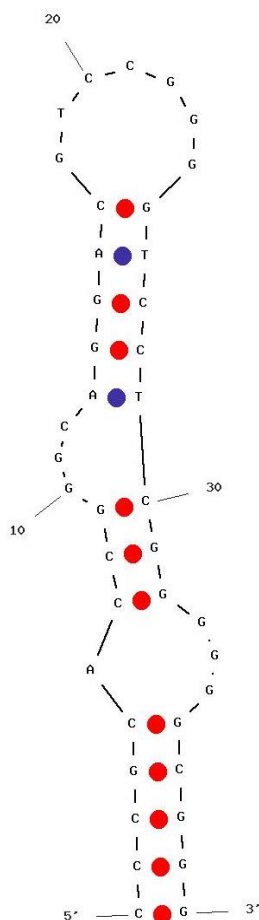
3.1 Reagentes Utilizados

11-ácido mercaptoundecanóico (MUA) 95%, 3-ácido mercaptopropionico (MPA) 99%, N-hidroxissuccinimida (NHS) 98% e N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), etanol absoluto 99%, tween 20, glicina, albumina sérica bovina (BSA) 98%, ferroceno (Fc), citrato de sódio dihidratado 99%, detergente Alconox, (III) cloreto de ouro trihidrato (HAuCl_4) 99,99% e tampão fosfato salino (PBS pH 7,4) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Água deionizada (18,2 M Ω) utilizada em todos os preparos das soluções foi obtida a partir de uma unidade Millipore Milli-Q (EUA).

O anticorpo monoclonal [D1-11 (3)] para o vírus da dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4) foi adquirido da empresa GeneTex (EUA). Os ratos foram imunizados com uma mistura dos quatro sorotipos e suas células do baço foram utilizadas para preparar hibridomas e clones selecionados com base na capacidade do anticorpo produzido em reagir com cada sorotipo de dengue (dados fornecido pelo fabricante) (97). O anticorpo foi escolhido a partir da capacidade de reagir com os diferentes sorotipos.

A sequência do aptâmero utilizada nesse trabalho foi 5'-SH/-CCCGCACCGGGCAGGACGTCCGGGGTCCTCGGGGGGCGGG-3' (20,21 nmol), adquirida da empresa Biosearch Technologies (Novato, CA, EUA). O terminal 5' foi modificado com o grupo SH para realizar ligações as AuNPs e diluído em água deionizada de acordo com o protocolo do fabricante. A estrutura em formato hairpin do aptâmero foi analisada pela plataforma IDT OligoAnalyzer e é demonstrada na **Figura 5**.

Figura 5: Estrutura do aptâmero para dengue, analisado pela plataforma IDT OligoAnalyzer.



3.2 Amostras de Dengue, Zika e Vírus da Febre Amarela

Amostras dos quatro sorotipos da dengue (DENV 1-4) e do zika vírus (ZIKV) foram obtidas do Laboratório de Pesquisas em Virologia do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. A taxa viral foi calculada de acordo com *Kulkarni et al. (98)*, usando o método $DICT_{50}$, apresentando um título médio de 10^7 ($DICT_{50}$). Os vírus da febre amarela utilizados no trabalho foram provenientes de vacinas fornecidos pelo Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Unesp-Botucatu. Todas as amostras foram testadas em triplicata e previamente por meio das técnicas de ELISA e RT-qPCR. Para preparar o pool do vírus da dengue, 100 μ l de cada sorotipo (DENV 1-4), foram misturados em um tubo.

3.3 Cultivo Celular e Expansão do Vírus da Dengue

Para o cultivo celular foi utilizada a linhagem de células C636 que estavam armazenadas em galão de nitrogênio no departamento de Microbiologia e Imunologia– IBB-UNESP-Botucatu. O cultivo das células foi feito em 24 garrafas de 25 cm² contendo meio Leibovitz's ((L-15) Gibco BRL), adicionado de 10% de caldo de triptose fosfato e 10% de soro fetal bovino, mantidos a 28°C. Após a monocamada de células estarem formadas, o que ocorreu em aproximadamente dois dias, cinco garrafas foram infectadas com cada sorotipo (DENV 1, 2, 3 e 4) e quatro garrafas foram mantidas como controles negativos (sem infecção) uma para cada sorotipo, totalizando 24 garrafas. A etapa de infecção seguiu o seguinte protocolo:

- 1- Pegar as garrafas com 80-85% de confluência (prontas para infecção);
- 2- Desprezar parte do meio, deixando 1 mL na garrafa;
- 3- Adicionar 100 µL do sorotipo (amostra) na garrafa pra infecção;
- 4- Na garrafa controle, adicionar 100 µL do meio Leibovitz's;
- 5- Colocar na estufa a 28°C durante uma hora, homogeneizando a cada 15 minutos;
- 6- Após uma hora, colocar em cada garrafa 4 mL do meio Leibovitz's+ 1% de soro fetal bovino;
- 7- Deixar a garrafa na estufa a 28°C por aproximadamente 7 dias (**Fig. 6**).

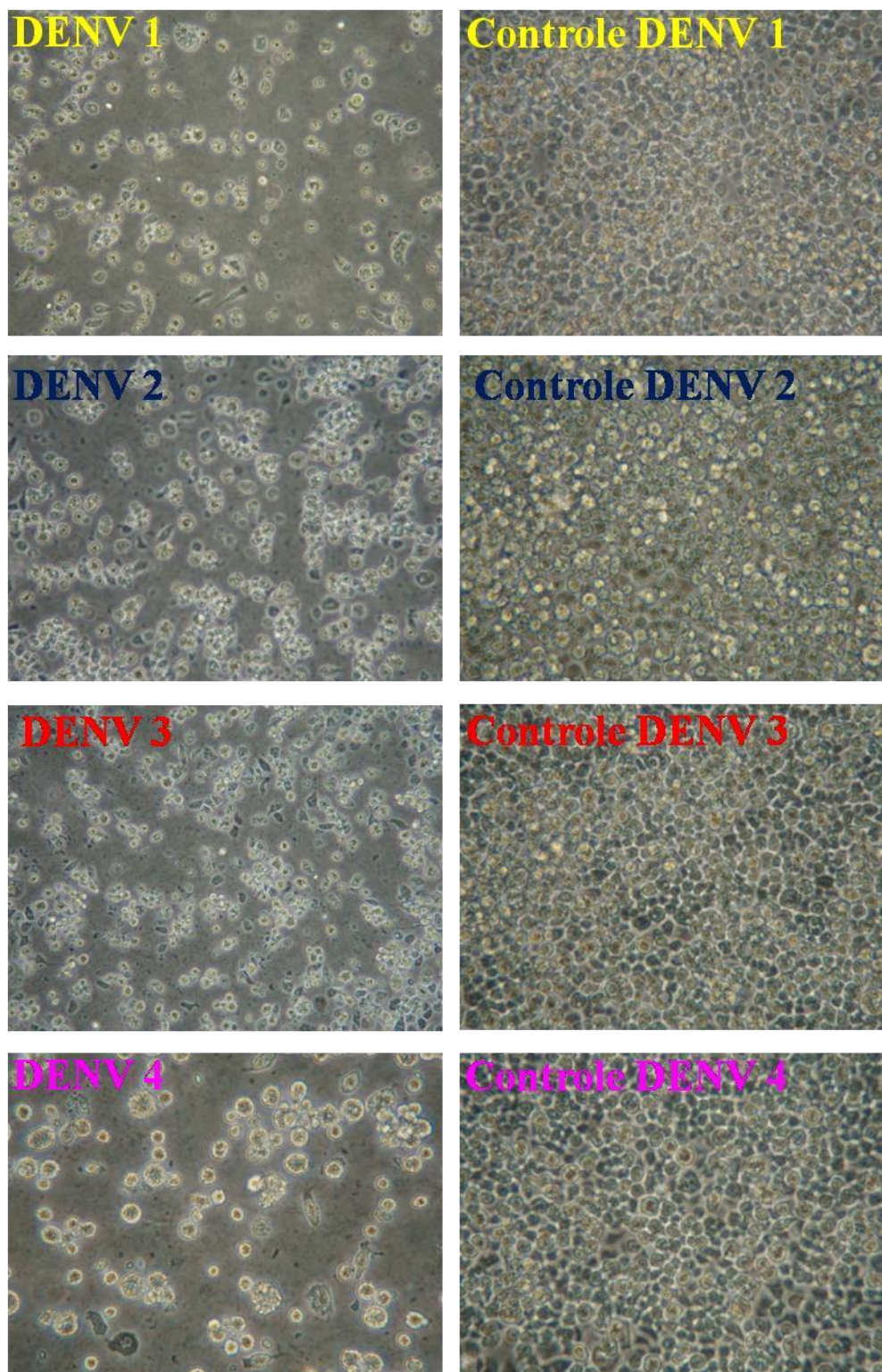
Figura 6: Garrafas do cultivo celular infectadas com os sorotipos 1, 2, 3 e 4.



Fonte: Autoria própria.

Passado os 7 dias aproximadamente, as garrafas infectadas com os sorotipos apresentaram alta taxa de efeito citopático, enquanto as garrafas controles mantiveram o tapete celular intacto. Tal efeito foi observado utilizando um microscópio invertido Carl Zeiss Axiovert 40 C (**Fig. 7**).

Figura 7: Imagens de MET obtidas das garrafas infectadas com os sorotipos da dengue e seus respectivos controles.



Fonte: Autoria própria.

A segunda etapa realizada para obtenção do vírus foi a seguinte:

- 1- Congelar as garrafas por 24 horas a -70°C ;
- 2- Após esse tempo, descongelar as garrafas em gelo, para que ocorresse o rompimento das células e consequente liberação dos vírus;
- 3- O conteúdo de cada garrafa foi desprezado dentro de tubos *falcon* de 15 mL;
- 4- Os tubos foram centrifugados a 800 g por 5 minutos a 4°C ;
- 5- O sobrenadante que continha os vírus foi armazenado em tubos a -70°C até o momento do uso e o *pellet* gerado foi descartado.

3.4 Análise de RT-qPCR

Para confirmar a presença dos vírus da dengue nas amostras de cultivo celular, análise utilizando a técnica de RT-qPCR foi realizada para cada garrafa. Primeiramente foi realizada a extração do RNA utilizando o kit de extração da Norgen Biotek Corp, de acordo com o seguinte protocolo:

- 1- Em um microtubo de centrifugação de 2,0 mL foi adicionado 350 μL de da solução Lysis do kit e 100 μL da amostra;
- 2- Microtubo vortexado por 1 minuto;
- 3- Adicionar ao microtubo 200 μL de etanol (99,5%) a -20°C ;
- 4- Microtubo vortexado por 30 segundos;
- 5- Passar a solução do microtubo para a coluna de sílica do kit;
- 6- Centrifugar a 14000 rcf por 1 minuto a 4°C ;
- 7- Descartar o líquido da coluna;
- 8- Adicionar a coluna 400 μL da solução Wash do kit;
- 9- Centrifugar a 14000 rcf por 1 minuto a 4°C ;
- 10- Descartar o líquido da coluna;
- 11- Adicionar a coluna 400 μL da solução Wash do kit;
- 12- Centrifugar a 14000 rcf por 2 minutos a 4°C ;
- 13- Descartar o líquido da coluna;
- 14- Reposicionar a coluna em um novo microtubo de 2,0 mL;

- 15- Adicionar a coluna 50 μ L da solução Elution Buffer do kit;
- 16- Centrifugar a 2000 rcf por 2 minutos a 4°C;
- 17- Centrifugar a 14000 rcf por 1 minuto a 4°C; 18- Descartar a coluna;
- 19- Armazenar o RNA extraído imediatamente no gelo.

As análises de RT-qPCR foram realizadas utilizando o Kit Onestep Promega e os primers qDENV F (forward) 5'-TTAGAGGAGACCCCTCCC-3' e qDENV R2 (reverse) 5'-GAGACAGCAGGATCTCTGG-3'. Os resultados mostraram amplificação da curva de Melt, com uma redução no ciclo de Threshold quando houve a presença do RNA dos sorotipos da dengue.

3.5 Metodologia

3.5.1 Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Ouro.

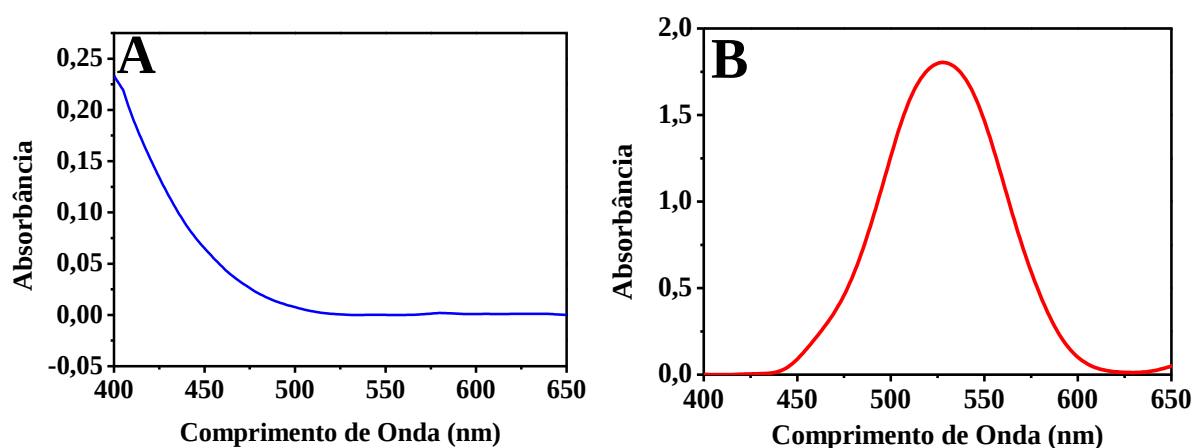
As AuNPs foram preparadas por meio da mistura de duas soluções, HAuCl_4 e citrato de sódio. A primeira solução foi preparada diluindo 0,004 g de HAuCl_4 em 10 mL de água deionizada e a segunda, a partir da diluição de 0,1 g de citrato de sódio em 10 mL de água deionizada. Em um frasco Erlenmeyer sobre um agitador magnético foram adicionados os 10 mL da solução de HAuCl_4 que permaneceu sobre agitação e aquecimento a 100°C até o ponto de ebulição. Após isso, 2 mL da solução de citrato de sódio foi adicionado ao frasco Erlenmeyer fazendo com que a solução que apresentava uma coloração amarela passasse para vermelho escuro em alguns segundos. Quando a solução atingiu essa coloração, a temperatura foi desligada e a solução permaneceu em agitação por mais 5 minutos (**Fig. 8**). Após essa etapa, a solução foi resfriada em temperatura ambiente ao abrigo de luz e então armazenada em um vidro âmbar. O citrato de sódio reduziu os íons do ouro para nanopartículas de ouro metálico e os excessos de ânions do citrato na solução mantiveram a superfície metálica do ouro dando uma carga negativa para cada nanopartícula.

Figura 8: Síntese das nanopartículas de ouro. A solução amarela é referente ao sal HAuCl_4 passando para coloração vermelha quando reduzido com citrato de sódio, formando as nanopartículas.



A solução de HAuCl_4 em 10 ml de água deionizada foi analisada através do equipamento de UV-Vis para provar que sem a utilização de um agente redutor, como o citrato de sódio não se observa o pico de absorbância (**Fig. 9A**). As AuNPs sintetizadas por meio da redução do HAuCl_4 com citrato de sódio também foram analisadas pelo UV-Vis, apresentando uma absorção máxima na faixa de 520 nm, resultado esse compatível com a literatura (**Fig. 9B**) (80).

Figura 9: Espectro UV-Vis. A) Solução de HAuCl_4 não interagindo com a luz. B) Solução de AuNPs absorvendo a luz em 520nm.



3.5.2 Preparação e Caracterização das Monocamadas Auto-Organizadas sobre as Nanopartículas de Ouro.

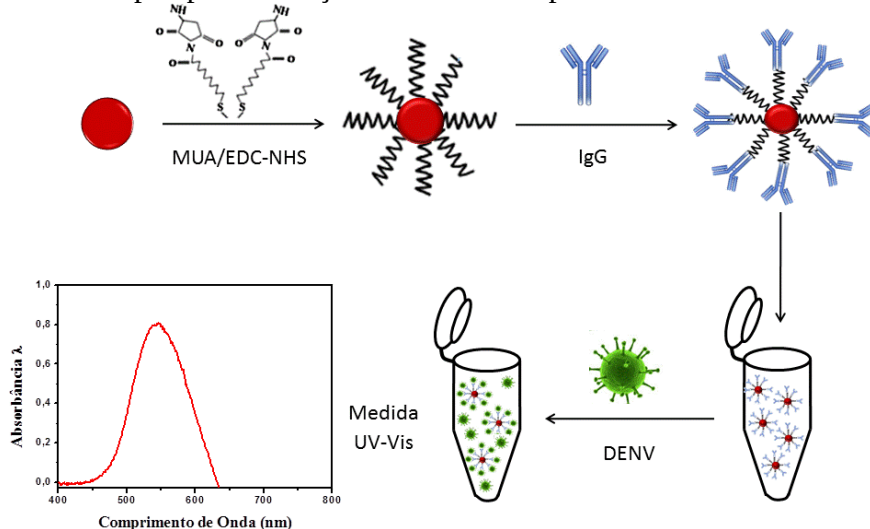
Monocamadas auto-organizadas (SAMs) foram formadas sobre as AuNPs servindo como moléculas ancoras para a fixação dos anticorpos. A vantagem de se trabalhar com SAMs, é que elas proporcionam ótimas condições conformacionais, além de estabilidade e um excelente microambiente para atividades biocatalíticas, proporcionando orientar biomoléculas sobre as nanopartículas sem que ocorra desnaturação (99). Para a produção das SAMs alcanotióis foram utilizados, a partir de solução com 11-ácido mercaptoundecanóico (MUA), proporcionando a adsorção irreversível do tiol selecionada à superfície das AuNPs. Decorrente esta etapa, os grupos tióis foram modificados com o grupo N-hidroxisuccinimida criando ligações covalentes com a amina dos anticorpos. A caracterização das SAMs sobre as nanopartículas foi realizada utilizando diferente técnicas, como: SPR, LSPR e MET. As técnicas de SPR e LSPR forneceram as cinéticas de adsorção e dessorção de todo processo em tempo real, além das propriedades dielétricas e a espessura das SAMs formadas.

3.5.3 Modificações nas Superfícies das AuNPs

Para produção do imunossensor as AuNPs foram utilizadas como base e sua síntese ocorreu como descrito no item 3.5.1 com a utilização de Tween20 19 mg/mL. As AuNPs obtidas apresentaram diâmetro médio de $22,0 \pm 5,0$ nm e formato esférico com dispersão em solução, dados esses obtidos por meio da MET e análise do software ImageJ. A medida do tamanho das AuNPs foi repetida várias vezes e não foi encontrada diferença significativa, indicando um colóide estável. A concentração do colóide foi encontrada assumindo a redução completa do HAuCl_4 (100).

A modificação da superfície das AuNPs foi feita através da deposição de monocamadas auto-organizadas (SAMs) utilizando alcanotióis. Para isso, em 2 mL da solução de AuNPs adicionaram-se 100 μL de MUA $0,018 \text{ mol L}^{-1}$, em incubação a 25°C durante 1 hora, originando a adsorção irreversível do tiol a superfície das AuNPs. Os grupos carboxílicos terminais dos ligantes foram ativados com 200 μL de uma mistura 1:1 contendo $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ EDC e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NHS durante 1 hora. Este procedimento desencadeou a formação de ligações covalentes com as aminas dos anticorpos. 100 μL dos anticorpos monoclonais foram adicionados sequencialmente em uma concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ dando origem ao complexo AuNPs-anticorpo do biossensor. Para detecção do vírus da dengue, 100 μL de uma mistura contendo os quatro sorotipos de dengue (DENV 1, 2, 3 e 4) com um título médio de 10^7 (DICT_{50}) foram adicionados ao complexo e incubados durante 15 minutos (**Fig. 10**).

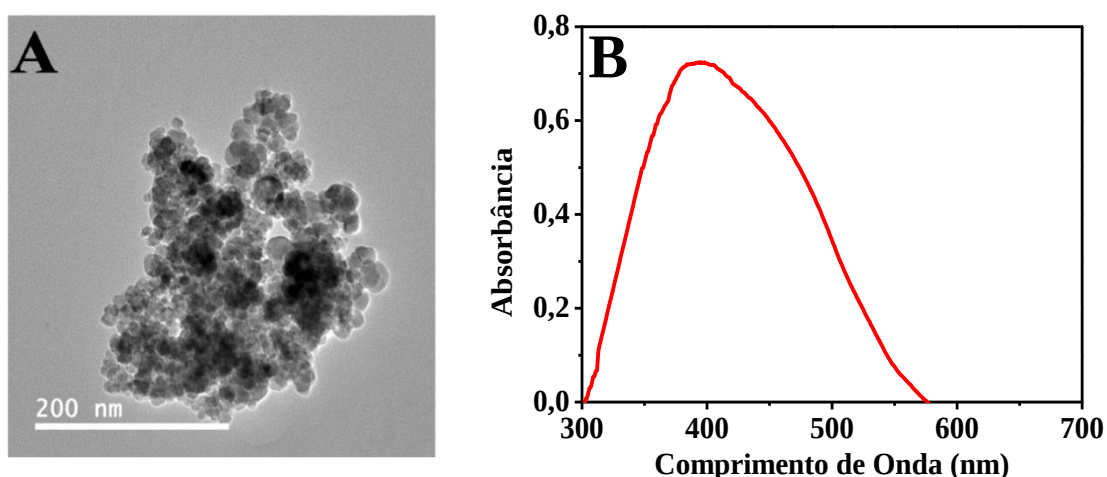
Figura 10: Representação esquemática da detecção do vírus da dengue. A imagem mostra a superfície das AuNPs modificadas com a formação das monocamadas auto-organizadas e a conjugação com os anticorpos para detecção do vírus no espectro UV-Vis.



3.5.4 Síntese e Caracterização das Nanopartículas de Óxido de Ferro.

As nanopartículas de óxido de ferro, foram sintetizadas e caracterizadas por nossos colaboradores da Universidade de Padova na Itália e descritas no trabalho *Magro et al. 2012a* [101]. O material resultante nanoparticulado foi caracterizado por Espectroscopia Mössbauer, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), MET, Difração de Raio X (DRX) e medições de magnetização conforme descrito no trabalho de *Magro et al. 2012b* [102], resultando em nanopartículas maghemita estequiométrica ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). As nanopartículas apresentaram diâmetro médio de 11 ± 2 nm (Fig. 11A) com uma absorbância de 0,72 e comprimento de onda de 394 nm (Fig. 11B).

Figura 11: (A) Imagens de MET das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ em escala de 200 nm, apresentando diâmetro médio de 11 ± 2 nm. B) Espectro UV-Vis.



3.5.5 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR)

As análises de LSPR foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível (UV-vis) Biohrom Lira S11 (BiochormLtd, Inglaterra). Os espectros foram obtidos em um comprimento de onda de 400-800 nm com passo de 1nm e velocidade de varredura de 500 nm min^{-1} , utilizando cubeta de poliestireno. Para fazer o espectro de referência, foi utilizada água deionizada Milli-Q antes de cada medida.

3.5.6 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

As interações moleculares entre os anticorpos monoclonais e o DENV foram investigadas utilizando um equipamento de ressonância plasmônica de superfície- SPR (AutoLab Springle®, Eco Chemie, Holanda). O sensor da SPR é um disco de ouro e foi adquirido a partir da Autolab. Apresenta diâmetro de 17 mm com uma espessura de ouro de 50 nm. Este sensor de ouro foi colocado em um prisma semi-cilindro e inserido no instrumento Autolab SPR para realização das análises.

3.5.7 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

Os experimentos da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram realizados utilizando um potenciostato Autolab III/FRA2 (Metrohm, NL). Todos os experimentos foram realizados utilizando um sistema de três eletrodos, contendo um contra-eletrodo de fio de platina, um eletrodo de referência saturado com Ag/AgCl (3 mol L^{-1}) e uma superfície de silício revestida com ouro como o eletrodo de trabalho. Os experimentos da EIS foram realizados em amplitude de 0,005V na faixa de frequência de 0,001 a 10,000Hz em solução tampão PBS 10 mM com $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Fc. A solução tampão foi desoxigenada com N_2 durante 10 minutos antes das medições eletroquímicas. As medições foram realizadas sob a tensão de circuito aberto com uma configuração de duas sondas em que o eletrodo de referência separado não foi utilizado. Todos os espectros de impedância foram ajustados aos circuitos elétricos equivalentes utilizando software NOVA (Metrohm, NL).

3.5.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDX)

Os aspectos e modificações das AuNPs e dos kits para diagnósticos do vírus da dengue (etapas 1 e 2, descritas nos resultados e discussão) foram caracterizados pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens foram adquiridas utilizando um Tecnai Spirit (Fei Company). Os aspectos e modificações na superfície das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e seu complexo (etapa 3, descrito nos resultados e discussão), foram caracterizados pela técnica de MET e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX), utilizando um JEOL- JEM2100 LaB_6 200 kV integrado com um sistema operacional EDX. As grades de cobre utilizadas como suporte para obtenção das imagens nos dois equipamentos foram recobertas com parafina e sobrepostas sobre 10 μL de amostra, em seguida deixada para secar a temperatura ambiente durante toda a noite em vidro tampado.

3.5.9 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para analisar a homogeneidade e estimar o raio hidrodinâmico das AuNPs, alíquota das amostras foram analisada pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering – DLS), no aparelho DynaPro Titan (Wyatt Technology Corporation. As amostras foram filtradas em filtros Millex-GV 0,22 μm (Millipore®) e as medidas foram realizadas na temperatura de 20°C, com 100 aquisições de 10 segundos cada utilizando cubeta de quartzo.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Etapa 1: Nanopartículas de Ouro

Como mencionado anteriormente, a agregação natural das AuNPs é observada ao longo do tempo vindo a causar perda da atividade catalítica que leva a redução da condutividade e a uma diminuição da estabilidade química, tornando-as não favoráveis para produção de biossensores (77). Deste modo, objetivando a produção comercial de um kit para detecção do vírus da dengue, a estabilidade e dispersão das AuNPs foi avaliada por meio de diferentes metodologia. Utilizamos a preparação das nanopartículas na presença de surfactante e pelo controle do pH ao longo de um ano. Essas duas metodologias são citadas na literatura como métodos eficientes para nosso objetivo (77, 103).

4.1.1 Preparação das AuNPs e estabilização por redução aquosa (diferentes pHs)

A síntese das AuNPs ocorreu conforme descrito anteriormente no item 3.5.1. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a solução foi dividida em dois grupos distintos, nomeados de A e B. Em cada grupo continham quatro alíquotas diferentes, tendo os seus pHs ajustado para 5,9; 6,2; 6,8 e 7,2 respectivamente. As alíquotas de AuNPs do grupo A foram armazenadas em vidro escuro na geladeira e as alíquotas do grupo B foram armazenada em vidro escuro sob temperatura ambiente, ambas durante um ano (03/2015 – 03/2016). A escolha do pH bem como seu ajuste utilizando soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH), foram embasadas no trabalho publicado por *Muangnapoh et al.* (77), que segundo os autores são condições ideais para a dispersão da ocorrência de AuNPs através do método de redução aquosa.

4.1.2 Influencia do pH e do Armazenamento na Dispersão das AuNPs

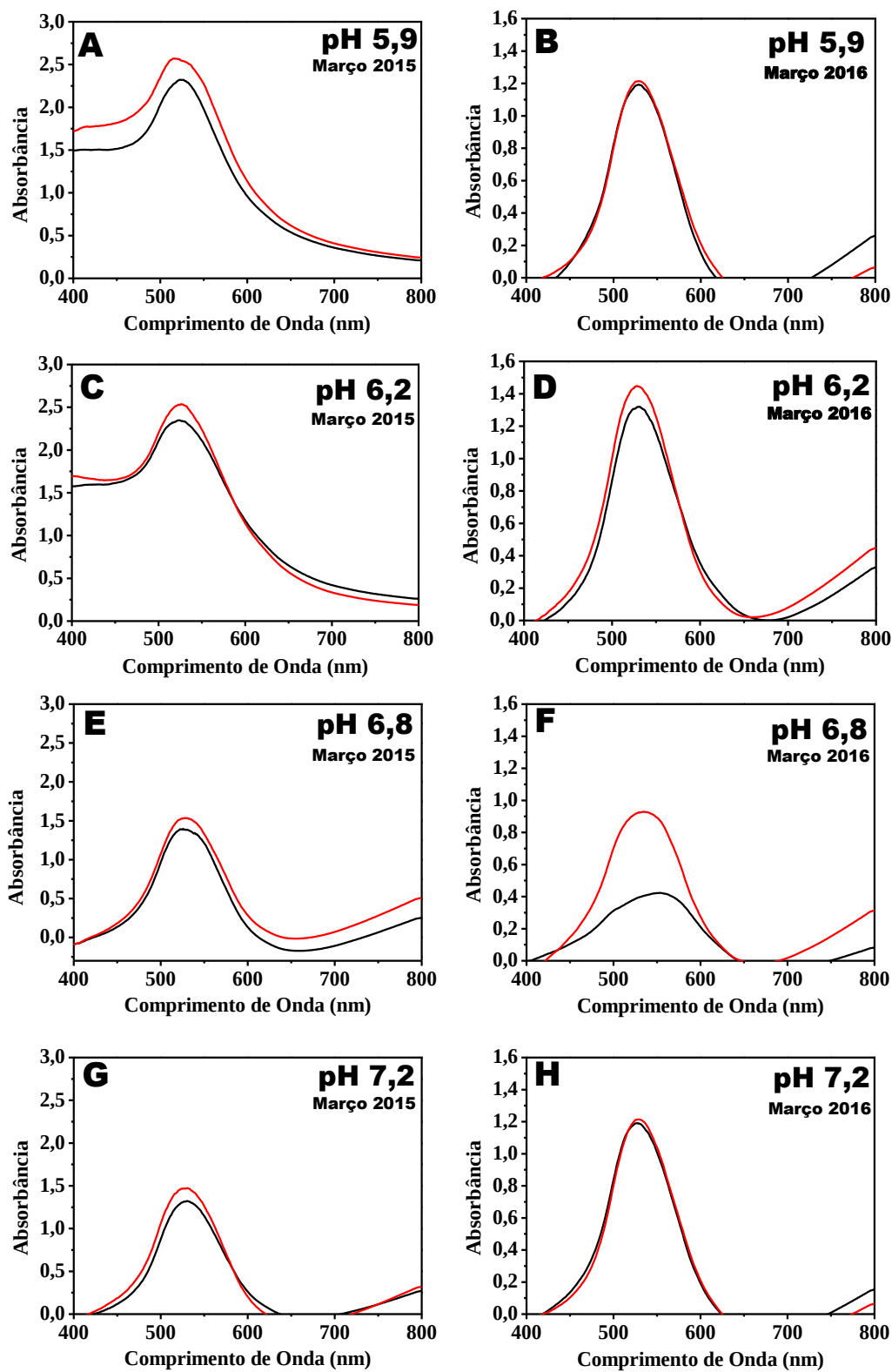
O objetivo da análise dos grupos A e B das soluções de AuNPs foi verificar se a temperatura e a presença de luz na forma de armazenamento produziram um impacto significativo na formação de agregados.

A caracterização das medidas das AuNPs foi realizada de 15 em 15 dias através da técnica de LSPR usando um espectrofotômetro UV-Vis e também por medição do pH de cada alíquota. Os primeiros resultados demonstraram que as alíquotas quando armazenadas em geladeira mantiveram uma maior dispersão quando comparadas as alíquotas armazenadas em temperatura ambiente, a qual

demonstrou uma agregação natural indicando que a temperatura no tempo de armazenamento interferiu significativamente. O resultado é demonstrado nas **Figuras 12-A, C, E e G**, onde as linhas vermelhas representam o armazenamento em geladeira e as linhas pretas o armazenamento em temperatura ambiente. Estas mesmas amostras foram armazenadas novamente nas mesmas condições e após um ano foram medidas igualmente, utilizando o mesmo equipamento de UV-Vis. Os resultados mostraram que as amostras a pH 6,2 e 6,8 (**Fig. 9D e 1F**) armazenadas em geladeira mantiveram uma absorção maior do que as amostras armazenadas à temperatura ambiente, o que era semelhante ao realizado no início. No entanto, as amostras com pH 5,9 e 7,2 (**Fig. 12B e 12H**) armazenadas tanto na geladeira como à temperatura ambiente não mostraram diferença significativa na absorção entre elas, demonstrando que a forma de armazenamento das AuNPs durante esse período não apresentou muita variação.

Ao comparar a forma de armazenamento das alíquotas com o mesmo pH, observou-se que em todos os casos houve uma diminuição da absorbância das amostras após um ano, indicando maior agregação. Para as AuNPs com pH 5,9 medidas em março de 2015 (**Fig. 12A**) observamos que houve uma diminuição na absorbância de 0,26 em comparação com a mesma amostra medida em março de 2016 (**Fig. 12B**). Já para a solução com pH 6,2 medida em março de 2015 (**Fig. 12C**), a diferença de absorbância foi de 0,17 em comparação com a medida de março de 2016 (**Fig. 12D**). A alíquota com pH 6,8 em março de 2015 (**Fig. 12E**) apresentou uma diferença de absorbância de 0,17, quando medida novamente em março de 2016 (**Fig. 12F**). A última comparação realizada mostrou que a solução a pH 7,2 em março de 2015 (**Fig. 12G**) apresentou uma diferença na absorbância de 0,16 após um ano (**Fig. 12H**). Com isso, verificamos que a mudança no pico de absorção dos gráficos é atribuída a um aumento no índice de refração local, a agregação das AuNPs reduz sua área superficial e consequentemente a LSPR diminui (104, 105). Logo concluímos que o armazenamento das AuNPs se mostrou mais eficiente, mantendo uma maior dispersão e estabilidade quando as amostras foram mantidas sob refrigeração.

Figura 12: Espectros de UV-Vis das soluções de AuNPs ajustados a diferentes pHs e armazenadas em geladeira (linha vermelha) e temperatura ambiente (linha preta). Análises realizadas em março de 2015 (A, C, E e G) e em março de 2016 (B, D, F e H).



4.1.3 Estabilização das AuNPs em Diferentes pHs ao Longo do Tempo

Logo após a síntese das AuNPs o pH aferido da solução foi de 7,0. Para chegar ao pH 7,2 solução de NaOH foi utilizada. No entanto, deve-se ter cuidado, pois o excesso de NaOH aumenta a concentração de íons OH que podem vir a interferir nos íons hidróxidos adsorvidos nas AuNPs (106, 107). Para diminuir o pH das outras alíquotas, solução de HCl foi adicionada em pequenas quantidades. Quando isso acontece, ocorre um aumento na concentração de íons H⁺ na solução (106, 108).

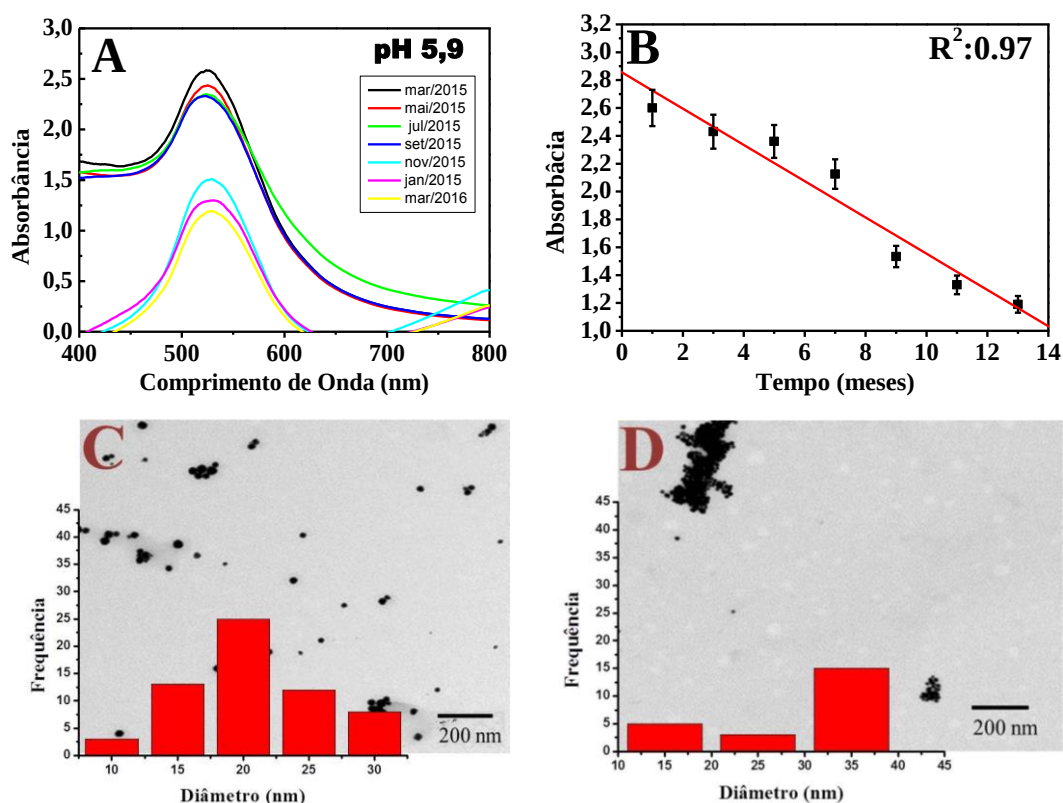
Conforme descrito na literatura, quando o pH permanece na faixa entre 5,9 e 7,2 a solução das AuNPs permanece dispersa e estável por um longo período de tempo sem aglomeração, pois mantém seu potencial elétrico (109). De acordo com o teste anterior realizado sobre a melhor forma de armazenamento, observou-se que nas alíquotas armazenadas em geladeira a estabilidade manteve-se por mais tempo em comparação com as alíquotas armazenadas em temperatura ambiente. No entanto, ao analisarmos as soluções de AuNPs armazenadas em geladeira, observamos que embora apresentassem vantagens em comparação as soluções armazenadas em temperatura ambiente, não mantiveram a estabilidade e a dispersão ao passar do tempo, formando pequenos grupos de aglomerados (**Fig. 13**). Ao analisarmos as amostras de pH 5,9 armazenadas em geladeira, o gráfico do UV-Vis mostrou que ao longo de um ano houve diminuição significativa na absorbância, de 2,59 em março de 2015 para 1,18 em março de 2016, totalizando uma queda de 1,41 que representa a ocorrência de aglomeração (**Fig. 13A**). As imagens de MET confirmam os resultados e mostram que em março de 2015 as AuNPs aparecem dispersas em solução, mas também apresentavam pequenos aglomerados (**Fig. 13C**). Após um ano, a imagem obtida usando MET mostrou um grande aglomerado com um diâmetro médio de 25 nm confirmadas por análise do programa ImageJ e pela técnica DLS (**Fig. 13D**). O gráfico com o coeficiente de determinação, Figura 13B, mostra R²: 0,97, resultado semelhante ao encontrado no trabalho de *Basso et al.* (80). Para as amostras com pH 6,2 houve também uma diminuição da absorbância que passou de 2,56 em março de 2015 para 1,44 em março de 2016 (**Fig. 13E**) com um R²: 0,98, Figura 13F. A imagem obtida através da MET mostra que em março de 2015 ocorreram pequenos aglomerados na solução, mas foi possível manter as divergências entre as AuNPs (**Fig. 13G**). No entanto, a mesma amostra em janeiro de 2016 mostrou uma forte aglomeração e baixa dispersão em solução (**Fig. 13H**) com diâmetro médio de 35 nm.

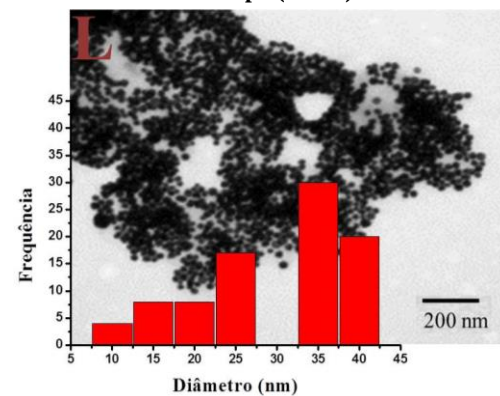
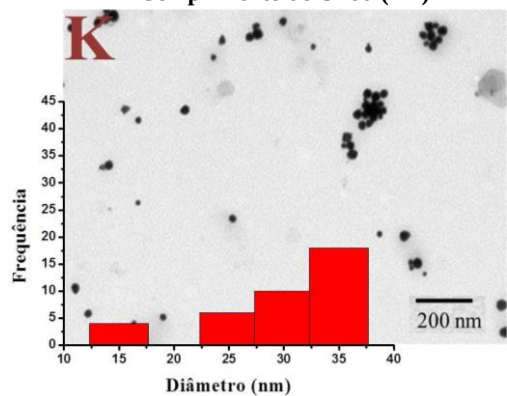
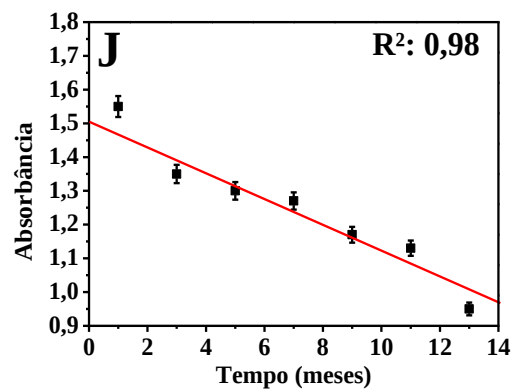
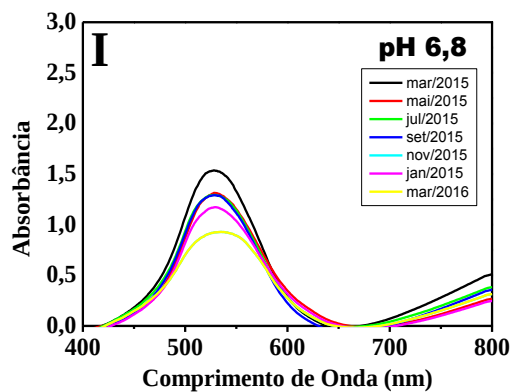
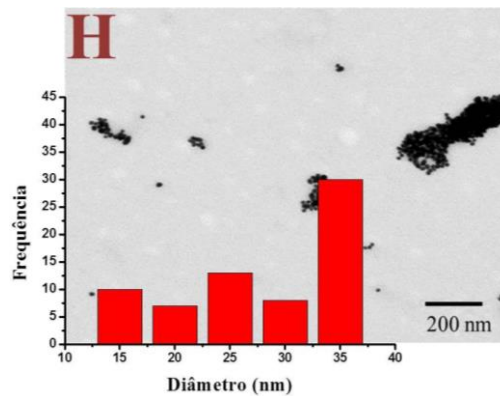
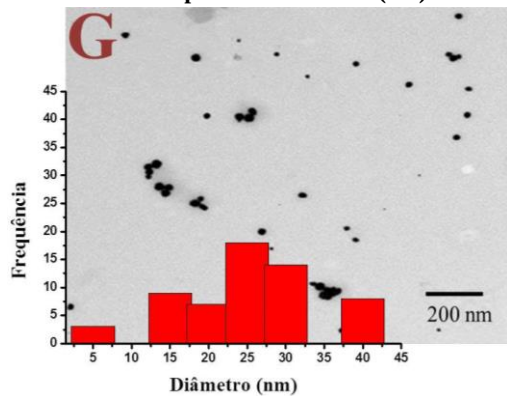
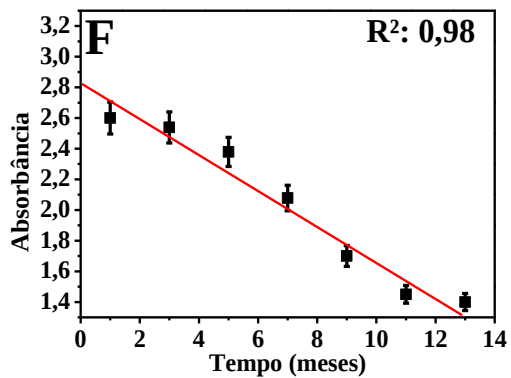
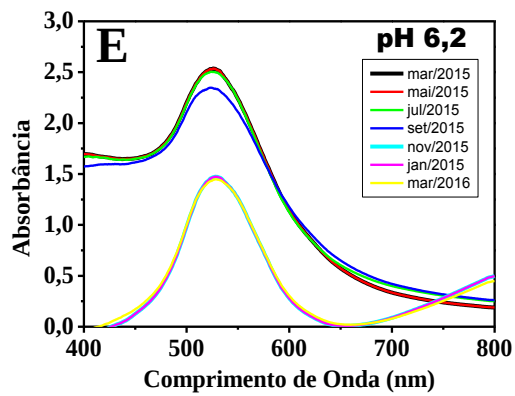
Quando analisamos as alíquotas com pH ajustado para 6,8 nas mesmas condições que as alíquotas anteriores, o gráfico mostra que houve aglomeração ao longo do tempo, representado pela diminuição gradual dos valores de absorbância que passou de 1,54 em março de 2015 para 0,93 em março de 2016 com queda de 0,61 (**Fig. 13I**). No entanto, essa queda foi menor quando comparada

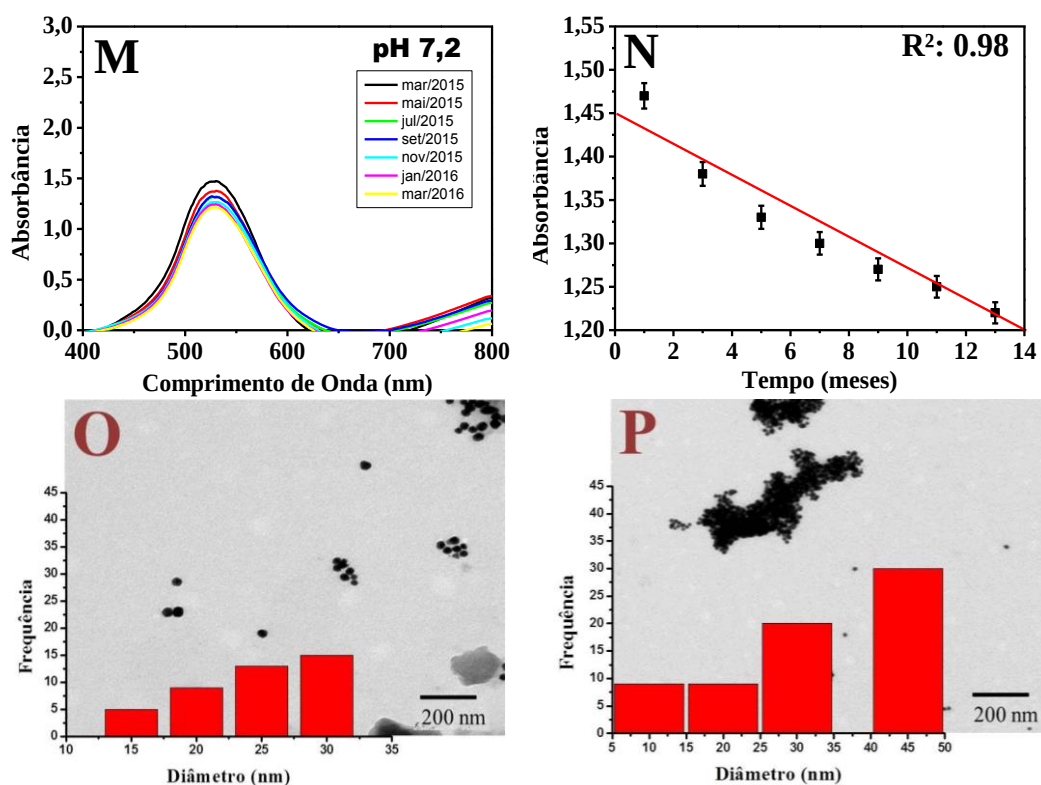
às amostras anteriores. As imagens de MET demonstraram que em março de 2015 a amostra de AuNPs já apresentava vários aglomerados (**Fig. 13k**) que aumentaram ao longo do tempo (**Fig. 13L**). Com a análise do programa ImageJ complementado com a técnica DLS foi possível obter o diâmetro médio de 35 nm. O coeficiente de determinação para esta alíquota foi R^2 : 0,97 demonstrado na **Figura 13J**.

Para amostras com pH 7,2, as análises UV-Vis realizadas em março de 2015 demonstravam uma absorvância de 1,48 que passou a ser 1,21 em março de 2016, indicando uma diminuição na absorção de 0,27 (**Fig. 13M**). As imagens de MET relativas às análises realizadas em março de 2015 (**Fig. 13O**) e março de 2016 (**Fig. 13P**) confirmam os resultados apresentados pelo UV-Vis, com diâmetro médio de 40 nm. O coeficiente de determinação para esta amostra no decorrer de um ano foi de R^2 : 0,98 (**Fig. 13N**).

Figura 13: Espectro de absorção para as amostras de AuNPS em diferentes pHs armazenadas em geladeiras e medidas ao longo de um ano com seus respectivos coeficientes de determinação. As imagens C, G, K e O demonstram o diâmetro médio das AuNPS analisadas pelas técnicas de MET e DLS (expresso em %) em 03/2015. As imagens D, H, L e P mostram a formação de agregados e o diâmetro médio das AuNPS analisados pelas técnicas de MET e DLS (expresso em %) em 03/2016.







No período de 15 em 15 dias, desde março de 2015 à março de 2016 os valores dos pHs de cada alíquota foram aferidos utilizando um pHmetro. Comparando os valores obtidos, observou-se que houve um aumento crescente do pH em todas as alíquotas, indicando que somente a adição de soluções de NaOH e HCl não foram capaz de manter os valores iniciais estáveis. A última medida do pH das alíquotas armazenadas em geladeira em março de 2016 apresentou uma variação entre 7,3 e 7,8, enquanto as alíquotas armazenadas em temperatura ambiente variaram de 8,3 a 8,8 (**Tab. 2**). O aumento do valor de pH acima de 7,2 indica a alta formação de aglomerados e não dispersão das AuNPs em solução devido à formação excessiva de grupos OH (74).

Tabela 2: Alterações do pH das soluções de AuNPs influenciado pela forma de armazenamento.

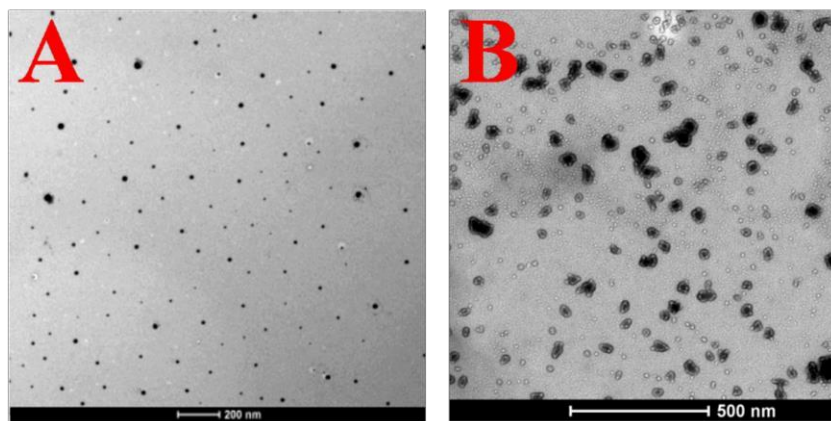
pH AuNPs (março 2015)	Estocagem	pH AuNPs (março 2016)
5,9	Geladeira	7,6
5,9	Temperatura Ambiente	8,3
6,2	Geladeira	7,3
6,2	Temperatura Ambiente	8,8
6,8	Geladeira	7,8
6,8	Temperatura Ambiente	8,3
7,2	Geladeira	7,8
7,2	Temperatura Ambiente	8,3

4.1.4 Preparação das AuNPs e Estabilização Utilizando Surfactante

Nesta etapa do experimento foi adicionada a síntese das AuNPs solução de surfactante para testar a capacidade de estabilidade e dispersão do reagente. O surfactante utilizado foi o Tween®20, pois quando incorporado as AuNPs as torna estáveis devido a concentração elevada de sal na solução ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), gerando estabilização eletrostática proporcionada por estar carregada negativamente. A síntese das AuNPs ocorreu como descrito no item 3.5.1, no entanto, o surfactante foi adicionado em dois momentos diferentes: durante a síntese, logo após a solução de AuNPs mudar sua coloração para o vermelho, e em um segundo momento após o resfriamento da solução a temperatura ambiente.

A utilização do Tween20 não gerou nenhuma alteração na forma das AuNPs, permanecendo esférica (**Fig. 14A**). Outro surfactante também foi testado para manter a estabilidade e dispersão da solução, o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). No entanto, a utilização do CTAB conduziu à formação de partículas com formato cilíndricos, descritas na literatura como nano bastões ou nanorod (60, 103, 110) (**Fig. 14B**). Dessa forma, o uso do CTAB foi descartado e os experimentos seguiram com a utilização apenas do Tween20.

Figura 14: (A) Imagens de MET para amostras de AuNPs sintetizadas com Tween20 durante a síntese e B) CTAB.



As análises das duas amostras de AuNPs com tween20 adicionados em diferentes momentos da síntese foram realizadas utilizando um equipamento espectrofotômetro (**Fig. 15**) e, quando comparadas, observou-se que no momento em que o surfactante foi adicionado após a mudança na coloração da solução de AuNPs, fez com que as AuNPs permanecessem dispersas mantendo sua forma e tamanho (linha verde). Resultado comparado a solução controle de AuNPs (sem a adição de surfactante-linha vermelha), demonstrando que não houve mudança no valor da absorbância e alteração no comprimento de onda. No entanto, o gráfico referente ao surfactante adicionado a solução de AuNPs em temperatura ambiente apresentou uma diminuição de 0,35 no valor da absorbância e um deslocamento de 12 nm no comprimento de onda (linha azul) quando comparado com a solução controle de AuNPs (linha vermelha), indicando a formação natural de pequenos aglomerados entre as AuNPs devido à aglutinação do ouro e diminuição da LSPR (70).

O pH foi averiguado para as três soluções: AuNPs, AuNPs com tween20 adicionado após mudança na coloração e AuNPs com tween20 adicionado após resfriamento em temperatura ambiente. Os valores obtidos variaram de 6,8 a 7,0 (Tab. 3), que segundo *Muangnapoh et al.*(77), são os valores ideais para manter a dispersão entre as AuNPs, pois mantém seu potencial elétrico.

Figura 15: Espectro de absorção UV-Vis para diferentes sínteses das AuNPs. HAuCl_4 , sem formação de nanopartículas (linha preta), AuNPs sem Tween20 (linha vermelha), AuNPs adicionadas de Tween20 no momento da síntese (linha verde) e AuNPs adicionadas de Tween20 após resfriamento em temperatura ambiente (linha azul).

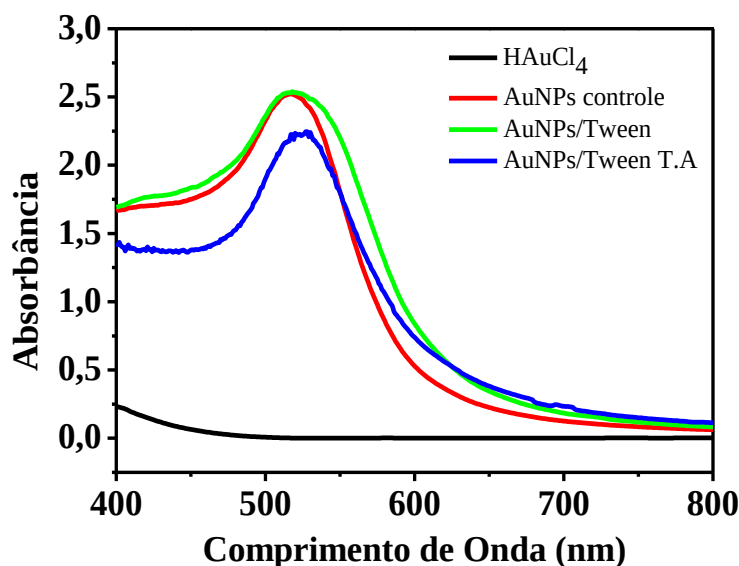


Tabela 3: pH das soluções de AuNPs com diferentes métodos de sínteses.

Solução	pH
AuNPs controle (sem Tween20)	7,0
AuNPs/Tween (síntese)	6,8
AuNPs/Tween (após resfriamento em T.A)	6,8

4.1.5 Influência da Temperatura no Armazenamento das AuNPs/Tween20

A fim de analisar a melhor forma de armazenamento das AuNPs na presença do Tween20, alíquotas das soluções foram armazenadas em duas condições: refrigerador e a temperatura ambiente. Tween foi adicionado após a mudança de coloração das AuNPs baseado nos resultados obtidos no experimento anterior, que demonstrou dessa forma manter por mais tempo a dispersão entre as NPs. As concentrações de Tween utilizadas nesse experimento foram de 19, 21, 23, 25 e 27 mg/mL,

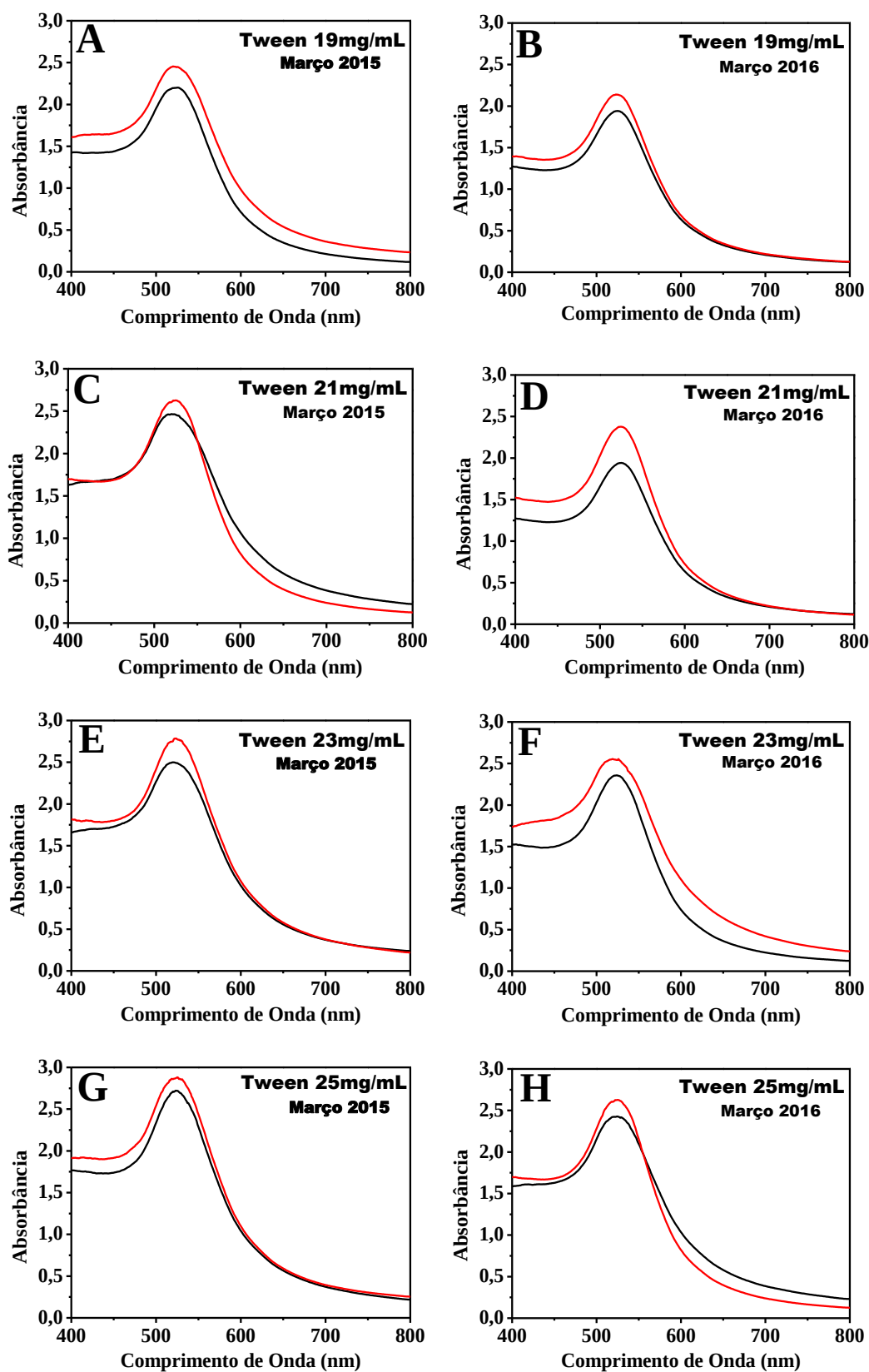
baseadas no trabalho de *Chirra et al.* (103), em que os autores demonstraram dispersão da solução sem interferência no tamanho ou forma das AuNPs. O acompanhamento das amostras foram feitos por meio de análises de UV-Vis, MET, DLS e averiguação do pH, sendo feitas a cada 15 dias no período 03/2015 à 03/2016.

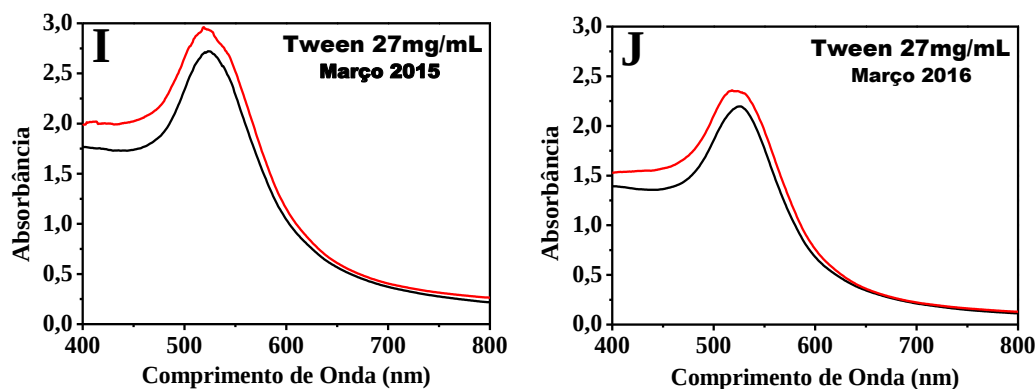
Os resultados com os experimentos de UV-Vis são mostrados na **Figura 16** e ilustram a diferença nos valores de absorbância e comprimento de onda para amostras armazenadas em geladeira (linha vermelha) e temperatura ambiente (linha preta). As **Figuras 16-A, C, E, G e I** foram realizadas em março de 2015 e as **Figuras 16- B, D, F, H e J** são as análises das mesmas amostras realizadas em janeiro de 2016. Ao compararmos os resultados tanto em março de 2015 como em 2016, observa-se que as amostras armazenadas em refrigeração mantiveram uma maior absorbância do que as amostras mantidas em temperatura ambiente.

Na **Figura 16A** realizada em março de 2015 referente à solução de AuNPs/Tween20- 19 mg/mL é obtida uma diferença na absorbância de 0,28 entre a maneira como as soluções foram armazenadas, diferença que permaneceu um ano depois, quando a medida em março de 2016 foi de 0,22 (**Fig. 16B**). Ao compararmos as amostras de AuNPs/Tween20- 21mg/mL em março de 2015, a diferença na absorbância foi de 0,18 (**Fig. 16C**), contra 0,43 (**Fig. 16D**) de 2016, indicando que mesmo com a introdução de um surfactante com o passar do tempo existe uma tendência natural a aglomeração quando a amostra é mantida à temperatura ambiente.

Já as amostras de AuNPs/Tween20- 23mg/mL armazenadas em geladeira e temperatura ambiente, medidas em março de 2015 apresentaram entre elas uma diferença na absorbância de 0,30 (**Fig. 16E**) e 0,21 quando repetida a análise em março de 2016 (**Fig. 16F**). Resultado este, indicando que a aglomerados ainda ocorre devido à forma de armazenamento, mas com uma menor intensidade. As medidas realizadas em março de 2015 com amostras de AuNPs/Tween20- 25mg/mL (**Fig. 16G**) apresentaram uma absorbância de 2,8 quando armazenadas em geladeira e 2,71 para temperatura ambiente, uma diferença de 0,17. As análises após um ano em março de 2016 com as mesmas amostras mostrou uma diferença na absorbância de 0,21 (**Fig. 16H**). Finalmente, ao compararmos as amostras com a maior concentração AuNPs/Tween20- 27mg/mL, observamos que a amostra mantida em geladeira e analisada em março de 2015 apresentou a maior absorbância de todas (2,95), consequentemente também a maior dispersividade entre as AuNPs. A diferença no valor da absorbância entre as amostras foi de 0,24 (**Fig. 16I**). No entanto, após um ano a amostra mantida na geladeira mostrou uma diminuição no pico de absorbância atingindo 2,37, mas ainda manteve uma diferença de 0,17 para a amostra mantida à temperatura ambiente (**Fig. 16J**).

Figura 16: Espectros de UV-Vis das soluções de AuNPs ajustados com diferentes concentrações de Tween20 e armazenadas em geladeira (linha vermelha) e temperatura ambiente (linha preta). Análises realizadas em março de 2015 (A, C, E, G e I) e em março de 2016 (B, D, F, H e J).





4.1.6 Acompanhamento da Dispersão entre as AuNPs na Presença de Diferentes Concentrações de Tween20 ao Longo do Tempo

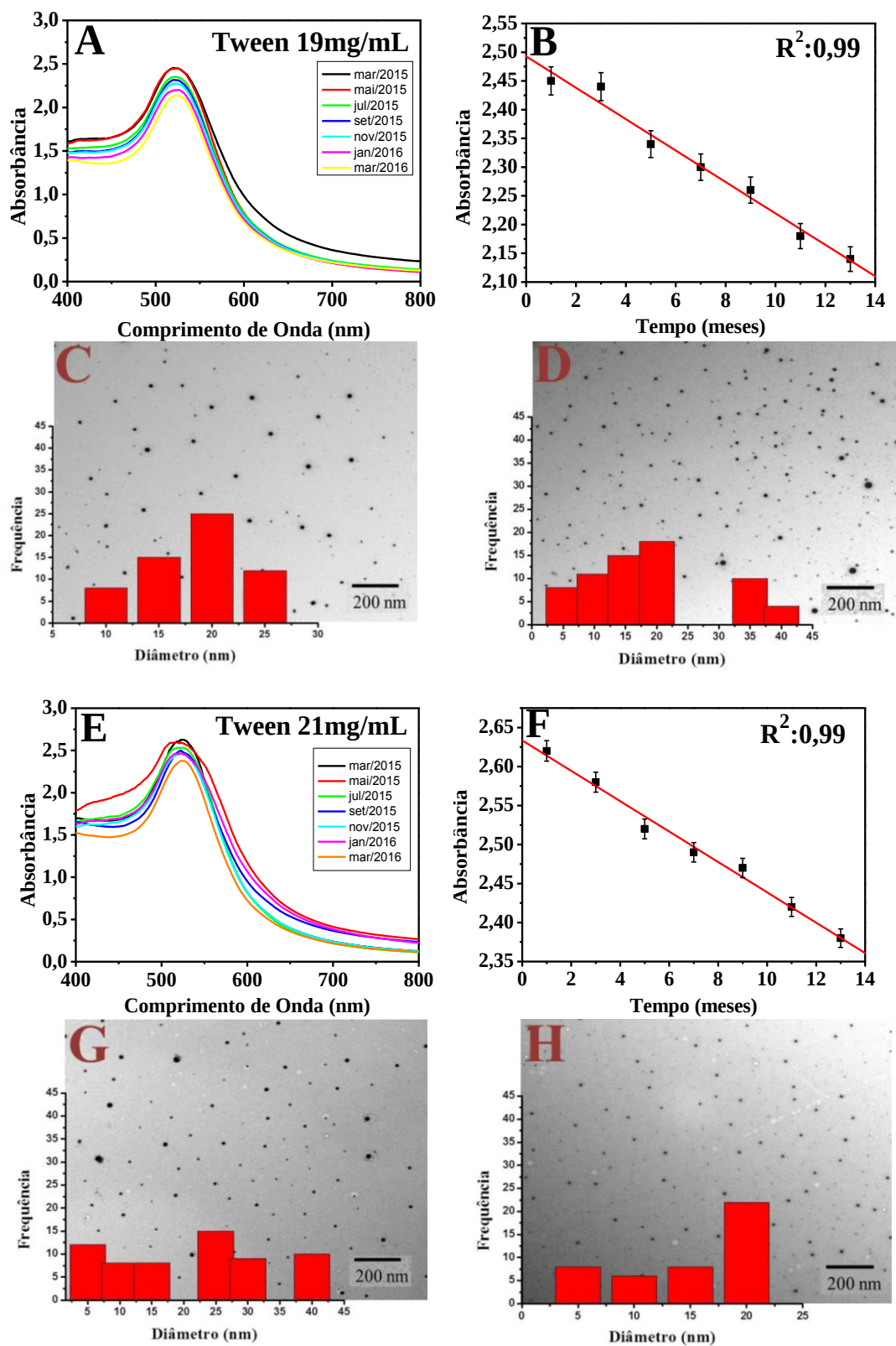
O uso de surfactante como agente estabilizador tem sido amplamente descrito na literatura, pois mantém a dispersividade entre as AuNPs. Porém, não há relatos dessa durabilidade ao longo do tempo (111). Nesta etapa do trabalho, as soluções de AuNPs com diferentes concentrações de Tween20 (19, 21, 23, 25 e 27 mg/mL) foram analisadas por UV-Vis, MET e DLS afim de verificar a eficiência do surfactante como agente estabilizador ao longo do tempo. As amostras foram mantidas sob refrigeração, pois de acordo com o estudo anterior, esta forma de armazenamento garante uma maior estabilidade da solução. As análises foram realizadas de 15 em 15 dias e os resultados mostraram a tendência natural de agregação ao longo do tempo, observada com a redução no pico de absorbância (**Fig. 17**), resultado semelhante ao encontrado no trabalho de *Basso et al.* (80).

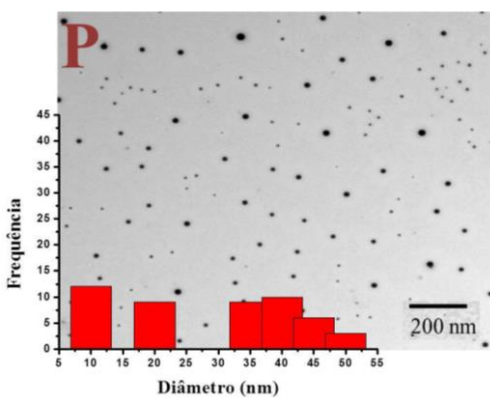
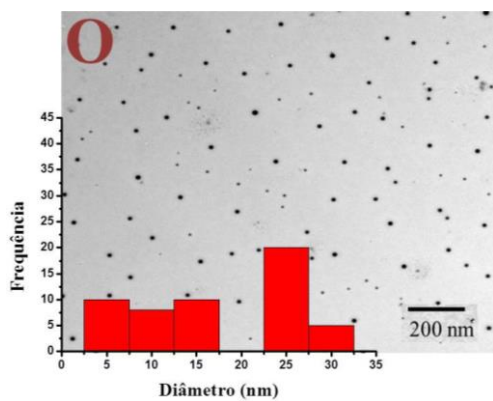
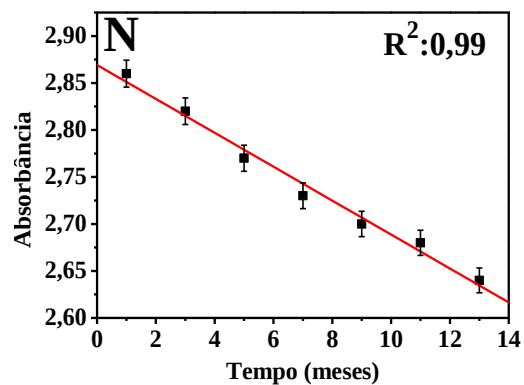
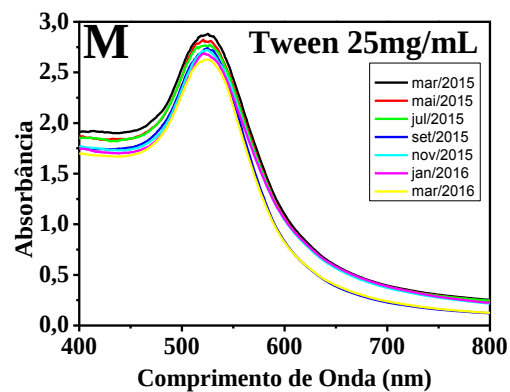
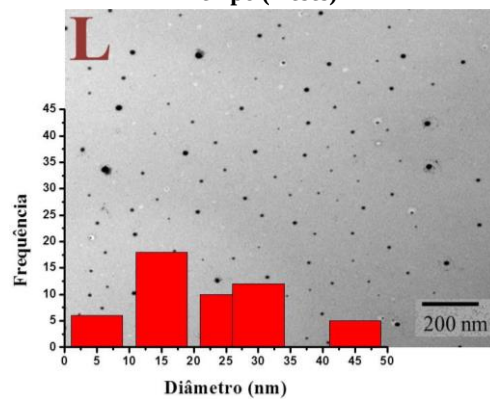
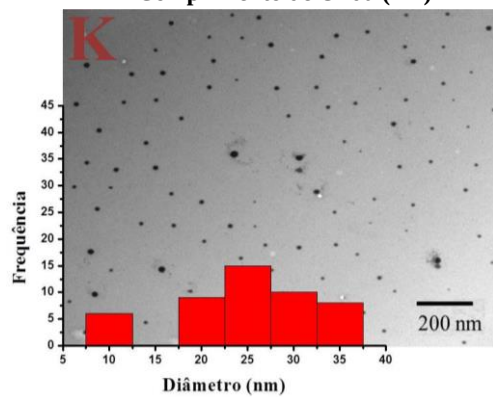
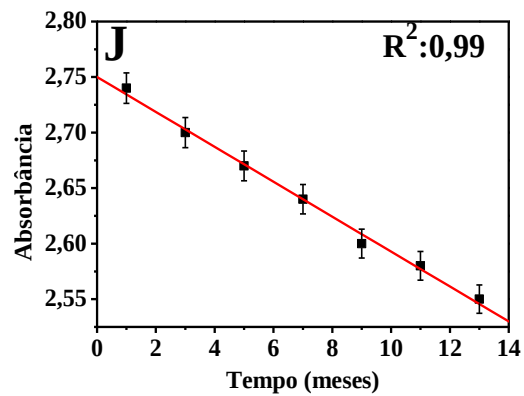
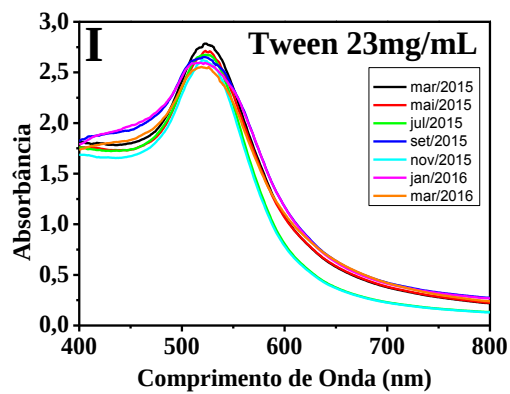
Na Figura **17A** os resultados mostraram que o valor do pico de absorbância em março de 2015 foi de 2,45 para a amostra de AuNPs/Tween20- 19 mg/mL, com declínio gradual nos meses seguintes chegando a 2,13 quando foi verificada em março de 2016, com linearidade de R^2 : 0,99 (**Fig. 17B**). No entanto, os valores de absorbância obtidos com o surfactante foram significativamente maiores em comparação com as amostras ajustadas a diferentes valores de pH, indicando uma maior dispersão. Nas imagens de MET (**Fig. 17C e D**) é possível observar claramente a dispersão entre as AuNPs/Tween 19 mg/mL após um ano de sua síntese, sem muita variação no diâmetro das AuNPs, permanecendo em média a 20 nm. Resultado similar foi mantido ao analisarmos a amostra de AuNPs/Tween20- 21 mg/mL (**Fig. 17E**), que apresentou absorbância máxima de 2,62 em março de 2015 e 2,36 em março de 2016, com R^2 : 0,99 (**Fig. 17F**). Para esta amostra, as imagens obtidas usando MET em março de 2015 (**Fig. 17G**) e março de 2016 (**Fig. 17H**) apresentaram alta dispersão sem formar agregados ao longo do tempo. O diâmetro médio das AuNPs

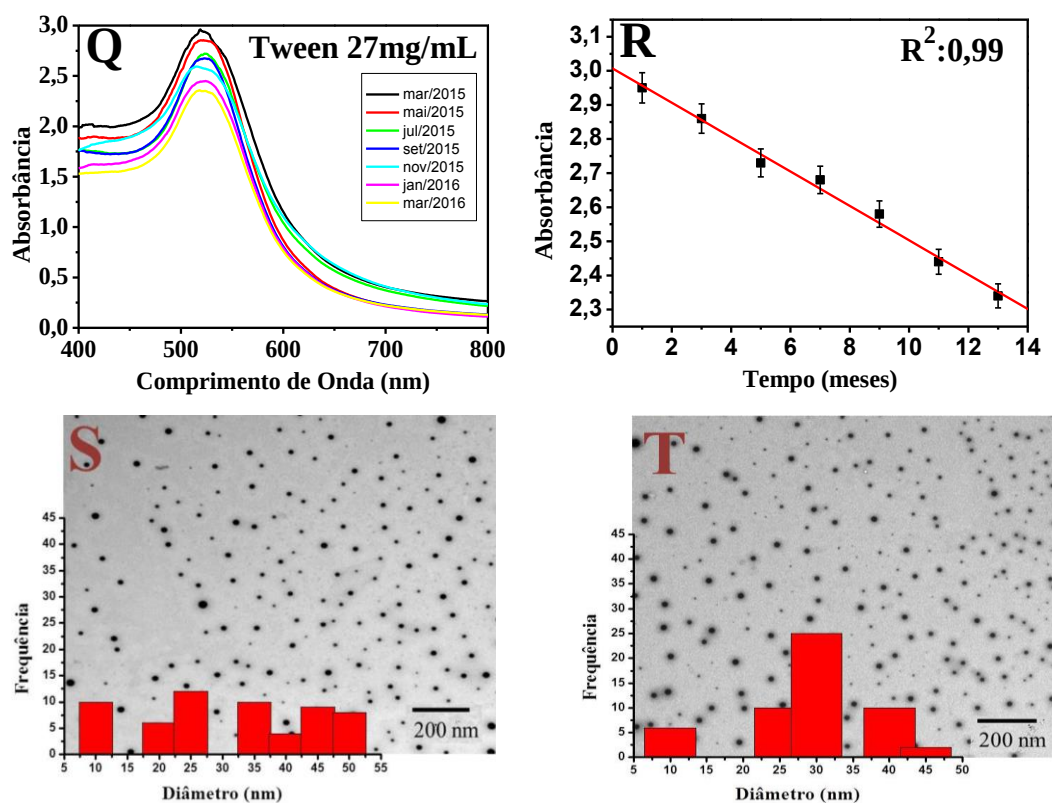
em março de 2016 foi de 20 nm.

Gráficos de UV-Vis obtidos a partir da análise das AuNPs/Tween20- 23 mg/mL (**Fig. 17I**) mostrou um pico de absorbância de 2,80 em março de 2015 e após um ano, em março de 2016 uma absorbância de 2,55 com R^2 : 0,99 (**Fig. 17J**). As imagens de MET mostraram que as AuNPs mantiveram a dispersão entre elas, como demonstradas nas **Figuras 17K e 17L**, com diâmetro médio variando de 15 a 20 nm. A solução de AuNPs/Teen20- 25 mg/mL foi analisada nas mesmas condições, com pico de absorbância de 2,89 em março de 2015 e 2,61 em março de 2016 (**Fig. 17M**) e linearidade de R^2 : 0,99 como demonstrada na **Figura 17N**. As imagens de MET mostraram uma grande dispersão tanto em 2015 como 2016, ambas capturadas nas **Figuras 17O e 17P**. O diâmetro médio das AuNPs foi de 30 nm. A última amostra analisada foi de AuNPs/Teen20- 27 mg/mL, cujo pico de absorbância foi de 2,94 em março de 2015, a maior encontrada neste estudo indicando que, nestas condições existe uma maior repulsão entre as AuNPs em solução, sendo elas mais facilmente atingidas pelo feixe de laser do espectrofotômetro aumentando a absorção de luz (80). No entanto, ao analisarmos a amostra um ano depois, vemos a maior queda no pico de absorbância registrada, sendo de 2,37 (**Fig. 17Q**). Zhang *et al.* (112), demonstra em seu artigo que isso pode ocorrer porque o excesso de surfactante em solução obstrui o processo de redução das AuNPs com citrato de sódio no momento da síntese, levando a formação de agregados ao longo do tempo. A linearidade apresentada pela amostra foi de R^2 : 0,99 (**Fig. 17R**). Em março de 2015, a imagem de MET (**Fig. 17S**) mostrou uma alta dispersão em solução. No entanto, ao longo do tempo, quando analisado novamente a amostra através de MET usando o software ImageJ e a técnica DLS (**Fig. 17T**), observamos que as AuNPs exibiram um diâmetro médio entre 30 e 35 nm, a maior de todas as amostras analisadas neste estudo.

Figura 17: Espectro de absorção para as amostras de AuNPs com diferentes concentrações de Tween20 armazenadas em geladeiras e medidas ao longo de um ano com seus respectivos coeficientes de determinação. As imagens C, G, K, O e S demonstram o diâmetro médio das AuNPS analisadas pelas técnicas de MET e DLS (expresso em %) em 03/2015. As imagens D, H, L, P e T mostram o diâmetro médio das AuNPS analisados pelas técnicas de MET e DLS em 03/2016.







Outro controle realizado nas soluções para checar a formação de agregados foi a averiguação periódica do pH. Em março de 2015 todas as amostras de AuNPs com adição de Tween20 apresentaram pH de 6,8. Após um ano, em março de 2016 o pH das mesmas amostras apresentaram valores que variaram entre 5,9 e 6,8. O estudo realizado por *Muangnapoh et al.* (77) e colaboradores demonstrou que neste intervalo de pH as AuNPs tendem a ficar dispersas em solução, pois ocorre repulsão eletrostática entre os elétrons presentes em suas superfícies. Resultados esses compatíveis com o obtido nesse trabalho (**Tab. 4**).

Tabela 4: Valores de pH obtidos em março de 2016 para soluções de AuNPs em diferentes concentrações de Tween20.

AuNPs	pH (Março 2016)
Tween20 19mg/mL	5,9
Tween20 21mg/mL	6,8
Tween20 23mg/mL	6,8
Tween20 25mg/mL	6,7
Tween20 27mg/mL	6,6

4.2 Etapa 2: Produção do Imunosensor para Detecção do Vírus da Dengue Utilizando AuNPs e Anticorpos

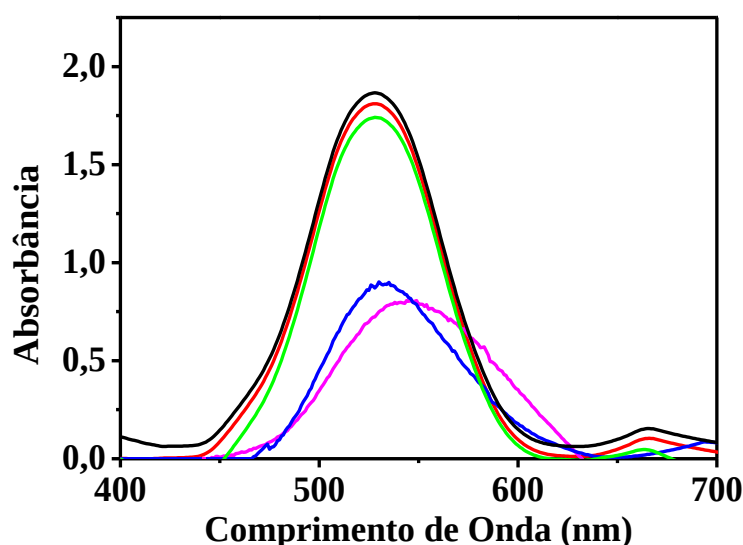
4.2.1 Caracterização da Microestrutura

Na segunda etapa do trabalho, as AuNPs com Tween20 (19 mg/mL) modificadas com a formação de monocamadas auto-organizadas e ligações de anticorpos monoclonais em sua superfície, foram utilizadas para produção de um kit diagnóstico para o vírus da dengue.

Para confirmar a modificação na superfície das AuNPs bem como a ligação dos anticorpos, espectros foram medidos antes e após cada etapa de conjugação por meio da técnica de espectroscopia LSPR. Cada redução no pico da absorbância e a mudança no comprimento de onda observada indicaram alterações na superfície das AuNPs (113). As AuNPs nuas (sem modificações) apresentaram pico de extinção a 524 nm (linha preta). Após adição da solução de MUA, ocorreu o deslocamento de 3 nm no comprimento de onda do λ max final, passando a ser de 527 nm (linha vermelha), indicando assim a formatação das SAMs em sua superfície. As SAMs apresentam em uma extremidade um grupo tiol, cujo final foi conectado as AuNPs que continham um grupo SH ligado a um átomo de carbono. Sua outra extremidade apresenta um grupo carboxílico que foi ativado pela solução EDC-NHS desencadeando ligações covalentes com as amins dos anticorpos. Após a ativação, houve nova redução no pico da absorbância e um deslocamento no comprimento de onda de 2 nm, indo assim para 529 nm (linha verde). As ligações covalentes entre a amina dos anticorpos e as AuNPs mediadas pelas SAMs ocorreram quando o anticorpo foi adicionado (linha azul). O gráfico então passou a apresentar o deslocamento de 4 nm (533 nm) no comprimento de

onda quando comparado com a modificação realizada por EDC-NHS. Uma solução contendo os quatro sorotipos da dengue (DENV 1, 2, 3 e 4) foi adicionada para mostrar a especificidade dos anticorpos conjugados as AuNPs em se ligar ao antígeno. O deslocamento de 14 nm no comprimento de onda resultou no aumento do índice de refração local causado pela ligação antígeno-anticorpo (linha rosa) (**Fig. 18**).

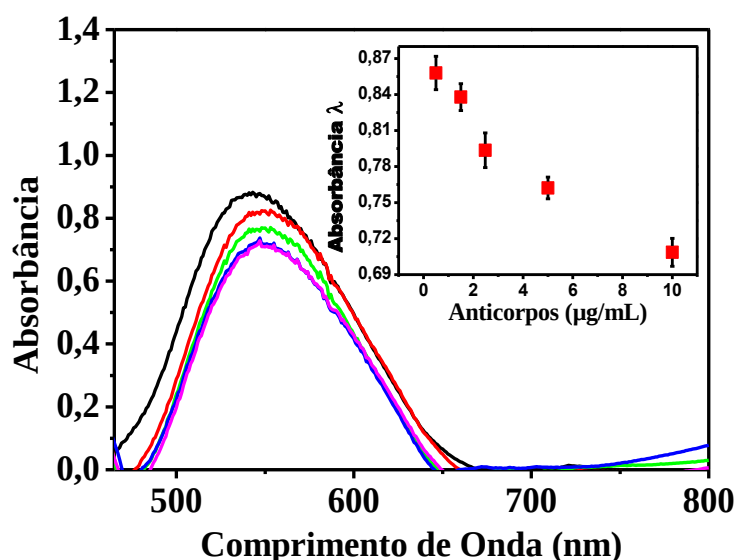
Figura 18: Espectro de UV-Vis mostrando a absorção de todas as etapas de modificação: AuNPs (linha preta), MUA (linha vermelha), EDC-NHS (linha verde), anticorpo (linha azul) e pool do vírus da dengue (linha rosa).



O alcance dinâmico no sinal obtido através do gráfico foi encontrado como forma de otimizar a concentração de anticorpos no experimento. A mudança da LSPR após a ligação do anticorpo foi medida para diferentes concentrações de anticorpos e antígenos. Concentrações mais elevadas de anticorpos levaram a picos de absorbância mais baixos (**Fig. 19**). Esse comportamento é resultado da interação da área superficial das AuNPs com os anticorpos, pois quando estão ligados ocorre uma menor interação da superfície do ouro com a luz transmitida. Resultados similares foram publicados por Wang e Irudayaraj anteriormente (113). A menor concentração de anticorpos a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ levou a uma absorbância de 0,85 (linha preta); enquanto uma concentração mais elevada de 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (linha vermelha) reduziu o pico de absorbância, indicando assim a redução da superfície nas AuNPs expostas à interação com a luz. Desse modo, as bandas de LSPR continuaram a perder intensidade conforme as concentrações de anticorpos aumentaram. A linha verde mostra a concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e absorbância de 0,79; a linha azul a concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ com absorbância de 0,74 $\mu\text{g/mL}$ e por fim a linha rosa mostra a maior concentração (10,0 $\mu\text{g/mL}$) e o menor pico de

absorbância (0,73). Não houve diferença significativa na redução da intensidade da banda LSPR nas duas maiores concentrações (5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL); demonstrando total ligação do anti- DENV a superfície das AuNPs. Inserida na **Figura 19** está a curva de calibração das cinco diferentes concentrações de anticorpos IgG. O pico de intensidade da absorbância diminuiu à medida que a concentração aumentou e o sistema se mostrou saturado a uma concentração de 5 µg/mL. A constante de dissociação (k_a) foi definida no software Autolab. A k_a foi encontrada através da inclinação do sinal SPR no gráfico do anticorpos versus a concentração do vírus, em que k_a foi de $0,7 \times 10^5$ mol/L. Nós fizemos a opção de usar nos experimentos a concentração de 0,5 µg/mL (teste de concentração mais baixo) para evitar o desperdício de anticorpos não ligados a superfície das AuNPs, bem como para melhorar a sensibilidade do teste e evitar custos extras.

Figura 19: Variações das concentrações de anticorpos. 0,5 µg/mL (linha preta), 1,5 µg/mL (linha vermelha), 2,5 µg/mL (linha verde), 5,0 µg/mL (linha azul) e 10,0 µg/mL (linha rosa), todas as diluições foram feitas em tampão PBS. Inserida na figura a curva de calibração com R^2 : 0,91.



Os valor de picos de absorbância demonstrados na **Figura 18** também foram utilizados para calcular a massa de anticorpos ligados a superfície das AuNPs, utilizando a fórmula de Feijter's (114).

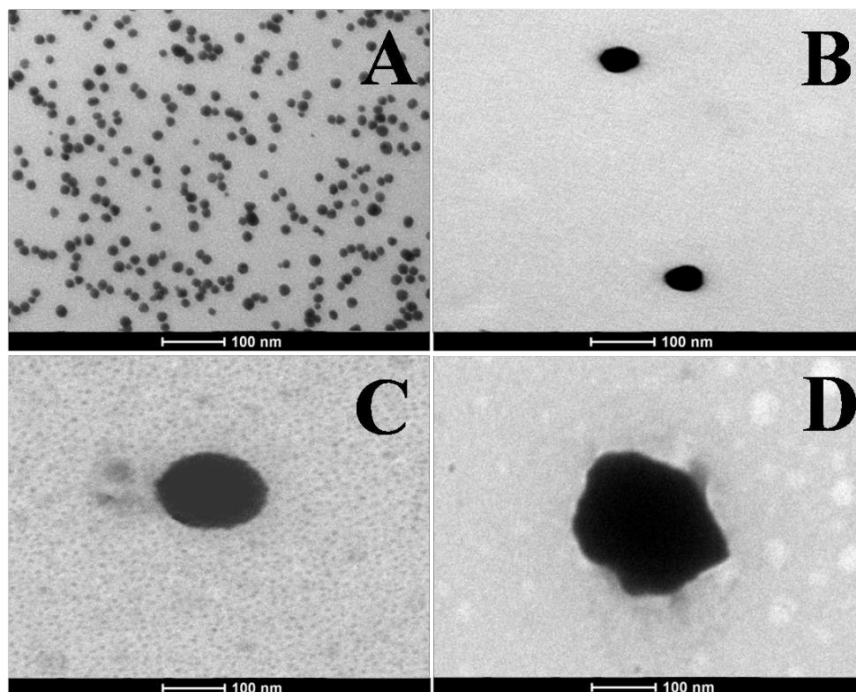
$$\Gamma = s \frac{ns - mn}{dn/dc}$$

Onde t é a massa da proteína (anticorpo) absorvida por unidade de área, n é o índice refrativo (n_s para as AuNPs e n_m para o meio circundante), que nesse sistema é essencialmente água, possuindo um índice de refração de 1,39 a 550 nm e dn/dc são utilizados como incremento do índice de refração de $0,19 \text{ ml g}^{-1}$ para proteínas [31,32]. Correspondendo entre 6 a 25 moléculas de anticorpo por AuNP.

A morfologia superficial das AuNPs foi registrada através de MET. A **Figura 20A** mostra as AuNPs sem modificações com 22 nm de diâmetro em média. A imobilização dos anticorpos nas AuNPs envolveu a deposição local de monocamadas auto-organizadas (SAMs) na superfície. A formação das SAMs utilizando MUA promove uma forma assimétrica das nanopartículas e um aumento médio no diâmetro para 34 nm (**Fig. 20B**). As aminas encontradas nos anticorpos covalentemente ligados aos grupamentos tióis na superfície das AuNPs causaram a aparência de uma elipse, originando uma solução estável e sem formação de agregados (**Fig. 20C**). Após a interação DENV-anticorpo, as AuNPs apresentaram diâmetro médio de 126 nm (**Fig. 20D**). O vírus da dengue consiste de um núcleo de ribonucleoproteína e de lipoproteínas com aproximadamente 50 nm de diâmetro [33]. Os resultados com a técnica de MET foram consistentes com os encontrados utilizando a técnica de UV-Vis. A redução juntamente com a mudança no pico da banda de LSPR mostrou todas as ligações químicas e modificações que ocorreram durante todo o experimento.

Os resultados com a técnica de MET foram semelhantes aos apresentados em estudos previamente publicados sobre a detecção do vírus da cinomose canina (CDV) e da bactéria *Lactobacillus spp.* e *Staphylococcus aureus*, evidenciando a alta especificidade da metodologia aqui utilizada [13, 37].

Figura 20: Imagens de MET com as modificações das AuNPs em uma escala de 100 nm. A) AuNPs, B) AuNPs modificadas com MUA e EDC-NHS, C) AuNPs modificadas com MUA/EDC-NHS/anticorpos e (D) AuNPs modificadas com MUA/EDC-NHS e anticorpos ligados ao DENV.



4.2.2 Experimentos de Ressonância Plasmônica de Superfície

Uma vez que as condições de ensaio foram otimizadas, o procedimento foi conduzido para detectar o vírus da dengue através da técnica de ressonância plasmônica de superfície. A SPR combina o reconhecimento molecular das biomoléculas e a alta sensibilidade do equipamento. Os resultados mostraram todo o processo de adsorção e dessorção das moléculas na superfície do sensor de ouro. A **Figura 21A** mostra o gráfico de SPR com a unidade ressonante (UR) no eixo y indicando a quantidade de material adsorvido na superfície do sensor e o tempo do experimento em segundos no eixo x.

A modificação na superfície no sensor de ouro foi realizada pela injeção da solução de MUA, que permaneceu durante toda noite para formação das SAMs. Para formação da linha de base, solução de tampão fosfato pH 7,4 (PBS) foi adicionada. A injeção de EDC-NHS ativou os grupos carboxílicos das SAMs e desencadeou ligações covalentes com as aminas dos anticorpos (ponto A). Todas as etapas de lavagem da superfície do sensor para remoção do excesso de material não ligado foi feito utilizando tampão fosfato (flechas azuis para baixo). A adição da solução de anticorpo à

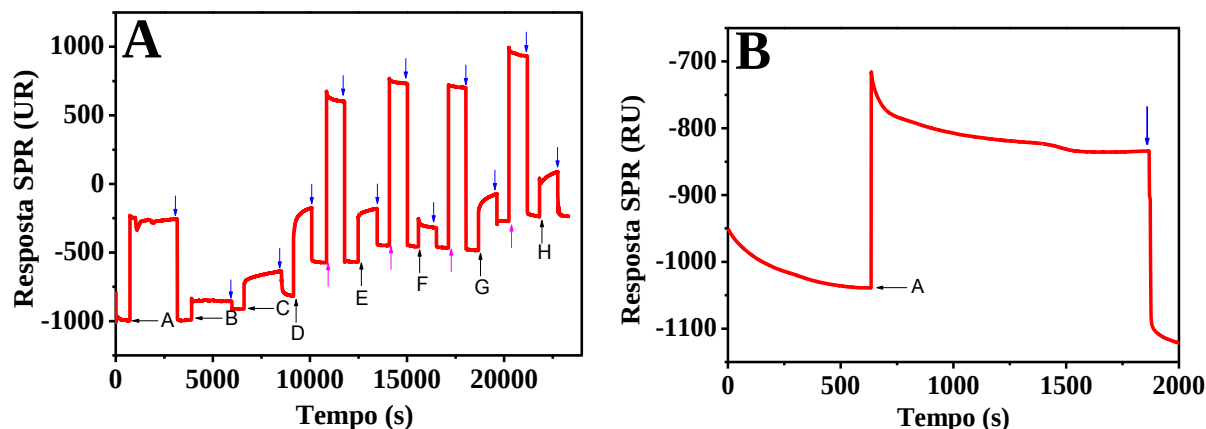
superfície do sensor de ouro (ponto B) foi realizada e permaneceu por 40 minutos. Após o processo de lavagem, quando subtraímos o ponto B da queda no gráfico, encontramos uma UR de 2096 miligraus, o que correspondeu a $17,5 \text{ ng/mm}^2$ de adsorção de anticorpos na superfície do sensor. Cada 120 miligraus no ângulo da SPR equivalente a 1 ng de proteína adsorvida por mm^2 na camada do sensor (80). A injeção da solução BSA a 1 mg/mL^{-1} no ponto C foi realizada de modo a bloquear os espaços remanescentes entre os anticorpos, evitando assim a ligação direta da amostra à superfície do sensor. A injeção do pool do vírus da dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4) foi feita no ponto D. Após a lavagem com tampão fosfato (seta azul para baixo) houve uma pequena queda no sinal em relação ao ponto de injeção, o que confirma a ligação específica antígeno-anticorpo. A solução de glicina-HCl foi adicionada para manter a reprodutibilidade no experimento e regenerar a superfície do sensor (flechas rosa para cima). Esta solução apenas quebra a ligação antígeno-anticorpo. Os pontos E e G são referentes a injeções do pool de vírus da dengue e mostraram a reprodutibilidade dos resultados encontrados durante todo o experimento. Foi possível observar pequena diminuição no sinal após as etapas de lavagem (flechas azuis para baixo), o que evidenciou a ligação do antígeno-anticorpo.

O controle negativo foi realizado através da injeção de uma amostra do vírus zika (ZIKV) (ponto F). Após a lavagem com tampão fosfato (flecha azul para baixo), houve uma diminuição total do sinal, se igualando à linha de base, não demonstrando nenhuma ligação entre a amostra e o anticorpo. A amostra do ZIKV foi mais uma vez adicionada ao sensor no ponto H para confirmar que a ligação do anticorpo é específica apenas para o vírus da dengue, comprovado pela diminuição total no sinal após a lavagem com tampão fosfato (flecha azul para baixo).

Todas as etapas de lavagem do experimento foram feitas utilizando tampão fosfato pH 7,4, representados pelas flechas azuis apontando para baixo. Cada passo da regeneração da superfície do sensor de ouro foi realizada usando solução glicina-HCl depois de cada etapa de lavagem, de modo a quebrar apenas a ligação antígeno- anticorpo, destacada pelas flechas rosa apontadas para cima.

Para validar o experimento e comprovar a especificidade do vírus ao anticorpo, um teste no SPR (**Fig. 21B**) utilizando apenas cultura de células C636 em meio L-15 sem inoculação do vírus foi adicionado à superfície do sensor (ponto A) e após a lavagem com tampão fosfato (flecha azul) é observado a queda total do sinal, indicando que não houve nenhuma ligação com a superfície do sensor. Deste modo, podemos afirmar que nenhum componente utilizado para cultivar o vírus influenciou nos resultados.

Figura 21: Gráfico de SPR para detecção do DENV e seus interferentes. A) EDC-NHS (ponto A), anticorpo (ponto B), BSA (ponto C), pool DENV (pontos D, E e G), controle negativo com ZIKV (pontos F e H). Todas as etapas de lavagem do experimento foram feitas utilizando tampão PBS pH 7,4, representado pelas flechas azuis para baixo e as etapas de regeneração da superfície do sensor foram feitas utilizando solução glicina- HCl representadas pelas flechas rosas para cima. B) Teste para confirmar a não influência de possíveis ligações moleculares presentes no meio de cultura. Solução de cultura de células C636 em meio L-15 (ponto A) e lavagem com tampão PBS pH 7,4 (flecha azul).



4.2.3 Desempenho Analítico

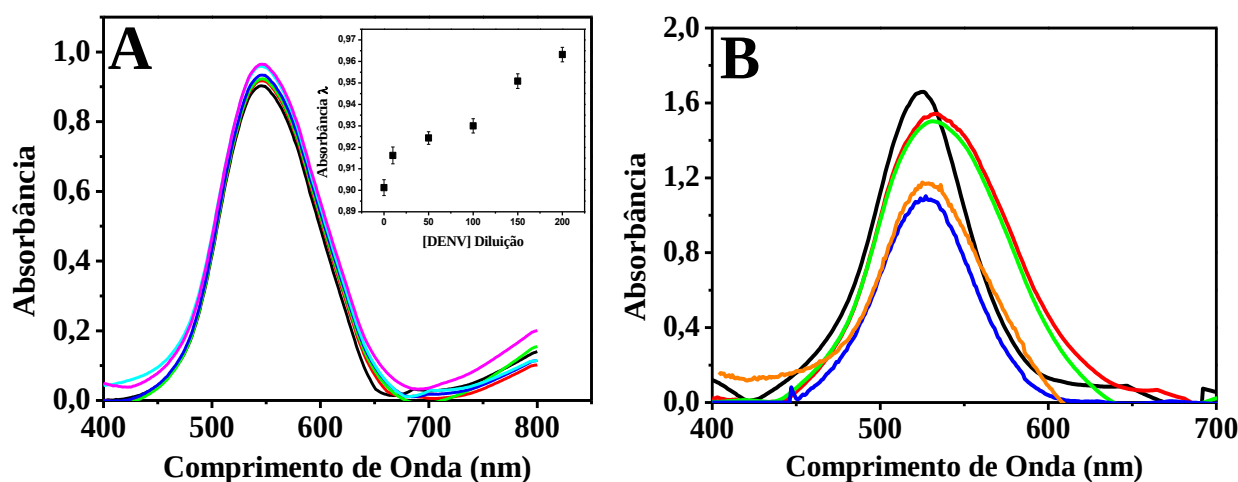
Para avaliar a sensibilidade e o alcance dinâmico do imunossensor, a rotina analítica foi realizada em condições ideais. Observamos que o espectro das AuNPs exibiu uma redução no pico da absorvância com deslocamento no comprimento de onda em função da concentração do DENV (**Fig. 22A**). A inserção na figura mostra o ajuste linear do gráfico de absorvância em função do índice de refração, com limite de detecção $DICT_{50} 10^7$ com uma diluição de intervalo linear de 0,0 a 200,0 e resposta linear R: 0,993. O limite de detecção do $DICT_{50} 10^7$ está dentro da faixa clinicamente relevante para humanos, pois de acordo com a literatura, a viremia é considerada positiva para um título $\geq 10^{1,7} DICT_{50}$ (26). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O desvio padrão relativo (RSD) foi de 6,0%, mostrando uma boa reprodutibilidade na produção do imunossensor, visto que a estabilidade é um fator chave para futuras aplicações. Para verificar se ao longo do tempo houve alterações nos valores, as medidas foram realizadas de 15 em 15 dias no decorrer de dois meses e os resultados mostraram que a resposta diminuiu ligeiramente nos primeiros dias mantendo-se constante posteriormente com 91% de sua resposta original no decorrer dos dois meses de armazenamento. Essa diminuição lenta na resposta parece estar relacionada à desativação gradual do anticorpo imobilizado nas AuNPs.

Além disso, avaliamos a detecção do vírus na presença de potenciais interferentes que podem estar presentes no processo de cultura viral. A interferência do ZIKV foi testada para avaliar a especificidade do nosso ensaio na detecção do vírus da dengue e na eficácia da experiência, pois o ZIKV poderia fornecer uma resposta falso positiva e invalidar os resultados aqui encontrados, uma vez que pertencendo a mesma família, apresenta proteínas estruturais semelhantes ao DENV, além de sintomas semelhantes, podendo causar um diagnóstico equivocado (115).

O espectro da LSPR com o ZIKV é mostrado na **Figura 22B**, em que o interferente ZIKV (linha laranja) foi adicionado a solução contendo os anticorpos ligados as AuNPs (linha azul). Nesse gráfico foi possível observar o deslocamento no comprimento de onda e a redução do pico de absorção. Quando as AuNPs foram modificadas com os anticorpos, o comprimento de onda encontrado foi de 527 nm com absorbância de 1,07. Após a adição do ZIKV à solução, ao contrário do vírus da dengue, o gráfico mostrou um aumento na absorbância para 1,19 e não houve deslocamento de comprimento de onda, ficando em 526 nm, portanto não houve ligação viral com o complexo AuNPs-anticorpo. Também foi testada uma possível interferência com o BSA. Após a adição de 100 vezes o excesso de BSA, nosso sensor não mostrou nenhum tipo de aumento na absorbância, demonstrando que a presença de outros vírus semelhantes ou uma proteína genérica não afeta a seletividade da metodologia na detecção apenas o vírus da dengue.

Todos os quatro sorotipos do vírus da dengue foram analisados através das técnicas de RT-qPCR e ELISA, testes tradicionais para validar os resultados encontrados no experimento. A taxa de reprodutibilidade dos nossos resultados em comparação com essas técnicas foi de 99,0%, realizada em triplicata. O uso das AuNPs se mostrou uma alternativa interessante e desejável para a detecção do vírus da dengue, pois evidenciou uma maior seletividade e sensibilidade, além de promover resultados rápidos e com baixos custos.

Figura 22: A) Variação da concentração do pool de DENV. O pool de DENV com título de 10^7 DICT₅₀/mL diluído para 0,0 µl de PBS (linha preta), 1/10 µl de PBS (linha vermelha), 1/50 µl de PBS (linha verde), 1/100 µl de PBS (linha azul), 1/150 µl de PBS (linha rosa) e 1/200 µl de PBS (linha azul clara). Inserida na figura a curva de calibração para o pool de DENV. B) Espectro de absorvância UV-Vis para o controle negativo. AuNPs (linha preta), MUA (linha vermelha), EDC-NHS (linha verde), anticorpo (linha azul) e ZIKV (linha laranja).

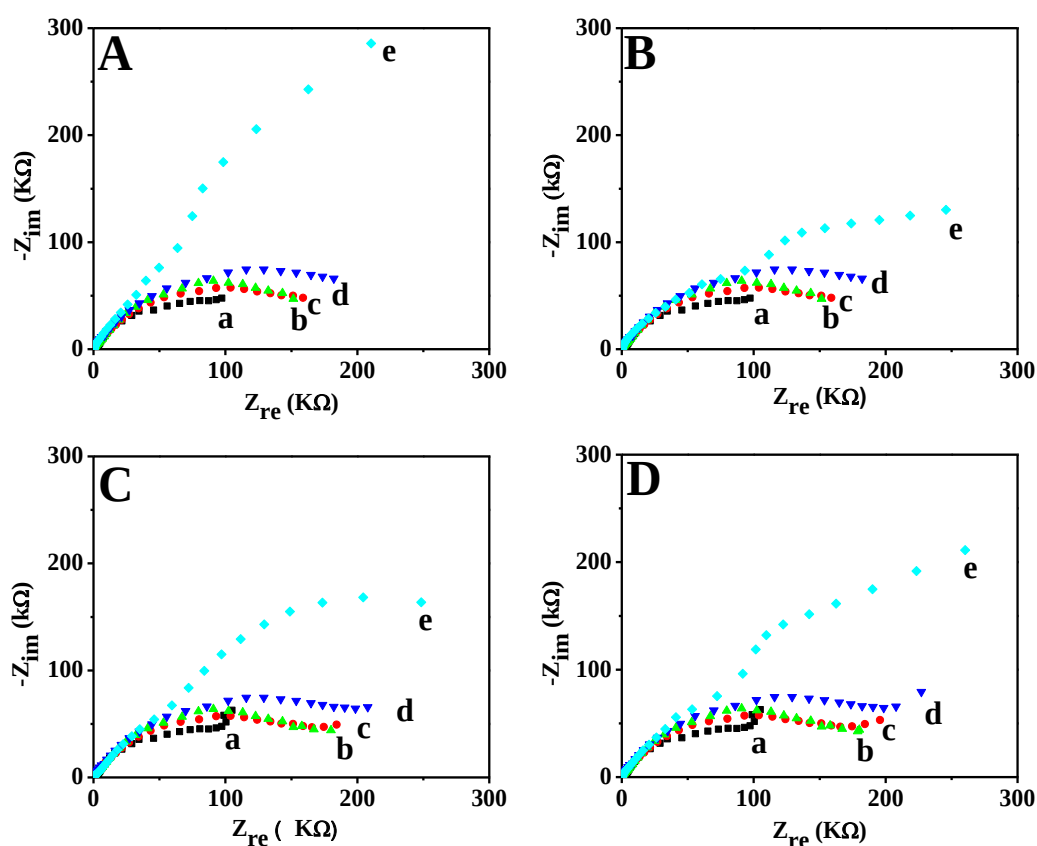


4.2.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

Para melhor compreender a imobilização do anticorpo sobre a superfície do sensor e para caracterizar as propriedades elétricas da tensão interfacial, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada durante cada passo de imobilização do anticorpo e na presença de cada sorotipo da dengue utilizando tampão fosfato PBS (10 mM, pH 7,4) contendo $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Fc. O estudo do processo interfacial é de grande importância para a avaliação dos problemas associados com a metodologia de imobilização. Assim, os estudos destes processos podem ajudar na escolha de um meio mais adequado de imobilização e também indicar as principais características associadas a cada passo do método de imobilização. Na **Figura 23** estão os resultados obtidos por espectroscopia para cada etapa de modificação. Tal como anteriormente estabelecido, o gráfico de impedância do eletrodo de ouro apresenta um sistema Faradaico incluindo uma correlação linear de Z_{im} (Z-imaginário) e Z_{re} (Z-real) a baixas frequências, o que indica uma região de difusão controlada que corresponde à impedância Warburg. Uma região semicircular em frequências mais altas indicando uma parte cinética determinada pela resistência de transferência de elétrons. A resistência de transferência de elétrons (R_{et} , o diâmetro do semicírculo) da sonda redox mediu a reatividade do Fc na modificação por MUA (curva a), ativação com EDC/NHS (curva b), modificação com

anticorpo (curva c), adição da solução de BSA (curva d) e sorotipo da dengue (curva e). A **Figura 23A** é referente ao DENV 1, tendo os valores de 97,75; 151,66; 160,12; 182,45 e 210,09 K Ω . A **Figura 23B** representa o DENV 2, com os valores de 96,95; 151,66; 160,26; 184,05 e 246,42 K Ω . Na **Figura 23C**, temos os valores de 100,75; 177,05; 186,31; 209,44 e 251,02 K Ω para o DENV 3 e por fim, na **Figura 23D** para o DENV 4, os valores são de 100,0; 179,38; 196,31; 229,43 e 261,81 K Ω , respectivamente.

Figura 23: Gráficos de espectroscopia das modificações na superfície do elétrodo recoberto com ouro. MUA (a), ativação com EDC-NHS (b), imobilização do anticorpo (c), bloqueio com BSA (d) e ligação do DENV (e). DENV 1 (A), DENV 2 (B), DENV 3(C) e DENV 4 (D). Potencial aplicado de 0,005 V em 10 mM PBS (pH 7,4) contendo 0,5 mM de Fc.



4.3 Etapa 3: Produção do Imunossensor para Detecção do Vírus da Dengue Utilizando Nanopartículas Maghemita, Nanopartículas de Ouro e Aptâmeros

A terceira etapa do projeto constitui-se da produção de um novo imunossensor colorimétrico, utilizando nanomateriais para detecção do vírus da dengue. Os nanomateriais utilizados nessa etapa do trabalho foram obtidos pela conjugação entre nanopartículas maghemita (γ -Fe₂O₃) e

nanopartículas de ouro (AuNPs). As propriedades físico-químicas dos nanomateriais favorecem aplicações em sistemas biológicos, devido à afinidade e especificidade de ligação a diferentes compostos, como enzimas (116), ácidos nucleicos (117), peptídeos (118), proteínas funcionalizadas, anticorpos (89) e toxinas (119). O uso de nanomateriais em imunoenaios tem aumentado ao longo do tempo, produzindo testes comerciais rápidos que podem ser facilmente realizados por pessoas não especializadas, não necessitando de treinamento prévio (89).

4.3.1 Performance do Imunossensor

Todas as etapas de modificação na superfície das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ foram analisadas pela técnica de LSPR, fornecendo o monitoramento em tempo real das alterações obtidas, demonstradas na **Figura 24**. As nanopartículas apresentaram pico de absorbância a 394 nm (linha preta). Após a modificação superficial das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pela deposição do ácido 3-mercaptopropiônico (1 mM), ocorreu a formação de monocamadas auto-organizadas por ligação de grupos carboxilas as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, deixando os grupos tióis livres para se ligarem as AuNPs. As AuNPs foram sintetizadas conforme descritas no item 3.5.1, apresentando diâmetro médio de 19 nm, determinado por análise de MET e do software ImageJ.

A formação do complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs foi realizada em pH 7,0. Em particular, as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) foram incubadas as AuNPs ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) sob rotação contínua a 24°C durante 2 horas. Após o período de incubação, as nanopartículas foram separadas pela aplicação de um ímã magnético externo e repetidamente lavadas com água deionizada, a fim de eliminar os componentes diamagnéticos (AuNPs não ligados). Após a modificação, o pico da LSPR mostrou um deslocamento de 394 nm para 522 nm (linha vermelha), característica dos AuNPs, conforme descrito por *Basso et al.* (6, 44). Este deslocamento ocorreu devido ao aumento do índice de refração local na superfície das AuNPs. Na próxima etapa, a conjugação do aptâmero as AuNPs ocorreu por ligação covalente com a extremidade tiol. A sequência do aptâmero utilizado foi 5'-SH/-CCCGCACCGGGCAGGACGTCCGGGGTCCTCGGGGGGCGGG-3', sendo específica para os quatro sorotipos da dengue. Essa sequência foi escolhida quanto à sua eficácia e especificidade de acordo com o trabalho publicado por *Chen et al.* (120). Uma queda no pico da absorbância e deslocamento no comprimento de onda para 524 nm (linha verde) foram observados após a adição do aptâmero. Esta pequena alteração no comprimento de onda é devida ao tamanho reduzido da sequência do aptâmero, com 40 pb e 24,76 kDa. Um pool contendo os quatro sorotipos de dengue foi adicionado ao complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /MPA/AuNPs/aptâmero e uma diminuição na intensidade do pico de absorbância acompanhada por um deslocamento no comprimento de onda de 524 nm para 560 nm

foi observado (linha azul). A ligação aptâmero-vírus provocou uma redução da área superficial de AuNPs quando a amostra foi iluminada com luz não polarizada, devido a todos os processos envolvidos, justificando a redução da absorbância e o deslocamento do comprimento de onda do sinal da LSPR. Todas as etapas de modificações na superfície das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ são demonstradas na **Figura 25**.

Figura 24: Gráfico de LSPR mostrando as etapas de modificações ocorridas no nanomaterial híbrido. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (linha preta), AuNPs (linha rosa), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}$ (linha vermelha), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$ (linha verde) e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}/\text{pool DENV}$ (linha azul).

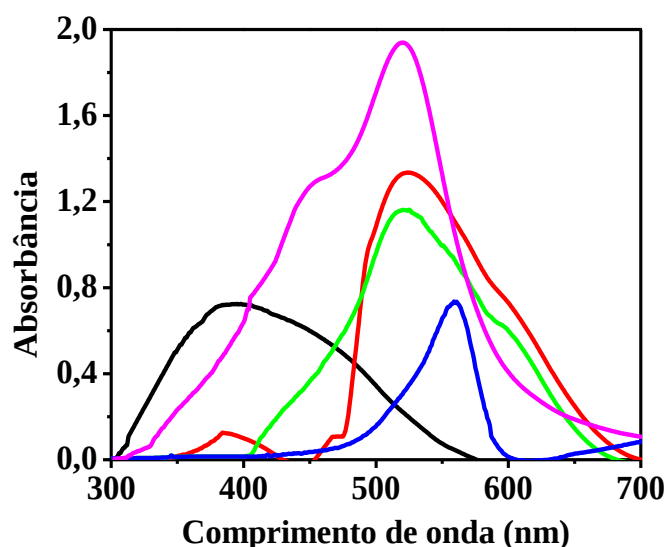
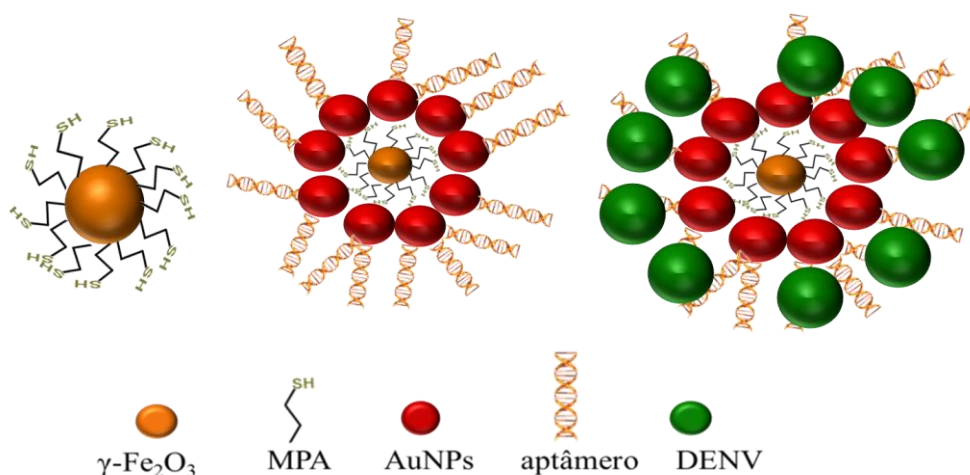
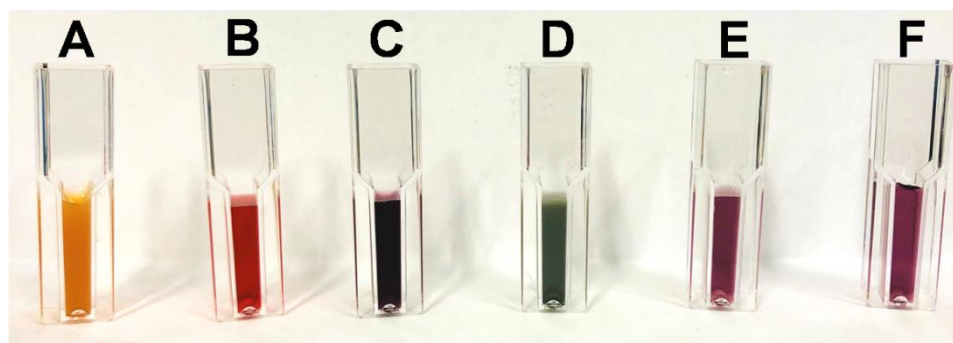


Figura 25: Representação esquemática da detecção do vírus da dengue. A imagem mostra a superfície das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ modificadas com MPA, AuNPs e aptâmeros, para detecção do vírus da dengue.



A alteração colorimétrica do kit foi detectada em cada etapa da produção do imunossensor, de acordo com as modificações superficiais do nanomaterial (**Fig. 26**). Na **Figura 26A** observamos as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sem qualquer modificação apresentando a coloração amarela terrosa, seguidas das AuNPs com coloração vermelha (**Fig. 26B**). A formação do complexo nanomaterial híbrido com deposição de aptâmeros em sua superfície ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$) apresentou coloração roxo escuro causada pela agregação dos aptâmeros nas nanopartículas (**Fig. 26C**). Após a adição do pool com os quatro sorotipos de dengue, a solução mostrou uma mudança em sua coloração para o verde, indicando a detecção do vírus causada pela ligação antígeno-aptâmero (**Fig. 26D**). Possíveis interferentes que apresentam estruturas semelhantes às do DENV como o ZIKV e o vírus da febre amarela que podem causar respostas falso-positivas foram testados, a fim de averiguar a especificidade do imunossensor. A adição do ZIKV não promoveu qualquer ligação ao complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$, apresentando uma coloração na tonalidade roxa (**Fig. 26E**). O mesmo aconteceu ao adicionarmos o vírus da febre amarela (**Fig. 26F**), demonstrando que a mudança para a cor verde ocorreu apenas para a ligação do DENV ao aptâmero.

Figura 26: Teste colorimétrico para detecção do DENV. As cubetas mostram: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (A), AuNPs (B), o complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$ (C), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}/\text{DENV}$ (D), testes de vírus interferentes com o ZIKV (E) e o vírus da febre amarela (F).

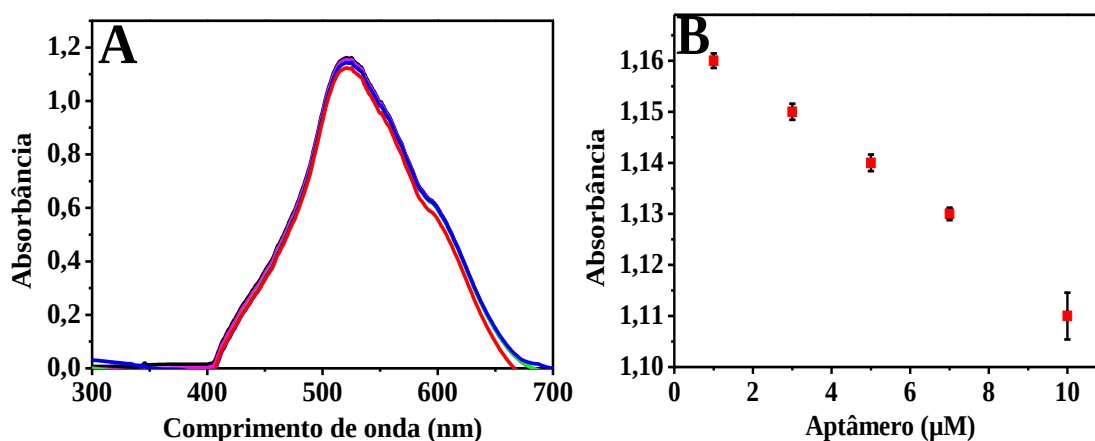


4.3.2 Otimização do Imunossensor

Para otimizar o sistema e determinar a concentração ideal de aptâmeros no experimento, diferentes concentrações do aptâmero foram testadas e a sensibilidade para o DENV foi monitorada por mudanças no espectro de UV-Vis (**Fig. 27A**). As concentrações testadas foram de 1,0; 3,0; 5,0;

7,0 e 10,0 μM com base em trabalhos anteriores publicados pelo nosso grupo (121). A maior concentração (10,0 μM) apresentou uma absorbância de 1,11 no comprimento de onda de 525 nm (linha vermelha). As concentrações do aptâmero com 3,0; 5,0 e 7,0 μM mostraram um aumento no pico de absorbância para 1,13-1,15 com comprimentos de ondas de 524-525 nm (linhas azul, verde e rosa na **Fig. 27A**). A menor concentração de aptâmero testada foi de 1,0 μM , que apresentou uma absorbância de 1,16 em 524 nm (linha preta). Esse resultado ocorreu devido a uma maior absorbância e menor transmitância da luz na superfície das nanopartículas. Quanto mais concentrada a solução com aptâmeros maior será sua ligação as AuNPs, diminuindo a área da superfície que interagem com a luz do laser. Nas concentrações mais altas (3,0; 5,0; 7,0 e 10,0 μM) não se observou grande diferença no sinal da LSPR, indicando que a concentração a 3,0 μM foi suficiente para recobrir a superfície das AuNPs modificadas. A **Figura 27B** mostra a curva de calibração e o fit linear em função das concentrações dos aptâmeros, indicando boa reprodutibilidade à medida que a concentração aumenta, com R^2 : 0,99.

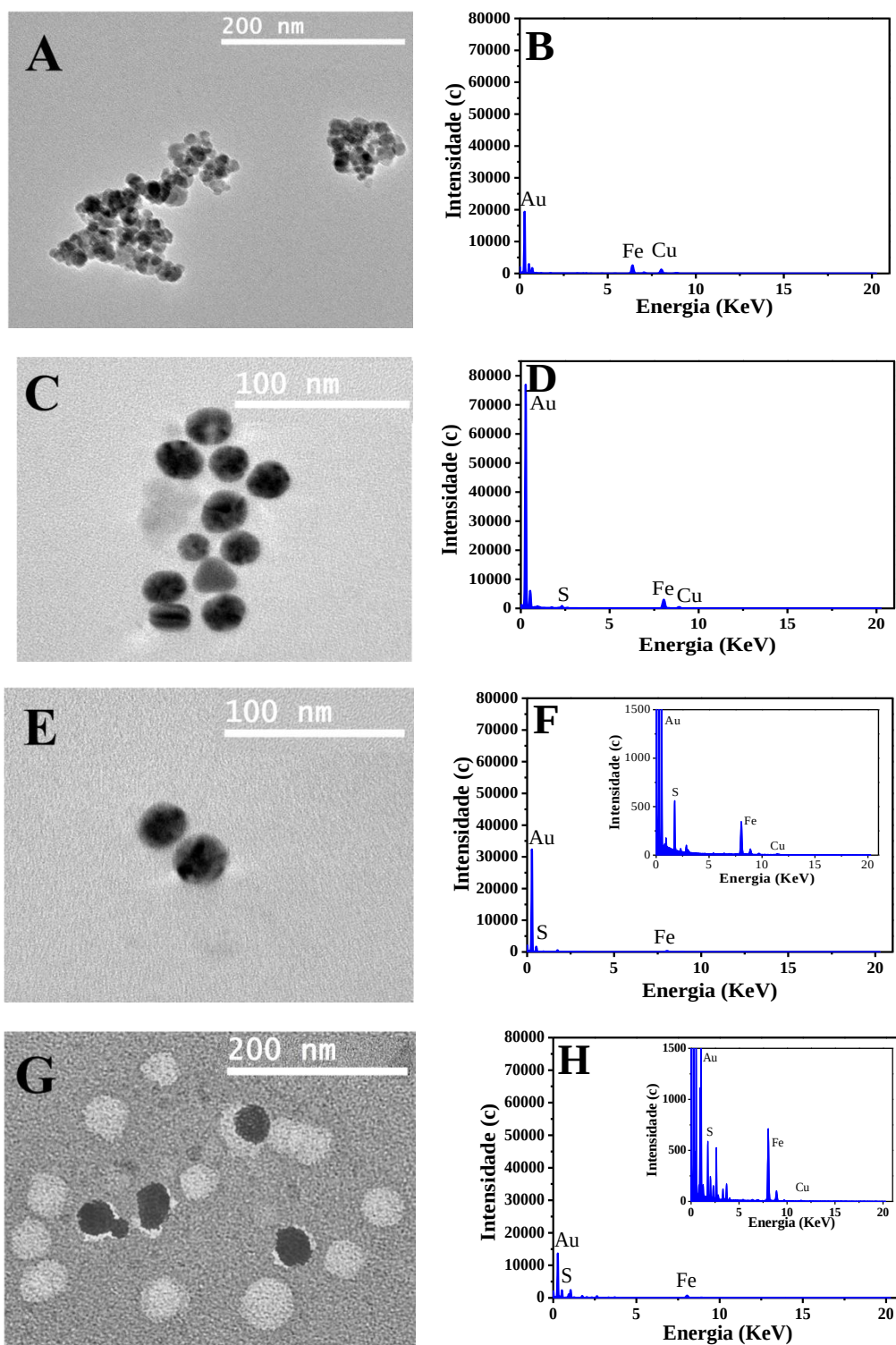
Figura 27: Espectro UV-Vis. A) Variações das concentrações de aptâmeros. 1,0 μM (linha preta) 3,0 μM (linha rosa), 5,0 μM (linha verde), 7,0 μM (linha azul) e 10,0 μM (linha vermelha), todas as diluições foram feitas com água deionizada. B) Curva de calibração para concentrações de aptâmeros com R^2 : 0,99.



As etapas de modificações e ligações na superfície das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ foram caracterizadas utilizando MET e EDX (**Fig. 28**), para confirmar os resultados obtidos na técnica LSPR. As amostras líquidas foram depositadas em grades de cobre recobertos com películas de carbono e secas a temperatura ambiente. As $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ não modificados apresentaram um diâmetro médio de 11 nm pela análise do software ImageJ das imagens obtidas na MET (**Fig. 28A**). Picos de ferro, bem como de

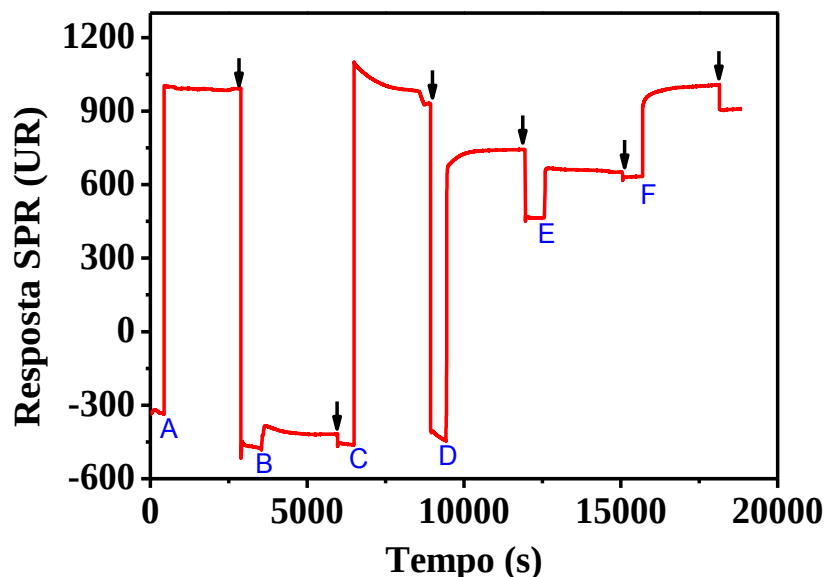
cobre e ouro (composição do material da grade) foram detectados por análises de EDX e são demonstrados na **Figura 28B**. Quando a superfície das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ foram modificadas pela formação das monocamadas auto-organizadas com MPA e subsequentemente AuNPs, foi observado um aumento na dispersibilidade da suspensão, possivelmente devido ao citrato de sódio presente na solução de AuNPs, que criou cargas negativas na superfície das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}$ e manteve a repulsão entre os conjugados. Esse conjugado passou a apresentar aumento no diâmetro para 30 nm (**Fig. 28C**) e, além dos picos de ferro e cobre já presentes, um pico de enxofre referente ao grupamento tiol presente na modificação da superfície com as monocamadas auto-organizadas e especificamente um aumento de cerca de 4 vezes no pico do ouro foram observados, confirmando a formação do complexo híbrido $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}$ (**Fig. 28D**). A **Figura 28E** mostra o complexo modificado com aptâmeros ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$), apresentando diâmetro médio de 31 nm. A pequena diferença em relação ao complexo não modificado é devido ao pequeno tamanho da sequência do aptâmero. Análises de EDX mostraram um aumento no pico de enxofre quando comparado com o complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}$ não modificado, devido à presença do aptâmero (**Fig. 28F**). A última modificação realizada foi a adição do pool com os quatro sorotipos da dengue. Na imagem de MET podemos observar o complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmeros}$ demonstrado pelas elipses pretas envoltas pelos vírus que são as esferas brancas (**Fig. 28G**). Imagens de *Flavivirus* em MET com a mesma morfologia e coloração descrita no nosso trabalho foram encontrada por Boigard et al. (122), ao analisar o zika vírus em células de mamíferos. Confirmando a presença do material biológico ao complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$, a análise de EDX mostrou uma redução significativa em todos os outros picos, ofuscados pela presença do vírus (**Fig. 28H**). Todos os valores obtidos nas imagens de MET foram confirmadas por análise do software ImageJ.

Figura 28: Imagens de MET e análises de EDX para todas as etapas de modificação do imunossensor. A) γ -Fe₂O₃ na escala de 200 nm. B) Gráfico de EDX das γ -Fe₂O₃. C) γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs com escala de 100 nm. D) Gráfico de EDX para γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs. E) γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs/aptâmero em escala de 100 nm. F) Gráfico de EDX para γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs/aptâmero. G) γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs/aptâmero ligados ao DENV na escala de 200 nm. H) Gráfico de EDX para γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs/aptâmero/DENV.



A confirmação de todas as etapas de ligações da metodologia proposta foi testada pela técnica SPR, que proporcionou o monitoramento em tempo real dos processos de adsorção e dessorção causados pelas ligações moleculares que aconteceram na superfície do sensor (90). Na **Figura 29** está demonstrado o gráfico da SPR, no qual o eixo y representa as unidades ressonantes (UR) onde um aumento a cada 120 miligraus no ângulo equivale a adsorção de 1 ng mm² de material na superfície do sensor, e no eixo x temos o tempo expresso em segundos (80). Primeiramente a linha base foi criada até a estabilização do sensor utilizando água deionizada. Após esta etapa a superfície do sensor de ouro precisou ser modificada pela deposição da solução de MPA (1mM) proporcionando a ligação das SAMs a superfície do sensor de ouro (ponto A). A injeção da solução das γ -Fe₂O₃ (0,5 mg mL⁻¹) ocorreu no ponto B, seguida pela lavagem com água deionizada para remoção das nanopartículas fracamente ligadas. A diferença entre a injeção no ponto B e a lavagem indicada pela flecha preta mostra a quantidade de γ -Fe₂O₃ adsorvidas na superfície do sensor. Seguinte esta etapa, a formação das SAMs ocorreu pela adição da solução de MPA (1 mM) (ponto C) necessária para ligação das AuNPs que ocorreu no ponto D. Após a lavagem, observou-se um aumento no sinal das UR correspondente à ligação das AuNPs ao grupo tiol das monocamadas. A injeção de aptâmeros na concentração de 3 μ M (ponto E) levou ao aumento da UR no gráfico e após a etapa de lavagem o valor obtido foi de 230 UR, referente a subtração do ponto E (lavagem indicada pela flecha preta), correspondente a 2,0 ng mm² de aptâmeros ligados ao complexo γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs. A injeção do pool com os quatro sorotipos da dengue ocorreu no ponto F, e o pequeno decline da UR após a lavagem, evidenciou a forte ligação entre o vírus e o aptâmero. Todas as etapas de lavagem com água deionizada no experimento são representadas pelas flechas pretas voltadas para baixo.

Figura 29: Gráfico SPR para detecção DENV. MPA formando as SAMs (ponto A), γ -Fe₂O₃ (ponto B), MPA (ponto C), AuNPs (ponto D), aptâmeros (ponto E) e pool DENV (ponto F). Todas as etapas de lavagem foram realizadas usando água deionizada e estão demonstradas pelas setas pretas para baixo.



4.3.3 Análises dos Interferentes

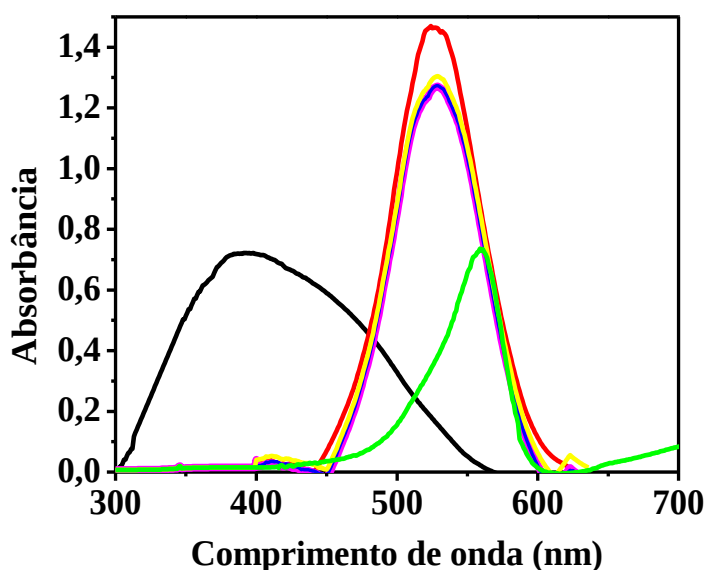
Como o vírus da dengue é um *Flavivirus* pertencente à família *Faviviridae* sua estrutura se assemelha a de outro vírus do mesmo gênero, apresentando proteínas estruturais semelhantes como ao do ZIKV e o vírus da febre amarela, podendo causar diagnóstico falso-positivo em testes convencionais, impedindo assim que o paciente tenha o tratamento médico correto [2]. Dessa forma, se faz necessário o teste de especificidade entre o aptâmero e o vírus da dengue utilizando possíveis interferentes para validar a metodologia proposta.

Os resultados são apresentados na **Figura 30** e não mostram ligações dos vírus ZIKV e febre amarela ao aptâmero do complexo γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs/aptâmero, evidenciando a ausência de interferências e a alta especificidade do sistema proposto. O complexo γ -Fe₂O₃/MPA apresentou uma absorbância de 0,72 em 389 nm de comprimento de onda (linha preta). A deposição das AuNPs na superfície das γ -Fe₂O₃/MPA, aumentou o pico de absorbância para 1,46 com deslocamento de 528 nm no comprimento de onda (linha vermelha). Após a adição do aptâmero (linha rosa) a absorbância obtida foi de 1,22 em 528 nm. A absorbância registrada após a adição do vírus da febre amarela ao complexo γ -Fe₂O₃/MPA/AuNPs/aptâmero foi de 1,3 com 528 nm no comprimento de onda (linha amarela) e de 1,22 com 527 nm no comprimento de onda após a injeção do ZIKV (linha azul).

Comparando os sinais obtidos dos interferentes (vírus da febre amarela e ZIKV) com o espectro UV-Vis para o vírus da dengue (linha verde), observamos que na presença dos dois interferentes não houve diminuição no pico de absorbância e deslocamento no comprimento de onda, mostrando que a sequência do aptâmero é específica apenas para se ligar aos quatro sorotipos da dengue. Uma vez, que a não ligação dos interferentes ao complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$ não causou aumento no índice de refração local.

Todos os resultados obtidos foram realizados em triplicata e a taxa de reprodutibilidade foi de 98,9%. As amostras utilizadas (DENV 1-2-3-4, vírus da febre amarela e ZIKV) foram previamente testadas pelas técnicas de ELISA e RT-qPCR para confirmar a presença de vírus.

Figura 30: Espectro UV-Vis para os controles negativos e o DENV. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}$ (linha preta), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}$ (linha vermelha), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$ (linha rosa), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}/\text{febre amarela}$ (linha amarela), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}/\text{ZIKV}$ (linha azul) e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}/\text{DENV}$ (linha verde).



5. CONCLUSÃO

Na primeira etapa do projeto, foi comparado dois métodos comumente usados na literatura para evitar a formação de agregados entre as AuNPs. Primeiramente foi testado o método de redução aquosa variando os valores de pH para manter a estabilidade e a dispersão entre as AuNPs com a adição de soluções de NaOH e HCl. No entanto, este método não revelou ser eficaz, permitindo uma forte agregação entre as AuNPs ao longo do tempo. O segundo método analisado foi a adição do surfactante Tween20 no momento da síntese das AuNPs. Foram testadas diferentes concentrações do surfactante para verificar a eficiência na dispersão. Os resultados adquiridos mostraram que, após um ano houve uma tendência natural à agregação, mas quando se fez uso do surfactante essa tendência diminuiu mantendo uma alta dispersão entre as AuNPs, concluindo que a metodologia utilizando surfactante conseguiu manter uma maior estabilidade na dispersão das AuNPs sem formação de grandes agregados.

A metodologia apresentada na segunda etapa do projeto se mostrou eficaz em detectar efetivamente o vírus da dengue. Os anticorpos ligados as AuNPs forneceram uma alternativa atrativa para abordagens na detecção e identificação do DENV. Esta nova metodologia envolveu procedimentos operacionais simples, reduzindo significativamente a duração dos testes tradicionais que levam em média de 1-5 dias para menos de 30 minutos, tornando-o mais rápido do que os métodos clínicos comumente utilizados. Além disso, com 0,004 g de HAuCl_4 foi possível produzir 12 ml de AuNPs, o suficiente para analisar 48 amostras. Somando todos os custos dos reagentes utilizados, o valor final do kit foi de cerca de R\$ 9,00 por amostra, que chegou a ser 100% menor do que os métodos de teste tradicionais, que variam de 40 a 1000 reais dependendo da localidade.

Na terceira etapa do projeto foi apresentado um novo nanomaterial híbrido formado pela ligação de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e AuNPs conjugadas a aptâmeros, formando o complexo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{MPA}/\text{AuNPs}/\text{aptâmero}$. O complexo apresentou alta especificidade e seletividade para os quatro sorotipos da dengue, não detectando possíveis interferências como o ZIKV e o vírus da febre amarela. Essa nova metodologia também proporcionou o diagnóstico colorimétrico da doença em real, sem a necessidade de outros equipamentos, minimizando custo e tempo. A substituição dos anticorpos tradicionalmente usados pelos aptâmeros mostrou-se eficiente e com alta taxa de especificidade e seletividade, formando apenas ligações com os quatro sorotipos da dengue, além do baixo custo, simplicidade de produção, fácil manipulação, bom rendimento de bioconjugação e produção em larga escala.

Em um futuro próximo, esperamos que os resultados apresentados neste trabalho possam ser

utilizados como ferramenta diagnóstica clínica para detectar não só o vírus da dengue, mas também outros patógenos.

6. ARTIGOS PUBLICADOS, CAPÍTULO DE LIVRO E PETENTES

ARTIGOS

BASSO, CAROLINE R.; CRULHAS, BRUNO, P.; MASSIMILIANO, MAGRO.; VIANELLO, FABIO.; PEDROSA, VALBER, A. A new immunoassay of hybrid nanomater conjugates to aptamers for the detection of dengue vírus. *Talanta*, v. 197, p. 482-490, 2019.

BASSO, CAROLINE R.; TOZATO, CLAUDIA C.; CRULHAS, BRUNO P.; CASTRO, GUSTAVO R.; JUNIOR, JOÃO PESSOA A.; PEDROSA, VALBER A. An easy way to detect dengue vírus using nanoparticle-antibody conjugates. *Virology*, v. 513, p. 85-90, 2018.

PARRA, JOÃO P. R. L. L.; CRULHAS, BRUNO P.; **BASSO, CAROLINE R.**; DELELLA, FLÁVIA K. ; CASTRO, GUSTAVO R.; PEDROSA, VALBER A. Using an Electrochemical Aptasensor to Early Detect Prostate Specific and Free Prostate-Specific Antigens Released by Cancer Cells. *Electroanalysis*, v. 30, p. 1-10, 2018.

KARPIK, AGNIESZKA E.; CRULHAS, BRUNO P.; **BASSO, CAROLINE R.**; CASTRO, GUSTAVO R.; PEDROSA, VALBER A. Aptamer-Based Biosensor Developed to Monitor MUC1 Released by Prostate Cancer Cells. *Electroanalysis*, v. 29, p. 10, 2017.

VERDOODT, NIELS; **BASSO, CAROLINE R.**; ROSSI, BRUNA F.; PEDROSA, VALBER A. Development of a rapid and sensitive immunosensor for the detection of bacteria. *Food Chemistry*, v. 221, p. 1792-1796, 2017.

TOZATO, CLAUDIA DE CAMARGO; ZADRA, VÍVIAN FERREIRA; **BASSO, CAROLINE R.**; ARAÚJO JUNIOR, JOÃO PESSOA. Canine distemper virus detection by different methods of One-Step RT-qPCR. *Ciência Rural*, v. 46, p. 1601-1606, 2016.

RECCO, LUCAS; CRULHAS, BRUNO P.; **BASSO, CAROLINE R.**; CASTRO, GUSTAVO R.; PEDROSA, VALBER A. Direct Electrochemical Detection of Estriol in Serum by Polymer Brushes Reinforced with Carbon Nanotubes. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, v. 5, p. M3041-M3044, 2016.

BASSO, CAROLINE RODRIGUES; SEMPIONATTO, JULIANE R.; TOZATO, CLAUDIA C.; ROCHA, GUSTAVO C.; ARAUJO, JOAO PESSOA; PEDROSA, VALBER A. Effects of Protein A in Detection of Canine Distemper Virus Through Immunosensor Construction. *IEEE Sensors Journal*, v. 15, p. 4677-4683, 2015.

BRUNO R. CRULHAS; RAMOS, N. P.; **BASSO, C. R.**; VLADIMIR E. COSTA; GUSTAVO R. CASTRO; PEDROSA, V. A. Fabrication and Characterization of Ferrocene Containg Hydrigel for Glucose Biosensor Application. *International Journal of Electrochemical Science (Online)*, v. 9, p. 7596-7604, 2014.

BASSO, CAROLINE R.; TOZATO, CLAUDIA C.; JUNIOR, JOÃO PESSOA A.; PEDROSA, VALBER A. A fast and highly sensitive method for the detection of canine distemper virus by the naked eye. *Analytical Methods (Print)*, v. xxx, p. 1, 2014.

ANTONIO, TAMARA.R. T. A; BASSO, CAROLINE. R.; PEDROSA, VALBER. A. Electrochemical Studies Based on Local Interfacial pH Changes of Gold Nanoparticles Immobilized on Polystyrene Brushes. International Journal of Electrochemical Science (Online), v. 8, p. 4150-4159, 2013.

BASSO, CAROLINE R.; TOZATO, CLAUDIA C; RIBEIRO, MARCELA CRISTINA M; JUNIOR, JOAO PESSOA ARAUJO; PEDROSA, VALBER A. A Immunosensor for the Diagnosis of Canine Distemper Virus Infection using SPR and EIS. Analytical Methods (Print), v. xx, p. 1-21/207890, 2013.

BASSO, CAROLINE R.; SANTOS, BRUNA L.; PEDROSA, VALBER A. Switchable Biosensor Controlled by Biocatalytic Process. Electroanalysis (New York, N.Y.), v. 25, p. n/a-n/a, 2013.

CAPÍTULO DE LIVRO

CRULHAS, B. P.; BASSO, C. R.; PEDROSA, V. A. Nanoplasmonic Biosensors. Biocatalysis and Nanotechnology. 3ed. Singapore: Pan Stanford, 2017, p. 1-900.

PATENTES

BASSO, C. R.; PEDROSA, V. A. ; Araujo Junior, J.P . Processo De Obtenção Dos Reagentes De Um Kit Colorimétrico Para A Detecção De Doenças Virais, Preferencialmente Do Vírus Da Cinomose Canina E Referido Kit Colorimétrico. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201503044, título: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS REAGENTES DE UM KIT COLORIMÉTRICO PARA A DETECÇÃO DE DOENÇAS VIRAIS, PREFERENCIALMENTE DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA E REFERIDO KIT COLORIMÉTRICO", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 04/12/2015.

BASSO, C. R.; PEDROSA, V. A. Método De Detecção De Doença Viral E Kit Diagnóstico 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201801603, título: "MÉTODO DE DETECÇÃO DE DOENÇA VIRAL E KIT DIAGNÓSTICO", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 06/08/2018.

7. REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Why are some tropical diseases called "neglected"? Disponível em: <<http://www.who.int/features/qa/58/en/>>. Acesso em: 11/01/2018.
2. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.
3. SOUZA, W. D. **Doenças Negligenciadas**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2010.
4. ANDRIES, A. C. et al. Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 16, p. 1-9, 2016.
5. COPYRIGHT VP. ViralZone. Disponível em: <<https://viralzone.expasy.org/>>. Acesso em: 11/01/2018.
6. WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 523-540, 2009.
7. JAHANSHAH, P. et al. Rapid immunoglobulin M-based dengue diagnostic test using surface plasmon resonance biosensor. **Scientific Reports**, v. 24, n. 4, p. 3851, 2014.
8. GUIMARÃES, G. D. F. **Clonagem, expressão e análise do tráfego celular das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 3 fusionadas à proteína lisossomal LAMP**. 2009. 129f. Dissertação de Mestrado- Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.
9. AMORIM, J. H. et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. **Vaccine**, v. 30, n. 5, p. 837-45, 2012.
10. CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue quo tu et quo vadis?. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562-1608, 2011.
11. DIALLO, M. et al. Potential role of sylvatic and domestic African mosquito species in dengue emergence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 445-449, 2005.
12. HOTTA, R. K. A. S. Studies on dengue fever (VI). On the inoculation of dengue virus into mice (in Japanese). **Nippom Igaku**, v. 3379, p. 629-633, 1994.
13. SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v. 101, n. 2634, p. 640-642, 1945.
14. RAMOS-CASTANEDA, J. et al. Dengue in Latin America: Systematic review of molecular epidemiological trends. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, 2017.
15. TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): A systematic literature search and analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. 2520, 2013.

16. DRUMOND, B. P. et al. Population dynamics of DENV- genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. **Archives of Virology**, v. 157, n. 11, p. 2061-2073, 2012.
17. FARIA, N. R. et al. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 2095, 2013.
18. MUTURI, E. J.; BARA J. Sindbis virus interferes with dengue 4 virus replication and its potential transmission by Aedes albopictus. **Parasites & Vectors**, v. 30, n. 8, p. 65, 2015.
19. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 3, p. 1-11, 2017.
20. EHRENKRANZ, N. J. et al. Pandemic dengue in Caribbean countries and the southern United States--past, present and potential problems. **The New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 26, p. 1460-1469, 1971.
21. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 29, p. 1-13, 2017.
22. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018, **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 59, p. 1-14, 2018.
23. DOS SANTOS, F. B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology Journal**, v. 3, n. 8, p. 387, 2011.
24. VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532-541, 2011.
25. MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropical**, v. 166, p.155-163, 2017.
26. NGUYEN, T. T. et al. In vitro evaluation of novel inhibitors against the NS2B-NS3 protease of dengue fever virus type 4. **Molecules**, v. 18, n. 12, 15600-15612, 2013.
27. GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p.480-496, 1998.
28. BROWN, H. E, et al. Habitat and density of oviposition opportunity influences aedes aegypti (diptera: culicidae) flight distance. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 5, p. 1385-1389, 2017.
29. BONG, L. J. et al. The effect of insecticidal stress on reproductive output of susceptible and field strains of aedes aegypti (diptera: culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 55, n. 1, p. 36-42, 2018.
30. SOUZA, R. L. et al. Effect of an intervention in storm drains to prevent Aedes aegypti

reproduction in Salvador, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 328, 2017.

31. QSIM, M. et al. Genetically modified aedes aegypti to control dengue: a review. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 27, n. 4, p.331-340, 2017.

32. CRUZ, I. O. Conheça o comportamento do mosquito Aedes aegypti. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=571&sid=32>>. Acesso em: 11/01/2018.

33. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Combate ao Aedes pode ser mais eficiente durante o frio. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/index.php/combate-ao-aedes/52609-combate-ao-aedes-pode-ser-mais-eficiente-durante-o-frio>>. Acesso em: 11/01/2018.

34. BOS, S.; GADEA, G.; DESPRES, P. Dengue: a growing threat requiring vaccine development for disease prevention. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 6, p.294-305, 2018.

35. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Vacina dengue: esclarecimentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201>. Acesso em: 06/08/2018.

36. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Vacina contra dengue tem preço definido. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-contradengue-tem-preco-definido/219201>. Acesso em: 06/08/2018.

37. ROSS, T. M. Dengue virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p.149-60, 2010.

38. KUMBHAT, S. et al. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 2, p. 255-259, 2010.

39. ZHANG, B. et al. Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 7, p. 1745-1761, 2015.

40. RANJIT, S.; KISSOON, N. Dengue hemorrhagic fever and shock syndromes. **Pediatric Critical Care Medicine: a Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies**, v. 12, n. 1, p. 90-100, 2011.

41. KAROLINY, A. et al. Dengue diagnosis on laser printed microzones using smartphone-based detection and multivariate image analysis. **Analytical Methods**, v. 8, p. 6506-6511, 2016.

42. SAXENA, P. et al. Development and evaluation of one step single tube multiplex RT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. **Virology Journal**, v. 5, p. 20, 2018.

43. WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 690-695, 2010.

44. WIWANITKIT, S. WIWANITKIT, V. Dengue rapid nanodiagnostic test: What to be concerned. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 249, 2016.

45. GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases: IJID**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.
46. BANSI, D.; MALHOTRA, A. C. Biosensors for clinical diagnostics industry. **Sensors and Actuators B**, v. 91, p. 117-27, 2003.
47. JAMES, P. et al. Biosensor Recognition Elements. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 10, p.1-12, 2008.
48. THÉVENOT, D. R.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121-31, 2001.
49. LELAND, C.; CLARK, J. R. C. L. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 102, p. 29-45, 1962.
50. BASSO, C. R. et al. A Immunosensor for the Diagnosis of Canine Distemper Virus Infection using SPR and EIS. **Analytical Methods**, v. 5, p. 5089-5095, 2013.
51. MICHAEL, L. N. Z. et al. A novel biosensor based on hafnium oxide: Application for early stage detection of human interleukin-10. **Sensors and Actuators B**, v. 175, p. 201-207, 2012.
52. ERCOLEA, M. D. G. et al. Escherichia coli detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. **Sensors and Actuators B**, v. 91, p.163-168, 2003.
53. CHEN YAN, F. D. et al. Recent progress of commercially available biosensors in China and their applications in fermentation processes. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 21, n. 4, p. 73-85, 2014.
54. CHEN, Y. W. M. L.; KANEKO, T.; MCINTYRE, P. C. Atomic layer deposited hafnium oxide gate dielectrics for charge-based biosensors. **Electrochemical and Solid-State Letters**, v. 13, p. 29-32, 2010.
55. WINKLER, T. E. et al. The role of microsystems integration towards point-of-care clozapine treatment monitoring in schizophrenia. **IEEE Sensors Letters**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2018.
56. WANG, N. et al. A novel surface plasmon resonance biosensor based on the PDA-AgNPs-PDA-Au film sensing platform for horse IgG detection. **Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 191, p. 290-295, 2018.
57. DOROTHEE, G. R. M.; VOR, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400-1458, 2008.
58. CHRISTOPHER, F.; FRONCZEK, J. Y. Y. Biosensors for monitoring airborne pathogens. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 4, p. 390–410, 2015.
59. VACULOVICOVA, M. P. M. et al. Nanotechnology-based analytical approaches for detection of viruses. **Analytical Methods**, v. 9, p. 2375-2391, 2017.
60. LIN, D. et al. Signal amplification for electrochemical immunosensing by in situ assembly of host-guest linked gold nanorod superstructure on immunocomplex. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 45, p. 195-200, 2013.
61. SEOW, N.; LAI, P. S.; YUNG, L. Y. Gold nanostructures for the multiplex detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene mutations. **Analytical Biochemistry**, v. 451, p. 56-62, 2014.

62. RECCO, L. C. et al. Direct electrochemical detection of estriol in serum by polymer brushes reinforced with carbon nanotubes. **ECS Journal of Solid State Scienc and Technology**, v. 5, n. 8, p. 3041-3044, 2016.
63. CHIKKAVEERAI AH, B. V. et al. Single-wall carbon nanotube forest arrays for immunoelectrochemical measurement of four protein biomarkers for prostate cancer. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 21, p. 9129-9134, 2009.
64. MERCANTE, L. A. et al. Electrospun polyamide 6/poly(allylamine hydrochloride) nanofibers functionalized with carbon nanotubes for electrochemical detection of dopamine. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 8, p. 4784-4790, 2015.
65. ALWARAPPAN, S. et al. Chitosan-Modified Graphene Electrodes for DNA Mutation Analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 686, p. 69-72, 2012.
66. JANEGITZ, B. C. et al. Electrochemical determination of estradiol using a thin film containing reduced graphene oxide and dihexadecylphosphate. **Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications**, v. 37, p. 14-9, 2014.
67. SIQUEIRA, J. R. et al. Penicillin biosensor based on a capacitive field-effect structure functionalized with a dendrimer/carbon nanotube multilayer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 2, p. 497-501, 2009.
68. CRESPI LHO, F. N. et al. The origin of the molecular interaction between amino acids and gold nanoparticles: A theoretical and experimental investigation. **Chemical Physics Letters**, v. 469, n. 1, p. 186-90, 2009.
69. URDEA, M. et al. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. **Nature**, v. 444, p. 73-79, 2006.
70. SAGAYA, L. et al. Immunodipstick based gold nanosensor for vitamin B12 in fruit and energy drinks. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1806-1810, 2013.
71. DISCIPIO, R. G. Preparation of colloidal gold particles of various sizes using sodium borohydride and sodium cyanoborohydride. **Analytical Biochemistry**, v. 236, n. 1, p. 168- 170, 1996.
72. SAPTARSHI, S. R.; DUSCHL, A.; LOPATA, A. L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, p. 26, 2013.
73. VAN QUY, D. et al. Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, p. 6, 2013.
74. WILSON R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 9, p. 2028-2045, 2008.
75. KHALIDA S. et al. Comparative study on methods for preparation of gold nanoparticles. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 2, p. 26-28, 2012.
76. OMIDFAR, K. et al. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 3, p.843-55, 2012.

77. MUANGNAPOH, T. N. S. et al. Facile strategy for stability control of gold nanoparticles synthesized by aqueous reduction method. **Current Applied Physics**, v. 10, p. 708-714, 2010.
78. HU, B. et al. Gold nanorod-covered kanamycin-loaded hollow SiO₂ (HSKAu(rod)) nanocapsules for drug delivery and photothermal therapy on bacteria. **Nanoscale**, v. 5, n. 1, p. 246-252, 2013.
79. PELTON, M. J. A.; BRYANT, G. Metal-nanoparticle plasmonics. **Laser & Photon**, v. 2, n. 3, p. 136–159, 2008.
80. BASSO, C. R. et al. A fast and highly sensitive method for the detection of canine distemper virus by the naked eye. **Analytical. Methods**, v. 7, p. 2264-2267, 2015.
81. LEUNG, K. C. et al. Gold and iron oxide hybrid nanocomposite materials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 1911-1928, 2012.
82. HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. **Materials Today**, v. 16, p. 262-271, 2013.
83. HAES, A. J. et al. Using solution-phase nanoparticles, surface-confined nanoparticle arrays and single nanoparticles as biological sensing platforms. **Journal of Fluorescence**, v. 14, p. 355-367, 2004.
84. BARATELLA, D. et al. Electrostatically stabilized hybrids of carbon and maghemite nanoparticles: electrochemical study and application. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, p. 11668-11677, 2017.
85. MAGRO, M. et al. Core–shell hybrid nanomaterial based on prussian blue and surface active maghemite nanoparticles as stable electrocatalyst. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, p. 159-165, 2014.
86. MIOTTO, G. et al. Protein corona as a proteome fingerprint: the example of hidden biomarkers for cow mastitis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 40-49, 2016.
87. MAGRO, M. et al. Colloidal surface active maghemite nanoparticles for biologically safe Crvi remediation: from core-shell nanostructures to pilot plant development. **Chemistry: A European Journal**, v. 40, p. 14219-14226, 2016.
88. MAGRO, M. et al. Covalently bound DNA on naked iron oxide nanoparticles: intelligent colloidal nano-vector for cell transfection. **Biochimica et Biophysica. Acta (BBA)**, v. 1861, p. 2802-2810, 2017.
89. MAGRO, M. et al. Analysis of hard protein corona composition on selective iron oxide nanoparticles by MALDI-TOF mass spectrometry: identification and amplification of a hidden mastitis biomarker in milk proteome. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 2949-2959, 2018.
90. BASSO, C. R. et al. Effects of protein A in detection of canine distemper virus through immunosensor construction. **IEEE Sensors Journal**, v. 15, n. 8, p. 4677-4683, 2015.
91. TRACI, R. et al. Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 45, p. 10549-10556, 2000.
92. WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and

sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, p. 267-297, 2007.

93. WEDDEMANN, A. et al. Review and outlook: from single nanoparticles to self-assembled monolayers and granular GMR sensors. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 1, p. 75-93, 2010.

94. YANG, S. F. et al. Detection of c-reactive protein based on a magnetic immunoassay by using functional magnetic and fluorescent nanoparticles in microplates. **The Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5576-5581, 2014.

95. HE, N. W. F. et al. Chemiluminescence analysis for HBV- DNA hybridization detection with magnetic nanoparticles based DNA extraction from positive whole blood samples. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 2, p. 267-273, 2013.

96. JATSCHK, J. A. D. et al. Propagating and localized surface plasmon resonance sensing — A critical comparison based on measurements and theory. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 7, p. 62-70, 2016.

97. Dengue virus Type 1, 2, 3 & 4 antibody [D1-11(3)]. In: Corporation GI, California 2016.

98. KULKARNI, A. et al. Neutrolizing antibody response and efficacy of novel recombinant tetravalente dengue DNA vaccine comprising envelope domain III in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 42, n. 2, p. 152-160, 2017.

99. ENOMOTO, J. et al. Gold cleaning methods for preparation of cell culture surfaces for self-assembled monolayers of zwitterionic oligopeptides. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 5, p.606-612, 2018.

100. FRENS G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, p. 20-22, 1973.

101. MAGRO, M. et al. Charge binding of rhodamine derivative to OH- stabilized nanomaghemite: universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 2068-2076, 2012a.

102. MAGRO, M. et al. Avidin functionalized maghemite nanoparticles and their application for recombinant human biotinyl-SERCA purification. **Langmuir**, v. 28, p. 15392-15401, 2012b.

103. CHIRRA, H. D. et al. Catalase-coupled gold nanoparticles: comparison between the carbodiimide and biotin-streptavidin methods. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2865-72, 2011.

104. RUACH-NIR, I. et al. Silica-stabilized gold island films for transmission localized surface plasmon sensing. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 1, p. 84-92, 2007.

105. GAO, S. et al. Innovative platform for transmission localized surface plasmon transducers and its application in detecting heavy metal Pd(II). **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 18, p. 7703-7712, 2009.

106. KUMAR, S. S. H. Y.; KIM, G. H. Bridging the nanogap electrodes with gold nanoparticles using dielectrophoresis technique. **Current Applied Physics**, v. 9, p.101-103, 2009.

107. CAO G. Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications. **World Scientific**. 2 ed. Louisiana, United States of America, 2011.

108. SCAFFARDI, L. B. N. P.; SANCTIS, O.; TOCHO, J. O. Sizing gold nanoparticles by optical

extinction spectroscopy. **Nanotechnology**, v. 16, p.158-163, 2005.

109. ANDREESCU, D. T. K. S.; GOIA, D. V. Stabilizer-free nanosized gold sols. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, p. 742–751, 2006.

110. ZHANG, W. et al. Colorimetric assay for heterogeneous-catalyzed lipase activity: enzyme-regulated gold nanoparticle aggregation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 39-42, 2015.

111. SILVA, T. R. D. B.; ZAPP, E.; Vieira, I. C. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles stabilized in Poly(allylamine hydrochloride) for determination of vanillin. **Electroanalysis**, v. 27, p. 465-472, 2015.

112. ZHANG, Z. et al. Label free colorimetric sensing of thiocyanate based on inducing aggregation of Tween 20-stabilized gold nanoparticles. **The Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2682-2686, 2012.

113. WANG, C.; IRUDAYARAJ, J. Gold nanorod probes for the detection of multiple pathogens. **Small**, v. 4, n. 12, p. 2204-2208, 2008.

114. POLLITT, M. J. G. B.; PIPERB, R.; BROCCINIA, S. Measuring antibody coatings on gold nanoparticles by optical spectroscopy. **RSC Advances**, v. 5, p. 24521, 2015.

115. WISPELAERE, M. et al. Inhibition of Flaviviruses by targeting a conserved pocket on the viral envelope protein. **Cell Chemical Biology**, v. 25, p. 1-11, 2018.

116. ROTELLO, V. M. Interfacing inorganic nanoparticles with biology. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, p. 1–2, 2017.

117. MAGRO, M. et al. Core–shell hybrid nanomaterial based on prussian blue and surface active maghemite nanoparticles as stable electrocatalyst. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, p. 159-165, 2014.

118. BRIEN, J.; SHEA, K. J. Tuning the protein corona of hydrogel nanoparticles: the synthesis of abiotic protein and peptide affinity reagents. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, p. 1200-1210, 2016.

119. CORBO, C. et al. Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications. **Biomaterials Science**, v. 5, p. 378-387, 2017.

120. CHEN, H. L. et al. Selection and characterization of DNA aptamers targeting all four serotypes of dengue viruses. **Plos One**, v. 6, p. 1-13, 2015.

121. CRULHAS, B. P. et al. Electrochemical aptamer-based biosensor developed to monitor PSA and VEGF released by prostate cancer cells. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 6771–6780, 2017.

122. BOIGARD, H. et al. Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1-20, 2017.