



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

DÉBORA MÁXIMO DAS NEVES LUNA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICOS PARA GLICOPROTEÍNAS DE
INTERESSE CLÍNICO A PARTIR DE FILMES MISTOS
DE FOSFOLIPÍDIOS E LECTINAS DEPOSITADOS EM
SUBSTRATOS SÓLIDOS**

Recife, 2015

DÉBORA MÁXIMO DAS NEVES LUNA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICOS PARA GLICOPROTEÍNAS DE
INTERESSE CLÍNICO A PARTIR DE FILMES MISTOS
DE FOSFOLÍPIDIOS E LECTINAS DEPOSITADOS EM
SUBSTRATOS SÓLIDOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Inovação Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco para obtenção do título
de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Recife, 2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Luna, Débora Máximo das Neves

Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para glicoproteínas de interesse clínico a partir de filmes mistos de fosfolipídios e lectinas depositados em substratos sólidos/ Débora Máximo das Neves Luna– Recife: O Autor, 2015.

136 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Cesar Augusto Souza de Andrade

Coorientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia e anexos

1. Glicoproteína 2. Lectinas 3. Dengue I. Andrade, Cesar Augusto Souza (orientador) II. Oliveira, Maria Danielly Lima de (coorientadora) III. Título

572.68

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 196

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 27 de fevereiro de 2015

Tese de doutorado defendida e APROVADA, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2015, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

(Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

(Departamento de Física – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

Aos meus pais Josival e Maria de Fátima e ao meu irmão Rodrigo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou eternamente grata a Deus por sua presença em minha vida. A minha família pela paciência, companheirismo e amor.

Ao Prof. César Augusto e Profa. Maria Danielly pela orientação dada ao longo destes anos, pelo empenho em solucionar os desafios que foram surgindo, pela compreensão de algumas limitações e por todo o aprendizado adquirido.

Ao Prof. Celso Melo e aos amigos do grupo Polímeros Não-Convencionais (PNC) por me acolherem durante as primeiras etapas da pesquisa, pelas trocas de conhecimentos e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do grupo Biodispositivos nanoestruturados (Bionano) pela troca de experiências, pela companhia cotidiana, palavras de conforto, incentivo e força.

À Tarcyla, Sérgio e Elias pela realização das imagens de AFM e MEV.

Ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) pela experiência única adquirida em um ambiente multiprofissional e interdisciplinar, em especial, ao secretário Paulo Germano por sua cordialidade e dedicação.

À Profa. Suely Galdino (*In memoriam*) por seus ensinamentos enriquecedores, tanto no âmbito profissional quanto pessoal, minha eterna gratidão, admiração e respeito.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

A todos os amigos e familiares que diretamente ou indiretamente exerceram participação na conclusão desta tese, muito obrigada.

RESUMO

LUNA, D.M.N. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para glicoproteínas de interesse clínico a partir de filmes mistos de fosfolipídios e lectinas depositados em substratos sólidos. 2015. 136f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A imobilização de lipídios em substratos sólidos tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de biossensores visando a uma alternativa simples e de baixo custo. Dessa forma, um ambiente favorável à imobilização de proteínas pode ser criado o que viabiliza a utilização destas moléculas como elemento de biorreconhecimento molecular. A finalidade deste estudo consiste em imobilizar a lectina *Concanavalina A*, em uma plataforma nanostruturada contendo moléculas fosfolipídicas a fim de identificar glicoproteínas presentes no soro contaminado com dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-3). A resposta foi avaliada por técnicas eletroquímica (Espectroscopia de Impedância Eletroquímica [EIE] e Voltametria Cíclica [VC]) e piezoelétrica (Microbalança de Cristal de Quartzo [QCM]). O biossensor eletroquímico apresentou maior resposta para DENV-3 ($\Delta R_{CT} = 180\%$) em relação aos DENV-1 ($\Delta R_{CT} = 60\%$) e DENV-2 ($\Delta R_{CT} = 80\%$). Por outro lado, o biossensor piezoelétrico identificou de forma qualitativa da presença do DENV. Com o objetivo de aumentar a especificidade na identificação do DENV, quatro imunossensores eletroquímicos constituídos por camada auto-organizada de cisteína, nanopartícula de ouro e anticorpo monoclonal (Anti-DENV-1, Anti-DENV-2, Anti-DENV-3 e Anti-DENV-4) foram desenvolvidos e avaliados após exposição ao vírus da dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os imunossensores demonstraram eficácia, linearidade e especificidade para todos os sorotipos analisados. Além disso, técnicas de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura caracterizaram satisfatoriamente a imobilização na superfície de todos os biossensores desenvolvidos.

Palavras-chave: Lectina. Glicoproteína. Dengue. Eletroquímica. Microbalança de Cristal de Quartzo.

ABSTRACT

LUNA, D.M.N. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para glicoproteínas de interesse clínico a partir de filmes mistos de fosfolipídios e lectinas depositados em substratos sólidos. 2015. 136f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Immobilization of lipids on solid substrates has been extensively used in the development of biosensors, aiming a simple and low-cost alternative. Thus, a favorable environment for immobilization of proteins can be obtained and these molecules can be used as a molecular element for biorecognition. The purpose of this study is to conduct the immobilization of the *Concanavalin A* lectin on a nanostructured platform containing phospholipid molecules with the aim of identify serum infected with dengue virus (DENV-1, DENV-2 and DENV- 3). The response was evaluated by electrochemical technique (Electrochemical Impedance Spectroscopy [EIS] and Cyclic Voltammetry [CV]) and piezoelectric technique (Quartz Crystal Microbalance [QCM]). The electrochemical biosensor showed greater response for DENV-3 ($\Delta R_{CT} = 180\%$) compared to DENV-1 ($\Delta R_{CT} = 60\%$) and DENV-2 ($\Delta R_{CT} = 80\%$). Moreover, piezoelectric technique identified qualitatively the presence of DENV. In order to increase the specificity in the identification of DENV, four electrochemical immunosensors based on self-organized layer of cysteine, gold nanoparticles and monoclonal antibody (Anti-DENV-1, Anti-DENV-2, Anti-DENV-3 e Anti-DENV-4) were developed and evaluated after exposure to dengue virus (DENV- 1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). The immunosensors demonstrated efficacy, linearity and specificity for all serotypes analyzed. In addition, atomic force microscopy and scanning electron microscopy techniques, satisfactorily characterized the immobilization on the surface of all developed biosensors.

Keywords: Lectin. Glycoprotein. Dengue. Electrochemistry. Quartz Crystal Microbalance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribuição geográfica da doença dengue, 2014. 2 | |
| Figura 2. Representação esquemática da constituição do vírus da dengue..... | 4 |
| Figura 3. Variação do potencial em função do tempo (esquerda) e obtenção de um voltamograma cíclico (direita). E_1 , E_{max} , E_{min} , E_f , correspondem aos potenciais inicial, máximo, mínimo e final respectivamente..... | 12 |
| Figura 4. Representação esquemática do diagrama de Nyquist..... | 13 |
| Figura 5. Representação esquemática do efeito piezoeletrico reverso, onde a aplicação de um potencial induz uma reorientação das cargas na superfície e consequentemente uma deformação | 14 |
| Figura 6. Representação esquemática do princípio de funcionamento do microscópio de força atômica | 18 |
| Figura 7. Ilustração esquemática do princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura..... | 20 |
| Figura 8. Representação esquemática da constituição de lipossomas | 21 |
| Figura 9. Adsorção de lipossomas em substrato hidrofóbico com formação de monocamada | 22 |
| Figura 10. Características estruturais da Concanavalina no formato de tetrâmero..... | 24 |
| Figura 11. Ilustração esquemática da obtenção do biossensor eletroquímico | 32 |
| Figura 12. Ilustração esquemática da obtenção do biossensor piezoelétrico | 35 |
| Figura 13. Distribuição do tamanho de partículas do lipossoma em função da intensidade (a), em função do volume (b) e potencial zeta (c) | 36 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Imagem topográfica por AFM da camada de DPPC (a), DPPC/ConA (b), DPPC/ConA/DENV-1 (c), DPPC/ConA/DENV-2 (d) e DPPC/ConA/DENV-3 (e) com suas correspondentes seções transversais. Área de varredura de 5mm × 5mm..... | 38 |
| Figura 15. Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) das etapas de construção do biossensor..... | 40 |
| Figura 16. Voltamograma cíclico (a) e Diagrama de Nyquist (b) da variação do tempo de exposição dos lipossomas na superfície do eletrodo | 42 |
| Figura 17. Voltametria cíclica (a) e Diagrama de Nyquist (b) da variação da concentração de ConA na superfície do eletrodo modificado com a membrana lipídica | 43 |
| Figura 18. Voltametria cíclica do sistema lipídio-ConA após a exposição de diferentes diluições do soro DENV-1 (a), DENV-2 (b) e DENV-3 (c) | 45 |
| Figura 19. Diagrama de Nyquist do sistema lipídio-ConA após a exposição de diferentes diluições do soro DENV-1 (a), DENV-2 (b) e DENV-3 (c) | 46 |
| Figura 20. Voltametria cíclica (a) e Diagrama de Nyquist (b) da interação do biossensor com o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e soro negativo. Diluição dos soros (1:10). Circuito equivalente utilizado para o fit das medidas de impedância c) | 47 |
| Figura 21. Δ RCT% do biossensor após a exposição de diferentes sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) e controle nas diluições 1:10 a 1:2000 | 50 |
| Figura 22. Estudo da variação da frequência com o aumento da concentração de <i>Concanavalina A</i> | 53 |
| Figura 23. Variação da massa em função da concentração de <i>Concanavalina A</i> | 54 |
| Figura 24. Variação da frequência em função da concentração de Ovoalbumina..... | 55 |
| Figura 25. Variação de frequência do cristal de quartzo após a exposição de diferentes camadas contendo 300 mL da diluição 1:1000 do soro da dengue contaminado com DENV-1 (a), DENV-2 (b), DENV-3 (c) e não contaminado (d)..... | 57 |
| Figura 26. Circuito equivalente de Butterworth-van Dyke..... | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 27. Impedância acústica imaginária ($Im Z_L$) do sensor após exposição a seis injeções consecutivas da diluição 1:1000 dos soros contaminados com DENV-1, DENV-2, DENV-3 e controle | 60 |
| Figura 28. Representação esquemática da construção do imunossensor eletroquímico | 66 |
| Figura 29. Distribuição do tamanho de partícula das NpAu (a) e das NpAu-AMB(b)..... | 67 |
| Figura 30. Potencial zeta das NpAu (a) e das NpAu-AMB (b) | 67 |
| Figura 31. Voltamograma cíclico (a) e Diagrama de Nyquist (b) da etapa de otimização da concentração de Cisteína no imunossensor | 70 |
| Figura 32. Voltametria cíclica e Diagrama de Nyquist (b) do tempo de incubação da cisteína com concentração fixa de 30mM | 71 |
| Figura 33. Voltametria cíclica (a) e Diagrama de Nyquist (b) do tempo de incubação da NpAu-AMB | 73 |
| Figura 34. Voltametria cíclica de diferentes diluições do vírus DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 | 75 |
| Figura 35. Espectroscopia de impedância eletroquímica de diferentes diluições do vírus DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (a) e modelo do circuito elétrico ajustado ao sistema (b) | 77 |
| Figura 36. Valores de ΔRCt versus as diluições do DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DEN-4 | 80 |
| Figura 37. Grau de recobrimento de diferentes diluições do DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DEN-4..... | 81 |
| Figura 38. Imagem por microscopia eletrônica de varredura das etapas de obtenção do imunossensor, cisteína (a), Cisteína/NpAu (b), Cis/NpAu/Anticorpo e após a exposição ao DENV-1 (d), DENV-2 (e), DENV-3 (f), DENV-4 (g) e VFA (h) | 82 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores dos elementos do circuito equivalente originado do fitting obtido através dos resultados de impedância do biossensor eletroquímico49

Tabela 2. Valores dos elementos do circuito equivalente originado do fit fitting obtido através dos resultados de impedância do imunossensor eletroquímico 78

LISTA DE SÍMBOLOS

A : Área ativa da superfície do cristal de quartzo

μ_q : Constante elástica do cristal de quartzo

ρ_q : Densidade de massa do cristal de quartzo

ω : Frequência angular

f : Frequência fundamental de oscilação do cristal de quartzo
 Z : Impedância

$\text{Im}(Z_L)$: Impedância acústica imaginária

$\text{Re}(Z_L)$: Impedância acústica real

Z_{eq} : Impedância do cristal de quartzo

L : Indutância motional

O_n : Número harmônico

Δf : Variação de frequência (Hz)

Δm : Variação de massa

ΔR : Variação da resistência

LISTA DE ABREVIATURAS

(4-MBA): 4- ácido mercaptobenzóico

(EDC): 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

(HAuCl₄): Ácido tetracloroáurico

(K₃[Fe(CN)₆]): Ferriacianeto de potássio

(K₄[Fe(CN)₆]): Ferrocianeto de potássio

(NHS): N-hidroxisulfosuccinimida

AFM: Microscópio de força atômica (do inglês, *atomic force microscopy*)

C: Concentração

Con A: Concanavalina A

Cs: Coeficiente de

sensibilidade Cys: Cisteína

DENV-1: Vírus da dengue (Sorotipo-1)

DENV-2: Vírus da dengue (Sorotipo-2)

DENV-3: Vírus da dengue (Sorotipo-3)

DENV-4: Vírus da dengue (Sorotipo- 4)

DPPC: 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina

EIS: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

K_a: Constante de afinidade

Lec-ML: Sistema lectina-membrana lipídica

MEV: Microscópio eletrônico de varredura

MPTS: 3 -Mercaptopropil-trimetoxisilano

NPsAu: Nanopartículas de ouro

NPsAu-AMB: Nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido mercaptobenzóico

QCM: Microbalança de Cristal de Quartzo (do inglês, *quartz crystal microbalance*)

R.S.D.: desvio padrão relativo (do inglês *relative standard deviation*)

R_{ct}: Resistência à transferência de elétrons

SAM: Monocamada auto-organizada (do inglês, *self-assembled monolayer*)

T_m: Transição de fase

VC: Voltametria Cíclica

Δf_{max}: Variação máxima de frequência

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Capítulo 1. Introdução | 2 |
| 1.1. Dengue | 2 |
| 1.2. Biossensores | 8 |
| 1.2.1. Biossensores Eletroquímicos..... | 11 |
| 1.2.2. Biossensores Piezoelétricos..... | 14 |
| 1.2.3. Caracterização morfológica da superfície sensora - AFM | 16 |
| 1.2.4. Caracterização morfológica da superfície sensora- MEV | 19 |
| 1.2.4. Utilização de camadas lipídicas estruturadas em sistemas sensores | 21 |
| 1.3. O papel da glicobiologia no diagnóstico da dengue..... | 23 |
| Capítulo 2. Objetivos | 27 |
| 2.1. Objetivo Geral | 27 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 27 |
| Capítulo 3. Obtenção de biossensor eletroquímico e piezoelétrico para a detecção de glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados por dengue | 30 |
| 3.1. Introdução | 30 |
| 3.2. Material e métodos | 30 |
| 3.2.1. Material..... | 30 |
| 3.2.2. Obtenção de vesículas lipídicas e caracterização por tamanho de partícula e potencial zeta(ζ) | 31 |
| 3.2.3. Biossensor Eletroquímico | 32 |
| 3.2.4. Biossensor piezoelétrico | 33 |
| 3.3. Resultados e Discussão | 35 |
| 3.3.1. Caracterização dos lipossomas e da morfologia do filme lipídico | 35 |
| 3.3.2. Caracterização eletroquímica do sistema sensor Lec-ML-eletrodo de ouro .. | 39 |
| 3.3.3. Detecção eletroquímica de glicoproteínas presentes no soro | 44 |
| 3.3.4. Caracterização piezoelétrica do sistema sensor Lec-ML-eletrodo de ouro.... | 52 |
| 3.3.5. Detecção piezoelétrica de glicoproteínas presentes no soro..... | 56 |
| CAPÍTULO 4. Desenvolvimento de uma plataforma auto-organizada livre de marcadores constituída por nanopartículas modificadas com ácido mercaptobenzóico e anticorpo para a identificação dos sorotipos da dengue (denv-1, denv-2, denv-3 e denv-4) | 63 |
| 4.1. Introdução | 63 |
| 4.2. Materiais e Métodos | 63 |
| 4.2.1. Material..... | 63 |
| 4.2.2. Preparação de nanopartículas de ouro modificadas com 4-ácido mercaptobenzóico (NpAu-AMB) | 64 |
| 4.2.3. Obtenção do imunossensor | 64 |
| 4.3. Resultados e Discussão | 66 |
| 4.3.1. Funcionalização da nanopartícula de ouro..... | 66 |
| 4.3.2. Caracterização eletroquímica das etapas de obtenção do imunossensor | 68 |
| 4.3.3. Detecção eletroquímica do imunossensor | 74 |
| 4.3.4. Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura | 82 |
| Capítulo 5. Conclusões | 84 |
| Capítulo 6. Referências | 87 |
| ANEXOS | 98 |

**APRESENTAÇÃO DE TRABALHO E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE
CONGRESSOS**

.....135

Capítulo 1

Capítulo 1. Introdução

1.1. Dengue

A dengue representa um problema de saúde pública mundial. Estima-se que 50-100 milhões de casos ocorram anualmente e que aproximadamente 40% da população mundial encontra-se em risco de contrair a infecção (WHO, 2014). Transmitida principalmente por mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, a dengue acomete as regiões tropicais e subtropicais do globo, como demonstrado na figura 1, e os quatro sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) são responsáveis pelas mesmas manifestações clínicas da doença. Em 2013 foi descoberto um novo sorotipo (DENV-5), confirmado após análise de uma infecção contraída em 2007 na Malásia (MUSTAFA et al., 2014).

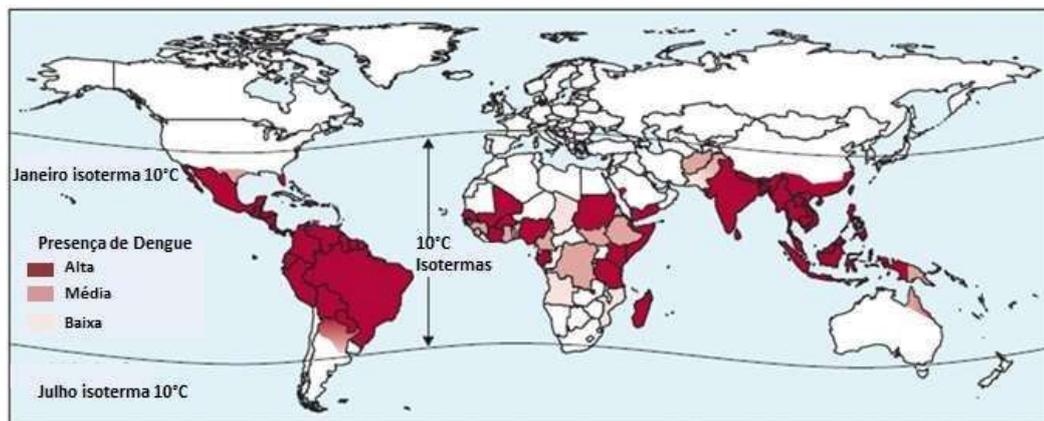


Figura 1. Distribuição geográfica da doença dengue, 2014 (GUZMAN E HARRIS, 2015).

Desde a década de 80, quando a primeira epidemia por dengue foi evidenciada no Brasil, o país apresenta potencial risco. Os sorotipos DENV-1 e DENV-4 têm sido relatados como prevalentes nas primeiras epidemias, seguido pelo DENV-2, na década de 90, DENV-3 em 2002 e em 2010/2011 as infecções pelo DENV-4 reemergiram no país (TEMPORÃO et al., 2011; OSANAI et al., 1983; NOGUEIRA et al., 1999; SIQUEIRA et al., 2005). O Brasil representa aproximadamente 71% das ocorrências de dengue registrada nas Américas e a co-circulação dos quatro sorotipos no país, aumenta a probabilidade de infecção e contribui para as manifestações mais severas da doença, dessa forma, o combate à dengue é considerado prioridade nas políticas públicas de saúde (TEIXEIRA et al, 2013; PAHO, 2014).

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* a qual é responsável por cerca de 70 viroses distribuídas em três gêneros: Hepacivirus, Pestivirus e Flavivirus. Neste último, existem cerca de 53 espécies responsáveis por infecções em humanos, dentre elas, os vírus da febre amarela, da encefalite japonesa, da encefalite transmitida por carrapatos, do Oeste do Nilo, da encefalite de Saint Louis e da Dengue (GUBLER et al., 2007; GOULD, 2008). O DENV é um vírus envelopado com um diâmetro entre 45-65nm (Fig.2) contendo uma fita simples de RNA 11kilobases (aproximadamente 10.200 nucleotídeos) senso (+), ou seja, atua como RNA mensageiro (mRNA) funcional no interior das células infectadas codificando uma única proteína que por sua vez é clivada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais [Capsídeo (C), Membrana (M) a qual é expressa como uma proteína precursora de membrana (PrM) e Envelope (E)] e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, S4a, NS4b e NS5), que regulam tanto a transcrição viral quanto a replicação e possuem a função de proteção contra a resposta antiviral do hospedeiro (LINDENBACH, THIEL, RICE, 2007).

A proteína E, uma glicoproteína de aproximadamente 55 kDa, é considerada o maior componente da superfície do vírus, responsável pelo tropismo celular, adesão em células-alvo do hospedeiro e indução da endocitose (GUZMAN e KOURI, 2002). Além disso, é constituída por um grande fragmento (também conhecido por ectodomínio) o qual é subdividido em três domínios (DI, DII e DIII).

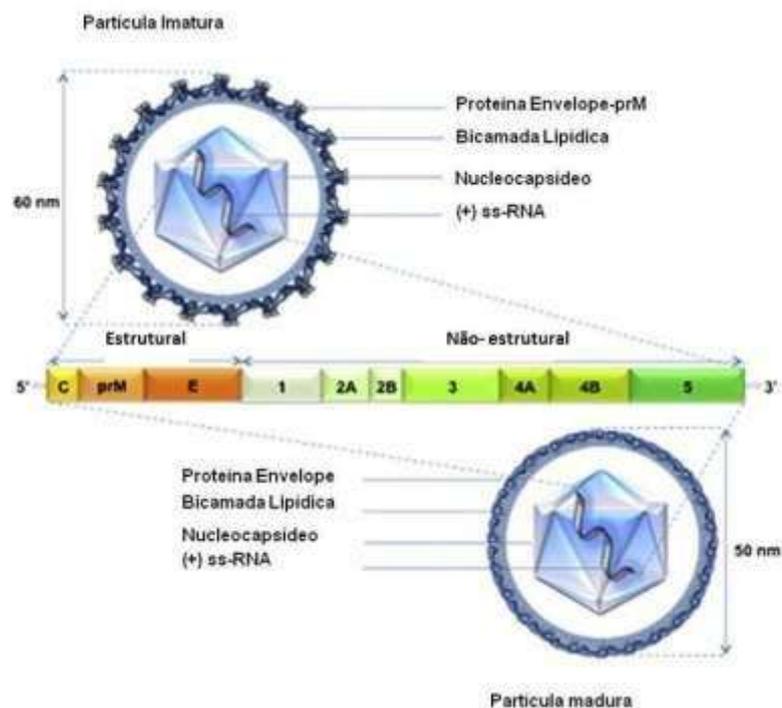


Figura 2. Representação esquemática da constituição do vírus da dengue (adaptado de HERRERO et al., 2013).

A reatividade cruzada de anticorpos alvos do domínio DI e DII da proteína E que não foram neutralizados contribuem para o desenvolvimento dos quadros clínicos mais severos da doença e ocorre quando existe uma infecção secundária oriunda por um sorotipo distinto daquele responsável pela infecção primária; já os anticorpos

direcionados para o domínio DIII são neutralizados e específicos para cada sorotipo (CRILL e CHANG, 2004).

Por outro lado, a glicoproteína não estrutural NS1, está associada à lise vascular e ao extravasamento de plasma nas formas mais severas da doença e atinge altos níveis durante a infecção aguda sendo, portanto, considerado um possível marcador para o diagnóstico da doença (SHU e HUANG, 2004).

Os sintomas apresentados pelos pacientes na fase aguda da doença são escassos e não específicos sendo facilmente confundidos com os de outras viroses e flavivirose. Recentemente a Organização Mundial de Saúde implantou uma nova classificação para os sintomas da doença, que consiste em: Dengue, Dengue com sintomas de alarme e Dengue grave. No Brasil, esta classificação passou a ser utilizada nos serviços de saúde a partir de janeiro de 2014. Os casos suspeitos de dengue ocorrem na presença de febre (2 a 7 dias) seguido por dois ou mais sintomas, como por exemplo, náusea, vômitos, exantema, mialgias e/ou artralgia, cefaleia e/ou dor retroorbital, petéquias e leucopenia. A dengue com sintomas de alarme, por sua vez, ocorre quando, no período de defervescência da febre, o paciente apresenta um ou mais dos seguintes sinais, como por exemplo, dor abdominal; vômitos persistentes; acumulação de líquidos, sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural, hepatomegalia maior do que 2 cm e aumento progressivo do hematócrito. Por fim, os casos suspeitos de dengue grave abrangem os casos da doença que apresente um ou mais dos seguintes resultados: choque, sangramento grave (segundo a avaliação do médico) e comprometimentos graves de órgãos (BRASIL, 2013).

Apesar de todo o esforço para se traçar um perfil de patogenicidade do vírus da dengue, sabe-se que a sua intensidade vai depender de um conjunto de fatores que

incluem a virulência do sorotipo, genótipo do vírus, a presença de anticorpos pré-existentes e a espécie do vetor. Desta forma, cada sorotipo pode ser considerado uma entidade filogeneticamente distinta e com características distintas *in vivo* (WHITEHORN e SIMMONS, 2011).

As formas mais severas da doença ocorrem na infecção secundária devido à presença de anticorpos decorrentes da infecção primária os quais formam complexos vírus-imunoglobulina G que, uma vez ligados a receptores Fc- γ presentes em monócitos e células *Natural Killer*, são internalizados e aumentam a replicação viral. Este aumento da replicação viral é diretamente proporcional à quantidade de vírus no sangue (AN et al., 2004).

Compreender a patogenia do vírus da dengue tem sido extremamente difícil, porque só os seres humanos desenvolvem naturalmente esta doença (SIMMONS et al., 2012). Este fato aliado ao fato de que, não existe atualmente vacina eficaz ou medicação específica para a dengue, faz da prevenção o foco das políticas públicas. Contudo, esta prática, por sua vez, também apresenta algumas limitações tanto de caráter econômico quanto da necessidade de vigilância e cooperação da população. Diante da problemática supracitada, o diagnóstico da infecção pelo vírus da dengue na fase aguda tem sido uma das principais preocupações da saúde pública mundial, a fim de que sejam tomadas medidas eficazes de ação o mais precoce possível, e de contribuir para a identificação das áreas de risco.

Atualmente, o diagnóstico da dengue pode ser realizado por uma variedade de testes laboratoriais, tais como o isolamento e identificação do DENV em amostras de sangue (soro ou plasma), detecção do ácido nucléico viral (RNA) utilizando a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR- *Reverse Transcriptase-*

Polymerase Chain Reaction), e detecção de anticorpos IgM/IgG ELISA (*Enzyme Linked Immunoassay*) (GUZMAN e KOURI, 2004).

O método de isolamento do vírus necessita de que a amostra seja coletada preferencialmente na fase aguda (entre cinco a seis dias após do aparecimento dos sintomas) e apresenta como desvantagem a dificuldade na propagação do vírus *in vitro*, o elevado tempo e a necessidade de posteriormente realizar a confirmação do isolamento viral. Geralmente para este fim, se utiliza a técnica da imunofluorescência indireta (GUZMÁN E KOURÍ, 2004).

A técnica do RT-PCR é capaz de detectar vírus ligados a anticorpos neutralizantes, identificar o sorotipo, apresenta alta sensibilidade, rapidez do método e pode ser utilizada em uma ampla variedade de amostra (de PAULA e FONSECA, 2004). Contudo, apesar dessas vantagens, apresenta certas limitações, como por exemplo, a possibilidade de contaminação da amostra, necessidade de alta tecnologia, falta de padronização do método, possibilidade de resultado falso negativo, necessidade de etapas experimentais adicionais e operador especializado (GUZMÁN E KOURÍ et al., 2004).

Em relação aos testes sorológicos, o ELISA é o mais utilizado. Esta técnica viabiliza a identificação de anticorpos originados tanto de uma infecção primária (IgM) quanto de uma infecção secundária (IgG). A utilização do MAC-ELISA (*IgM Antibody-Capture enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) na identificação de IgM é o método mais utilizado atualmente, porém, necessita de pelo menos cinco a dez dias do aparecimento dos sintomas para a detecção da infecção primária e cerca de quatro a cinco dias para a identificação da infecção secundária (GUBLER e MELTZER, 1999). De uma forma geral, o ELISA apresenta a desvantagem da possibilidade de reação cruzada com outras flavivirose e não é confiável na fase aguda, isto porque, existe uma dificuldade na

identificação da doença na presença de anticorpos neutralizantes presentes nos primeiros dias da infecção. Desta forma, se faz necessário a utilização de amostras tanto na fase aguda quanto na fase tardia (TELES, PRAZERES, LIMA-FILHO, 2005; KLUNGTHONG et al., 2007). Resultados mais confiáveis podem ser alcançados com a combinação de técnicas, RT-PCR nos primeiros dias de infecção e MAC-ELISA em períodos mais tardios (POERSCH et al., 2005).

Atualmente espera-se que o diagnóstico da dengue seja rápido, portátil, com alta sensibilidade, seletividade, de baixo custo e de fácil uso. Estes fatores em conjunto, contribuem para a identificação da doença em estágios iniciais e para a maior acessibilidade destes métodos pela a população. Neste contexto, biossensores podem ser considerados uma alternativa promissora tanto para o diagnóstico quanto para o mapeamento das áreas de risco e em tempo real.

1.2. Biossensores

Os sensores são dispositivos que respondem a estímulos físicos ou químicos, produzindo uma resposta proporcional à quantidade da substância detectada e quando possuem um sistema de detecção constituído por moléculas biológicas são conhecidos por biossensores (MALHOTRA et al., 2006). Assim, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define biossensor como um dispositivo capaz de fornecer informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa utilizando um elemento de reconhecimento biológico como receptor bioquímico, o qual está em contato direto com um elemento de transdução.

Após o uso de um biossensor desenvolvido por Clark e Lyons (1962) na identificação da glicose no sangue, houve um impulso tanto na tecnologia envolvendo a

sua constituição quanto na variabilidade de suas aplicações. Na área de saúde, mais especificamente no diagnóstico, biossensores tem sido utilizado na identificação de bactérias, fungos, vírus (CAYGILL, BLAIR, MILLNER, 2010; WARK et al., 2010) e inclusive na identificação do DENV (TELES, 2011).

A estrutura dos biossensores é composta por três componentes essenciais que são: Detector, transdutor e sistema de saída. O detector ou biorreceptor é responsável pelo reconhecimento molecular de alterações no meio e/ou de moléculas específicas contribuindo para a alta seletividade e sensibilidade destes biodispositivos. Os analitos alvos podem ser componentes antigênicos de vírus, ácidos nucleicos ou anticorpos específicos produzidos pelo organismo em resposta à infecção. A interação entre o analito e biorreceptor resulta em alterações físico-químicas que serão captadas pelo transdutor e transformadas em um sinal. Finalmente, o sinal elétrico produzido será captado por um sistema de saída de dados que modela os sinais eletrônicos do transdutor para apresentá-los em um medidor, um *display* ou tela de computador e armazená-los (MALHOTRA et al., 2006).

De acordo com o tipo de transdutor podemos classificar os biossensores em eletroquímicos, óticos, magnéticos ou piezoelétricos. Os biossensores eletroquímicos têm sido extensivamente utilizados e o seu princípio de funcionamento baseia-se na reação redox, que acontece na interface eletrodo/analito. Os biossensores podem ainda ser classificados em relação ao elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) em: Imunossensores, quando o biorreceptor usa interações como antígeno-anticorpo; genossensor, quando é constituído por DNA/RNA e enzimático quando a interação ocorre entre enzima-substrato.

O uso de biossensores proporciona uma variedade de benefícios quando comparados com os métodos atuais de diagnóstico, dentre eles podemos citar a simplicidade operacional, seletividade, especificidade, rapidez, baixo custo, potencial uso como dispositivos portáteis, capacidade de monitoramento em tempo real e o fato de não necessitar de marcadores, da preparação prévia da amostra e de operadores especializados. O seu desenvolvimento pode diminuir as taxas de morbi/mortalidade além de beneficiar políticas públicas de saúde ou mesmo aumentar a abrangência dos serviços de diagnóstico (WARK et al., 2010; YUN et al., 2009).

Com o objetivo de aumentar a aplicabilidade e a eficiência do sistema sensor e de eliminar eventuais limitações, tem se tornado frequente a utilização de eletrodos quimicamente modificados (PEREIRA et al., 2002). Existe atualmente uma gama de possibilidades na modificação da superfície e dentre elas podemos citar a utilização de monocamadas auto-organizadas (SAM) de moléculas anfóteras as quais proporciona homogeneidade, reduzem as correntes residuais não faradáicas e também a acumulação de espécies indesejadas sobre a superfície do eletrodo (passivação).

Entre as estratégias usualmente encontradas na obtenção de SAM e objetivando o desenvolvimento de biossensor biológico destaca-se o uso das nanopartículas de ouro a qual proporciona amplificação de resposta; do aminoácido cisteína, devido à presença a do grupo tiol e de anticorpos via imobilização da fração Fc no transdutor, dessa forma, o fragmento F(ab) do anticorpo fica livre para interagir com o antígeno presente na amostra a ser analisada (YANG et al., 2001; QINGWEN et al., 2001; KERMAN et al., 2008; RICCARDI et al., 2002).

1.2.1. Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos são atualmente utilizados na detecção de patógenos incluindo vírus do Epstein-Barr, Citomegalovírus, Herpes simplex e vírus da hepatite B (DING, 2008). Comparada com outras técnicas analíticas, a técnica eletroquímica apresenta a vantagem do baixo custo e facilidade operacional (HAHN; MERGENTHALER; ZIMMERMANN, 2005). A transdução do sinal pode ser do tipo amperométrica, potenciométrica, condutométrica e impedanciométrica.

Na detecção amperométrica, aplica-se um potencial ou rampa de potencial e a corrente gerada pela reação de oxirredução é mensurada. Na detecção potenciométrica a diferença de potencial é medida após a aplicação de valores distintos de correntes. A detecção condutométrica, por sua vez, mede a variação da condutância e a detecção impedanciométrica, a impedância em função da frequência (STRADIOTTO, NYAMANAKA, ZAONI, 2003).

Na voltametria cíclica verificamos a variação da corrente em relação ao potencial aplicado e ocorre em uma célula eletroquímica constituída por um eletrodo de trabalho, onde vai ocorrer a reação, um contra-eletrodo e um eletrodo de referência. O contra-eletrodo fornece a corrente ao eletrodo de trabalho e evita que ocorra distúrbios no eletrodo de referência o que garante a função do eletrodo de referência que é manter o seu potencial constante durante as medidas. O eletrodo de referência regula o potencial aplicado no eletrodo de trabalho, pelo fato de a área do eletrodo de trabalho ser menor, este assume o potencial recebido. O potencial é repetido ciclicamente entre valores extremos de potencial aplicado, partindo de um potencial inicial (E_1) até atingir o potencial máximo (E_{max}) decrescendo até o valor de potencial final (E_f) como demonstrado na figura 3 (DENARO, 1974).

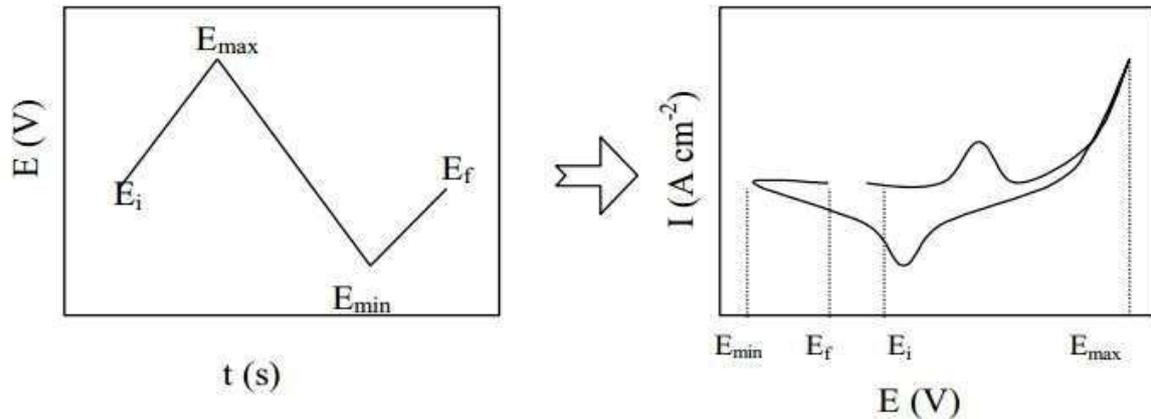


Figura 3. Variação do potencial em função do tempo (esquerda) e obtenção de um voltamograma cíclico (direita). E_i , E_{max} , E_{min} , E_f , correspondem aos potenciais inicial, máximo, mínimo e final respectivamente (SOARES, 2011).

Em termos de corrente estão presentes dois componentes que são o componente capacitivo (decorrente da redistribuição das cargas e de espécies polarizadas na superfície do eletrodo, sendo um processo não-faradáico) e um componente resultante da troca de elétrons entre o eletrodo e as espécies redox imobilizadas na superfície do eletrodo ou livres na solução (processo faradáico).

A técnica de Espectroscopia de impedância Eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) consiste em uma medida de caracterização elétrica também muito utilizada para o desenvolvimento dos biossensores. A análise impedimétrica pode ser aplicada para observar a deposição de membranas sobre a superfície de eletrodos e se obter informações a respeito da capacitância e resistência

com o objetivo de detectar eventos de biorreconhecimento (GUAN, MIAO, ZHANG, 2004).

Na EIS surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da aplicação de um potencial senoidal ao sistema e, desta forma, é possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Convencionalmente a espectroscopia de impedância consiste em medidas de impedância (Z) em função da frequência do sinal (f) ou da frequência angular (ω) ($\omega = 2\pi f$), sobre um amplo intervalo de frequência. A representação esquemática mais comum consiste no diagrama de Nyquist (Fig 4). Nesta representação a região de altas frequências está relacionada com a resistência da solução eletrolítica. As regiões intermediárias estão associadas com a cinética de transferência de carga a qual também pode representar a resistência à transferência de elétrons (R_{CT}) e a parte linear em baixas frequências corresponde à contribuição da difusão para o processo eletroquímico.

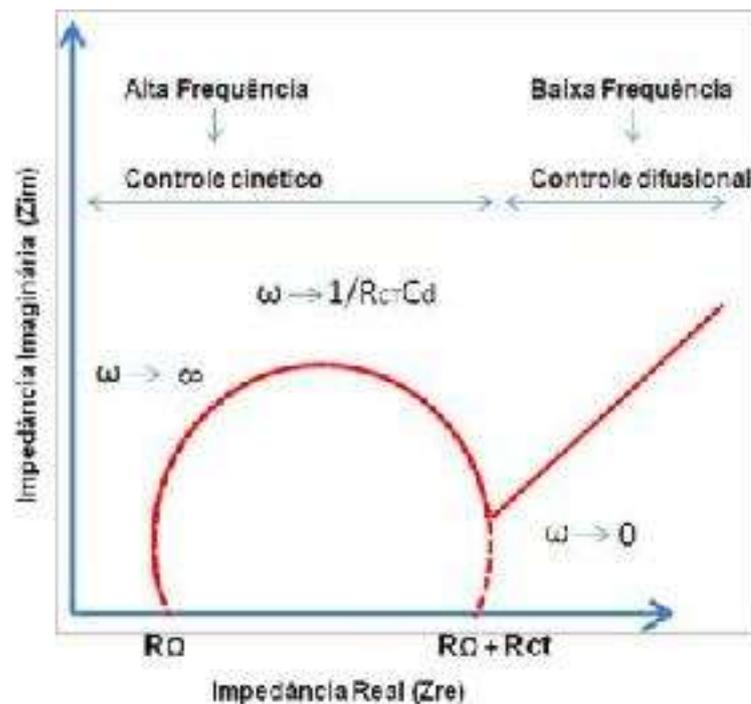


Figura 4. Representação esquemática do diagrama de Nyquist.

1.2.2. Biossensores Piezoelétricos

O termo piezoeletricidade descreve a relação entre o comportamento mecânico e elétrico de um material. Em 1880, Jacques e Pierre Currie constataram que ao aplicar uma pressão mecânica na superfície de alguns cristais gerava-se um potencial elétrico nas faces opostas à deformação, proporcional à intensidade da força aplicada, este fenômeno ficou conhecido como efeito piezoelétrico (Fig. 5) (CURIE, 1980). A técnica da Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*) é bastante utilizada na obtenção de biossensores piezoelétricos e está relacionada à detecção da variação de massa em nanoescala.

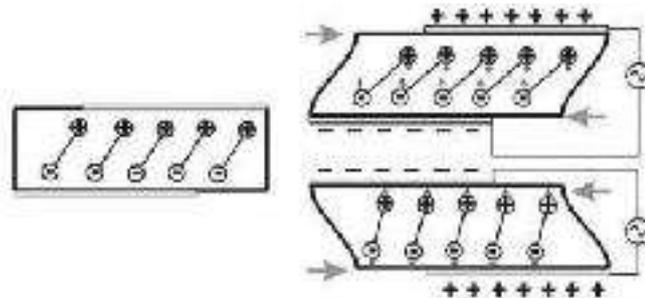


Figura 5. Representação esquemática do efeito piezoelétrico reverso, onde a aplicação de um potencial induz uma reorientação das cargas na superfície e consequentemente uma deformação.

Além disso, apresenta as vantagens de facilidade operacional, baixo custo, possibilidade de detecção em tempo real e sem a necessidade de marcadores (*label-free*) o que a torna uma poderosa ferramenta no estudo de interações biológicas. Neste

contexto, a QCM tem sido utilizada para as mais diversas aplicações incluindo o estudo de adsorção de proteínas, diagnóstico de patologias, imunoenaios, biorreconhecimento de moléculas específicas e no estudo *in situ* da hibridação de DNA/RNA (COOPER E SINGLETON, 2007; JANSHOFF; GALLA; STEINEM, 2000). A utilização de QCM na identificação de vírus tem sido relatada na literatura (SKLADAL et al., 2004; DELL'ATTI et al., 2007; YAO et al., 2008) assim como a identificação do vírus da dengue (SU et al., 2003; TAI et al., 2006).

Na QCM é utilizado um disco de quartzo coberto com uma fina camada de ouro acoplado a um circuito oscilador, o qual aplica uma corrente alternada no cristal, provocando uma deformação via efeito piezoelétrico reverso, dessa forma, ocorre um rearranjo de cargas e formação de dipolo. O quartzo é muito utilizado por possuir uma deformação elástica, ou seja, a polaridade no sentido oposto é observada de forma idêntica na outra face do cristal (BUTTY, WARD, 1992). Diretamente acoplado a este circuito oscilador existe um medidor da frequência. Quando uma massa é depositada na superfície do cristal ocorre a redução da amplitude de onda acústica que se propaga através do filme depositado sobre o cristal e conseqüentemente diminuição da frequência de ressonância do quartzo. Tal relação pode ser descrita pela expressão de Sauerbrey (Eq. 1)(Sauerbrey,1959):

$$\Delta f = -2f_0^2 \Delta m / A(\mu_q \rho_q)^{1/2} \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que, Δf é a variação de frequência (Hz), f é a frequência fundamental de oscilação do cristal de quartzo, Δm é a variação da massa, A é a área ativa da superfície do cristal de

quartzo, μ_q é o módulo de cisalhamento do quartzo e ρ_q a densidade de massa do quartzo que é específica para cada tipo de corte do cristal.

De acordo com a equação todos os elementos podem ser considerados constantes e, desta forma, a variação de frequência apresenta uma relação direta com a variação da massa. A equação foi desenvolvida para experimentos envolvendo gases e em condições especiais (vácuo). Para estudos em soluções aquosas e não aquosas algumas variáveis devem ser levadas em consideração tais como a viscosidade, densidade do meio, pressão hidrostática, rugosidade da superfície, hidrofobicidade da superfície e a temperatura (STEINEM e JANSHOFF, 2007). Em solução, a onda acústica é propagada através do meio gerando alta energia de dissipação a qual exerce influência na variação de frequência. Dessa forma, outra teoria que relaciona a frequência de ressonância do cristal de quartzo em ambiente líquido foi proposta por Kanazawa e Gordon (1985) e expressa na eq. (2).

$$\Delta f = -2f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_1 \rho_1}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad \text{Eq. 2}$$

Em que, η_1 e ρ_1 são a viscosidade e a densidade do líquido respectivamente.

1.2.3. Caracterização morfológica da superfície sensora - AFM

O microscópio de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) foi desenvolvida por Binning et al. (1986), é constituído basicamente por uma sonda sensora, cerâmicas piezoelétricas, circuitos de realimentação e um computador (Fig. 6). O AFM usa interação entre as forças sonda-amostra para traçar o mapa da superfície de

amostras não condutoras e condutoras (BINNING et al., 1986; HOWLAND; BENATAR, 1996; PAIVA, 2003).

O princípio de funcionamento do AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal de alguns micrometros de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada a um suporte flexível (*cantilever*) denominado de sonda, para alcançar resolução atômica, a ponta termina em um conjunto de átomos.

A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o *cantilever* se aproxime ou se afaste por interação interatômica, sendo essa deflexão proporcional à força de interação. A força de interação que a amostra exerce sobre a ponteira é determinada pela deflexão do *cantilever*, dada pela lei de Hooke ($F = -kx$), sendo k a constante de mola ou constante elástica do braço, que depende da geometria e do material de fabricação e x o deslocamento do *cantilever*, pela deflexão provocada pela interação.

As deflexões são mensuradas com o uso de um laser, focalizada na parte superior da extremidade livre do braço, que é refletida e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do *cantilever*. À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de “acidentes geográficos” encontrados sobre a superfície provocam alteração na sua posição. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas 2D e 3D da superfície. A força mais comumente associada no

AFM durante a deflexão do *cantilever* é a força de van der Waals (FREIRE-NORDI; TACIRO, 2004; MENGUI, 2006).

O AFM proporciona uma alta resolução espacial, tanto lateral como vertical, na visualização de superfícies em nível atômico de diferentes naturezas (metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas em sistemas condutores e isolantes) e em diversos meios (vácuo, pressão atmosférica, meios líquidos) (MENGUI, 2006).

Durante a varredura da amostra podem atuar forças de atração ou repulsão, que variam em função da distância entre o *cantilever* e a amostra. Forças de atração podem ter origem tanto em fatores físicos, como a capilaridade, ou químicos como as forças de van der Waals, esta atração aumenta até que, quando a ponteira aproxima-se muito da amostra, os átomos de ambas estão tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a se repelir. A força de repulsão se deve a interação coulombiana (BERNARDES FILHO; MATTOSO, 2003; MENGUI, 2006).

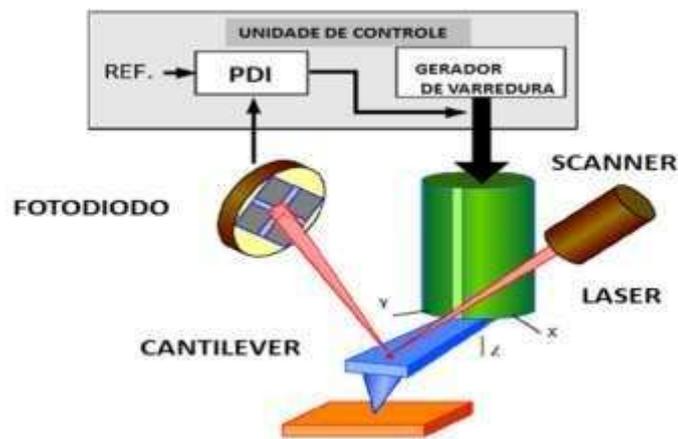


Figura 6. Representação esquemática do princípio de funcionamento do microscópio de força atômica.

1.2.4. Caracterização morfológica da superfície sensora- MEV

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) possibilita a visualização de imagens com alta magnificação ($> 100.000 \times$) e representa a transcodificação da energia emitida pelos elétrons ao interagir com a amostra. Neste equipamento, existe uma diferença de potencial entre o eletrodo negativo (cátodo) e o eletrodo positivo (ânodo aterrado) na ordem de 0,5 a 30 KV, este eletrodo atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. As fontes de elétrons pode ser constituídas por tungstênio ou hexaboreto de lantânio (LaB_6). O tungstênio é comumente utilizado por ser, entre os metais na forma pura, o que apresenta maior ponto de fusão (3422°C), menor coeficiente de expansão térmica e maior resistência à tração.. O feixe de elétrons, apresenta uma energia que vai desde algumas centenas de 1 eV até 100 keV. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras, que reduzem o diâmetro do feixe de elétrons a aproximadamente 100 \AA em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons, deflete o feixe horizontal e verticalmente para que ele varra uma área retangular da superfície da amostra.

Quando o feixe primário interage com a amostra, resulta entre outros efeitos, emissão de elétrons secundários, uma corrente de elétrons refletidos, condução induzida pelo feixe e frequentemente catodoluminescência, raios-x e elétrons transmitidos cada tipo de sinal, varia de acordo com a energia dos elétrons, do número atômico dos átomos da amostra e da densidade da amostra e comumente é utilizado na obtenção da imagem de forma qualitativa da morfologia e topografia da amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Quando ocorre a formação de elétrons secundários, o elétron primário interage elasticamente (sem perda de energia) com os átomos mais externos do material, mas o campo inerente dos átomos da amostra causa uma troca de momento do elétron incidente, fazendo com que ele seja refletido para fora da amostra, porém, com a mesma energia incidente. Já no caso da formação de elétrons refletidos, o elétron primário interage não elasticamente (com perda de energia) ao interagir com o átomo da amostra e é refletido com energia inferior àquela incidente e vai perdendo energia cinética através do processo de ionização por impacto até esta energia não ser suficiente para causar mais ionização (THORNTON, 1968). A figura 7. ilustra o princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura.

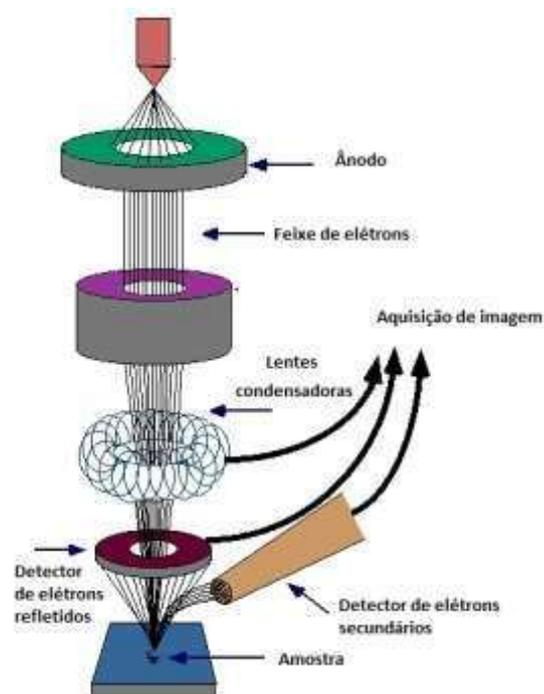


Figura 7. Ilustração esquemática do princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura (Adaptado de <http://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm>).

1.2.4. Utilização de camadas lipídicas estruturadas em sistemas sensores

Membranas lipídicas têm sido utilizadas na imobilização de moléculas biológicas uma vez que criam ambiente natural favorável à imobilização de compostos orgânicos e principalmente pela possibilidade de incorporação de proteínas ativas (PUU e GUSTAFSSON, 1995). Existe uma variedade de métodos descritos na literatura para a obtenção de biomembranas em suportes sólidos tais como a transferência de lipídios pela técnica de Langmuir-Blodgett, automontagem (*self-assembly*) de lipídios/tióis em superfície de ouro e fusão (coalescência) de lipossomas (COOPER, 2004).

Lipossomas são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso (Fig. 8). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana (BATISTA; de CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Os lipossomas podem ser classificados como lipossomas unilamelares pequenos (SUV - *small unilamellar vesicles*) (20-150 nm), lipossomas unilamelares grandes (LUV - *large unilamellar vesicles*) (200- 500 nm) e lipossomas multilamelares (MLV - *multilamellar vesicles*) os quais apresentam bicamadas concêntricas e com tamanho relativamente grande (200-1000 nm) (BASER e BUCHBAUER, 2010).

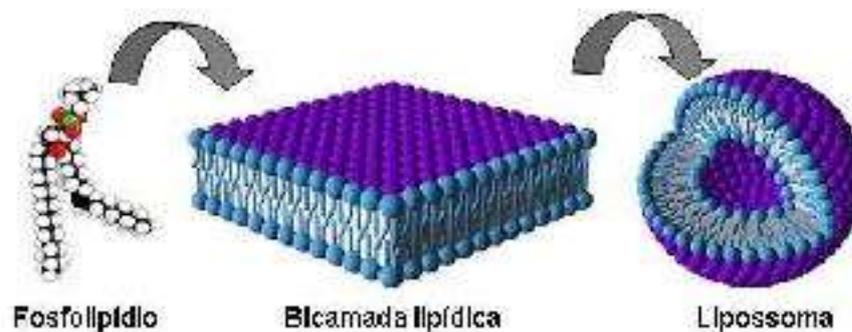


Figura 8. Representação esquemática da constituição de lipossomas (LIRA,2007).

Quando camadas lipídicas se encontram em contato com a superfície hidrofóbica, as cadeias hidrocarbonadas interagem com esta superfície enquanto que as cabeças polares se encontram em contato com a solução, como resultado pode ocorrer: (A) Adesão de vesículas na superfície e (B) Fusão de vesículas, com conseqüente formação de monocamadas ou bicamadas lipídicas (Fig. 9). A força motriz para a organização é originada de interação hidrofóbica como, por exemplo, van der Waals. A maioria das superfícies hidrofílicas promove a formação de bicamadas lipídicas, sendo geralmente utilizadas SUV (WENG et al., 2006). Estudos envolvendo proteínas e lipídios marcados mostrou que proteínas imobilizadas em superfícies lipídicas permanecem com a capacidade de interação (FREIRE et al., 2003).

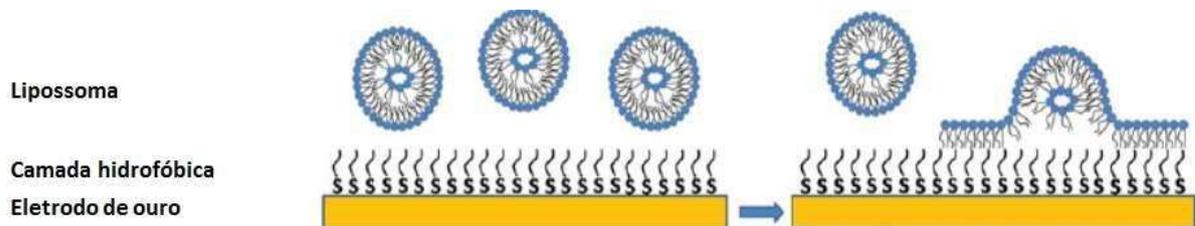


Figura 9. Adsorção de lipossomas em substrato hidrofóbico com formação de monocamada (NASCIMENTO et al., 2011).

Estudos teóricos sugerem que, a depender da interação entre o lipídio e o substrato, ocorre uma progressão de vesícula até a sua ruptura que dependerá principalmente da interação hidrofóbica e eletrostática, além disso, existem a hidratação repulsiva e a entropia (LIPOWSKY e SACKMANN, 1995). A utilização de lipídios em biossensores foi inicialmente utilizada por reduzir a interferência de espécies eletroativas (TANG et al, 1990). Monocamadas lipídicas são altamente homogêneas,

possuem poucos defeitos de superfície e apresentam resistência à ligação por proteínas não-específicas como por exemplo (BSA) (TERRETTAZ et al., 1993; PLANT, 1999; PLANT et al., 1995; COOPER et al., 1998).

1.3. O papel da glicobiologia no diagnóstico da dengue

Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza, quase todos os organismos sintetizam e metabolizam carboidratos. O termo carboidrato surgiu pelo fato de que a maioria dos açúcares simples possuem a fórmula empírica $C_nH_{2n}O_n$, onde $n \geq 3$, ou seja, em sua constituição os átomos de carbono estão combinados com moléculas de água (WADE, 1999). Os hidratos de carbono desempenham um papel vital por estar relacionados a uma grande quantidade de fenômenos biológicos: interações célula-célula, apoptose, transdução de sinal, processos inflamatórios, metástase, infecções bacterianas e virais, adesão, diferenciação e proliferação celular, fertilização e resposta imune. Além disso, servem como fontes de energia (amido e glicogênio) e são constituintes de coenzimas e de ácidos nucleicos (SAFINA, 2012).

As lectinas são definidas como proteínas que reconhecem e se ligam preferencialmente a carboidratos. O termo lectina é derivado da palavra latina *legere* que significa "escolher" ou "selecionar" (SHARON e LIS, 2004). As lectinas são de origem não imunológica, sendo encontradas nos mais variados microorganismos desde vírus e bactérias até plantas e animais, sendo que as lectinas provenientes de plantas são as mais comumente caracterizadas (PESQUERO et al., 2008). A interação entre lectinas e carboidratos pode ser tão específica quanto a interação entre antígeno e anticorpo ou substrato e enzima (MINKO, 2004).

A lectina *Concanavalina A* (Con A) obtida da *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) é uma das primeiras lectinas a ser caracterizada, purificada e estudada em relação a sua estrutura tridimensional e química. Entre pH 2 e 5,5, ConA existe como um dímero de duas subunidades ligadas covalentemente, com um peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Em valores de pH acima de 5,5 a ConA existe como tetrâmero com um peso molecular predominante de 110 kDa, o contato dímero-dímero na estrutura tetramérica é estabilizada por ligações de hidrogênio e seis pontes salinas entre dímeros (AGRAWAL e GOLDSTEIN, 1965, 1967; SMITH e GOLDSTEIN, 1970; MCKENZIE et al, 1972; GOLDSTEIN, 1976; REEKE et al, 1975).

A ConA possui em cada subunidade, um sítio para ligação a resíduos α -D-manose e α -D-glicose, um sítio para ligações a cátions cálcio e manganês os quais são importantes para a estabilizar a conformação da proteína e para ativar a ligação à carboidratos e um terceiro sítio que é responsável pelo reconhecimento hidrofóbico (Fig. 10) (ZENG, 2012; LIU et al., 2007).

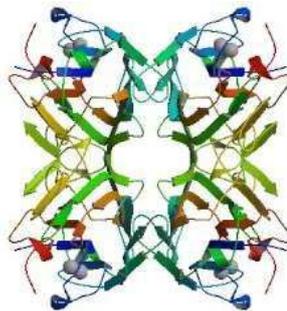


Figura 10. Características estruturais da Concanavalina no formato de tetrâmero (Fonte: www.rcsb.org / PDB).

Carboidratos podem ser utilizados como biomarcadores de patologias e, desta forma, as lectinas têm contribuído na identificação de carboidratos específicos (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). A glicobiologia tem proporcionado novas

perspectivas na obtenção de alternativas terapêuticas para o tratamento e prevenção de doenças. Com relação à doença dengue, sabe-se que o aumento de glicoproteínas no soro do paciente infectado tanto pode ocorrer pela presença de partículas virais, as quais se apresentam constituídas por glicoproteínas, (por exemplo, a proteína E e NS1), quanto devido à própria resposta imunológica do hospedeiro, vários estudos têm indicado concentrações aumentadas de IL-2, G-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, MCP-1, MIF, TNF- α , e IFN- γ (WAN, 2013).

Além disso, a infecção pelo vírus da dengue é mediada pela interação lectina-carboidrato. De fato, a interação da glicoproteína E com o hospedeiro se dá através de receptores lectínicos tipo C (CD209/DC-SIGN) em célula dendríticas (GREEN E ROTHMAN, 2006; POKIDYSHEVA et al., 2006) e receptor de manose (MR; CD206) presente em macrófagos (MILLER et al., 2008). O vírus da dengue apresenta dois potenciais sítios de N-glicosilação N67 e N-153, enquanto que a maioria das outras flaviviruses apresenta apenas um sítio de N-glicosilação em N154 (CHAMBERS, MCCOURT, RICE, 1990; HEINZ e ALLISON, 2003).

Diversos métodos têm sido descritos na literatura para a identificação de carboidratos, tais como a cromatografia, eletroforese e espectrometria de massa. Estas técnicas são muito sensíveis, no entanto, apresentam a desvantagem do alto consumo de tempo e de muitas vezes necessitar de marcadores. A utilização de biossensores para esta finalidade, além de apresentar a vantagem de não necessitar de marcação, ainda possibilita a identificação em tempo real (SAFINA de 2012). Estudos tem relatado o uso de lectinas no desenvolvimento de biossensores com a finalidade de identificar resíduos glicídicos em infecções (PEREIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al, 2009; ZENG, 2012).

Capítulo 2

Objetivos

Capítulo 2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver biossensores para a detecção de glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados com dengue e detecção direta do vírus da dengue

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a adsorção de lipídios e sistemas mistos de lectinas-membrana lipídica (Lec-ML) sobre substrato sólido (eletrodo de trabalho) via técnicas eletroquímicas (EIE e VC) e via técnica piezoelétrica (QCM);
- Avaliar o perfil de interação do biossensor eletroquímico e piezoelétrico com as glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados por DENV-1, DENV-2, DENV-3 e soro na ausência da infecção via EIE e VC;
- Determinar a variação da resistência à transferência de carga (R_{ct}) das diferentes etapas de construção do biossensor e após a interação com diferentes sorotipos do DENV, utilizando modelos de circuito equivalentes extraído dos resultados experimentais obtidos com a técnica da espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Obter a impedância acústica imaginária do biossensor piezoelétrico após exposição ao soro infectado e controle utilizando modelos teóricos;

- Sintetizar nanopartículas de ouro e realizar sua caracterização pela determinação do tamanho de partícula e potencial zeta antes e após a modificação com ácido mercaptobenzóico;
- Obter um imunossensor eletroquímico constituído por nanopartícula de ouro modificada com ácido mercaptobenzóico (NPsAu-AMB) e Anti-DENV (1-4);
- Avaliar a resposta eletroquímica de cada imunossensor após exposição ao DENV-1; DENV-2; DENV-3; DENV-4 e Vírus da febre amarela (Controle);
- Determinar o grau de recobrimento de diferentes diluições do DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 na superfície do imunossensor.
- Caracterizar estrutural e morfológicamente o sistema sensor utilizando microscopia de força atômica e de varredura;

Capítulo 3

Estudo 1

Capítulo 3. OBTENÇÃO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO E PIEZOELÉTRICO PARA A DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS PRESENTES NO SORO DE PACIENTES CONTAMINADOS POR DENGUE

3.1. Introdução

Neste capítulo abordaremos o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos e outro piezoelétricos, objetivando a identificação de glicoproteínas presentes no soro de pacientes infectados com DENV-1, DENV-2 e DEN-3. Para isto, a resposta eletroquímica do sistema sensor foi avaliado em diferentes diluições do soro oriundo de pacientes infectados (1:10, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:1500 e 1:2000) e da diluição 1:10 do soro do paciente na ausência da infecção (amostra controle). A resposta do biossensor piezoelétrico, por sua vez, foi avaliada por seis injeções consecutivas da diluição 1:1000 tanto do soro do paciente infectado quando do soro controle.

A plataforma nanoestruturada de ambos os biossensores consiste na imobilização de camadas auto-organizadas de lipossomas sobre a superfície do eletrodo de ouro, seguida pela imobilização de Concanavalina A (camada de biorreconhecimento molecular). A técnica de microscopia de força atômica foi utilizada para a caracterização morfológica da superfície.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Material

O fosfolípido 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), o 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS) e a lectina *Concanavalina A* foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). O soro dos pacientes contaminados com dengue

sorotipos 1, 2, e 3 (três pacientes de cada sorotipo) e o soro controle (três pacientes) foram cedidos pelo laboratório de virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAMERP). Todos os soros foram previamente caracterizados utilizando a técnica do RT-PCR (MONDINI et al., 2007). Tampão fosfato salino (PBS) (pH 7.4) contendo 0.1M CaCl₂ e 0.1M MnCl₂ foram utilizados para preparar as soluções da Con A. A água ultrapura foi obtida do sistema de purificação Millipore-Synergy. Todos os produtos químicos e solventes foram de grau analítico e usados como recebidos, sem purificação prévia.

3.2.2. Obtenção de vesículas lipídicas e caracterização por tamanho de partícula e potencial zeta(ζ)

Os lipossomas foram preparados usando uma versão modificada do método de Amselen et al. (1990) o qual utiliza filme lipídico formado a partir da evaporação de solventes. Sendo assim, vesículas lipídicas foram preparadas utilizando 1 mM de fosfatidilcolina dissolvido em solução de clorofórmio/metanol 3:1 (v/v) sob agitação magnética (150 rpm/min, 15min). Em seguida, a solução orgânica foi submetida a evaporação sob pressão reduzida (25 min a 40 ± 1 °C) e agitação a 120 rpm a fim de evaporar os solventes. Após a formação de um filme de lipídio, este foi hidratado por adição de 1 mL de solução PBS 0,2 M (pH 7,4). A suspensão foi mantida sob agitação magnética por 40 min e em seguida armazenada a 4 °C. A obtenção do tamanho de partícula e potencial zeta foi realizada por espalhamento de luz dinâmico a um ângulo de 90°C no qual o efeito de reflexão é minimizado, com um laser de He-Ne operando a $\lambda = 633$ nm e utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK).

3.2.3. Biossensor Eletroquímico

A superfície do eletrodo de ouro foi previamente polida com pasta de óxido de alumínio $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (0,05 μm), lavados vigorosamente com água ultrapura e em seguida submetidos à sonicação em ultrassom com água deionizada por 5 min. Após esta etapa, 5 μL de lipossomas foram imobilizados na superfície do eletrodo pelo método *drop coating* por 15 min e a 25 °C. Após a primeira etapa, o eletrodo modificado foi lavado com água para remover os lipídios não-adsorvidos e em seguida, 1 mL de ConA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em PBS 10 mM (pH 7,4) foi incubado durante 15 min e lavado com água para remover o excesso de ConA. Finalmente, o eletrodo modificado com lipídio/Con A foi exposto a 2 μL de soro negativo ou igual volume do soro de pacientes infectados pelo DENV-1, DENV-2 e DENV-3 diluído em solução de PBS (pH 7,4) 10 mM durante 20 min à temperatura ambiente. As diluições de soro utilizadas neste estudo foram 1:10, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:1500 e 1:2000. Na Figura 11 é apresentada uma ilustração esquemática das etapas de obtenção do biossensor eletroquímico.

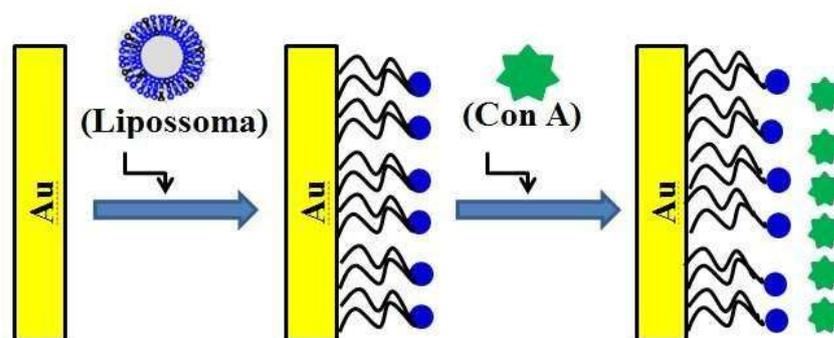


Figura 11. Ilustração esquemática da obtenção do biossensor eletroquímico.

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um sistema de três eletrodos: eletrodo de referência contendo Ag/AgCl, um eletrodo de platina como contra

eletrodo e um eletrodo de ouro como o eletrodo de trabalho ($\phi = 2 \text{ mm}$). Todos os experimentos foram realizados em uma potenciostato PGSTAT 128N (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands), em interface com um analisador. Os espectros de impedância foram obtidos na faixa de frequência 100 MHz a 100 kHz. A amplitude do potencial de onda senoidal (SWP) foi de 10 mV, enquanto o potencial de corrente contínua (DC) foi limitado ao circuito aberto mensurado antes da aplicação do SWP. As medidas de CV foram realizadas com um potencial de varredura entre -0,2 a 0,7 V a uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} . As medidas CV e EIS foram realizados utilizando 10 mM de sonda redox de $\text{K}_4 [\text{Fe} (\text{CN})_6]^{4-} / \text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]^{3-}$ (1: 1) em PBS (pH 7,4). Todas as medições electroquímicas foram realizadas em triplicata, de pelo menos três medidas diferentes, à temperatura ambiente e dentro de uma gaiola de Faraday.

Análises morfológicas da superfície foram realizadas na presença da camada lipídica, camada lipídica com lectina e posteriormente na presença dos soros, através da microscopia de força atômica (AFM, PicoSPM II, Molecular Imaging, EUA). Cantilevers com uma sonda de silício (Multi 75AL, NCHR, frequência ressonante = 75 kHz, a constante de força = 3 Nm^{-1}) foram utilizados em modo não-contato no ar e à temperatura ambiente (cerca de $25 \text{ }^\circ\text{C}$). A resolução lateral foi fixada em 512×512 pixels em uma área de varredura de $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}$. As imagens foram obtidas a partir de, pelo menos, três zonas macroscopicamente separadas para assegurar uma boa distribuição e analisadas utilizando o software Gwyddion (Necas et al., 2008).

3.2.4. Biossensor piezoelétrico

As medidas de QCM foram realizadas utilizando um controlador QCM200 QCM, um oscilador QCM25, um suporte do cristal com uma célula de fluxo axial ($150 \text{ }\mu\text{L}$ de

volume) e vazão de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Stanford Research Systems Co. CA, EUA). Cristal de quartzo polido, corte AT-cut, 5 MHz de frequência de ressonância (Stanford Research Systems Co. CA, EUA) foi utilizado neste estudo. As medidas foram realizadas quando a frequência de ressonância apresentou-se estável (linha de base $<0,2$ Hz). Os dados experimentais foram salvos em tempo real utilizando um software QCM200. A mudança de frequência (Δf) foi obtida pela diferença entre as frequências do QCM medidas durante cada etapa de obtenção do biossensor e durante a exposição do mesmo ao soro. Os resultados foram realizados em triplicata e estão sendo representados como a média, o desvio padrão 5% para todos os experimentos (N=3).

Cristais de quartzo foram previamente limpos em banho de ultrassom utilizando acetona e em seguida etanol (três minutos em cada solvente) e secados em atmosfera de nitrogênio. Os cristais de quartzo limpos foram então imersos durante 30 minutos em uma solução 0,1 mM de MPTS em etanol à temperatura ambiente, após a quimissorção de MPTS, lavados com etanol para remover o excesso de MPTS que não reagiu e finalmente incubados durante 1h a 40°C (PIWONSKI et al., 2005). Na superfície de modificada com MPTS foi adicionado um volume constante da vesícula lipídica (25 μL), incubadas durante 1 h em temperatura ambiente. Em seguida os cristais modificados com MPTS-lipídios foram acoplados ao QCM sob fluxo contínuo de uma solução de PBS (pH 7.4) a uma razão de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ até a estabilização da frequência. Após este processo, a camada de biorreconhecimento foi otimizada através do estudo da saturação, dessa forma, 500 μl de diferentes concentrações de Con A (2,7; 5,4; 8,1; 20,8; 13,5; 16,2; 18,9 e 21,6) foram injetados no sistema e fluxo por 30min (estabilização da frequência de ressonância). A fim de avaliar a eficácia de reconhecimento da ConA por glicoconjugados, o eletrodo modificado contendo MPTS-DPPC-ConA foi submetido a seis

adições sucessivas de 300 μL solução de ovalbumina ($0,5 \mu\text{M}$) em PBS e a constante de afinidade aparente foi mensurada. Depois disso, foi feito o estudo do eletrodo modificado por MPTS-DPPC-ConA após a exposição a 300 μL da solução de 1: 1000 do soro contaminado com DENV-1, -2, -3 e soro negativo. Após a estabilização da frequência foram feitas um total de seis adições sucessivas do volume a 300 μL da solução de 1: 1000 do soro contaminado para cada tipo de soro, a fim de avaliar a resposta do sensor com o aumento do número de camadas. A ilustração esquemática das diferentes etapas da construção do biossensor piezoelétrico está sendo apresentada na figura 12.

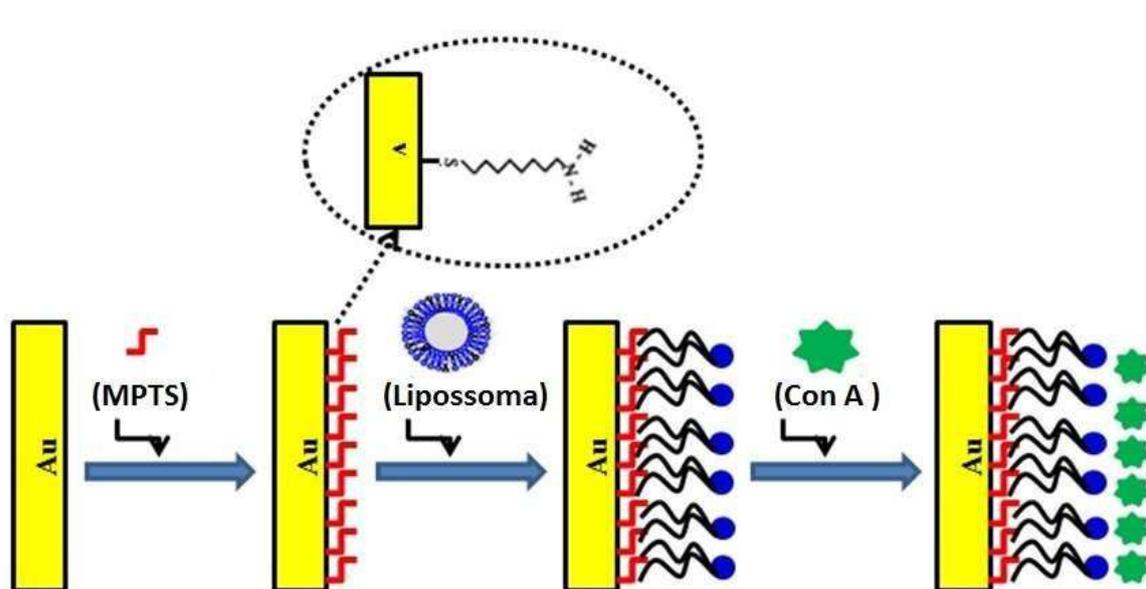


Figura 12. Ilustração esquemática da obtenção do biossensor piezoelétrico.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Caracterização dos lipossomas e da morfologia do filme lipídico

Os lipossomas utilizados para a obtenção do filme lipídico na superfície do eletrodo apresentaram diâmetro médio de 440 nm ($\text{PDI} = 0,85$), tanto com relação à intensidade de luz dispersa quando ao volume (Fig. 13a e 13b). O potencial zeta, medido

através da técnica de mobilidade eletroforética, demonstrou que os lipossomas apresentaram um potencial zeta (ζ) de $-3,2 \pm 0,3$ mV (Fig. 13c).

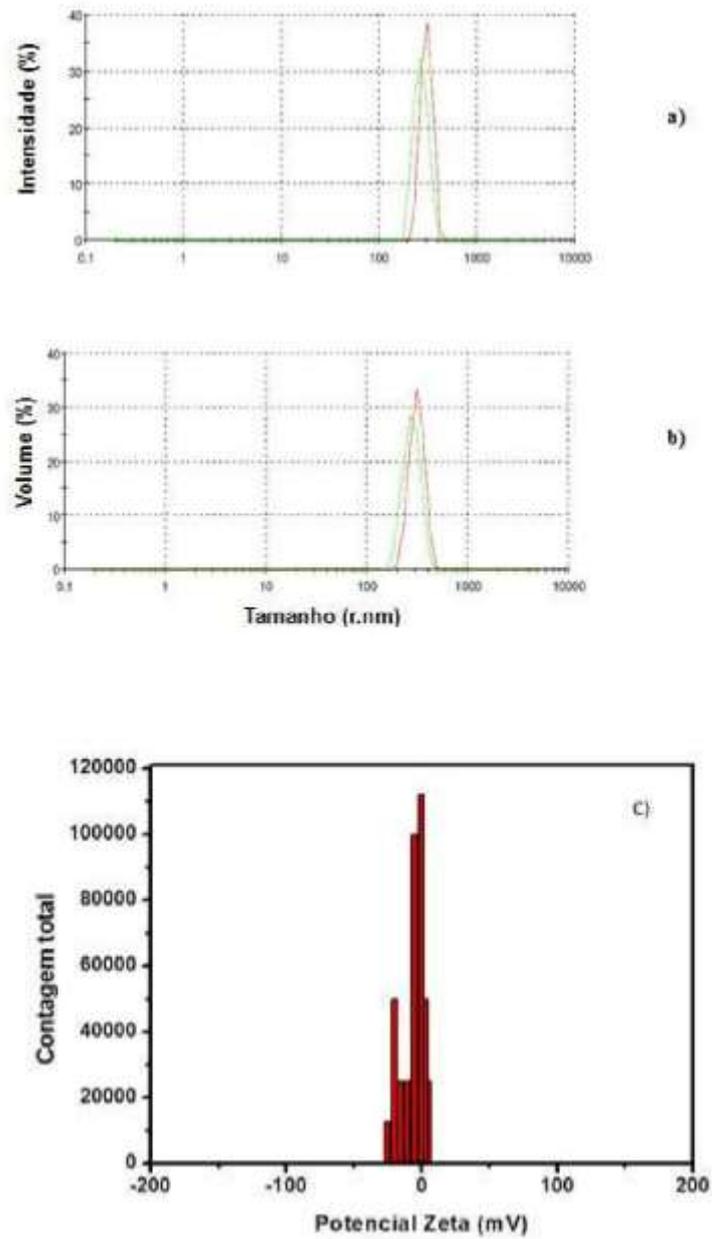


Figura 13. Distribuição do tamanho de partículas do lipossoma em função da intensidade (a), em função do volume (b) e potencial zeta (c).

A morfologia do filme lipídico e sua associação com a lectina ConA foi estudada por meio da técnica de AFM. A Figura 14 mostra as imagens topográficas de AFM obtidas para a camada lipídica de DPPC (a), DPPC-ConA (b), DENV-1 (c), DENV-2 (d) e DENV-3 (e) e as suas correspondentes secções transversais. Na Fig. 14a observamos que o filme lipídico depositado apresenta uma distribuição não-uniforme na superfície do eletrodo, com uma altura média de $(30 \pm 4,2)$ nm. As imagens de AFM mostram também a coexistência de domínios fluído e gel na camada lipídica estando de acordo com a literatura (GIOCONDI et al., 2008). Além disso, após a adsorção da lectina ConA na camada lipídica, foi possível observar a presença de estruturas globulares relativamente grandes (com altura média de $42 \pm 3,6$ nm) distribuídos entre os domínios fluído e gel da camada lipídica. Estudos realizados por Giocondi et al. (2008) confirmaram que proteínas tendem a localizar-se preferencialmente nas delimitações entre os domínios da fase fluída e gel de cadeias lipídicas. Além disso, nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que determinaram uma altura de aproximadamente 12 nm para o tetrâmero ConA (BOUCKAERT et al., 1996). Após a interação de diferentes sorotipos com a camada sensora de DPPC-ConA, foi observada uma variação de altura em torno de $54,2 \pm 5,1$ nm para o DENV-1, $60,6 \pm 4,8$ nm para o DENV-2 e $68,4 \pm 3,9$ nm para o DENV-3 (Fig.14c-e) o que corresponde a diferentes especificidades da ConA pelas glicoproteínas presentes no soro infectado com o DENV.

Sabe-se que o vírus da dengue apresenta dois potenciais sítios para ligação com carboidratos, sítios N-67 e N-153, os quais apresentam resíduos glicídicos ricos em manose e representam um papel relevante para a adesão viral e resposta imunológica (HACKER et al., 2009; ZHANG et al., 2004). Tem sido reportada também, ausência de ligação a carboidrato em N-153 para DENV2 (JOHNSON et al. 1994). De acordo com

Pereira et al. (2008), a ligação de partículas virais com a lectina ConA é provavelmente governada por ligação a manose. No entanto, as diferenças no número e tipo de carboidrato nas proteínas de superfície do vírion correlacionadas com o sorotipo e a resposta com o hospedeiro continuam mal compreendidas (HERRERO et al., 2013).

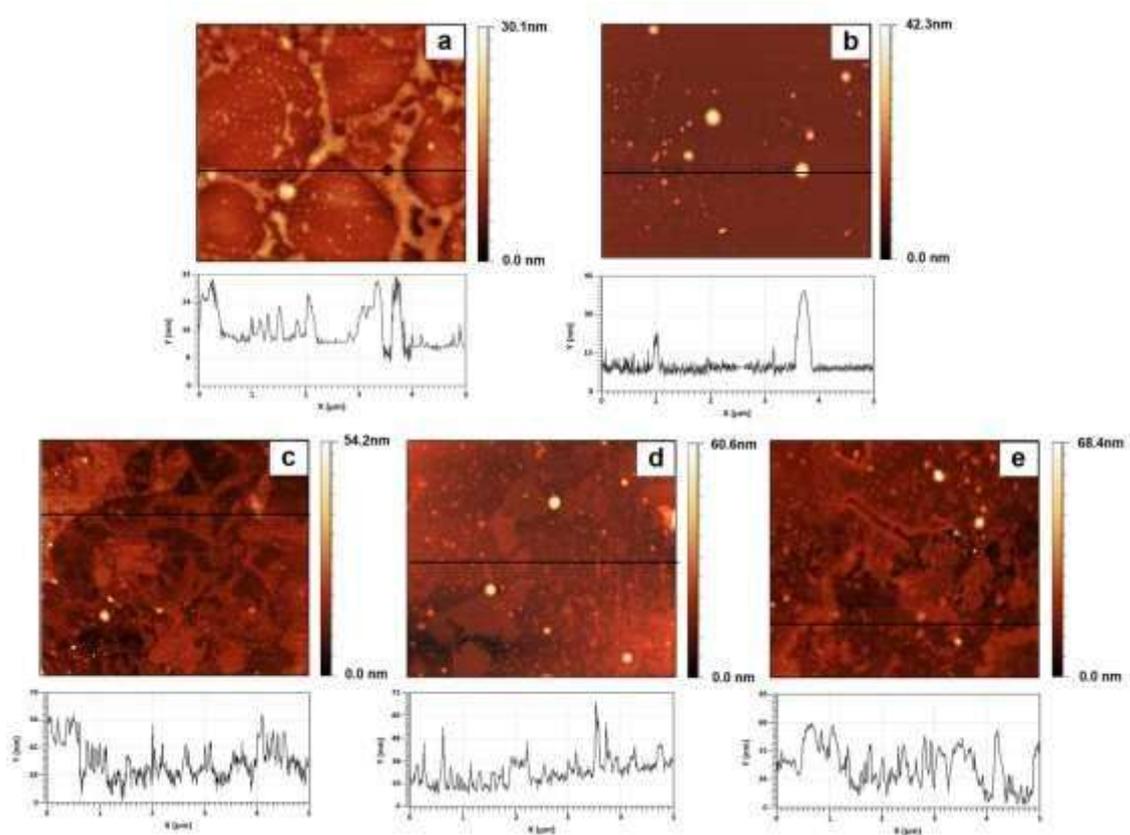


Figura14. Imagem topográfica por AFM da camada de DPPC (a), DPPC/ConA (b), DPPC/ConA/DENV-1 (c), DPPC/ConA/DENV-2 (d) e DPPC/ConA/DENV-3 (e) com suas correspondentes secções transversais. Área de varredura de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

3.3.2. Caracterização eletroquímica do sistema sensor Lec-ML-eletrodo de ouro

Na Figura 15 demonstra a caracterização por VC e EIE tanto da camada lipídica quando da camada ConA-Lip-eletrodo de ouro. Utilizamos a sonda redox $K_4[Fe(CN)_6]^{4-} / K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ (1:1) para todos os experimentos envolvendo a técnica eletroquímica. De acordo com a Figura 15a o eletrodo de ouro apresentou picos de oxirredução bem definidos, típico de um processo reverso. Após cada etapa de construção do biossensor, a passagem da corrente de elétrons diminui devido ao aumento da propriedade de barreira à cinética de transferência de elétrons que ocorre na interface eletrodo/eletrólito (BARD e FAULKNER, 2001). A formação de camada lipídica na superfície do eletrodo de ouro promove uma diminuição na corrente de pico redox, este fenômeno se repete após a imobilização da lectina ConA na superfície lipídica para cerca de -8 e 16 mA. A presença da ConA dificulta a difusão de íons tais como os ânions da sonda redox o que também indica sucesso na obtenção destas etapas de construção do biossensor.

A Fig. 15b mostra o diagrama de Nyquist durante as etapas de construção do biossensor. O eletrodo por ser um metal condutor, apresenta uma resistência praticamente nula, contudo, este fato ocorre apenas em teoria, na prática, observamos que mesmo sendo um condutor o eletrodo apresenta pequena impedância como demonstrado no surgimento de um pequeno arco e predominância do efeito difusivo dos íons da sonda redox para a superfície do eletrodo. Após cada etapa de modificação observa-se aumento gradual do diâmetro do semicírculo - aumento da resistência à transferência de íons da sonda redox para a superfície do eletrodo - o que se deve à adsorção de biomoléculas na superfície (BARD; FAULKNER, 2001).

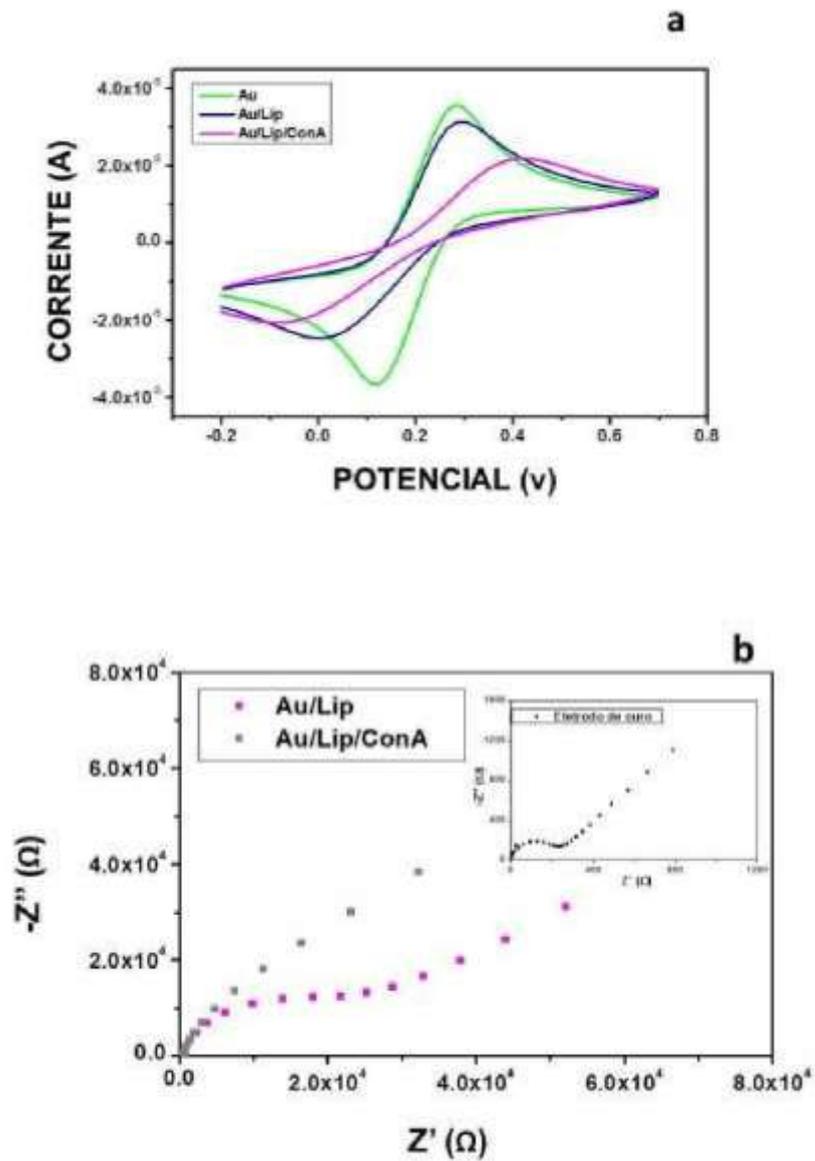


Figura 15. Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) das etapas de construção do biossensor.

Tanto a escolha do tempo de exposição dos lipossomas na superfície do eletrodo quanto a determinação da concentração de ConA, a ser imobilizada da camada lipídica,

foram realizadas previamente através de um estudo de otimização. Isto porque, é de extrema relevância a obtenção de alto grau de homogeneidade da camada lipídica, a fim de diminuir a possibilidade de formação de defeitos na monocamada e, conseqüentemente proporcionar maior quantidade de sítios para a posterior interação com a lectina. Desta forma, 5 μ L da solução contendo lipossomas foi exposta na superfície do eletrodo por incubação nos tempos de 10, 15 e 30min sendo analisado por VC e EIE (Fig. 16a e 16b). Podemos observar que com o aumento do tempo de exposição da camada lipídica na superfície do eletrodo ocorreu diminuição considerável da distância entre os picos de oxidação e redução.

O diagrama de Nyquist revela que a presença do lipídio no tempo de 10 min aumentou a resistência à transferência de carga. A partir de 15 min, o aumento da resistência à transferência de carga tornou-se pouco expressivo e, desta forma, optou-se pela utilização deste tempo nos experimentos subsequentes. Após a otimização do tempo de exposição do lipossoma na superfície do eletrodo, iniciamos o estudo da otimização da imobilização da lectina Con A sobre a camada lipídica. Dessa forma, 1 mL de ConA diluída em PBS 10 mM (pH 7,4) em diferentes concentrações (3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 μ g/mL) foi incubada durante 15 min e, posteriormente, as respostas por EIE e VC foram analisadas.

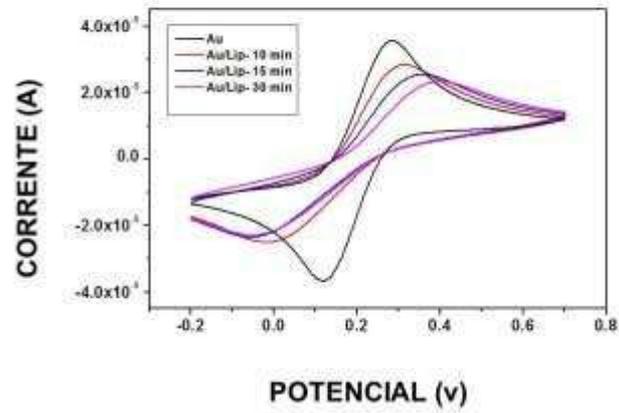
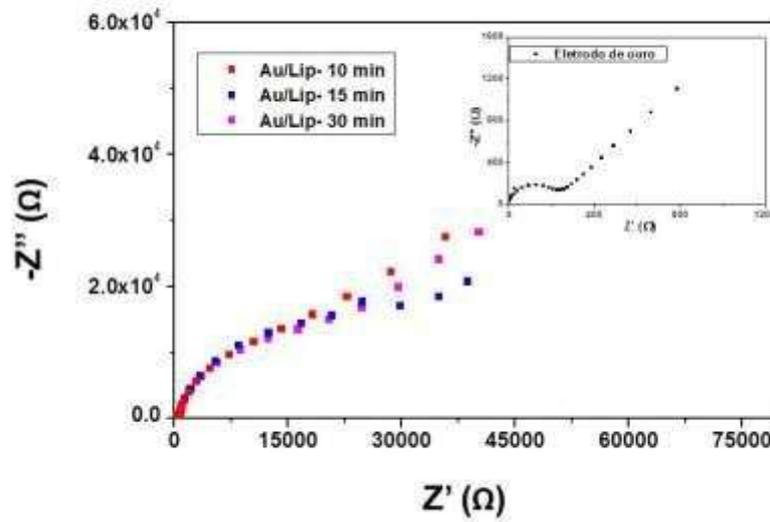
a**b**

Figura 16. Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) da variação do tempo de exposição dos lipossomas na superfície do eletrodo.

De acordo com a Figura 17a e 17b, observa-se que o aumento na concentração de ConA é proporcional ao aumento da imobilização sobre a camada lipídica. A maior concentração analisada ($50\mu\text{g}/\text{mL}$) proporcionou uma redução acentuada das correntes de pico de oxi-redução, correspondendo a uma diminuição da corrente de pico de oxidação de $2,84\times 10^{-5}$ (inicialmente) para $1,44\times 10^{-5}$ e uma diminuição da corrente de pico de redução de $-2,24\times 10^{-5}$ para $-1,57\times 10^{-5}$.

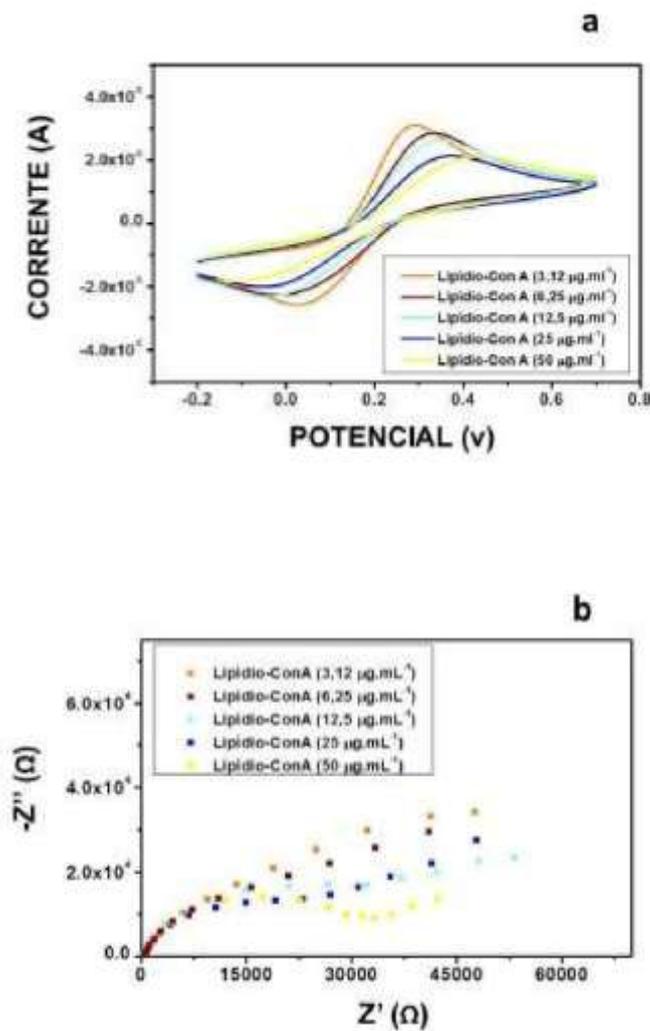


Figura 17. Voltametria cíclica (a) e Diagrama de Nyquist (b) da variação da concentração de ConA na superfície do eletrodo modificado com a membrana lipídica.

3.3.3. Detecção eletroquímica de glicoproteínas presentes no soro

A Fig. 18a-c demonstra a resposta por VC do sistema sensor lipídio-ConA após a exposição a seis diluições diferentes de cada sorotipo (1:10, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:1500 e 1:2000). Observa-se uma diminuição gradual da corrente em função do aumento da concentração de soro de dengue. Uma redução mais expressiva na resposta amperométrica ocorreu para o soro infectado com dengue DENV2 e DENV3. A redução da corrente está correlacionada com a intensidade do complexo que se forma entre ConA-glicoproteína na superfície do transdutor. A Fig. 19a-c exhibe as impedâncias real e imaginária do biossensor em diferentes diluições do soro. Os resultados estão de acordo com análise de VC e apresentaram maiores valores de resistência à transferência de carga para os sorotipos DENV-2 e DENV-3 em comparação com DENV-1.

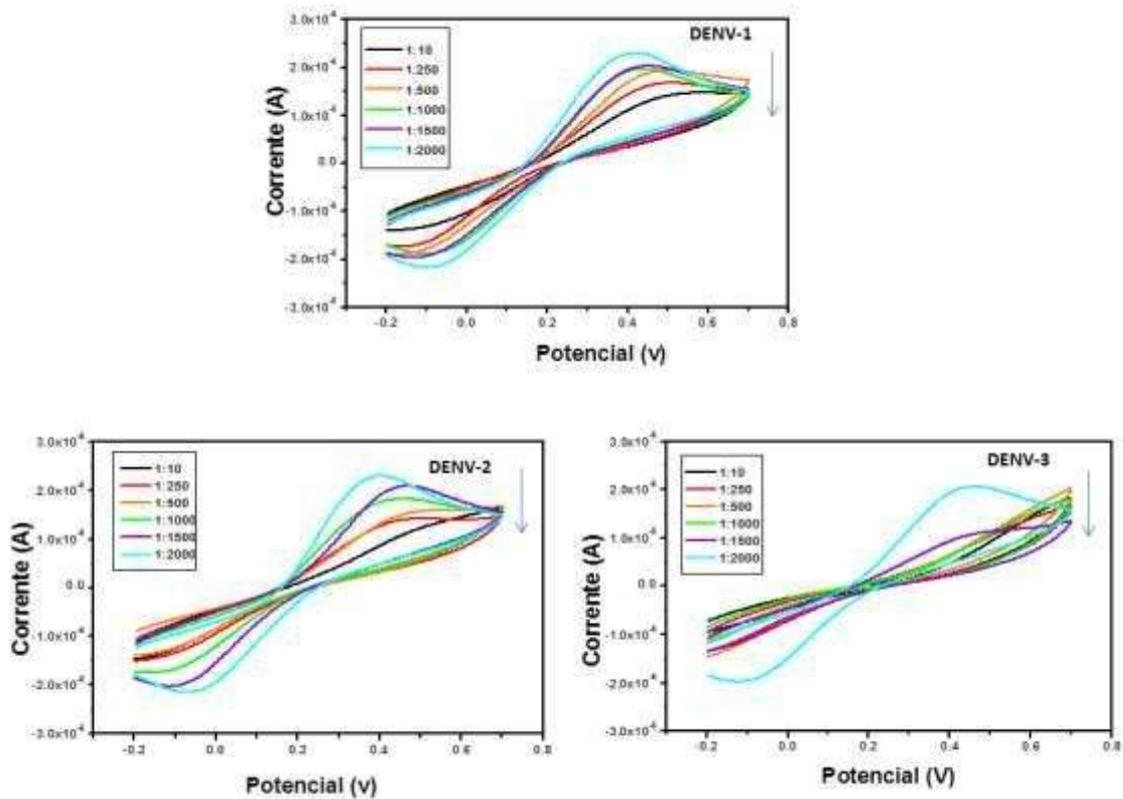


Figura 18. Voltametria cíclica do sistema lipídio-ConA após a exposição de diferentes diluições do soro DENV-1 (a), DENV-2 (b) e DENV-3 (c).

A Figura 20a apresenta os resultados do CV da resposta do sistema sensor após exposição à diluição 1:10 do soro contaminado com diferentes sorotipos incluindo a resposta do soro na ausência de infecção, a fim de avaliar a especificidade do biossensor. Observa-se uma redução expressiva do pico anódico e catódico na presença do soro infectado e que esta redução é mais notável para a infecção pelo sorotipo DENV-3. A razão pela qual ocorre redução do pico anódico e catódico reside no fato de o complexo lectina-glicoproteína agir como uma camada bloqueadora à transferência de carga o que dificulta a difusão de íons da sonda redox para a superfície do eletrodo.

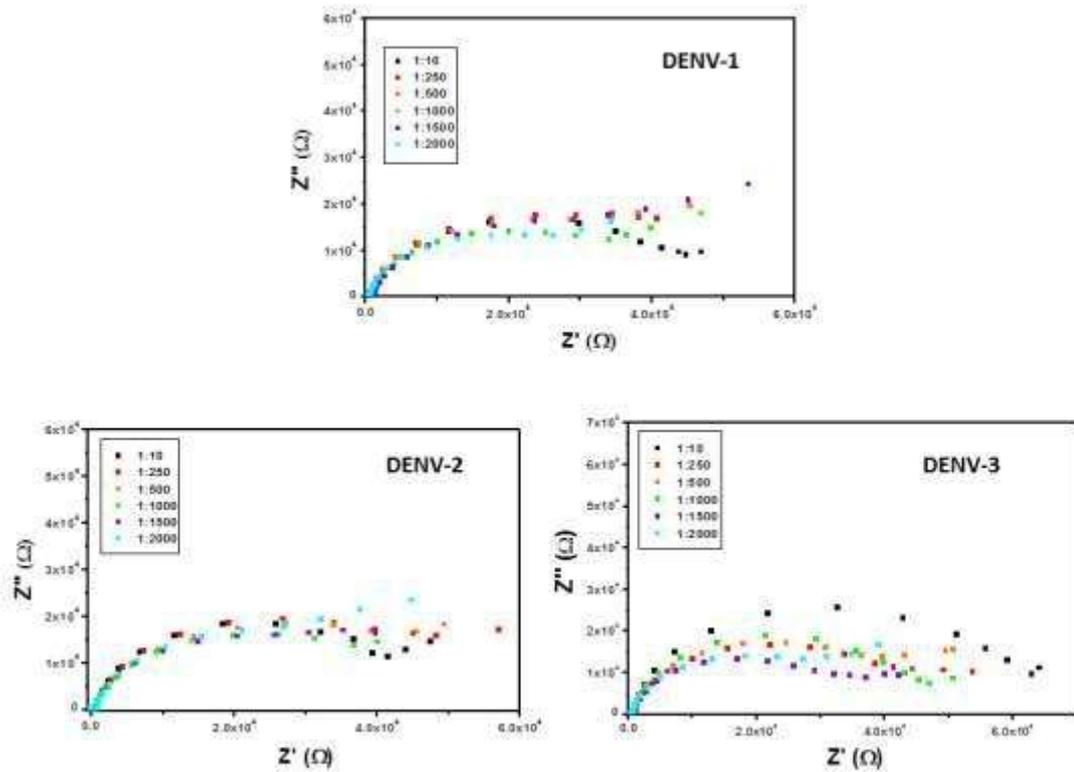


Figura 19. Diagrama de Nyquist do sistema lipídio-ConA após a exposição de diferentes diluições do soro DENV-1 (a), DENV-2 (b) e DENV-3 (c).

Dessa forma, o biossensor lipídio-ConA-Au apresentou a capacidade reconhecer glicoproteínas no soro infectado por DENV-1, DENV-2 e DENV-3 na seguinte intensidade de resposta $DENV3 > DENV2 > DENV1$.

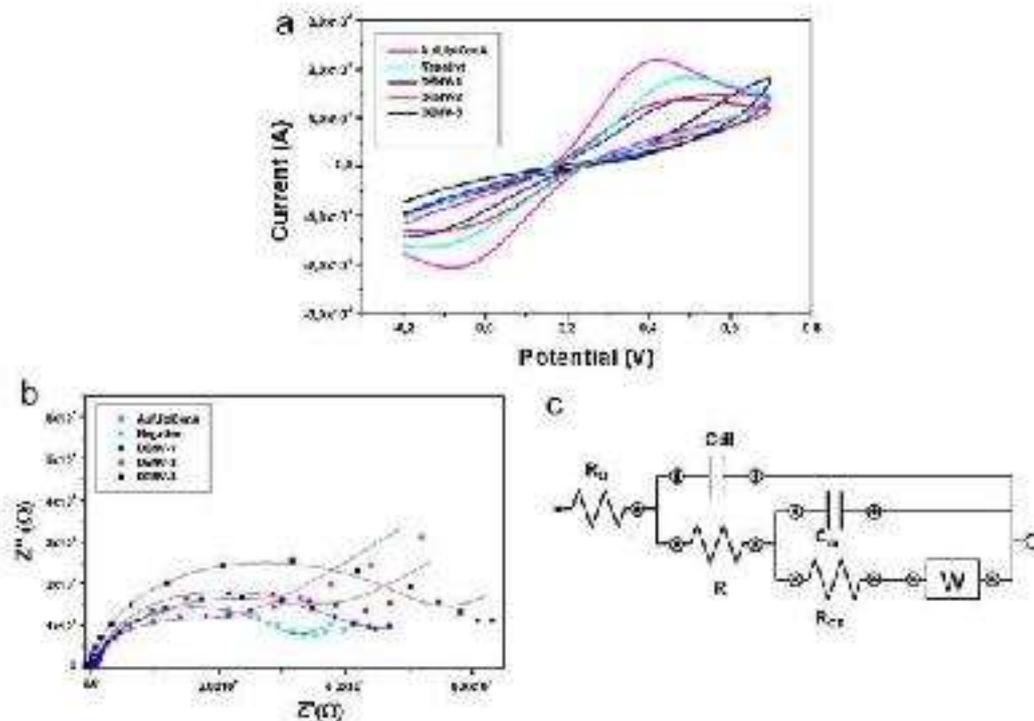


Figura 20. Voltametria cíclica (a) e Diagrama de Nyquist (b) da interação do biossensor com o DENV-1, DENV-2, DENV-3 e soro negativo. Diluição dos soros (1:10). Circuito equivalente utilizado para o ajuste das medidas de impedância (c).

A Figura 20b mostra o diagrama de Nyquist e os correspondentes ajustes obtidos a partir do circuito equivalente (Fig. 20c). O aumento no R_{ct} foi observado após a exposição do sensor aos soros contaminados com DENV-1, DENV-2 e DENV-3. O elemento R_{ct} neste estudo serve como um parâmetro da resposta sensora na detecção da presença de infecção por dengue. O circuito equivalente está representado pela resistência da solução (R_{Ω}), a resistência à transferência de elétrons (R_{ct}) e a impedância de Warburg (W) como os principais elementos. Além disso, a capacitância da dupla camada (C_{dl}), a resistência da camada de lectina (R) e capacitância da membrana lipídica (C_m) também foram levados em consideração. O R_{ct} depende da característica dielétrica da interface eletrodo/solução, por outro lado a W e R_{Ω}

representam as propriedades da solução eletrolítica. O R_{CT} representa a cinética de transferência de carga da sonda redox na superfície do eletrodo e altos valores de R_{CT} estão associados com bloqueio na superfície do eletrodo. Em nosso estudo, as mudanças na R_{CT} foram mais relevantes quando comparada com os outros componentes da impedância. A Tabela 1 demonstra os elementos do circuito equivalente tanto nas etapas de preparação de biossensor como em sua subsequente interação com glicoproteínas do soro presente em pacientes infectados com dengue (sorotipos 1, 2 e 3). Nossos resultados revelaram diferentes respostas para cada sorotipo. Os maiores valores de R_{CT} foram obtidos para DENV3 possivelmente devido a maior indução na expressão de glicoproteínas no soro de pacientes contaminados por dengue permitindo, desta forma, um maior número de moléculas ligadas a ConA

Tabela1. Valores dos elementos do circuito equivalente originado do ajuste obtido através dos resultados de impedância do biossensor eletroquímico.

| Camada | Cdl (nF) | Rct (kΩ) | W | RΩ (Ω) | C (nF) | RΩ (Ω) |
|------------------------------|------------|-------------|-------------|------------|--------------|-------------|
| Eletrodo | 230 ± 4,31 | 0,3 ± 0,05 | 5,66 ± 1,34 | 77 ± 3,21 | 11,3 ± 1,32 | 728 ± 3,54 |
| Lipídio (Lip) | 1160 ± 11 | 13 ± 0,94 | 9,87 ± 1,85 | 124 ± 7,42 | 9,36 ± 1,27 | 740 ± 5,32 |
| Lip-ConA | 906 ± 14 | 17,5 ± 1,17 | 27,2 ± 3,05 | 190 ± 5,93 | 13,8 ± 2,31 | 681 ± 6,72 |
| Lip-ConA-soroDENV-1 | | | | | | |
| Lip-ConA-sDENV-1 (1:10) | 775 ± 5,29 | 30,5 ± 2,74 | 55,1 ± 4,56 | 150 ± 4,25 | 5,32 ± 1,35 | 782 ± 3,41 |
| Lip-ConA-sDENV-1 (1:250) | 560 ± 4,75 | 24,4 ± 3,85 | 32,2 ± 4,23 | 208 ± 3,12 | 6,18 ± 1,56 | 712 ± 7,64 |
| Lip-ConA- sDENV-1 (1:500) | 564 ± 5,21 | 23,3 ± 2,01 | 32,6 ± 2,40 | 217 ± 6,23 | 5,11 ± 1,26 | 733 ± 9,43 |
| Lip-ConA- sDENV-1 (1:1000) | 874 ± 6,83 | 22,7 ± 2,74 | 35,3 ± 2,57 | 186 ± 4,72 | 4,27 ± 1,24 | 804 ± 5,36 |
| Lip-ConA- sDENV-1 (1:1500) | 1070 ± 6 | 20,9 ± 2,54 | 25,3 ± 2,59 | 188 ± 5,30 | 2,98 ± 0,63 | 687 ± 7,49 |
| Lip-ConA- sDENV-1 (1:2000) | 1060 ± 8,4 | 19,7 ± 1,39 | 29 ± 3,12 | 120 ± 4,16 | 13,7 ± 1,64 | 600 ± 6,28 |
| Lip-ConA-soroDENV-2 | | | | | | |
| Lip-ConA- sDENV-2 (1:10) | 650 ± 6,75 | 32,3 ± 1,73 | 56 ± 3,27 | 151 ± 2,34 | 5,96 ± 0,74 | 802 ± 9,42 |
| Lip-ConA- sDENV-2 (1:250) | 622 ± 9,04 | 30,8 ± 3,74 | 44 ± 4,14 | 235 ± 4,03 | 5,15 ± 1,15 | 601 ± 13,75 |
| Lip-ConA- sDENV-2 (1:500) | 713 ± 8,12 | 26,3 ± 4,01 | 36 ± 2,94 | 336 ± 5,92 | 6,42 ± 1,64 | 863 ± 18,39 |
| Lip-ConA- sDENV-2 (1:1000) | 738 ± 7,55 | 25,8 ± 3,92 | 46,1 ± 3,91 | 311 ± 6,73 | 9,17 ± 1,73 | 833 ± 20,34 |
| Lip-ConA- sDENV-2 (1:1500) | 755 ± 7,46 | 21,5 ± 2,79 | 38,2 ± 2,06 | 302 ± 5,12 | 11,2 ± 2,27 | 865 ± 15,57 |
| Lip-ConA- sDENV-2 (1:2000) | 1340 ± 13 | 21,1 ± 4,15 | 22,4 ± 2,78 | 104 ± 4,39 | 9,99 ± 2,03 | 678 ± 5,23 |
| Lip-ConA-soroDENV-3 | | | | | | |
| Lip-ConA- sDENV-3 (1:10) | 432 ± 8,01 | 48,4 ± 2,68 | 61,4 ± 5,12 | 118 ± 2,63 | 10,13 ± 1,86 | 768 ± 8,43 |
| Lip-ConA- sDENV-3 (1:250) | 945 ± 9,42 | 38,3 ± 3,08 | 40,5 ± 2,01 | 126 ± 2,74 | 5,49 ± 1,04 | 804 ± 13,79 |
| Lip-ConA- sDENV-3 (1:500) | 699 ± 10 | 27,5 ± 2,36 | 52,4 ± 1,98 | 218 ± 3,65 | 6,14 ± 1,43 | 955 ± 17,32 |
| Lip-ConA- sDENV-3 (1:1000) | 998 ± 9,32 | 26,1 ± 2,59 | 45,8 ± 4,35 | 240 ± 4,95 | 11,90 ± 2,57 | 984 ± 7,31 |
| Lip-ConA- sDENV-3 (1:1500) | 1160 ± 14 | 25,4 ± 2,77 | 44 ± 3,64 | 113 ± 4,54 | 7,41 ± 1,58 | 833 ± 7,8 |
| Lip-ConA- sDENV-3 (1:2000) | 1080 ± 12 | 22,1 ± 3,05 | 33,1 ± 2,31 | 162 ± 4,69 | 15,96 ± 2,41 | 643 ± 9,36 |
| Lip-ConA-soroNegativo | | | | | | |
| Lip-ConA-sNeg (1:10) | 474 ± 5,56 | 24,4 ± 2,63 | 87,7 ± 6,34 | 121 ± 2,54 | 7,15 ± 1,4 | 698 ± 4,53 |
| Lip-ConA-sNeg(1:250) | 987 ± 7,37 | 24,3 ± 5,04 | 56,2 ± 2,93 | 111 ± 3,71 | 8,95 ± 1,52 | 744 ± 4,28 |
| Lip-ConA-sNeg(1:500) | 948 ± 8,77 | 23,8 ± 4,26 | 26,1 ± 3,24 | 115 ± 2,63 | 7,53 ± 1,36 | 860 ± 8,54 |
| Lip-ConA-sNeg(1:1000) | 957 ± 6,93 | 22,2 ± 3,85 | 28,9 ± 2,74 | 117 ± 2,68 | 7,64 ± 0,93 | 801 ± 6,04 |
| Lip-ConA-sNeg (1:1500) | 1070 ± 10 | 20,1 ± 5,92 | 29,5 ± 1,49 | 118 ± 2,57 | 8,5 ± 1,34 | 741 ± 2,51 |
| Lip-ConA-sNeg (1:2000) | 1130 ± 14 | 18 ± 7,42 | 30,9 ± 2,59 | 113 ± 2,65 | 8,75 ± 1,62 | 732 ± 5,63 |

O desempenho do biossensor na detecção de glicoproteínas de dengue foi avaliado através da variação relativa do parâmetro (ΔR_{CT}). Esta variação pode ser calculada de acordo com seguinte expressão:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(\text{ConADENV}_{\text{sorotipo}}) - R_{CT}(\text{ConA})}{R_{CT}(\text{ConA})} \times 100 \quad \text{Eq.3}$$

Em que, R_{CT} (ConA) é o valor da resistência a transferência de elétrons do eletrodo modificado lipídio-ConA-Au. R_{CT} (ConADENVsorotipo) é o valor da resistência a transferência de elétrons do sistema lipídio-ConA-Au após a exposição ao soro do paciente contaminado com dengue 1, 2 e 3. O $\Delta R_{CT}\%$ claramente aumenta com o aumento da concentração do soro infectado. A maior resposta ocorreu, em valores aproximados, na infecção por DENV-3 ($\Delta R_{CT} = 180\%$), seguida pelo DENV-2 ($\Delta R_{CT} = 80\%$) e DENV-1 ($\Delta R_{CT} = 60\%$), estes resultados indicam que a interação entre a lectina ConA e as glicoproteínas presentes no soro infectado com dengue pode ser detectada pela superfície do eletrodo modificado (Fig. 21). Não foram observadas respostas significativas diante da exposição ao soro negativo.



Figura 21. $\Delta R_{CT}\%$ do biossensor após a exposição de diferentes sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) e controle nas diluições 1:10 a 1:2000.

Além disso, a reprodutibilidade do sistema biossensor foi avaliada a partir da resposta do ΔR_{CT} em três pacientes diferentes para cada sorotipo e cada um foi testado em um biossensor individualmente ($n = 3$), valores aceitáveis de R.S.D. (do inglês *relative standard deviation*) foram encontrados (5,73%, 5,43% e 4,89% para DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente).

ConA potencialmente de liga às partículas de dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) no domínio III da proteína E do vírus a qual contém dois potenciais locais de ligação ao carboidrato em N-67 e N-153, enquanto a maioria dos outros flavivírus apresenta apenas um único local de glicosilação no sítio N154 (CHAMBERS et al, 1990; HEINZ e ALLISON,2003). MABALIRAJAN et al. (2005) demonstraram que DENV-1 e DENV-3 estão associados à dengue hemorrágica em infecções primárias, enquanto que DENV-2 e DENV-4 só foram associados com dengue hemorrágica na infecção secundária. Além disso, em resposta a infecção por dengue, existe a produção de mediadores inflamatórios que estão envolvidos na progressão da doença. Exemplo deste efeito é a ativação do sistema complemento (C3 e C5B) envolvidos no aumento da permeabilidade em casos graves de dengue. Os níveis dos complementos C3 e C5b, bem como outras glicoproteínas plasmáticas, já se encontram aumentados em eventos primários associados com DENV-3. Da mesma forma que outras glicoproteínas presentes no soro de pacientes contaminados por dengue, C3 contém carboidratos com elevado teor de manose, conseqüentemente apresentam maior interação específica com a lectina ConA (MIKI et al., 1986).

3.3.4. Caracterização piezoelétrica do sistema sensor Lec-ML-eletrodo de ouro

Neste estudo, MPTS foi utilizado com o objetivo de criar uma camada altamente organizada (SAM) e ao mesmo tempo hidrofóbica. Desta forma, quando vesículas fosfolipídicas entram em contato ocorre a formação espontânea de monocamada lipídicas com as suas cadeias hidrofóbicas em contato com a superfície modificada do SAM e a porção hidrofílica em contato com o ar (MEUSE et al., 1998). O estudo da interação entre a proteína ConA e lipídios tem sido extensivamente estudada, e inclusive pelo método do QCM (PEI et al., 2005; MORI et al., 2009; PEDROSO et al., 2008).

Na obtenção do biossensor, inicialmente foi realizado o estudo da saturação da camada de biorreconhecimento molecular de Con A (Fig 22.). Os nossos resultados revelam uma correlação positiva entre concentração de lectina e a variação da frequência de ressonância do cristal de quartzo (Δf) Desta forma, na medida em que a concentração aumenta de 2,7 a 16,2 μM , a variação de frequência aumenta progressivamente de 218,21 Hz para 246,09 Hz, a partir de quando permanece constante com o aumento da concentração. Contudo, a partir de 21,6 μM ocorre diminuição da variação de frequência para 239,72 Hz. Este fenômeno ocorre possivelmente devido ao fato de ocorrer impedimento estérico entre as moléculas de Con A alterar a cinética de adsorção, favorecendo a dessorção das moléculas de Con A. Assim, a concentração de 16,2 μM corresponde ao estado ideal de equilíbrio nas condições analisadas.

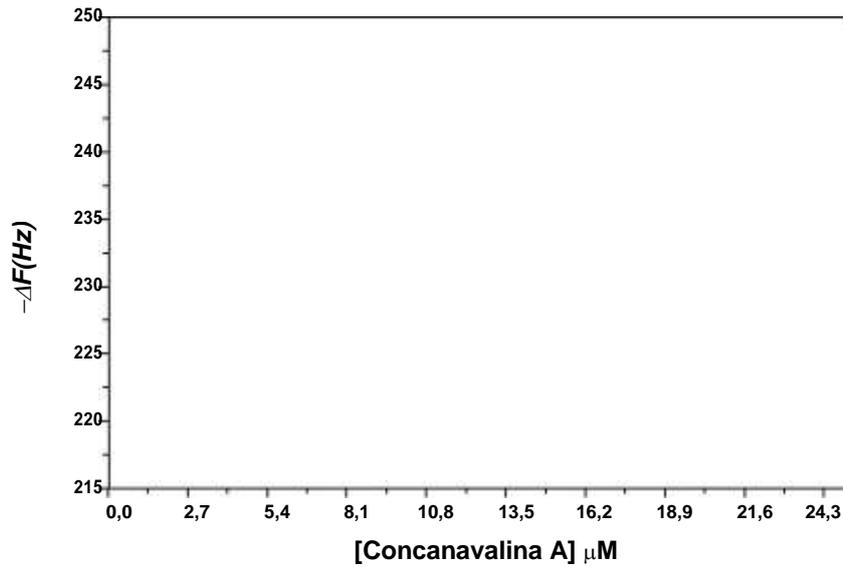


Figura 22. Estudo da variação da frequência com o aumento da concentração de *Concanavalina A*.

Nas condições experimentais, a monocamada constituída por fosfatidilcolina (PC) se encontra no estado fluido, uma vez que a sua temperatura de transição de fase (T_m) é entre -15 e -7 °C (NEW, 1990). Neste estado, proteínas ligadas à superfície tendem a oferecer resistência ao equilíbrio e conseqüentemente espera-se que ofereça resistência à variação de frequência. No entanto, que houve aumento expressivo da variação de frequência na medida em que se aumenta a concentração de Con A, sugerindo a alteração na fluidez proporcionada pelas condições experimentais, favorecendo a imobilização da proteína.

Apesar da monocamada de lipídio e Con A não ser considerada um filme rígido, de acordo com Hook et al. (2001), a equação de Sauerbray (Eq. 4) pode ser utilizada para sistemas biomoleculares não-rígidos e inclusive para bicamadas lipídicas.

$$\Delta m = \frac{C_s}{O_n} \Delta f \quad \text{Eq. 4}$$

Em que, C_s corresponde ao coeficiente de sensibilidade ($17,7 \text{ ng.Hz}^{-1}\text{cm}^{-2}$) para um cristal de quartzo de 5MHz e O_n é o número harmônico.

Desta forma, relacionando a variação de massa com a concentração de Con A (Fig. 23) podemos observar que a concentração de $2,7 \mu\text{M}$ de Con A induz uma variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo a qual corresponde a $3,86 \mu\text{g.cm}^{-2}$, já na saturação este valor aumenta para $4,35 \mu\text{g.cm}^{-2}$.

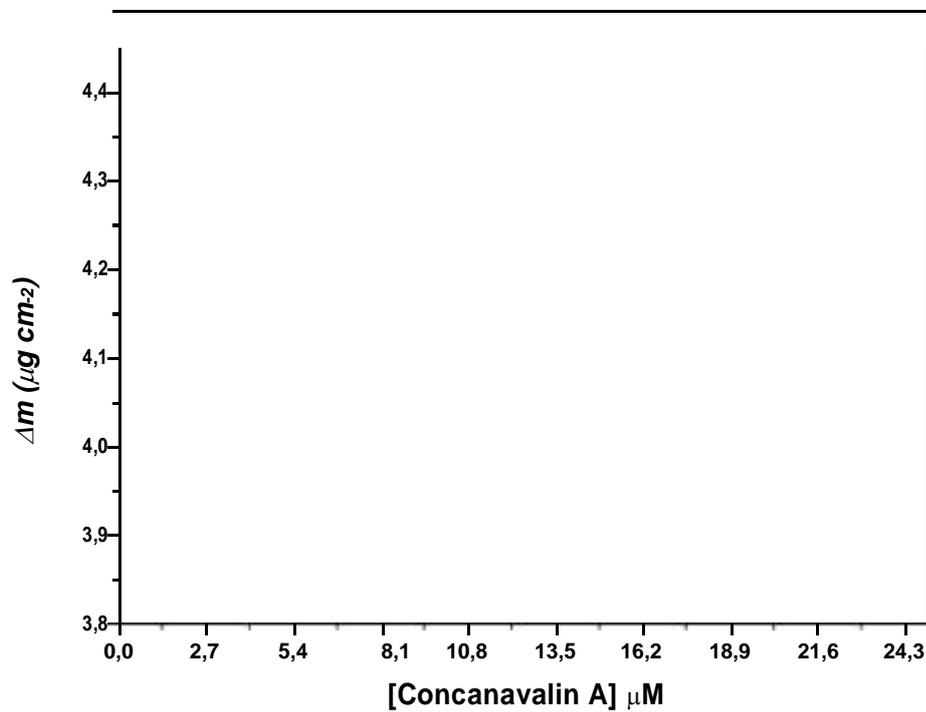


Figura 23. Variação da massa em função da concentração de *Concanavalina A*.

A eficácia do reconhecimento molecular do biossensor MPTS-DPPC-ConA foi avaliada por exposição a ovalbumina. Ovalbumina é uma glicoproteína contendo cerca de 2% da manose (ZHANG et al., 2006) e quatro locais de glicosilação (LIS et al., 1998).

De acordo com a Figura 24 podemos observar que com o aumento da concentração de ovoalbumina de 0,5 a 3,0 μM ocorreu maior variação da frequência de ressonância do cristal de quartzo. Tal comportamento é devido à diminuição gradual da frequência do mesmo diante da interação entre a proteína Con A e a ovoalbumina, sendo que esta variação ocorreu na faixa de 260 Hz a 335 Hz.

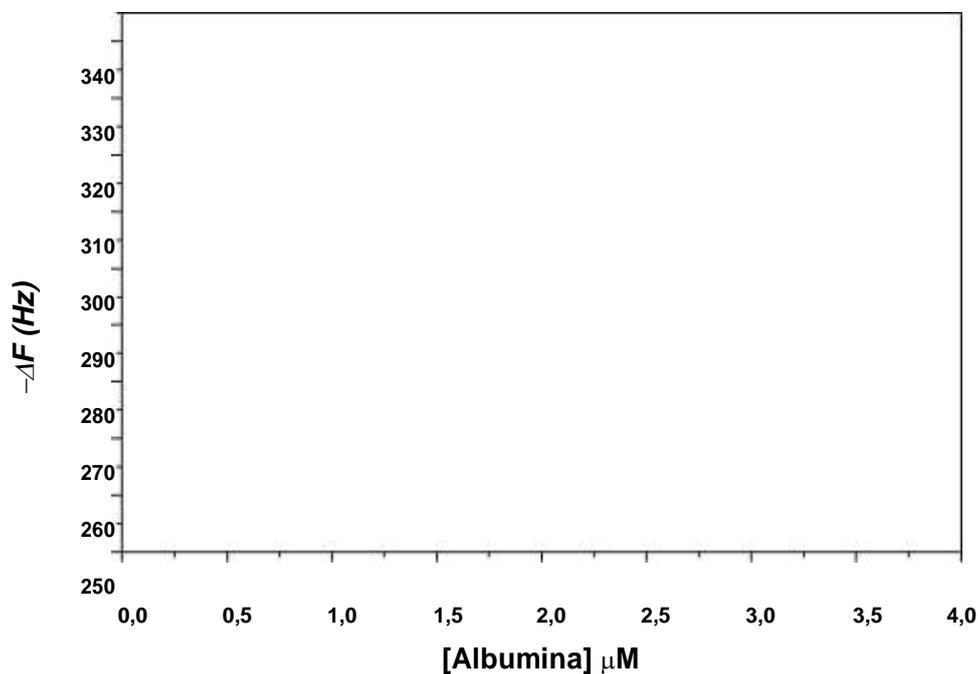


Figura 24. Variação da frequência em função da concentração de ovoalbumina.

Este comportamento está de acordo com a isoterma de Langmuir. Neste modelo, a variação da frequência no equilíbrio está relacionada com a concentração do ligante

(Equação 5) (PEDROSO, 2008).

$$\frac{C}{\Delta f} = \frac{C}{\Delta f_{max}} + \frac{1}{\Delta f_{max}} \cdot \frac{1}{K_A} \quad \text{Eq. 5}$$

onde Δf é a variação da frequência de equilíbrio, C é a concentração de ConA, Δf_{max} é a mudança de frequência quando a C é infinita e K_A é a constante de afinidade aparente. K_A é dada pela relação entre o coeficiente angular e coeficiente linear (PESQUERO et al., 2008).

A partir da figura 24 é possível traçar uma regressão linear relacionando $C/\Delta F$ em função de C . Dessa forma, a K_A da interação de ConA-ovalbumina encontrada corresponde a $K_A = 2,79 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Este resultado está de acordo com a literatura onde as constantes de afinidade de lectina por polissacarídeos ou glicoconjugados foi calculadas por diferentes técnicas encontradas com valores na ordem de 10^5 - 10^7 M^{-1} (ZHANG et al., 2006).

3.3.5. Detecção piezoelétrica de glicoproteínas presentes no soro

O reconhecimento de carboidrato tem sido alvo das pesquisas envolvendo biossensores (ZENG et al., 2012). Nas fases iniciais da infecção pelo vírus do dengue, há um aumento na expressão de glicoproteínas específicas no soro (XU et al., 2006). No presente estudo, o biossensor contendo lectina foi exposto a seis injeções sucessivas de 300 μL da diluição 1:1000 (v/v) do soro do paciente infectado com DENV-1, 2, 3 e negativo (Figura 25).

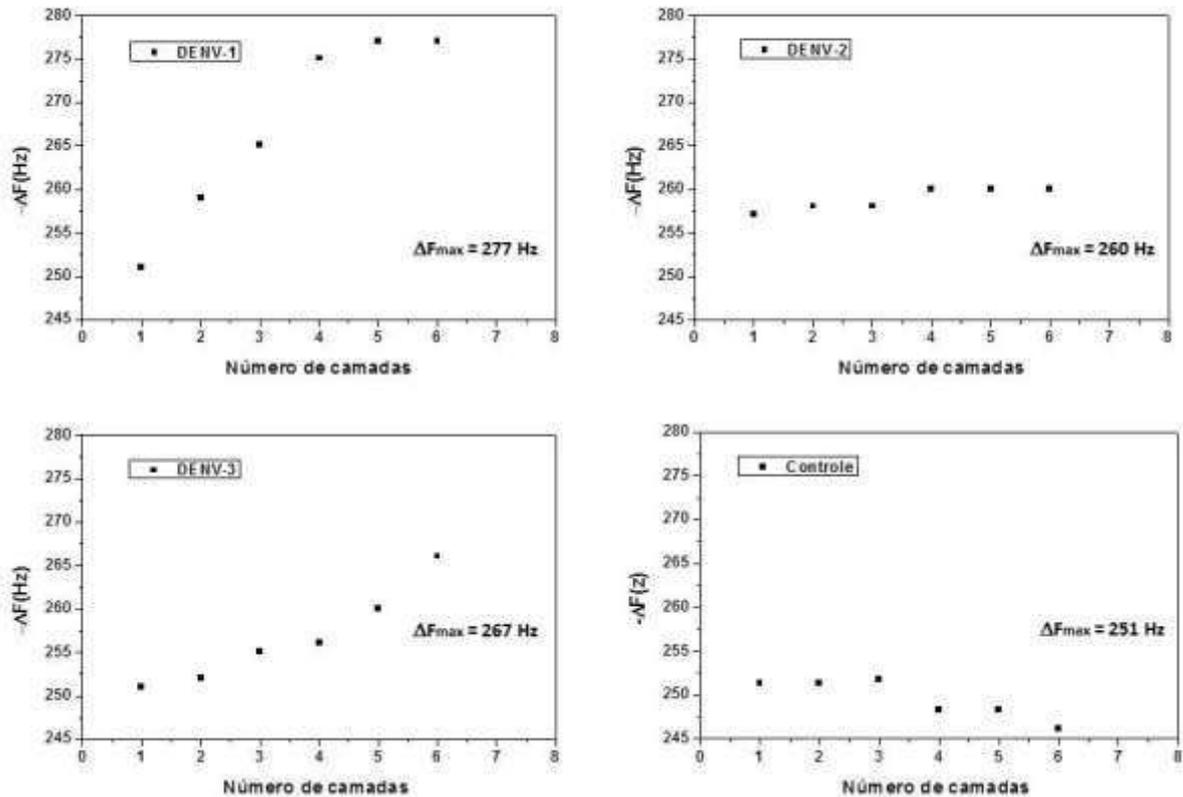


Figura 25. Variação de frequência do cristal de quartzo após a exposição de diferentes camadas contendo 300 μ L da diluição 1:1000 do soro da dengue contaminado com DENV-1 (a), DENV-2 (b), DENV-3 (c) e Não contaminado (d).

Foi possível observar que com o aumento da quantidade de camadas do soro infectado na superfície do cristal ocorreu um aumento na variação da frequência de ressonância do cristal piezoelétrico para todos os sorotipos analisados e que esta resposta apresentou correlação com o número de camadas do soro em contato com as camadas de biorreconhecimento molecular da lectina. No entanto, a análise piezoelétrica refletiu um comportamento distinto ao observado na impedância. Podemos destacar que

foi observada uma variação de frequência similar para os diferentes sorotipos de dengue testados, sendo obtida como padrão de resposta a sequência DENV-1 ($\Delta F_{\max} = 277$ Hz) > DENV-3 ($\Delta F_{\max} = 267$) > DENV-2 ($\Delta F_{\max} = 260$ Hz) com diferença reduzida entre os sorotipos avaliados, porém, mais elevado quando comparado ao controle $\Delta F_{\max} = 251$ Hz. A análise estatística pelo teste t de Student revelou que a resposta de cada biossensor na presença do DENV é estatisticamente distinta da resposta na ausência de infecção (controle) no intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$). Este dado destaca que o sensor piezoelétrico foi capaz de identificar apenas a presença ou ausência na infecção por dengue o que reforça a aplicação da ferramenta impedimétrica para investigar a diferença de resposta entre DENV-1, DENV-2 e DENV-3.

Quando ocorre interação de moléculas com a superfície do cristal de quartzo ocorre uma perturbação mecânica e conseqüentemente alteração na impedância (BANDEY et AL., 1999). O comportamento elétrico do cristal de quartzo (corte AT) utilizado em um equipamento de QCM pode ser representado através do modelo elétrico de Butterworth-van Dyke (BVD) (KANNISTO et al., 2009) (Fig. 26).

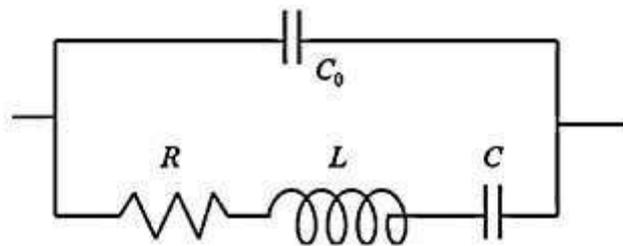


Figura 26. Circuito equivalente de Butterworth-van Dyke.

Onde, C_0 corresponde a capacitância estática do cristal; R_m (resistor) a dissipação de energia devido ao contato do cristal com solução; C_m (condensador) corresponde à energia armazenada na oscilação e está relacionada com elasticidade do quartzo e do meio circundante; L (indutor) é referente ao componente inerte de oscilação e está relacionado com a massa depositada durante a vibração.

De acordo com Luklum et al. (2000) a impedância acústica relaciona-se diretamente com a variação de frequência e variação da resistência, como seguem:

$$\frac{\Delta f}{f} = - \frac{Im(Z_L)}{\pi Z_{eq}} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde,

Δf = Variação de frequência

f = Frequência de ressonância do cristal

$Im(Z_L)$ = Impedância acústica imaginária

Z_{eq} = Impedância do cristal de quartzo $(\rho_q \mu_q)^{1/2}$

ρ_q = Densidade do cristal ($2,65 \text{ g.cm}^{-3}$) para cristais de corte AT e $f=5\text{MHz}$;

μ_q = Constante elástica ($2,947 \times 10^{11} \text{ g.cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$).

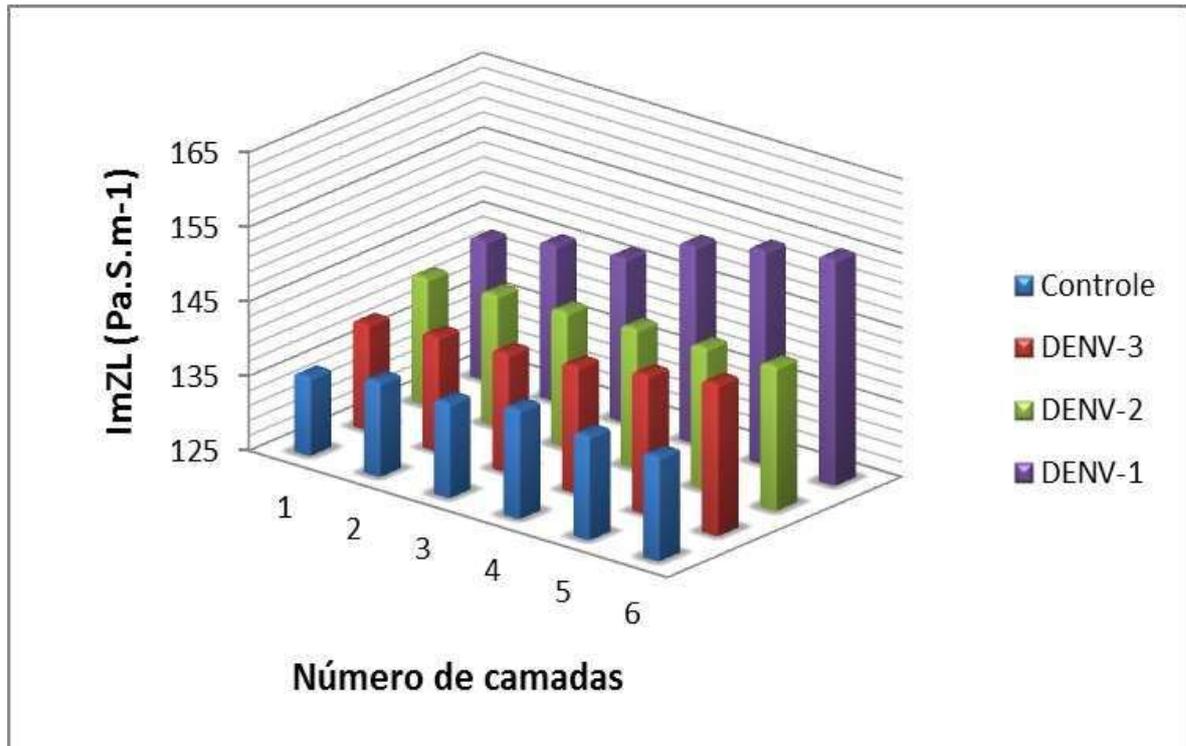


Figura 27. Impedância acústica imaginária ($Im Z_L$) do sensor após exposição a seis injeções consecutivas da diluição 1:1000 dos soros contaminados com DENV-1, DENV-2, DENV-3 e controle.

A Figura 27 representa a relação entre a impedância imaginária (ImZ_L) com a quantidade de injeções realizadas na diluição 1:1000 dos soros dos pacientes contaminados com DENV-1, DENV-2 e DENV-3. A partir da Figura 29 podemos observar que o DENV-1 apresentou os maiores valores de impedância imaginária (144 a 155 $Pa.S.m^{-1}$) quando comparado ao sorotipo DENV-2 e DENV-3, os quais variaram de 139 a 144 $Pa.S.m^{-1}$. Os resultados obtidos demonstram que a resposta do biossensor piezoelétrico, após a exposição ao soro de pacientes contaminados com dengue, altera a capacitância da dupla camada, quando comparado à exposição do soro na ausência da infecção, sendo mais expressivo no soro contaminado com DENV-1.

A capacidade de reconhecimento de glicoproteínas pelo sistema sensor em todas as amostras do soro contaminado e a sua baixa expressão diante do soro não contaminado podem ser explicadas pelo fato de que mesmo em estágios iniciais da doença ocorrer o aumento destas glicoproteínas quer seja pela própria constituição das partículas virais, quer seja pela indução de mediadores inflamatórios (DUSSART et al, 2006). A intensidade da resposta imune irá depender de uma variedade de fatores tais como a virulência do sorotipo, o genótipo do vírus e a presença de anticorpos pré-existentes, um fator de risco para as formas mais severas da doença. Apesar de cada sorotipo DENV ser considerado uma entidade filogeneticamente e com características distintas in vivo (SU, 2003), sabe-se que uma infecção primária dos sorotipos DENV-1 e DENV-3 é em geral mais grave em comparação com outros sorotipos DENV-2 e DENV-4 (FERREIRA et al., 2010). Os resultados obtidos com o biossensor piezoelétrico reforçam a potencial aplicabilidade de um método diagnóstico qualitativo, simples, de baixo custo e em tempo real da infecção por dengue.

CAPÍTULO 4

Estudo 2

CAPÍTULO 4 -

CAPÍTULO 4. DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA AUTO-ORGANIZADA LIVRE DE MARCADORES CONSTITUÍDA POR NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS COM ÁCIDO MERCAPTOBENZÓICO E ANTICORPO PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS DA DENGUE (DENV-1, DENV-2, DENV-3 E DENV-4)

4.1. Introdução

Neste capítulo abordaremos o estudo da obtenção de um imunossensor eletroquímico específico para cada sorotipo do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Para este fim, monocamadas auto-organizadas de cisteína e nanopartículas de ouro modificadas com ácido mercaptobenzóico foram utilizadas na imobilização de cada anticorpo sorotipo específico. A sensibilidade foi avaliada por diferentes diluições do vírus da dengue (1:10; 1:25; 1:50; 1:75 e 1:100) e a especificidade do imunossensor foi investigada através da exposição ao vírus da febre amarela (VFA) como controle negativo, uma vez que é um vírus da mesma família do DENV. Análises da morfologia das diferentes etapas do biossensor foram obtidas por microscopia de varredura.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Material

Cisteína (Cis), ferriacianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), 4- ácido mercaptobenzóico (4-MBA), citrato de sódio, ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$), N-hidroxisulfosuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis,

USA) e utilizados como recebidos. O vírus da dengue, os anticorpos específicos para cada sorotipo e o vírus da febre amarela foram obtidos do departamento de virologia e terapia experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fiocruz (Brazil). Tampão fosfato salino (PBS, pH 7.4) foi utilizado para preparar a sonda redox, soluções e diluições. Água ultrapura foi obtida do sistema de purificação (Millipore-Synergy). Todos os solventes e reagentes químicos foram de grau analítico e utilizados sem purificação prévia.

4.2.2. Preparação de nanopartículas de ouro modificadas com 4-ácido mercaptobenzóico (NpAu-AMB)

Nanopartículas de ouro (NpAu) foram sintetizadas de acordo com a metodologia de ZHOU et al. (2011). A metodologia é baseado na diluição de 1mL de ácido cloroáurico (HAuCl_4) em 99 mL de água, seguida pela adição de 4 mL de citrato de sódio 1% e mantida a 60°C por 35 minutos. Posteriormente, as NpAu foram então diluídas em água 1:4 (v/v) e depois 0.2 mL de AMB (10^{-3}M) foi adicionado ao sistema que foi mantido sob agitação magnética por 2h em temperatura ambiente. O tamanho de partículas e o potencial zeta foram avaliados antes e após a modificação química das partículas utilizando um equipamento zetasizer Nano ZS90 (Malvern instruments, England).

4.2.3. Obtenção do imunossensor

Inicialmente, o eletrodo de trabalho de ouro foi limpo por uma sequencia de etapas que incluem: polimento com pasta de alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, 0,05 μm), lavagens com água ultrapura, seguida por ultrasonicação em água deionizada por 5 min. Após esta etapa, 5 μL de uma solução de cisteína (30mM) foi adsorvida na superfície do eletrodo

pelo método *drop coating* por 15 min e então lavado com PBS a fim de remover as moléculas que não adsorveram na superfície. Posteriormente, o grupo funcional amina da cisteína foi ativado utilizando 2 μL de uma mistura de EDC 0.4M e NHS 0.1M (1:1, v/v) em contato com a superfície do eletrodo por 10 min. Em seguida, 5 μL de nanopartículas de ouro funcionalizadas com ácido mercaptobenzóico (NPAu-AMB) e incubadas na superfície do eletrodo por 60 min, novamente ativados com EDC:NHS e adicionados 2 μL de anticorpo (1:50) por 40min. A avaliação da resposta do sistema imunossensor foi realizada por exposição de 2 μL de diferentes diluições (1:10; 1:25; 1:50; 1:75 e 1:100) do vírus DENV-1; DENV-2; DENV-3; DENV-4 em PBS, expostos por 20min. Cada camada do imunossensor foi previamente otimizada em relação ao tempo e concentração e todas as medidas foram realizadas em triplicata a temperatura ambiente. A Fig. 28 representa a ilustração esquemática da plataforma sensora.

A resposta foi obtida utilizando o potenciostato PGSTAT 128N (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands), utilizando um sistema de três eletrodos, ou seja o eletrodo de trabalho de ouro, eletrodo de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de referência de Ag/AgCl. Na voltametria cíclica (VC) foi utilizada uma velocidade de varredura 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e potencial variando de -0.2 a 0.7 V. As medidas de impedância foram realizadas na faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz e a uma amplitude de onda senoidal de 10 mV. A sonda redox utilizada foi $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1) em 10 mM em PBS. Todas as medições foram realizadas em triplicata, a temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday.

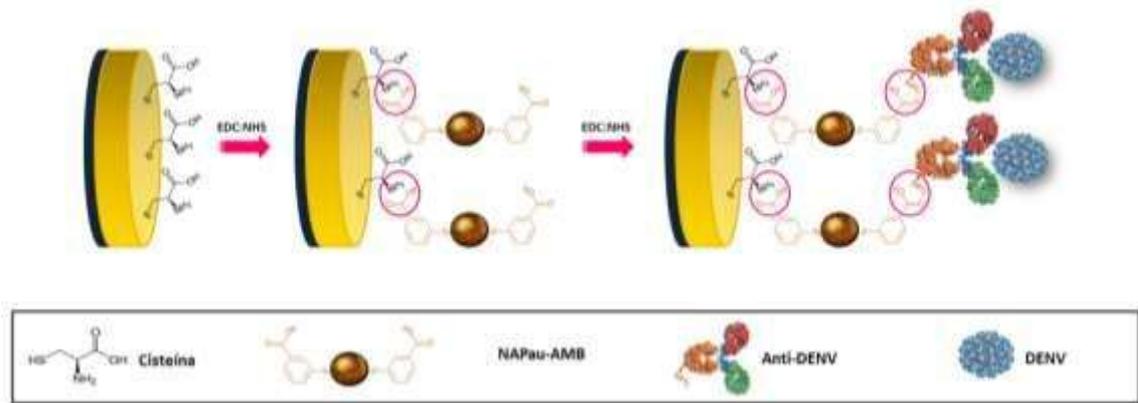


Figura 28. Representação esquemática da construção do imunossensor eletroquímico (Fonte: do autor, 2015).

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Funcionalização da nanopartícula de ouro

A funcionalização das nanopartículas de ouro com o ácido mercaptobenzóico (NpAu-AMB) foi avaliada por medida de tamanho de partícula e do potencial zeta. Foram investigados tanto antes quanto após a modificação das NpAu (figura 29a e 29b), onde podemos observar que antes da modificação, as NpAu apresentaram um tamanho médio de $9,36 \text{ nm} \pm 12,35$ e que após a modificação das partículas com AMB o tamanho médio aumentou para $16,83 \text{ nm} \pm 0,49$. Além disso, de acordo com a Fig. 30a e 30b, podemos observar que as NpAu apresentaram um potencial zeta (ζ) de $(-25,5 \pm 17,7) \text{ mV}$ e após a modificação com AMB o potencial zeta continuou negativo, porém com menor intensidade com aproximadamente $(-12,6 \pm 9,44) \text{ mV}$. O AMB se liga na superfície da NpAu via grupamento $-\text{SH}$ deixando livre o grupo funcional $-\text{COOH}$ (ZHOU et al., 2008).

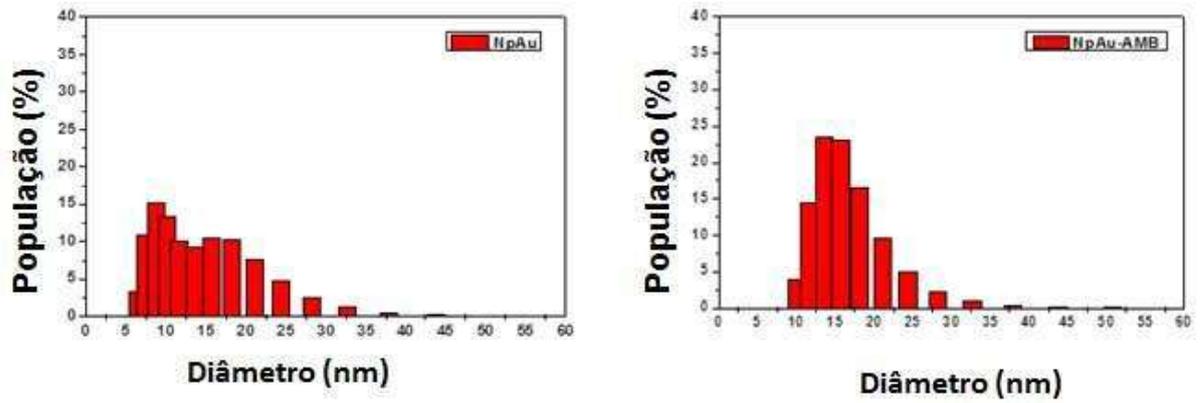


Figura 29. Distribuição do tamanho de partícula das NpAu (a) e das NpAu-AMB (b).

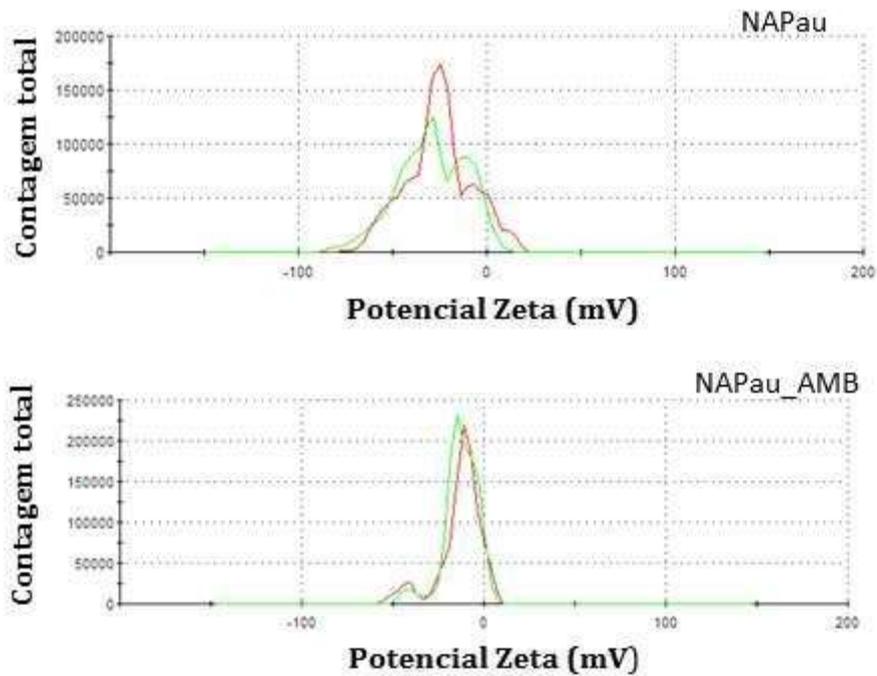


Figura 30. Potencial zeta das NpAu (a) e das NpAu-AMB (b).

4.3.2. Caracterização eletroquímica das etapas de obtenção do imunossensor

Apesar das vantagens atribuídas aos sensores eletroquímicos, o seu desempenho pode ser potencializado por modificação da sua superfície, o que promove redução da passivação de sua superfície que se dá principalmente por produtos e subprodutos da reação de oxirredução. Na obtenção do imunossensor, o aminoácido L-cisteína ($\text{SHCH}_2\text{CH}(\text{NH}^+_3)\text{CO}^-_2$), o qual apresenta ponto isoelétrico 5,0, foi utilizado na modificação da superfície do eletrodo de ouro. Camadas automontadas de cisteína tem sido extensivamente relatadas na literatura na obtenção de biossensores (YANG et al., 2001; HERNÁNDEZ et al., 2003; PAULO et al., 2011) principalmente porque apresentam grupamentos funcionais –sulfidrílico, amino e carboxílico. Além disso, estudos apontam que a cisteína adsorve rigidamente na superfície de ouro e o processo é considerado relativamente rápido (SANTOS et al., 2012; HERNANDES, VICENTE, HERNANDES, 2003). Ao grupamento funcional amino da cisteína foi ligado o grupamento carboxílico presente no sistema NpAu-AMB via ativação por EDC:NHS, formando uma ligação amida. A fim de otimizar a concentração e o tempo de exposição da molécula de cisteína na superfície de ouro, foram realizados estudos por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

Na figura 31a observamos o voltamograma cíclico e diagrama de Nyquist para as diferentes concentrações de cisteína (10; 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mM), onde podemos observar que o aumento da concentração de cisteína proporcionou redução pouco expressiva nos picos de oxidação e de redução dos voltamogramas, para a concentração 10 mM (34,4 e -28 μA respectivamente) e para a concentração 70 mM (29 e -30 μA respectivamente). Pode-se destacar que mesmo em altas concentrações da cisteína esta

camada e os íons provenientes da sonda redox apresentam a característica de processo reversível limitado por difusão.

No espectro da impedância versus a concentração de Cisteína (figura 31b), por sua vez, após a adição da molécula de cisteína, observamos um aumento gradual tanto da componente resistiva do sistema quanto da componente capacitiva e conseqüentemente da impedância total. O componente resistivo (Z') variou de 3563 Ω (concentração 10mM) a 4200 Ω (concentração 30mM), mas a partir desta concentração o aumento mostrou-se pouco expressivo. Além disso, em altas concentrações observamos a diminuição do processo difusional nas regiões de baixa frequência. Estes resultados demonstram efetividade na imobilização da cisteína no eletrodo de ouro e para fins de obtenção do imunossensor utilizamos a concentração de 30mM.

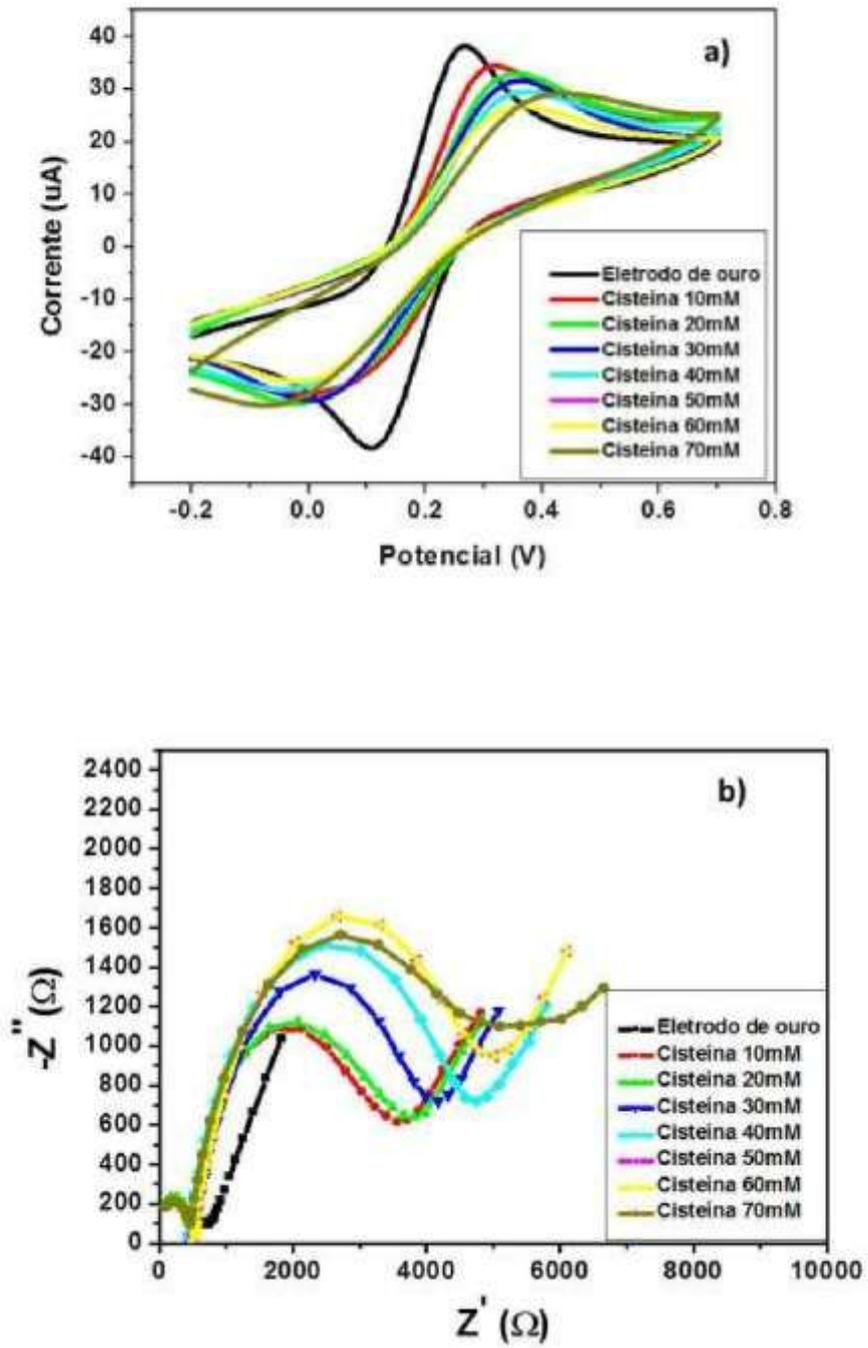


Figura 31- Voltamograma cíclico (a) e Diagrama de Nyquist (b) da etapa de otimização da concentração de Cisteína no imunossensor.

Após esta etapa, avaliamos a resposta eletroquímica da concentração 30mM em diferentes tempos de incubação (5, 10, 15, 20 e 25 min) como demonstrado pelas análises de VC e EIE (Figs. 32a e 32b, respectivamente).

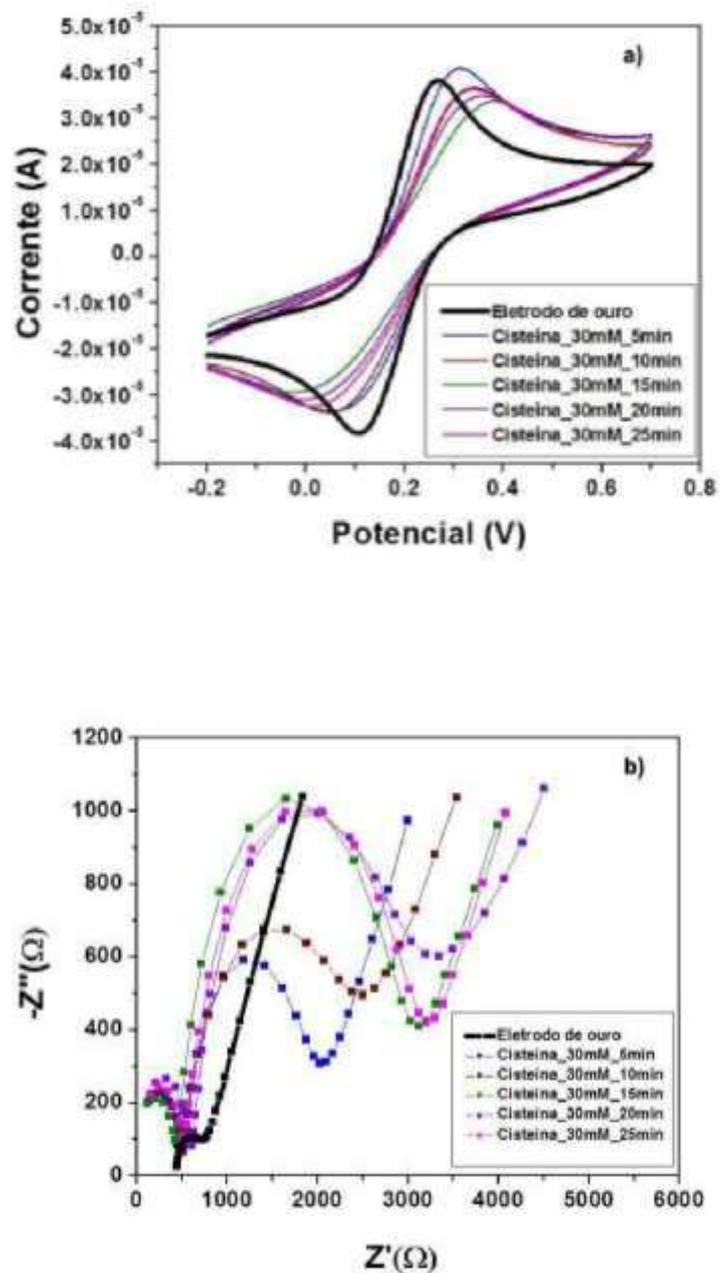


Figura 32. Voltametria cíclica (a) e Diagrama de Nyquist (b) do tempo de incubação da cisteína com concentração fixa de 30mM.

De acordo com os dados de VC observamos o que o aumento do tempo de imobilização da cisteína no eletrodo de ouro diminuiu a passagem de corrente tanto nas áreas anódicas quanto catódicas até o tempo de 15 min ($3,36 \times 10^{-5}$ a $-2,95 \times 10^{-5}$ μA) onde a partir deste tempo, as moléculas de cisteína imobilizadas na superfície do eletrodo tendem a estar menos estáveis quando em contato com a sonda redox o que favorece o processo de desorção e conseqüentemente facilita a passagem da corrente. Os espectros EIE (Fig. 36b) demonstram aumento da R_{CT} com o aumento do tempo de incubação da cisteína de 2092 Ω (10 min) para 3115 Ω (15 min), porém, após o tempo de 15 min esta variação se tornou menos expressiva, sendo então utilizada na obtenção do imunossensor.

Após a formação de camada auto-organizada de Cisteína, grupamentos aminos terminais ($-\text{NH}_2$) da Cisteína foram ligados covalentemente ao grupamento carboxílico do AMB presente na NpAu via ativação com EDC:NHS. A otimização do tempo de contato das NpAu-AMB com a superfície modificada com Cisteína foi avaliado por (VC e EIE), os tempos analisados foram 10, 20, 30, 40, 50, 60 min (Fig. 33a e 33b). Após a ativação com EDC:NHS, observa-se acúmulo de espécies eletroativas na superfície e conseqüentemente facilidade à passagem da corrente não-faradaica. A imobilização da NpAu-AMB proporciona uma discreta diminuição das correntes de pico e está relacionada à presença do anel aromático no MBA o qual facilita o acoplamento de fluxo de elétrons na interface eletrodo-solução (COSTA et al, 2014; WANG et al, 2011). Com o aumento do tempo de imobilização das NpAu-AMB para 60min, observamos uma expressiva diminuição das correntes de picos anódica e catódica. Para o tempo de 60min a corrente de pico de oxidação foi reduzida de 45 μA (10min) para 24 μA , já a corrente de pico de redução apresentou valores de -43 μA (10min) e -28 μA (60min) (Fig. 33a).

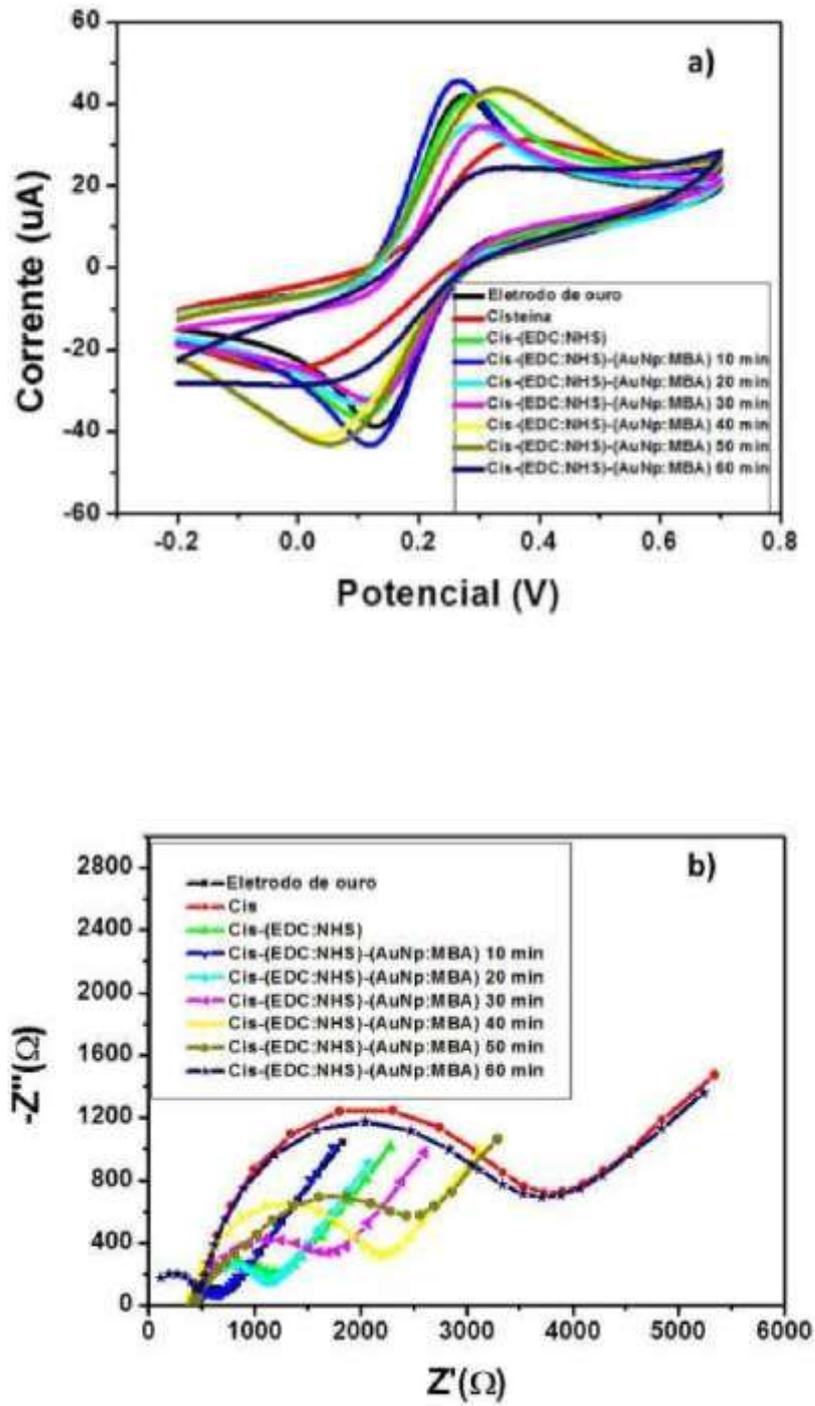


Figura 33. Voltametria cíclica (a) e diagrama de Nyquist (b) do tempo de incubação da NpAu-AMB.

Além disso, de acordo com os resultados obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica (Figura 33 b) houve um aumento expressivo da propriedade de resistência à transferência de carga com o aumento do tempo, onde com 60min o R_{ct} apresentou o valor de 3711 Ω . Desta forma, este tempo foi utilizado na imobilização de NpAu-AMB na plataforma do imunossensor. A utilização de NpAu na plataforma biossensora contribui para a resposta analítica uma vez que por ser partículas nanométricas de metal nobre que apresentam alta relação entre superfície e volume e alta energia de superfície (GUO E WANG, 2007; PINGARRÓN et al., 2008).

4.3.3. Detecção eletroquímica do imunossensor

Na Figura 34 o comportamento eletroquímico dos anticorpos (Anti DENV-1, Anti DENV-2, Anti DENV-3 e Anti DENV-4) e a resposta após a exposição dos diferentes sorotipos da dengue nas diluições (1:10; 1:25; 1:50; 1:75 e 1:100) estão sendo representadas por VC. Podemos observar que para todos os sorotipos analisados a interação do anticorpo com o vírus forma imunocomplexos de natureza não condutiva o que dificulta a passagem da corrente faradáica da solução para o transdutor. A resposta do imunossensor é ainda proporcional à quantidade de vírus em contato com a plataforma sensora. Em relação ao DENV-1, observamos que as correntes de pico anódica e catódica correspondem respectivamente a $1,39 \times 10^{-5} A$ e $-1,13 \times 10^{-5} A$ (diluição 1:100) e com o aumento da concentração estes valores diminuem para $1,04 \times 10^{-5}$ e $-1,03 \times 10^{-5} A$ (1:10). O DENV-2 por sua vez, apresentou valores de $1,17 \times 10^{-5}$ e $-1,04 \times 10^{-5} A$ (diluição 1:100), e diminuição da corrente faradaica para $8,89 \times 10^{-6}$ e $-8,85 \times 10^{-6} A$ (diluição 1:10). O DENV-3 apresentou valores de $1,09 \times 10^{-5}$ e $-1,09 \times 10^{-5} A$ (diluição

1:100), diminuição da corrente faradaica para 9×10^{-6} e $-9,6 \times 10^{-6}$ A (diluição 1:10). Em contrapartida, o DENV-4 valores de $1,25 \times 10^{-5}$ e $-1,13 \times 10^{-5}$ A (diluição 1:100), diminuição da corrente faradaica para $9,80 \times 10^{-6}$ e $-9,24 \times 10^{-6}$ A (diluição 1:10).

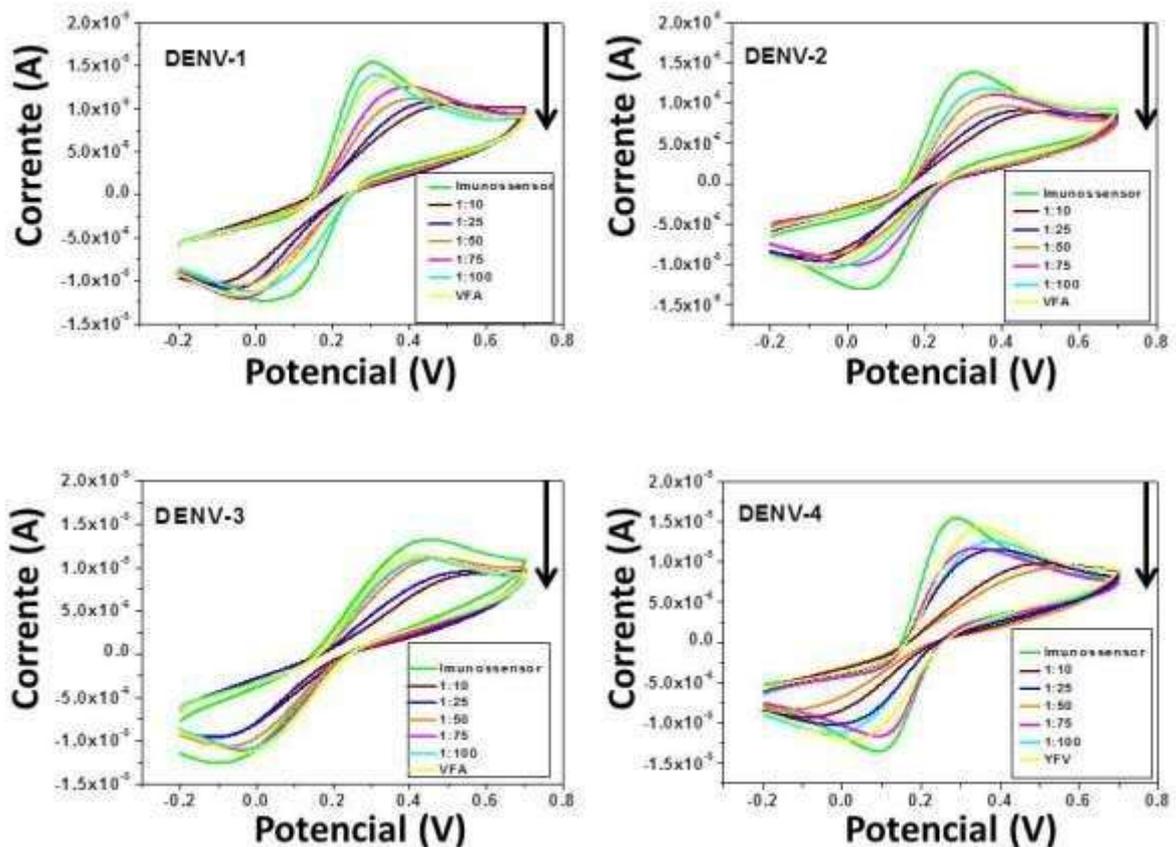


Figura 34. Voltametria cíclica de diferentes diluições do vírus DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

Individualmente cada imunossensor foi exposto a diluição 1:10 do vírus da febre amarela (VFA), um vírus da mesma família do DENV, a fim de avaliar a seletividade e cujos valores de corrente corresponderam a aproximadamente $1,13 \times 10^{-5}$ A, ou seja, inferior à diluição 1:10 dos quatro sorotipos. Avaliando a separação entre os picos de oxidação e redução na diluição 1:10, observamos que nas condições de VC os DENV-4 e

DENV-3, apresentaram respostas mais expressivas quando comparados ao e DENV-1 e DENV-2.

A utilização dos dados de EIE no estudo do comportamento do imunossensor é relevante uma vez que são realizados em condições próximas do equilíbrio quando comparada com a técnica de VC a qual induz uma perturbação no sistema ao se trabalhar com potenciais elevados. A Figura. 35a demonstra o espectro de impedância para cada imunossensor sorotipo específico em diferentes diluições e inclusive com o VFA. Podemos observar um aumento do diâmetro do semicírculo na medida em que se aumenta a concentração do vírus da dengue e que a resposta do controle negativo (vírus da febre amarela) apresentou-se pouco expressiva denotando a seletividade do imunossensor analisado. Além disso, o modelo de circuito elétrico adotado, ajusta-se satisfatoriamente ao sistema sensor e para todos os sorotipos analisados.

O circuito adotado para a análise dos dados experimentais de EIE foi o de Randles (RANDLES, 1947) (Figura 35b). A tabela 2 mostra os elementos do circuito obtido após o fit, onde, R_s representa a resistência ômica da solução, o C_{dl} representa a capacitância da dupla camada elétrica, o R_{ct} representa a resistência à transferência de carga e o W representa a impedância de Warburg que por sua vez está relacionada à difusão de íons da solução para o eletrodo de trabalho.

Os valores da resistência à transferência de carga em relação à diluição 1:10 foram DENV-1 (26,6 Ω), DENV-2 (25,2 Ω), DENV-3 (41,3 Ω) e DENV-4 (44,2 Ω). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos das análises dos voltamogramas cíclico.

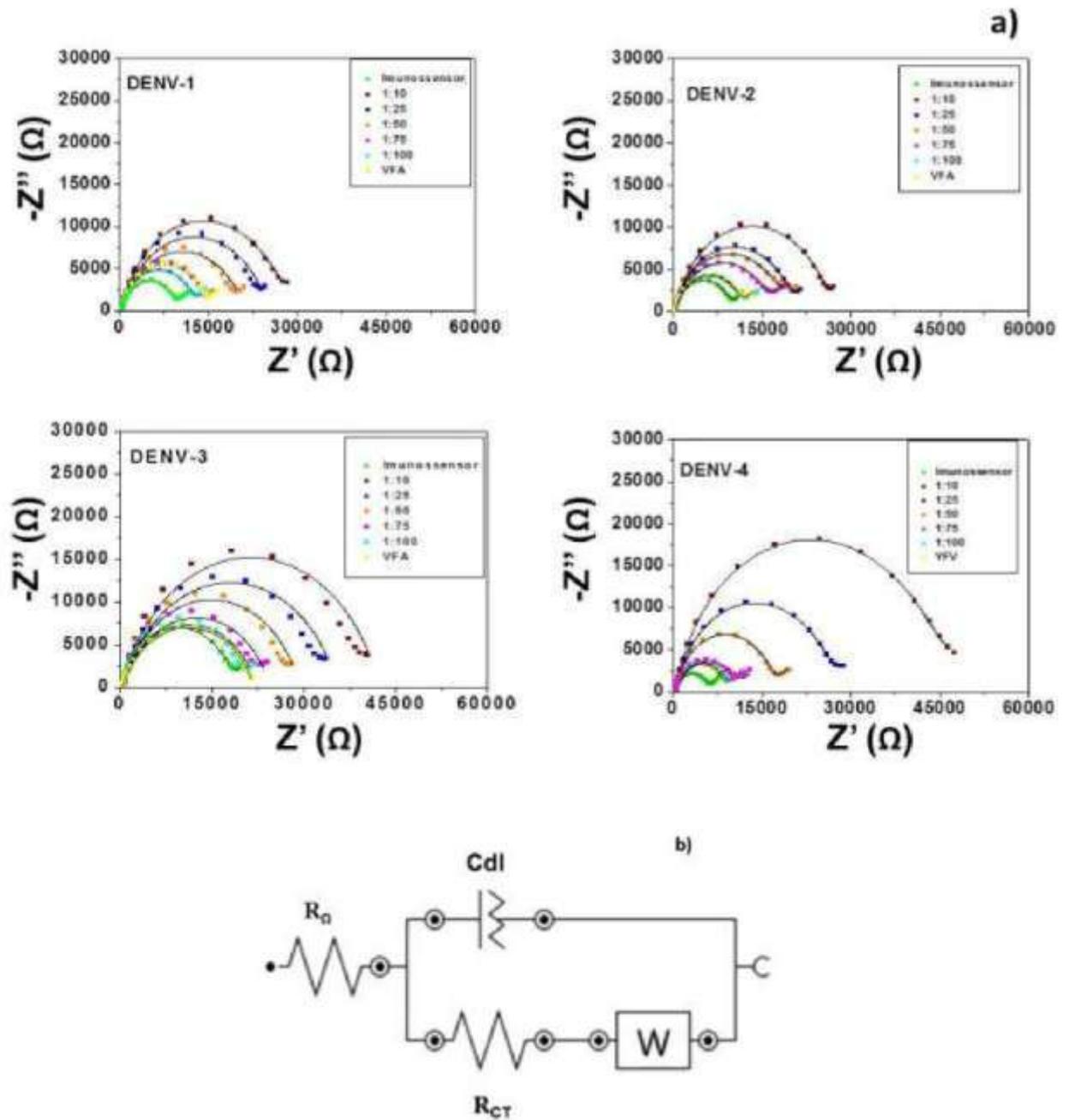


Figura 35. Espectroscopia de impedância eletroquímica de diferentes diluições do vírus DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (a) e modelo do circuito elétrico ajustado ao sistema (b).

Tabela 2. Média dos valores dos elementos do circuito equivalente originado do fit obtido através dos resultados de impedância do imunossensor eletroquímico. Desvio padrão ~ 5% para todas as medidas (N=3).

| Camada | $R\Omega$ (Ω) | Y_0 ($\mu\Omega$) | N | R_{CT} ($K\Omega$) | Y_0 ($\mu\Omega$) |
|---------------------|------------------------|-----------------------|-------|------------------------|-----------------------|
| Eletrodo | 595 | 173,00 | 0,445 | 0,28 | 269 |
| Cisteína | 590 | 4,44 | 0,840 | 2,42 | 460 |
| Cisteína/EDC:NHS | 533 | 6,77 | 0,746 | 0,77 | 458 |
| Cisteína/NAPau | 574 | 8,60 | 0,746 | 1,09 | 464 |
| Anticorpo_DENV-1 | 473 | 2,46 | 0,850 | 8,9 | 427 |
| DENV-1 (1:10) | 538 | 2,77 | 0,865 | 26,6 | 541 |
| DENV-1 (1:25) | 371 | 2,76 | 0,802 | 24,2 | 315 |
| DENV-1 (1:50) | 390 | 2,66 | 0,785 | 20,1 | 953 |
| DENV-1 (1:75) | 497 | 2,13 | 0,860 | 13,9 | 513 |
| DENV-1 (1:100) | 504 | 1,97 | 0,859 | 11,9 | 393 |
| Anticorpo_DENV-2 | 466 | 1,94 | 0,859 | 9,18 | 416 |
| DENV-2 (1:10) | 522 | 1,68 | 0,869 | 25,2 | 479 |
| DENV-2 (1:25) | 543 | 1,77 | 0,863 | 19,1 | 405 |
| DENV-2 (1:50) | 469 | 1,83 | 0,852 | 17,2 | 277 |
| DENV-2 (1:75) | 460 | 1,41 | 0,818 | 15,4 | 277 |
| DENV-2 (1:100) | 532 | 1,79 | 0,845 | 11,1 | 383 |
| Anticorpo_DENV-3 | 577 | 1,82 | 0,868 | 17,4 | 449 |
| DENV-3 (1:10) | 360 | 2,23 | 0,813 | 41,9 | 337 |
| DENV-3 (1:25) | 448 | 2,90 | 0,789 | 35,0 | 420 |
| DENV-3 (1:50) | 353 | 2,45 | 0,795 | 29,0 | 560 |
| DENV-3 (1:75) | 333 | 3,00 | 0,765 | 24,2 | 270 |
| DENV-3 (1:100) | 299 | 2,62 | 0,762 | 22,0 | 961 |
| Anticorpo_DENV-4 | 533 | 1,43 | 0,848 | 5,49 | 361 |
| DENV-4 (1:10) | 598 | 1,62 | 0,877 | 44,2 | 307 |
| DENV-4 (1:25) | 591 | 1,51 | 0,876 | 25,9 | 346 |
| DENV-4 (1:50) | 573 | 0,95 | 0,900 | 16,2 | 322 |
| DENV-4 (1:75) | 345 | 3,45 | 0,728 | 11,0 | 482 |
| DENV-4 (1:100) | 574 | 1,23 | 0,860 | 8,6 | 330 |
| Negativo-VFA (1:10) | 554 | 1,30 | 0,876 | 8,0 | 377 |

Além disso, a resistência à transferência de carga após a exposição ao vírus da febre amarela apresentou valores inferiores, mesmo quando comparado a maiores diluições do vírus da dengue (1:100) e isto para todos os quatro tipos de imunossensor.

O desempenho do biossensor na detecção do vírus da dengue também foi avaliado através da variação relativa do parâmetro ΔR_{CT} . Esta variação pode ser calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(DENV) - R_{CT}(Anticorpo)}{R_{CT}(Anticorpo)} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde, $R_{CT}(Anticorpo)$ é o valor do R_{CT} do imunossensor antes da exposição ao vírus DENV. $R_{CT}(DENV)$ é o valor do R_{CT} imunossensor após a exposição a diferentes diluições do DENV. De acordo com a figura 36 podemos observar que na medida em que a diluição do vírus dengue foi aumentando, o ΔR_{CT} foi diminuindo para cada imunossensor analisado, além disso, houve linearidade ao fazer a regressão da reta com coeficiente de correção para o DENV-1 ($R= 0,99042$), DENV-2 ($R= 0,95423$), DEN-3 ($R= 0,96896$) e DENV-4 ($R= 0,90918$) na faixa das diluições analisadas 1:10 a 1:100. De acordo com os valores de resistência à transferência de carga relativa DENV-1 (33,7 a 199 %), DENV-2 (21 a 174,5 %), DENV-3 (6,4 a 141 %) e DENV-4 (56,5 a 705 %), o DENV-4 apresentou maior interação com a superfície do imunossensor principalmente nas menores diluições analisadas. Além disso a resposta de cada imunossensor na presença do VFA (negativo) foi considerada pouco expressiva principalmente nas menores diluições. Além disso, a diferença entre a resposta do imunossensor na presença do DENV e na presença do VFA foi considerada estatisticamente significativa de acordo com o teste t de Student ($p \leq 0,05$) e nas diluições analisadas.

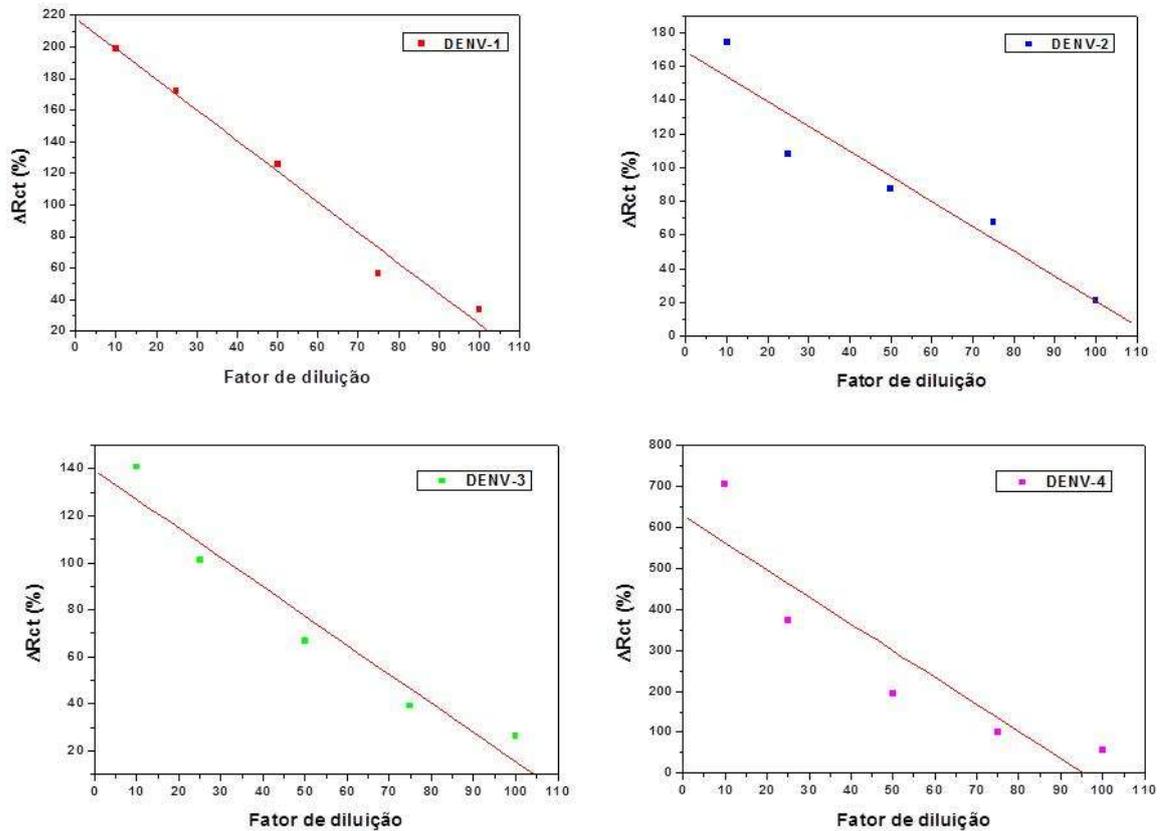


Figura 36. Valores de ΔR_{CT} em relação a diferentes diluições do DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DEN-4.

O grau de recobrimento (θ) do DENV sobre a superfície do imunossensor foi avaliado de acordo com a equação 8, em que, $R_{CT}(\text{Anticorpo})$ corresponde à resistência à transferência de carga da superfície sensora para cada tipo de imunossensor e $R_{CT}(\text{DENV})$, a resistência à transferência de carga após a exposição ao vírus da dengue (SZYMAŃSKA et al., 2007).

$$\theta = 1 - \left(R_{CT(\text{Anticorpo})} / R_{CT(\text{DENV})} \right) \quad \text{Eq.(8)}$$

De acordo com a Fig. 37, observamos que em relação ao grau de recobrimento do DENV sobre a superfície do imunossensor, observamos que o DENV-4 apresenta maior interação com superfície do imunossensor 0,36 a 0,87, quando comparado ao DENV-1 (0,25 a 0,66), DENV-2 (0,17 a 0,63) e DENV-3 (0,20 a 0,58) e que para todos os imunossensores este aumento foi gradual com o aumento da concentração e sem tendência à saturação nas diluições analisadas.

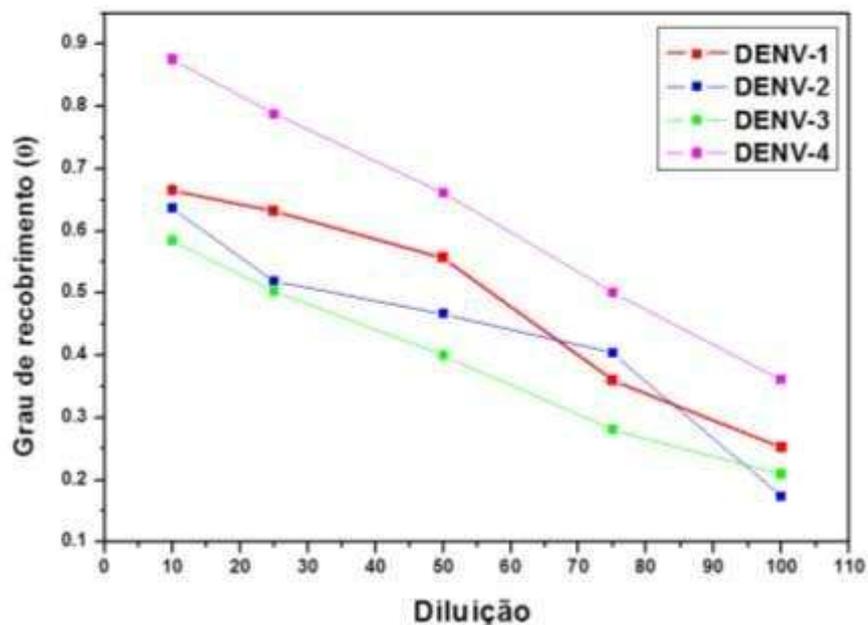


Figura 37. Grau de recobrimento de diferentes diluições do DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DEN-4.

4.3.4. Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura

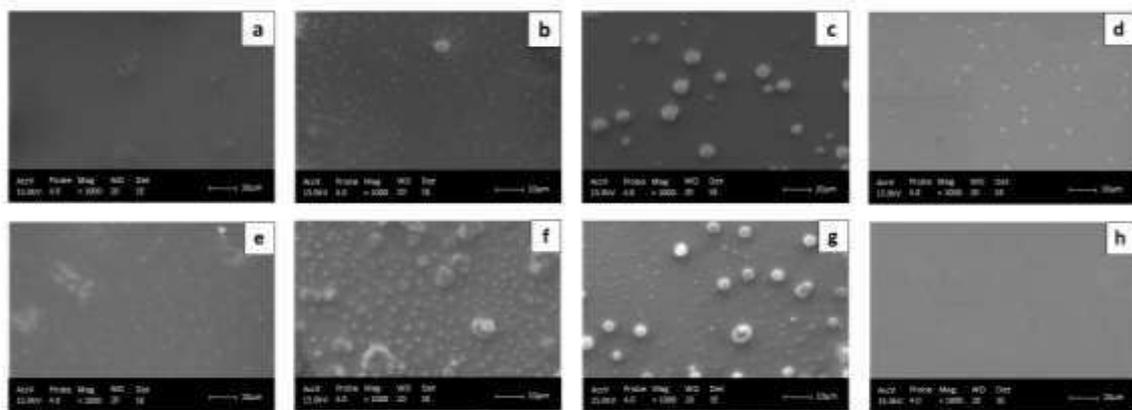


Figura 38. Imagem por microscopia eletrônica de varredura das etapas de obtenção do imunossensor, cisteína (a), cisteína/NpAu (b), cys/NpAu/Anticorpo e após exposição ao DENV-1 (d), DENV-2 (e), DENV-3 (f), DENV-4 (g) e VFA (h).

As imagens por MEV da superfície do imunossensor após cada etapa de obtenção e após a interação com os diferentes sorotipos do DENV estão apresentadas na Fig. 38. É possível observar que a imobilização da cisteína apresenta-se com uma distribuição homogênea na camada (Fig. 38b) e que após a interação com as NpAu (Fig. 38c) ocorre o aparecimento de agregados circulares. A caracterização da superfície do imunossensor após exposição aos diferentes sorotipos do DENV (Fig.38 d a Fig.38 g) indica uma continuidade na formação de agregados com diferentes ordens de magnitude, neste caso, devido à interação antígeno- anticorpo, sendo mais expressivo em DENV-4 (Fig. 38 g) o que não pode ser visualizado na presença do VFA (Fig. 38 h). Estes resultados estão diretamente correlacionados com os achados eletroquímicos.

CAPÍTULO 5

Conclusões

Capítulo 5. Conclusões

Nesta tese biossensores eletroquímicos e biossensores piezoelétrico, constituídos por *Concanavalina A* em membrana lipídica foram obtidos e caracterizados a fim de identificar a presença da infecção pelo vírus da dengue (DENV-1, DENV-2 e DENV3) em meio complexo do soro de pacientes infectados. As respostas de ambos os biossensores foram significativamente diferentes das obtidas após exposição ao soro de pacientes na ausência da infecção. Além disso, os biossensores apresentaram linearidade de resposta com o aumento da concentração.

O biossensor piezoelétrico identificou de forma qualitativa a presença de infecção pelo DENV, por outro lado, o biossensor eletroquímico, evidenciou diferentes padrões de resposta entre os sorotipos analisados, sendo mais expressiva para o DENV-3. A infecção decorrente do DENV-3 apresenta um aumento de glicoproteínas ricas em α -D-manose e α -D-glicose no soro do paciente infectado de forma distinta àquela expressado em infecções decorrentes pelo DENV-1 e DENV-2. Estes achados podem contribuir na investigação das características peculiares da infecção oriunda deste sorotipo, em meio complexo (soro), utilizando um método simples, de baixo custo e em tempo real.

A fim de obter biossensores mais específicos na identificação da infecção por DENV, quatro imunossensores constituídos por Anti-DENV-1, Anti-DENV-2, Anti-DENV-3 e Anti-DENV-4, foram desenvolvidos por imobilização dos anticorpos em camadas altamente organizadas de nanopartícula de ouro e exposto aos diferentes sorotipos do DENV. O padrão de resposta foi analisado por técnicas eletroquímicas e a superfície em cada etapa de construção foi caracterizada por MEV. Os resultados demonstraram que para todos os imunossensores analisados houve reconhecimento da presença do vírus,

linearidade de resposta nas diluições analisadas e seletividade quando exposto ao vírus da febre amarela (controle).

CAPÍTULO 6

Referências

Capítulo 6. Referências

AMSELEN S., GABIZOND A., BARENHOLZ Y. Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. **J. Pharm. Sci.** vol., 79, p., 1045–1052, 1990.

AN J., ZHOU D.S., ZHANG J.L., MORIDA H., WANG J.L., YASUI K. Dengue-specific CD8⁺ T cells have both protective and pathogenic roles in dengue virus infection. **Immunol Lett**, vol, 95, p. 167-74, 2004.

BARD, A.J., FAULKNER, L.R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, 2nd ed. Wiley, New York, 2002.

BASER K.H.C., BUCHBAUER G. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications**. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 2010.

BATISTA C. M., CARVALHO, C.M.B. DE; MAGALHAES N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, vol. 43, n.2, 2007.

BERNARDES FILHO R., MATTOSO L. H. C. Estudo de Polímeros por Microscopia de Força Atômica. **Comunicado técnico**, 53, 4p, 2003.

BHARDWAJ S., HOLBROOK M., SHOPE R.E., BARRETT A.D.T., WATOWICH S.J. Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein. **J. Virol.**, vol, 75, p. 4002–4007, 2001.

BINNING G., QUATE, C. F. Atomic force microscope. **Phys. Rev. Lett.**, vol 56, n 9.

BOUCKAERT, J., POORTMANS, F., WYNS, L., LORIS, R., 1996. Sequential structural changes upon zinc and calcium binding to metal-free concanavalin A. **J. Biol. Chem.**, vol., 271, p. 16144–16150, 1996.

BRASIL. Sistema de Notificação de agravos de Notificação- SINAN. 2013. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acessado em: 26/01/2015.

BHATT S., GETTING P.W., BRADY O.J. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature** vol., 496 p. 504–07, 2013.

BUTTRY D.A., WARD M.D. Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance. **Chem. Rev.**, vol., 92, p. 1355– 1379, 1999.

CARDOSO S.A., PAIXÃO V.F., OLIVEIRA M.D., HONDA E.R., OLIVEIRA L.L., DA SILVA C.C., DE PAULA S.O. Dengue-1 envelope protein domain III produced in *Pichia pastoris*: potential use for serological diagnosis. **Protein Expr Purif.**, vol. 92, p. 9-13, 2013.

CAYGILL R.L., BLAIR G.E., MILLNER P. A. A review on viral biosensors to detect human pathogens *Analytica Chimica Acta*, vol., 681, p. 8–15, 2010.

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

CLARK JR L.C., LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, vol. 105, p. 29-45, 1962.

COOPER M. A. Review Advances in membrane receptor screening and analysis. **J. Mol. Recognit.** Vol., 17, p. 286–315, 2004.

COOPER M. A., SINGLETON V. T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. **J. Mol. Recognit.**, vol., 20, p. 154–184, 2007.

COSTA M.P., ANDRADE C. A. S., MONTENEGRO R.A., MELO, F.L., OLIVEIRA M.D.L. Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor. **J. Coll. Int. Sc.**, vol. 433, p. 141-148, 2014.

CRILL W. D., CHANG G. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **J. Virol.**, vol., 78, p. 13975–13986, 2004.

CURIE J., CURIE P. Development par pression de l'electricite polarise dans les cristaux hemiedries et fares inclines. **Comp. Rend.**, vol. 91, p. 294–297, 1880.

DEDAVID, B. A., GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras: Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

de PAULA S.O., FONSECA B.A. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Braz J Infect Dis.**, vol., 8, p. 390-8, 2004.

DELL'ATTI D., et al. Development of combined DNA-based piezoelectric biosensors for the simultaneous detection and genotyping of high risk Human Papilloma Virus strains. **Clin. Chim. Acta**, vol. 383, p. 140, 2007.

DENARO A. F. **Fundamentos de eletroquímica.** São Paulo: Editora Bliicher Ltda, 1974.

DING C.F., ZHAO F., ZHANG M.L., ZHANG S.S. Hybridization biosensor using 2, 9-dimethyl-1, 10-phenantroline cobalt as electrochemical indicator for detection of hepatitis B virus DNA. **Bioelectrochem.**, vol., 72, p. 28, 2008.

DUSSART P., LABEAU B., LAGATHU G., LOUIS P., NUNES M.R.T., RODRIGUES S.G., STORCK-HERRMANN C., CESAIRE R., MORVAN J., FLAMAND M., BARIL L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clin. Vacc. Immunol.** Vol.13, p. 1185-1189, 2006.

FERREIRA G.P., FIGUEIREDO, L. B., COELHO, L. F. L., JUNIOR, P.A.S., CECILIO A. B., FERREIRA, P.C.P., BONJARDIM C. A., ARANTES R. M. E., CAMPOS M. A., KROON, E. G. Dengue virus 3 clinical isolates show diferente patterns of virulence in experimental mice infection. **Microbes and Infection**, vol., 12, p. 546-554, 2010.

FREIRE R.S., PESSOA C. A, KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, Vol. 26, p. 381-389, 2003

FREIRE-NORDI C.S., TACIRO C., BERNARDES-filho, R., PARIZOTO, N.A. Obtenção de imagens de algas por microscopia de força atômica. **Comunicado técnico** 63, 2004.

GHAZARIAN H., IDONI B., OPPENHEIMER S.B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem.** Vol. 113, p. 236-247, 2011.

GIOCONDI M.C., SEANTIER B., DOSSET P., MILHIET P.E., LE GRIMELLE C. Characterizing the interactions between GPI-anchored alkaline phosphatases and membrane domains by AFM. **Pflugers Arch.** Vol., 456, p. 179–188, 2008.

GOULD E.A., SOLOMON T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, vol., 371, p. 500–9, 2008.

GUBLER D.J., KUNO G., MARKOFF L. **Flaviviruses, Fields virology**. 5th ed. Knipe D.M., Howley P.M., editors. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, and Wilkins, p. 1153–1252, 2007.

GUBLER D.J., MELTZER M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Adv Virus Res.**, vol., 53, p. 35-70, 1999.

GUO S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, vol. 598, p. 181–192, 2007.

GUZMAN M.G; HARRIS E. Dengue. **The Lancet**, vol 385, p. 453-465, 2015.

GUZMAN M.G., KOURI G. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis**, vol, 2, p. 33–42, 2002.

GUZMÁN M.G., KOURÍ G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **Int J Infect Dis.**, vol 8, p. 69-80, 2004.

HACKER K., WHITE L., DE SILVA A.M. N-linked glycans on dengue viruses grown in mammalian and insect cells. **J. Gen. Virol.** Vol., 90, p. 2097–2106, 2009.

HAHN S., MERGENTHALER S., ZIMMERMANN B., HOLZGREVE W. **Nucleic acid based biosensors: the desires of the user.** *Bioelectrochem.*, vol., 67, p. 151, 2005.

HEINZ F.X., ALLISON S.L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Adv. Virus Res.** Vol., 59, p. 63–97, 2003.

HERNÁNDEZ P., VICENTE J., HERNÁNDEZ L. Self-Assembled Monolayer of L-Cysteine on a Gold Electrode as a Support for Fatty Acid Application to the Electroanalytical Determination of Unsaturated Fatty Acid. **Electroanalysis**, vol. 15, p 1625-1631, 2003.

HERRERO L.J., ZAKHARY A., GAHAN M.E., NELSON M.A., HERRING B.L., HAPPEL A.J., KELLER P.A., OBEYSEKERA M., CHEN, W.Q., SHENG, K.C., TAYLOR, A., WOLF, S.,

BETTADAPURA, J., BROOR, S., DAR, L., MAHALINGAM, S. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. **Pharmacol. Ther.** Vol., 137, p. 266–282, 2013.

HOOK F., KASEMO B., NYLANDER T., FANT C., SOTT K, ELWING H., Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. **Anal. Chem.** vol., 73, p. 5796–5804, 2001.

HOWLAND R., BENATAR, L. **A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy**, Park Scientific Instruments, 1996.

JANSHOFF, A., GALLA, H.-J., STEINEM C. Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors. An alternative to optical biosensors? **Angew. Chemie.**, vol., 39, p. 4004–4032, 2000.

JOHNSON A.J., GUIRAKHOO F., ROEHRIG J.T., The envelope glycoproteins of dengue-1 and dengue-2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. **Virology**, vol., 203, p. 241–249, 1994.

KANAZAWA K. K., GORDON, J. G. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid II. **Anal. Chem.** vol., 57, p. 1770–1771, 1985.

KANNISTO C., MURTO MÄKI L., VIITALA T. An impedance QCM study on the partitioning of bioactive compounds in supported phospholipid bilayers. **Coll. Surf. B: Bioint.**, vol., 86, p. 298–304, 2008.

KERMAN K., SAITO M., YAMAMURA S., TAKAMURA Y., TAMIYA E. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. **Anal Chem**, vol., 27, p. 585–92, 2008.

KLUNGTHONG C., GIBBONS R.V., THAISOMBOONSUK B., NISALAK A., KALAYANAROOJ S., THIRAWUTH V., NUTKUMHANG N., MAMMEN M.P., JARMAN R.G. Dengue Virus Detection Using Whole Blood for Reverse Transcriptase PCR and Virus Isolation. **J. Clin. Microbiol.**, vol. 45, p. 2480–2485, 2007.

LINDENBACH B.D., THIEL H.J., RICE C.M. **Flaviviridae: the viruses and their replication**. Philadelphia, USA: Lippincott William & Wilkins, p. 1101–52, 2007.

LIRA M.C.B. **Complexo de inclusão ácido úsnico : β -ciclodextrina: preparação caracterização e nanoencapsulação em lipossomas.** 2007. 90f. dissertação (mestrado em ciências farmacêutica) universidade federal de Pernambuco, recife, 2007.

LIS H., SHARON N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular recognition. **Chem. Rev.** vol., 98, p., 637, 1998.

LUCKLUM R., HAUPTMANN P., The Δf - ΔR QCM technique: an approach to an advanced sensor signal interpretation. **Electrochim. Acta** **45**, P. 3907–3916, 2000.

MALHOTRA B. D, CHAUBEY, A., SINGH, S. Prospects of conducting polymers in biosensors. **Analytica chimica acta**, p, 16, 2006.

MANTZILA A.G., STRONGYLIS C., TSIKARIS V., PRODRONIDIS M.I. Assessment of the interaction between a synthetic epitope of troponin C and its specific antibody using a label-free faradaic impedimetric immunosensor and alpha-Keggin silico-tungstic heteropolyacid as a redox probe. **Biosens. Bioelectron**, vol., 23, p. 362–369, 2007.

MENGUI, U.A. **Crescimento por BEM e caracterização de filmes SnTe e heteroestruturas de SnTe/Sn_{1-x}Eu_xTe sobre BaF₂.** 117f. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia Espaciais) Instituto nacional de pesquisas espaciais, São José dos campos, 2006.

MEUSE C.W., NIAURA G., LEWIS M.L., PLANT A.L. Assessing the Molecular Structure of Alkanethiol Monolayers in Hybrid Bilayer Membranes with Vibrational Spectroscopies. **Langmuir**, vol. 14, p. 1604-1611, 1998.

MORI T., TOYODA M., OHTSUKA, T., OKAHATA Y. Kinetic analyses for bindings of concanavalin A to dispersed and condensed mannose surfaces on a quartz crystal microbalance. **Anal. Biochem**, vol., 395, p. 211–216, 2009.

NASCIMENTO J. M., FRANCO O.L., OLIVEIRA M. D. L., ANDRADE C. A. S. Evaluation of Magainin I interactions with lipid membranes: An optical and electrochemical study. **Chem. Phys. Lip.**, vol., 165, p. 537– 544, 2012.

NECAS D., Klapetek P., Anderson C., 2008. Disponível em <http://www.gwyddion.net>. Acessado em 10/02/2014.

NEW, R.R.C. **Liposomes: A Practical Approach**. Oxford University Press, New York. 1990.

NOGUEIRA R.M., MIAGOSTOVICH M.P., SCHATZMAYR H.G., SANTOS F.B., ARAUJO E.S.M., FILIPPIS A.M.B., et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986– 1998. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, vol. 94, n. 3, p. 297–304, 1999.

OLIVEIRA M.D.L., CORREIA M.T.S., DINIZ F.B. Concanavalin A and polyvinylbutyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. **Biosens. Bioelectron**, vol., 25, p. 728– 732, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/11/ministerio-da-saude-atualiza-dados-sobre-casos-de-dengue>>. Acessado em: 18/01/2015.

OSANAI, C.H., ROSA A.P., TANG A.T., AMARAL R.S., PASSOS A.D., TAUIL P.L. Surto de dengue em Boa Vista Roraima. **Rev. Inst Med Trop**, vol. 25, p.53–54, 1983.

OSTUNI E., YAN L., WHITESIDES G.M., Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. **Colloid Surf. B Bioin-terfaces**, vol., 15, p. 3–30, 1999.

PAIVA E. C. **Estudo do processo de nucleação de cdte crescido sobre si (111) por epitaxia de paredes quentes (hwe)**. 2003. 58f. Tese (Magister Scientiae em Física Aplicada), UFV, Minas Gerais, 2003.

PAHO-Pan American Health Organization. Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by Country: Figures for 2014. Disponível em: <<http://www.paho.org/hq/index.php>>. Acessado em 18/01/2015.

PAULO T. F., DIOGENES I. C. N., ABRUNA H. D. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Myoglobin Immobilized on L-Cysteine Self-Assembled Gold Electrode. **Langmuir**, vol., 27, p. 2052–2057, 2011.

PEDROSO M. M., ATANABE, A.M., ROQUE-BARREIRA, M. C., BUENO, P. R., FARIA R.C. Quartz Crystal Microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. **Microchem. J.**, vol., 89, p. 153– 158, 2008.

PEI Z., ANDERSON H., AASTRUP A, RAMSTRÖMA O. Study of real-time lectin-carbohydrate interactions on the surface of a quartz crystal microbalance. **Bios. Bioelec.**, vol., 21, p. 60–66, 2001.

PEREIRA A. C., SANTOS, A, KUBOTA L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quím. Nova**, vol, 25, p. 1012-1021, 2005.

PEREIRA E.M.A., SIERAKOWSKI M.R., JO T.A., MOREIRA R.A., MONTEIRO-MOREIRA A.C.O., FRANCA R.F.O., FONSECA B.A.L., PETRI D.F.S. Lectins and/or xyloglucans/alginate layers as supports for immobilization of dengue virus particles. **Coll. Surf. B Bioint.**, vol., 66, p. 45–52, 2008.

PESQUERO N.C., PEDROSO M.M., BUENO P.R., ROQUE-BARREIRA MC., FARIA R.C. Determinação da constante cinética da lectina KM+ pelo ligante peroxidase por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo. 2008. **IN: 6th Ibero-American Congress on Sensors (Ibersensor)**, São Paulo – SP, 24 – 26 de novembro de 2008.

PINGARRÓN, J.M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 5848–5866, 2008.

PIWONSKI I., GROBELNY, J., CICHOMSKI, M., CELICHOWSKI, G., ROGOWSKI, J. Investigation of 3mercaptopropyltrimethoxysilane selfassembled monolayers on Au(1 1 1) surface. **Appl. Surf. Sci**, vol., 242, p. 147–153, 2005.

PLANT, A.L. Self -Assembled Phospholipid/Alkanethiol Biomimetic Bilayers on Gold. **Langmuir**, vol. 9, p. 2764-2767, 1997.

PUY G., GUSTAFSON Y. Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes – factors of importance for kinetics and stability. **Biochem. Bioph. Acta**, vol., 1327, p., 149–161, 1997.

QINGWEN L., HONG G., YIMING W, GUOAN L. JIE M.; Studies on Self-Assembly Monolayers of Cysteine on Gold by XPS, QCM, and Electrochemical Techniques. **Electroanalysis**, vol., 13, p. 1342, 2001.

RANDLES, J.E.B. Kinetics of rapid electrode reactions. **Disc. Faraday Soc.** Vol., 1, p. 11-19, 1947.

REIMER L. **Scanning electron microscopy, physics of image formation and microanalysis**. Springer-Verlag, 1985.

RICCARDI C.S., DA COSTA P.I., YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Quim. Nova**, Vol. 25, p. 316-320, 2002.

SAFINA G. LIER M.V., DANIELSSON B. Flow-injection assay of the pathogenic bacteria using lectin-based quartz crystal microbalance biosensor. **Talanta**, vol., 77, p. 468-472, 2008.

SANTOS A., SILVA J.J., BUENO P.R., WATANABE A.M. Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da adsorção de l-cisteína em ouro por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 7, p. 1365-1368, 2012.

SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, vol., 155, p 206-222, 1959.

SHU P.Y., HUANG J.H. Current advances in dengue diagnosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, vol 11, p. 642-50, 2004.

SIQUEIRA JR J.B., MARTELLI C.M.T., COELHO G.E., SIMPLÍCIO A.C., HATCH D.L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis**, vol. 11, n. 1, p. 48-53, 2005.

SIMMONS, C. P., FARRAR, J. J., NGUYEN V, V., & WILLS, B. Dengue. **N Engl J Med** vol. 366, p. 1423-1432, 2012..

SKLADAL P., RICCARDI C.D., YAMANAKA H., DA COSTA P.I. Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of hepatitis C virus. **J. Virol. Methods**, vol., 117, p. 145, 2004.

SOARES J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da uréase em filmes de polipirrol**. Tese (Doutor em ciência e engenharia os materiais), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

STEINEM C., JANSHOFF A. **Piezoelec. sens.**. Berlin: Springer, p. 111-150, 2007.

STRADIOTTO N.R.; YAMANAKA H., ZAONI M.V.B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 14, n.2, p 159-73, 2003.

SUA C-C, WU T-Z, CHENB L-K, YANG H-H, TAI D-F. Development of immunochips for the detection of dengue viral antigens. **Anal. Chim. Acta**, vol., 479, p. 117–123, 2003.

SZYMAŃSKA I, RADECKA H, RADECKI J, KALISZAN R. Electrochemical impedance spectroscopy for study of amyloid beta-peptide interactions with (-) nicotine ditartrate and (-) cotinine. **Biosens Bioelectron.**Vol.22, p. 1955–1960, 2007.

TAI D.-F., LIN C.-Y., WU T.-Z., HUANG J.-H., SHU P.-Y, Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. **Clin. Chem.**, vol., 5, p. 1486–1491, 2006.

TEIXEIRA M.G.; SIQUEIRA, J.B.; FERREIRA J.L.C; BRICKS, L. JOINT, G.Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **Negl. Trop.Dis.**, Vol.7, -1-13, 2013.

TELES F.R.R., PRAZERES D.M.F., LIMA-FILHO J.L. Trends in dengue diagnosis. **Rev. Med. Virol.** Vol. 15 p. 287–302, 2005.

TELES, F.R.R. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review. **Anal. Chim. Acta**, vol. 687, p. 28–42, 2011.

TEMPORÃO J.G., PENNA G.O., CARMO E.H., COELHO G.E., AZEVEDO R.S.S., NUNES M.R.T., et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerg Infect Dis**, vol., 17, p. 938–4, 2011.

THORNTON P.R. **Scanning Electron Microscopy, Applications to materials and device science.** Chapman and Hall Ltd, 1968.

WANG H., OHNUKI H., ENDO H., IZUMI M. Preparation of Amperometric Glucose Biosensor Based on 4-Mercaptobenzoic Acid. **Physics Procedia**, vol. 14, p. 2-6, 2011.

WARK A.W., LEE J., KIM S., FAISAL S.N., LEE, H J. Bioaffinity detection of pathogens on surfaces. **J. Ind.Engin. Chemi.**, vol. 16, p. 169–177, 2010.

WENG K. C., KANTER J. L., ROBINSON W. H., FRANK C. W. Fluid supported lipid bilayers containing monosialoganglioside GM1: A QCM-D and FRAP study. **Coll. Surf. B: Bioint.** vol. 50, p. 76–84, 2006.

WHITEHORN J, SIMMONS C.P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, 29, p. 7221-8, 2011.

WHO- orld Health Organization. Dengue control. 2014. Acessado em : <http://www.who.int/denguecontrol/en/>. Acessado em 18/10/2014.

XU H., DI B., PAN Y.X., QIU L.W, WANG Y.D., HAO W., HE L.J., YUEN K.Y, CHE X.Y. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **J. Clin. Microbiol.** Vol., 44, p 2872-2878, 2006.

YANG W., GOODING J.J, HIBBERT D.B. Characterisation of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of L-cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper. **J. Electroanal. Chem.**, vol. 516, p. 10, 2001.

YAO C. et al. Hybridization assay of hepatitis B virus by QCM peptide nucleic acid biosensor. **Biosens. Bioelectron**, vol., 23, p. 879, 2008.

YUN, Y.H. et al., Review Tiny Medicine: Nanomaterial-Based Biosensors **Sensors**, vol. 9, p. 9275-9299, 2009.

ZENG X., ANDRADE C.A.S., OLIVEIRA M.D.L., SUN X.-L, Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. **Anal. Bioanal. Chem.** vol., 402, p. 3161-3176, 2012.

ZHANG, Y., et al., **Analytical Chemistry**, Vol. 78, p.2001-2008, 2006.

HANG, Y., ZHANG, W., OGATA, S., CLEMENTS, D., STRAUSS, J.H., BAKER, T.S., KUHN, R.J.,ROSSMANN, M.G. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, vol., 12, p. 1607–1618, 2004.

Y. ZHOU, S.X. WANG, K. ZHANG, X.Y. JIANG, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008)7454–7456.

ZHOU Y. ZHAO H., HEA Y., DINGA N., CAO Q. Physicochem. Colorimetric detection of Cu²⁺ using 4-mercaptobenzoic acid modified silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Eng. Aspects**, vol., 391, p. 179– 183, 2011.

Anexos

ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO



Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue



Débora M.N. Luna^a, Maria D.L. Oliveira^b, Maurício L. Nogueira^c, Cesar A.S. Andrade^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, FAMERP, 15080-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 December 2013

Received in revised form 15 February 2014

Accepted 24 February 2014

Available online 11 March 2014

Keywords:

Dengue

Lectin

Phospholipid

Biosensor

Glycoproteins

ABSTRACT

In this work, we developed a biosystem based on Concanavalin A (ConA) and lipid membranes to recognize glycoproteins from the serum of patients contaminated with dengue serotypes 1, 2 and 3 (DENV1, DENV2 and DENV3). The modified gold electrode was characterized using cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy. Morphological analyses of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), DPPC-ConA, DPPC-ConA-DENV1, DPPC-ConA-DENV2 and DPPC-ConA-DENV3 revealed the existence of a non-uniform covering and large globules. EIS and CV measurements have shown that redox probe reactions on the modified gold electrodes were partially blocked due to the adsorption of lipid-ConA system and reveal the interaction response of the immobilized ConA to the presence of glycoproteins of dengue serum. The biosystem exhibited a wide linear response to different concentrations of sera of dengue serotypes 1, 2 and 3. A higher impedimetric response to glycoproteins present in dengue serotype 3 was observed. Our results demonstrate the applicability of lectin and lipid membranes to the development of biosensors for dengue infections.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dengue virus (DENV) is considered a global public health problem and approximately 40% of the world population is at risk of contracting this infection (Organization, 2009). The four serotypes of the dengue virus (DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4) are transmitted to humans and cause two clinical syndromes: classical dengue fever (DF) and hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) (Gubler, 2002; Guzman and Kouri, 2002). The viral particles consist of the three structural proteins (capsid, premembrane and envelope glycoprotein) and the seven nonstructural ones (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) important for dengue virus replication (Lindenbach and Rice, 2001).

Among the techniques available for the diagnosis of dengue infections, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM antibody capture enzyme immunoassay (MAC-EIA) have been commonly used (Guzman and Kouri, 2004). The RT-PCR

rapidly detects the viral RNA of all serotypes from the patient's serum in the viremia phase while MAC-EIA is suitable for distinguishing between primary and secondary dengue infections based on the IgM/IgG ratio, despite not providing a specific diagnosis for the dengue virus, which can be easily confused with other febrile illnesses. The combination of these two approaches is more appropriate for accurately detecting dengue (Poersch et al., 2005). Despite the individual benefits of each method, both have limitations, such as high technological support demands and possible false negative results (Teles, 2011).

Currently, new methods for dengue diagnosis are required to provide specific and rapid detection in real-time, early states of the disease, allied to lower cost. Such methods would enable an appropriate protective management, surveillance and future immunization strategies to restrain the spread of the disease. In addition, the clinical symptoms are often confused with a variety of viral and bacterial diseases, including other flaviviruses infections such as West Nile virus, Japanese encephalitis virus, yellow fever virus, tick-borne encephalitis virus, Murray Valley encephalitis virus and St. Louis encephalitis virus (Gould and Solomon, 2008; Ross, 2010).

In this context, point-of-care biosensors can provide a good performance in diagnosing for high sensitivity and selectivity, handling

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8460; fax: +55 81 2126 8547.

E-mail addresses: csrandrade@gmail.com, csrandrade@pq.cnpq.br (C.A.S. Andrade).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.02.008>

0009-3084/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

facility and rapid detection (Seah et al., 1995). Electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry are effective techniques to investigate changes in the electrode/electrolyte interface in the development of biosensors for real samples (Mantzila et al., 2007; Prodromidis, 2010). Electrochemical biosensors have also been used in the development of virus biosensors (Gaygil et al., 2010), including the dengue virus (Binh et al., 2012; Cavalcanti et al., 2012; Cheng et al., 2012; Fang et al., 2010).

The use of carbohydrate recognition in the development of biosensors is the key point in the identification of various pathologies (Zeng et al., 2012). It is known that in the early stages of dengue virus infection there is an increased expression of specific glycoproteins in the serum (Xu et al., 2006; Dussart et al., 2006). Recently, lectin-based biosensors obtained by us have shown distinct patterns of response for glycoproteins in the serum of patients infected by DENV1, DENV2 and DENV3 (Andrade et al., 2011). In addition, a biosensor for patients with DF and DHF has also been developed by our group (Oliveira et al., 2009).

Concanavalin A (ConA), extracted from jack bean seeds (*Canavalia ensiformis*), is one of the most widely studied lectins. At pH 7.4 it exists as a tetramer with a higher degree of organization, molecular weight of 110 kDa and an overall size of 6.7 nm × 11.3 nm × 12.2 nm (Ballenstätt et al., 2006; Bouckaert et al., 1996). It is known that under neutral conditions each subunit of ConA contains one binding site for glucose- and mannose-specific carbohydrate structures, one for calcium and manganese cations, which activate the binding site of protein for carbohydrates, and a third one for hydrophobic recognition (Liu et al., 2007). Thus, ConA is extensively used in protein-carbohydrate interaction (Pei et al., 2005; Mori et al., 2009; Pedrosa et al., 2008), including studies for the diagnosis of dengue (Andrade et al., 2011; Pereira et al., 2008).

In addition, the use of lipid molecules with biosensors reduces the interference of electroactive species, contributes to signal amplification and, furthermore, creates a native environment for protein immobilization and protection from denaturation (Sofou and Thomas, 2003; Ramsden, 1998). 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) is one of the phospholipids commonly found as constituents of cells and organelles and is conventionally used in biosensors (Yamamoto et al., 2010; Fuij et al., 2000).

In this study, we developed a novel electrochemical biosensor based on ConA lectin and phospholipid membrane association for the specific identification of glycoproteins present in the serum of infected patients with dengue (DENV1, DENV2 and DENV3). The biosensor was characterized by means of cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy (AFM).

2. Experimental

2.1. Materials

Concanavalin A lectin and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) and used as received. The dengue sera were available in the Laboratory of Virology/FAMERP stocks. In this work we used the sera of patients contaminated with dengue serotypes 1, 2 and 3 (three patients of each serotype) and serum controls (three patients). All sera were previously characterized as patient dengue negative (serum control) and dengue positive (serotypes 1, 2 and 3) using RT-PCR (Mondini et al., 2007). Phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4) containing 0.1 M CaCl₂ and 0.1 M NaCl₂ was used to prepare the ConA solutions. The ultrapure water was prepared with a purification system (Millipore-Synergy). All chemicals and

solvents were of analytical grade and used as received, without further purification.

2.2. Preparation of lipid vesicles

Liposomes were prepared based on a lipid film formed by the evaporation of solvents (Amselen et al., 1990; Andrade et al., 2004). Liposomes were obtained using 1 mM DPPC dissolved in chloroform/methanol solution (3:1, v/v) under magnetic agitation (150 rpm/min, 15 min). Next, the organic solution was submitted to evaporation under reduced pressure (25 min at 40 ± 1 °C) and agitation at 120 rpm to remove solvents. Subsequently, the dried lipid film was hydrated through the addition of 1 mL of 0.2 M PBS (pH 7.4) and kept under magnetic stirring (40 min). Finally, the suspension of liposomes was stored at 4 °C until use.

2.3. Preparation of the biosensor system

The bare gold electrode surface was freshly polished with 0.05 μm α-Al₂O₃ paste, rigorously rinsed with ultrapure water and cleansed ultrasonically in deionized water for 5 min. After this process, the lipid-modified electrode was obtained by dropping liposome solution onto the bare gold electrode surface at 25 °C for 15 min. After the first immobilization, the modified electrode was rinsed with water to remove non-adsorbed lipid, incubated into 1 mL of the ConA (50 μg/mL) in 10 mM PBS (pH 7.4) for 15 min and rinsed with water to remove excess of the ConA. Finally, the lipid-ConA-modified electrode was exposed to negative serum control or serum from patients infected by DENV1, DENV2 and DENV3 diluted in 10 mM PBS solution (pH 7.4) for 20 min at room temperature. The serum dilutions used in this study were 1:10, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:1500 and 1:2000.

2.4. Impedance measurements

Electrochemical measurements were performed using a three-electrode system containing an Ag/AgCl as reference electrode, platinum as a counter electrode and a bare gold electrode as the working electrode (φ = 2 mm). All the experiments were carried out on a PGSTAT 128N potentiostat (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands), interfaced with an analyzer controlled by a computer. The impedance spectra were then recorded in the frequency range of 100 mHz to 100 kHz. The amplitude of the applied sine wave potential (SWP) was 10 mV, while the direct current (dc) potential was limited at the open circuit potential measured just before the application of the SWP. CV measurements were performed with a potential sweeping between -0.2 to 0.7 V at a scan rate of 50 mV s⁻¹. CV and EIS measurements were carried out at different stages of the preparation of the modified electrode and performed in the presence of 10 mM K₃[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ (1:1) solution (used as a redox probe) in PBS (pH 7.4). All electrochemical measurements were performed in triplicate using at least three different sensors at room temperature inside a Faraday cage.

2.5. Atomic force microscopy measurements

Atomic force microscopy (AFM) measurements were performed using a commercial PicoSPM II microscope (Molecular Imaging, USA). Cantilevers with a silicon AFM probe (Multi 75AL, NCHR, resonant frequency = 75 kHz, force constant = 3 N m⁻¹) were used for the noncontact mode AFM in air at room temperature (approximately 25 °C). Lateral resolution was set at 512 × 512 pixels in a scan area of 5 × 5 μm. Images were obtained from at least three macroscopically separated areas to ensure a good distribution and analyzed using AFM Gwyddion software (Necas et al., 2008).

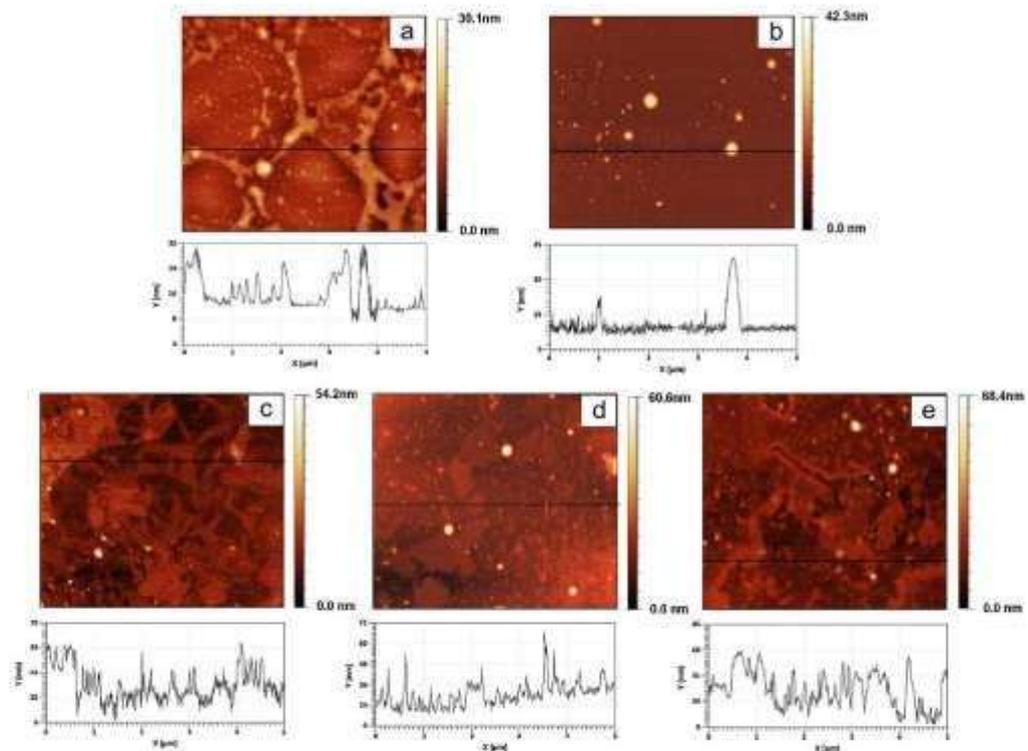


Fig. 1. AFM topographic image obtained for DPPC layer (a), DPPC/ConA (b), DPPC/ConA/DENV1 (c), DPPC/ConA/DENV2 (d) and DPPC/ConA/DENV3 (e) with the corresponding cross section. Scan area of $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$.

3. Results and discussion

3.1. Morphological characterization

The architecture of the lipid films and its association with ConA lectin was studied by the AFM technique. Fig. 1 shows AFM topographic images obtained for DPPC (a), DPPC-ConA (b), DENV1 (c), DENV2 (d) and DENV3 (e) and their corresponding cross-sections. Fig. 1a shows the lipid film demonstrating a non-uniform covering of the electrode surface, with a mean height of 30 ± 4.2 nm (see cross-section graph). The AFM images also show the coexistence of fluid and gel domains in the lipid layer (Giocondi et al., 2008). In addition, we also evaluate the association between DPPC and ConA. The insertion of the proteins was performed after absorption of the lipid layer on the substrate.

In Fig. 1b it is possible to visualize large globules (with a mean height of 42 ± 3.6 nm) distributed between fluid and gel domains of the lipid layer corresponding to ConA lectin. Giocondi et al., 2008 also observed that some proteins insert preferentially at the boundary between fluid and gel domains of the lipid layers (Giocondi et al., 2008). Our results are in accordance with previous studies that determined a height of ~ 12 nm for the ConA tetramer (Bouckaert et al., 1996). Regardless of the serotype, diverse heights were obtained. The fine structured film with thickness on the DPPC-ConA sensor is attributed to adsorbed DENV. In addition, DENV1 showed the weakest interaction with the DPPC-ConA sensor layer (54.2 ± 5.1 nm). The thickest adsorbed layer on the sensor

surface was observed for DENV2 and DENV3 with mean heights of 60.6 ± 4.8 nm and 68.4 ± 3.9 nm, respectively (Fig. 1d–e). The difference in the height data may well be due to the specificity of ConA lectin to the DENV.

It is noteworthy that dengue viruses have conserved two potential N-linked carbohydrate sites at N-67 and N-153, which are glycosylated (Zhang et al., 2004). These carbohydrates are high-mannose glycans with importance for viral attachment and immune response (Hacker et al., 2009). In addition, has been reported to lack glycosylation at N-153 for DENV2 (Johnson et al., 1994). According to Pereira et al., 2008, the attachment of dengue virus particles to ConA lectin is probably driven by recognition of the mannose-binding site. However, the differences in the number and type of carbohydrate moieties on the virion surface proteins in according to the serotype and their role in virus host interactions remain poorly understood (Herrero et al., 2013).

3.2. Electrochemical characterization of the lipid-ConA-Au electrode sensor

The electrochemical method was used in this work owing to its effectiveness for the development of biosensors for real samples (Mantzila et al., 2007). Fig. 2a shows typical cyclic voltammograms of the stepwise process of the biosensor preparation. We used $10 \text{ mM } \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1) as the redox probe during all experiments. The cyclic voltammogram of the bare gold electrode showed a pair of well-defined redox peaks,

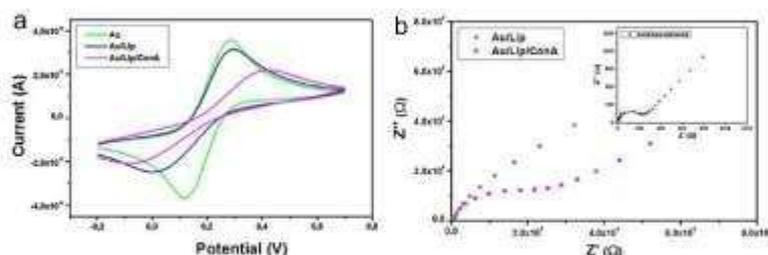


Fig. 2. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist plots (b) of the stepwise assembly of the sensor. The voltammetric and impedance spectra were taken in $10\text{ mM K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in PBS $10\text{ mM pH } 7.4$. Cyclic voltammetry scan was initiated at -0.2 V vs. Ag/AgCl in positive direction at 50 mV s^{-1} . The frequency range for impedance measurements was set on 100 mHz to 100 kHz and the sine wave potential of amplitude equal to 10 mV .

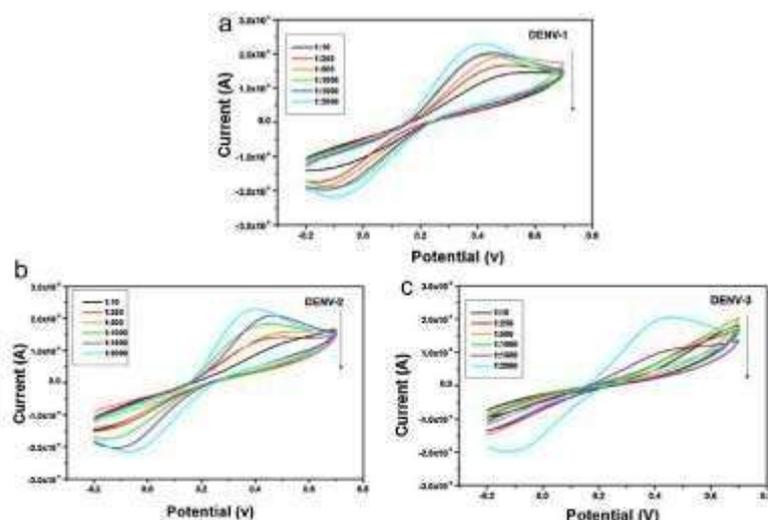


Fig. 3. Cyclic voltammograms of the lipid-ConA system after exposure to different dengue serum: DENV1 (a), DENV2 (b) and DENV3 (c) in dilution folds ranging from 1:10 to 1:2000. Supporting electrolyte: $10\text{ mM K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in PBS $10\text{ mM pH } 7.4$ solution. Cyclic voltammetry scan was initiated at -0.2 V vs. Ag/AgCl in positive direction at 50 mV s^{-1} .

demonstrating the reverse process of the redox probe in the solution phase. After each step of biosensor construction, the current decreases, due to enhanced barriers in the transfer kinetics at the electrode/electrolyte interface (Bard and Faulkner, 2001).

The formation of a lipid layer on the bare gold electrode leads to a decrease in the redox peak currents. Also, after immobilization of the ConA lectin on the lipid layer, the redox peak currents decreased to -8 and 16 mA . In addition, the decrease in the redox peak currents of the sensor layer was attributed to a blocking effect via inhibition of the diffusion of ions such as $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ anions, and indicates successful immobilization at each step.

Fig. 2b shows the Faradaic impedance spectra in the Nyquist plots during the stepwise modification process. The bare gold electrode reveals a very small semicircle domain, indicating a very low electron-transfer resistance (R_{CT}). Successive increases in diameter of the semicircles were observed after electrode modification. This is the result of the increase in charge transfer resistance for ferro/ferricyanide redox probe to access the metal surface, owing to the adsorption of biomolecules, which retards the electron transfer kinetics between the redox probe and the electrode surface (Bard and Faulkner, 2001).

3.3. Electrochemical detection of serum glycoproteins in patients infected with dengue

Fig. 3a–c shows the recognition capability of the lipid-ConA system for six different dilutions of each dengue serotype (1:10, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:1500 and 1:2000). Fig. 3 reveals a gradual decrease in the current with the increase in the dengue serum concentration. A major decrease in the amperometric response for dengue serotypes 2 and 3 was observed. The reduction in the current is related to the amount of the ConA-glycoprotein complex formed on the electrode surface.

Fig. 4a–c shows the real and imaginary parts of the impedance of the lipid-ConA system in the presence of increasing serum concentrations. EIS results are in accordance with CV analysis. EIS experiments showed higher values for the interfacial electron transfer resistance to DENV2 and DENV3 as compared to DENV1.

Fig. 5a and b presents the CV and EIS results for 1:10 dilution of the infected serum and non-contaminated serum for the evaluation of the specific biosensor response. After the lipid-ConA-Au sensor interacted with DENV serum, a remarkable disappearance of the current peaks occurred (Fig. 5a). In particular, after interaction with DENV3, the sensor shows the disappearance of the anodic and

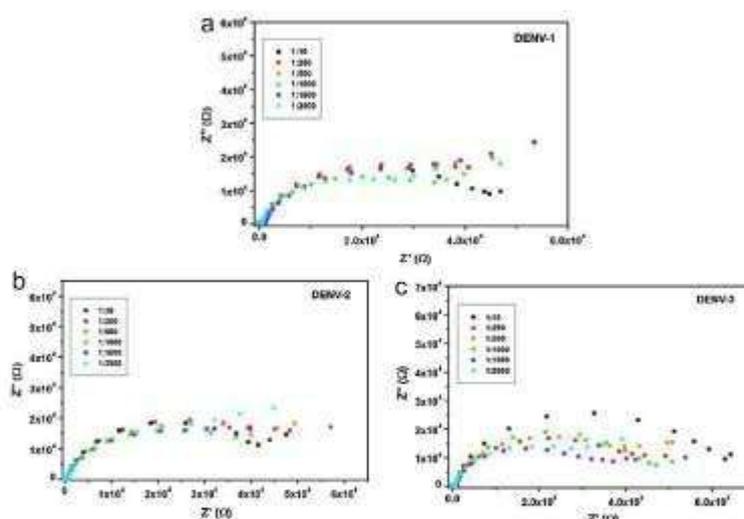


Fig. 4. Nyquist plots of the lipid-ConA system after exposure to different dengue serum: DENV1 (a), DENV2 (b) and DENV3 (c) in dilution folds ranging from 1:10 to 1:2000. Supporting electrolyte: $10\text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in PBS $10\text{ mM pH } 7.4$ solution. The frequency range for impedance measurements was set on 100 mHz to 100 kHz and the sine wave potential of amplitude equal to 10 mV .

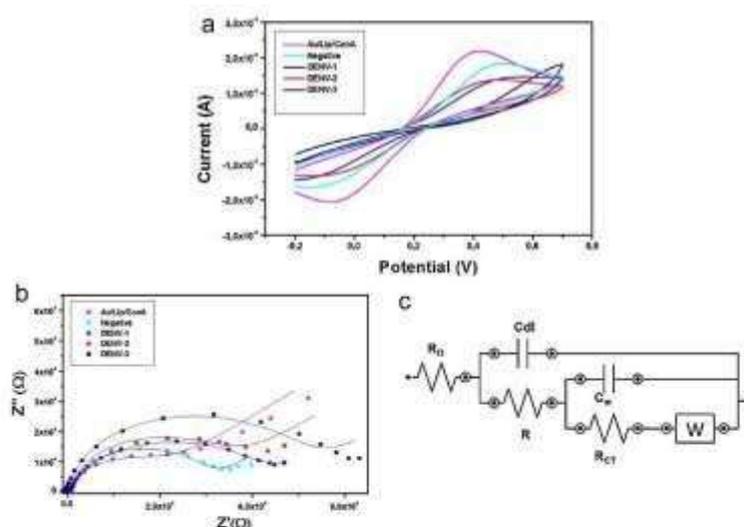


Fig. 5. Cyclic voltammetry (a) and Nyquist plots (b) of interaction lipid-ConA system with different dengue serotypes (DENV1, DENV2 and DENV3) and negative control at a fixed concentration (1:1:10). The spectra were taken in $10\text{ mM K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in PBS $10\text{ mM pH } 7.4$. Cyclic voltammetry scan was initiated at -0.2 V vs. Ag/AgCl in positive direction at 50 mV s^{-1} . The frequency range for impedance measurements was set on 100 mHz to 100 kHz and the sine wave potential of amplitude equal to 10 mV . The solid lines correspond to the fitting using the complex equivalent parameters obtained. (c) Equivalent circuit adapted to fit the impedance data in the presence of a redox pair of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

cathodic peaks, due to the specific interaction between the ConA lectin and glycoproteins present in the tested serum. The reason for peak reduction is that the lectin-glycoprotein complex acts as an inert electron and mass-transfer blocking layer and hinders the diffusion of ferro/ferricyanide toward the electrode surface (Oliveira et al., 2009).

Furthermore, the biosensor demonstrated a weak interaction with glycoproteins present in the DENV1 serotype, revealing a small decrease in the amperometric response of the electrode. The lipid-ConA-Au sensor system was able to recognize the dengue serotype in the following sequence: DENV3 > DENV2 > DENV1.

Table 1
Values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results.

| Modified electrode | Cdl (nF) | R_{CT} (K Ω) | W | R_{Ω} (Ω) | C (nF) | R (Ω) |
|------------------------|--------------|------------------------|-------------|---------------------------|--------------|----------------|
| Bare gold electrode | 290 ± 4.31 | 0.3 ± 0.05 | 5.66 ± 1.34 | 77 ± 3.21 | 11.30 ± 1.32 | 728 ± 3.54 |
| Lipid | 1160 ± 11.45 | 13.0 ± 0.94 | 9.87 ± 1.85 | 124 ± 7.42 | 9.36 ± 1.27 | 740 ± 5.32 |
| Lipid-ConA | 906 ± 13.97 | 17.5 ± 1.17 | 27.2 ± 3.05 | 180 ± 5.93 | 13.81 ± 2.31 | 681 ± 6.72 |
| Lip-ConA-DENV1 | | | | | | |
| Dilution 1:10 | 775 ± 5.29 | 30.5 ± 2.74 | 55.1 ± 4.56 | 150 ± 4.25 | 5.32 ± 1.35 | 782 ± 3.41 |
| Dilution 1:250 | 560 ± 4.75 | 24.4 ± 3.85 | 32.2 ± 4.23 | 208 ± 3.12 | 6.18 ± 1.56 | 712 ± 7.64 |
| Dilution 1:500 | 564 ± 5.21 | 23.3 ± 2.01 | 32.6 ± 2.40 | 217 ± 6.23 | 5.11 ± 1.26 | 733 ± 9.43 |
| Dilution 1:1000 | 874 ± 6.83 | 22.7 ± 2.74 | 35.3 ± 2.57 | 186 ± 4.72 | 4.27 ± 1.24 | 804 ± 5.36 |
| Dilution 1:1500 | 1070 ± 6.35 | 20.9 ± 2.54 | 25.3 ± 2.59 | 188 ± 5.30 | 2.98 ± 0.63 | 687 ± 7.49 |
| Dilution 1:2000 | 1060 ± 8.36 | 19.7 ± 1.39 | 29.0 ± 3.12 | 120 ± 4.16 | 13.7 ± 1.64 | 600 ± 6.28 |
| Lip-ConA-DENV2 | | | | | | |
| Dilution 1:10 | 650 ± 6.75 | 32.3 ± 1.73 | 56.0 ± 3.27 | 151 ± 2.34 | 5.86 ± 0.74 | 802 ± 8.42 |
| Dilution 1:250 | 622 ± 9.04 | 30.8 ± 3.74 | 44.0 ± 4.14 | 235 ± 4.03 | 5.15 ± 1.15 | 601 ± 13.75 |
| Dilution 1:500 | 713 ± 8.12 | 26.3 ± 4.01 | 36.0 ± 2.94 | 336 ± 5.82 | 6.42 ± 1.64 | 863 ± 18.38 |
| Dilution 1:1000 | 738 ± 7.55 | 25.8 ± 3.92 | 46.1 ± 3.91 | 311 ± 6.73 | 9.17 ± 1.73 | 833 ± 20.34 |
| Dilution 1:1500 | 755 ± 7.46 | 21.5 ± 2.70 | 38.2 ± 2.06 | 302 ± 5.12 | 11.2 ± 2.27 | 865 ± 15.57 |
| Dilution 1:2000 | 1340 ± 12.73 | 21.1 ± 4.15 | 22.4 ± 2.78 | 104 ± 4.39 | 9.99 ± 2.03 | 678 ± 5.23 |
| Lip-ConA-DENV3 | | | | | | |
| Dilution 1:10 | 432 ± 8.01 | 48.4 ± 2.68 | 61.4 ± 5.12 | 118 ± 2.63 | 10.13 ± 1.86 | 768 ± 8.43 |
| Dilution 1:250 | 945 ± 9.42 | 38.3 ± 3.08 | 40.5 ± 2.01 | 126 ± 2.74 | 5.49 ± 1.04 | 804 ± 13.79 |
| Dilution 1:500 | 699 ± 10.01 | 27.5 ± 2.36 | 52.4 ± 1.98 | 218 ± 3.65 | 6.14 ± 1.43 | 955 ± 17.32 |
| Dilution 1:1000 | 998 ± 9.32 | 26.1 ± 2.59 | 45.8 ± 4.35 | 240 ± 4.85 | 11.90 ± 2.57 | 984 ± 7.31 |
| Dilution 1:1500 | 1160 ± 13.74 | 25.4 ± 2.77 | 44.0 ± 3.64 | 113 ± 4.54 | 7.41 ± 1.58 | 833 ± 7.80 |
| Dilution 1:2000 | 1080 ± 12.03 | 22.1 ± 3.05 | 33.1 ± 2.31 | 162 ± 4.68 | 15.96 ± 2.41 | 643 ± 9.36 |
| Lip-ConA-DENV negative | | | | | | |
| Dilution 1:10 | 474 ± 5.56 | 24.4 ± 2.63 | 87.7 ± 6.34 | 121 ± 2.54 | 7.15 ± 1.40 | 698 ± 4.53 |
| Dilution 1:250 | 987 ± 7.37 | 24.3 ± 3.04 | 56.2 ± 2.93 | 111 ± 3.71 | 8.95 ± 1.52 | 744 ± 4.28 |
| Dilution 1:500 | 948 ± 8.77 | 23.8 ± 4.26 | 26.1 ± 3.24 | 115 ± 2.63 | 7.53 ± 1.36 | 860 ± 8.54 |
| Dilution 1:1000 | 957 ± 6.93 | 22.2 ± 3.85 | 28.9 ± 2.74 | 117 ± 2.88 | 7.64 ± 0.83 | 801 ± 6.04 |
| Dilution 1:1500 | 1070 ± 9.92 | 20.1 ± 5.92 | 29.5 ± 1.49 | 118 ± 2.57 | 8.50 ± 1.34 | 741 ± 2.51 |
| Dilution 1:2000 | 1130 ± 14.05 | 18.0 ± 7.42 | 30.9 ± 2.59 | 113 ± 2.65 | 8.75 ± 1.62 | 732 ± 5.63 |

Fig. 5b shows the Nyquist plot of the data points measured and the corresponding fitting curves (straight solid lines in Fig. 5). In addition, it is clear that the fitting of the data points is in accordance with the complex equivalent circuit (Fig. 5c). An increase in the R_{CT} values is detected after exposure to DENV1, DENV2 and DENV3. The R_{CT} element of the equivalent circuit can therefore serve as the sensor parameter. The determination of its value allows the detection of the dengue serotypes.

The impedance data was fitted with NOVA 1.8 software using the complex equivalent circuit (Fig. 5c), which includes solution resistance (R_{Ω}), electron transfer resistance (R_{CT}), and the Warburg impedance element (W) as the main elements. Furthermore, double-layer capacitance (Cdl), protein layer resistance (R) and capacitance of the lipid membrane (C_m) were also considered. Weight factors were obtained based on Nyquist graphical

data, hence the frequency range elected for analysis was 100 mHz to 100 kHz, while maintaining the parameters fixed in the fit procedure. The R_{CT} depends on the insulating feature at the electrode/electrolyte interface. W and R_{Ω} represented the bulk properties of the electrolyte solution. R_{CT} controls the electron transfer kinetics of the redox-probe at the electrode surface and it is well known that high R_{CT} values are usually associated with blockage of the electrode surface. In our study, changes in R_{CT} were higher than in the other impedance components.

Table 1 shows the equivalent circuit parameters of the fitting curves for the various steps of the biosensor preparation and its subsequent interaction with serum glycoproteins in infected patients with dengue (serotypes 1, 2 and 3). Our results revealed different responses for each dengue serotype. The highest values of R_{CT} were obtained for DENV3, due to the ConA specificity. The performance of the modified electrode for detection of dengue glycoproteins was evaluated through the relative variation of this parameter (ΔR_{CT}). This variation can be calculated according to the following equation:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \left(\frac{R_{CT}(\text{ConA-DENV}_{\text{serotype}}) - R_{CT}(\text{ConA})}{R_{CT}(\text{ConA})} \right) \times 100$$

where $R_{CT}(\text{ConA})$ is the value of the electron-transfer resistance of the lipid-ConA-Au modified electrode. $R_{CT}(\text{ConA-DENV}_{\text{serotype}})$ is the value of the electron transfer resistance of the lipid-ConA-Au modified electrode after exposure to the patients' sera containing dengue serotypes 1, 2 and 3. The ΔR_{CT} clearly increases with serum concentration, indicating that the interactions between ConA lectin and dengue serum glycoproteins can be sensed by the modified electrode surface (Fig. 6). We observed no significant responses (very low changes in R_{CT}) performing experiments with negative dengue serum obtained from healthy patients. It is worthy of note that the high R_{CT} values are usually associated with blockage of the electrode surface. Thus, we related the different R_{CT} values to the ability of the ConA to recognize glycoproteins in dengue serotypes.

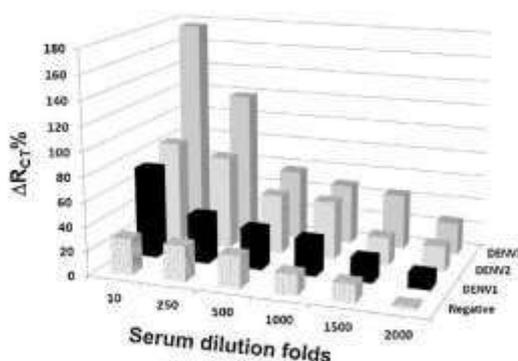


Fig. 6. ΔR_{CT} % for the lipid-ConA system case after exposure of the electrode to different dengue serotypes (DENV1, DENV2 and DENV3) and negative control in dilution folds ranging from 1:10 to 1:2000.

The increase in ΔR_{CT} is different for each serotype studied and the highest response was for DENV3. In addition, the reproducibility of the biosensor system was evaluated from the ΔR_{CT} response of three different patients for each dengue serotype at different biosensors ($n=3$) and an acceptable R.S.D. values of 5.73%, 5.43% and 4.89% for DENV1, DENV2 and DENV3, respectively.

ConA has the ability to attach to dengue particles (DENV2 and DENV3) of domain III in proteins E of the virus containing two glycosylated potential N-linked carbohydrate sites at N-67 and N-153, whereas most other flaviviruses have only a single N-linked glycosylation site at N154 (Chambers et al., 1990; Heinz and Allison, 2003). Mabalirajan et al. (2005) have shown that DENV1 and DENV3 caused hemorrhagic dengue fever in primary infections, while DENV2 and DENV4 were only associated with DHF in secondary infection. In addition, in response to dengue infection, the production of inflammatory mediators is involved in disease progression. An example of this effect is the activation of the complement system (C3 and C5b) involved in the increasing permeability seen in severe dengue. The levels in complement C3 and C5b as well as other plasmatic glycoproteins, are increased in primary events associated with DENV3. Like other glycoproteins present in dengue sera, C3 contains carbohydrates in both subunits with high-mannose type, (Man)₅-9 (GlcNAc)₂, which promotes the ConA specific interaction (Miki et al., 1986).

4. Conclusions

In the present paper, we have introduced a simple approach to the development of a biosystem based on the immobilization of Concanavalin A lectin on a gold electrode modified with a lipid monolayer. Cyclic voltammetry and electrochemical impedance techniques were used to investigate the immobilization of the Concanavalin A lectin on lipid film. Subsequently, using the lipid-ConA system a good sensitivity and reproducibility were obtained, revealing the possibility of detecting abnormal glycoproteins for the diagnosis of dengue. The detection of glycoproteins in the blood serum by ConA occurs by recognition of the mannose-binding site.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Rede ELINOR de Nanobiotecnologia CAPES and MCT/FINEP.

References

Amvren, S., Gabizon, A., Barenholz, Y., 1990. Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. *J. Pharm. Sci.* 79, 1045–1052.

Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Nascimento, S.C., Santos-Magalhaes, N.S., 2004. Antitumor activity of *Crotalaria mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int. J. Pharm.* 278 (2), 435–445.

Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., de Melo, C.P., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Nogueira, M.L., Singh, P.R., Zeng, X., 2011. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic-inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin. *J. Colloid Interface Sci.* 362, 517–523.

Ballerstadt, R., Evans, C., McDonald, R., Gowda, A., 2008. Concanavalin A for in vivo glucose sensing: a toxicity review. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2), 275–284.

Bard, A.J., Faulkner, L.R., 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed. Wiley, New York.

Binh, T.T.N., Peh, A.E.K., Chee, C.Y.L., Fink, K., Chow, V.T.K., Ng, M.M.L., Toh, C.S., 2012. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina dengue virus biosensor. *Bioelectrochemistry* 88, 15–21.

Bouckaert, J., Poortmans, F., Wyns, L., Loris, R., 1988. Sequential structural changes upon zinc and calcium binding to metal-free concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 271 (27), 16144–16150.

Cavalcanti, I.T., Silva, B.V.M., Peres, N.G., Moura, P., Sotomayor, M.D.P.T., Guedes, M.F., Dutra, R.F., 2012. A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. *Talanta* 91, 41–46.

Caygilli, R.L., Blair, G.E., Miller, P.A., 2010. A review on viral biosensors to detect human pathogens. *Anal. Chim. Acta* 681 (1–2), 8–15.

Chambers, T.J., McCourt, D.W., Rice, C.M., 1990. Production of yellow fever virus proteins in infected cells – identification of discrete polypeptide species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology* 177 (1), 158–174.

Cheng, M.S., Ho, J.S., Tan, C.H., Wong, J.P.S., Ng, L.C., Toh, C.S., 2012. Development of an electrochemical membrane-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of dengue virus. *Anal. Chim. Acta* 725, 74–80.

Dussart, P., Labeau, B., Lagathu, G., Louis, P., Nunes, M.R.T., Rodrigues, S.G., Stock-Herrmann, C., Cesaire, R., Morvan, J., Flamand, M., Baril, L., 2006. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 1185–1189.

Fang, X.Q., Tan, O.K., Tse, M.S., Ooi, E.E., 2010. A label-free immunosensor for diagnosis of dengue infection with simple electrical measurements. *Biosens. Bioelectron.* 25 (5), 1137–1142.

Giocondi, M.C., Searrier, B., Dosset, P., Milhiet, P.E., Le Grimelec, C., 2008. Characterizing the interactions between GFP-anchored alkaline phosphatases and membrane domains by AFM. *Biophys. Arch.* 450 (1), 179–188.

Gould, E.A., Solomon, T., 2008. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371 (9611), 500–508.

Gubler, D.J., 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 10 (2), 100–103.

Guzman, M.G., Kouri, G., 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2, 33–42.

Guzman, M.G., Koun, G., 2004. Dengue diagnosis: advances and challenges. *Int. J. Infect. Dis.* 8 (2), 69–80.

Hacker, K., White, L., de Silva, A.M., 2009. N-linked glycans on dengue viruses grown in mammalian and insect cells. *J. Gen. Virol.* 90, 2097–2106.

Heinz, F.X., Allison, S.L., 2003. Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv. Virus Res.* 59, 63–97.

Herrero, L.J., Zakhary, A., Gahan, M.E., Nelson, M.A., Herring, B.L., Papet, A.J., Keller, P.A., Obeyesekere, M., Chen, W.Q., Sheng, K.C., Taylor, A., Wolf, S., Bettadapura, J., Brose, S., Dar, L., Mahalingam, S., 2013. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacol. Ther.* 137 (2), 266–282.

Johnson, A.J., Gairakhov, F., Roehrig, J.T., 1994. The envelope glycoproteins of dengue-1 and dengue-2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. *Virology* 203 (2), 241–249.

Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2001. Flaviviridae: the virus and their replication. In: Fields, B.N. (Ed.), *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp. 931–1042.

Liu, S.Q., Wang, K.W., Du, D., Sen, Y.M., He, L., 2007. Recognition of glycoprotein peroxidase via con A-carrying self-assembly layer on gold. *Biomacromolecules* 8 (7), 2142–2148.

Mabalirajan, U., Kathiravan, T., Sharma, S.K., Banga, A., Ghosh, B., 2005. Short report: T4-H2 immune response in patients with dengue during defervescence: preliminary evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72 (6), 783–785.

Mantilla, A.G., Stronglyis, C., Tsikaris, V., Prodromidis, M.I., 2007. Assessment of the interaction between a synthetic epitope of tropomyosin C and its specific antibody using a label-free faradaic impedimetric immunosensor and alpha-Keggin silicotungstic heteropolyacid as a redox probe. *Biosens. Bioelectron.* 23 (3), 362–369.

Miki, K., Ogata, S., Misumi, Y., Ikehara, Y., 1986. Carbohydrate structures of the third component of rat complement. Presence of both high-mannose and complex type oligosaccharide chains. *Biochem. J.* 240 (3), 691–698.

Mondini, A., Bronzoni, R.V.M., Cardiel, I.L.S., Santos, T.M.J.L., Lázaro, E., Nunes, S.H.P., Silva, G.C.D., Mazini, M.C.F.S., Rahal, P., Figueiredo, L.T., Chiaravalloti Neto, F., Nogueira, M.L., 2007. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J. Clin. Virol.* 40, 84–86.

Mori, T., Toyoda, M., Ohtsuka, T., Okahata, Y., 2009. Kinetic analyses for binding of concanavalin A to dispersed and condensed mannose surfaces on a quartz crystal microbalance. *Anal. Biochem.* 395, 211–216.

Necas, D., Klapetek, P., Anderson, C., <http://www.gwyddion.net>, 2008.

Oliveira, M.D.L., Correia, M.T.S., Diniz, F.B., 2008. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 25 (4), 728–732.

Organization, W.H., <http://www.who.int/topics/dengue/en/>, 2009.

Pedroso, M.M., Atanabe, A.M., Roque-Barreira, M.C., Boeno, P.R., Faria, R.C., 2008. Quartz crystal microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. *Microchem. J.* 89, 153–168.

Pei, Z., Anderson, H., Aastrup, T., Ramstrom, O., 2005. Study of real-time lectin-carbohydrate interactions on the surface of a quartz crystal. *Biosens. Bioelectron.* 21, 60–66.

Pereira, E.M.A., Sierakowski, M.R., Jo, T.A., Moreira, R.A., Monteiro-Moreira, A.C.D., França, R.F.D., Fonseca, B.A.L., Petri, D.F.S., 2008. Lectins and/or xyloglucan/alginate layers as supports for immobilization of dengue virus particles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 66, 45–52.

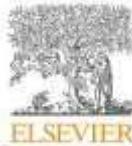
Poersch, C.D., Pavoni, D.P., Queiroz, M.H., de Borja, L., Goldenberg, S., dos Santos, C.N.D., Krieger, M.A., 2005. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J. Clin. Virol.* 32 (4), 272–277.

Prodromidis, M.I., 2010. Impedimetric immunosensors – a review. *Electrochim. Acta* 55 (14), 4227–4233.

Puu, G., Artursson, E., Gustafson, I., Lundström, M., Jass, J., 2000. Distribution and stability of membrane proteins in lipid membranes on solid supports. *Biosens. Bioelectron.* 15 (1–2), 31–41.

- Ramsden, J.J., 1998. Biomimetic protein immobilization using lipid bilayers. *Biosens. Bioelectron.* 13 (6), 593–598.
- Ross, T.M., 2010. Dengue virus. *Clin. Lab. Med.* 30 (1), 149.
- Seah, C.L., Chow, V.T., Tan, H.C., Gan, Y.C., 1995. Rapid, single-step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J. Virol. Methods* 51 (2–3), 193–200.
- Sofou, S., Thomas, J.L., 2003. Stable adhesion of phospholipid vesicles to modified gold surfaces. *Biosens. Bioelectron.* 18 (4), 445–455.
- Teles, F.S.R.R., 2011. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: a review. *Anal. Chim. Acta* 687 (1), 29–42.
- Xu, H., Di, B., Fan, Y.X., Qiu, L.W., Wang, Y.D., Hao, W., He, L.J., Yuan, K.Y., Che, X.Y., 2006. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2872–2878.
- Yamamoto, Y., Shervani, Z., Shimoaki, T., Yokoyama, T., Ando, T., Somekawa, A., Takayama, M., Tamaoki, K., Yoshida, T., Taga, K., Kamaya, H., Ueda, I., 2010. Physisorption behavior of ecdurane on the dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) monolayer using high sensitive quartz crystal oscillator method. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects* 387 (1–3), 47–51.
- Zeng, X., Andrade, C.A.S., Oliveira, M.D.L., Sun, X.-L., 2012. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 3161–3176.
- Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J.H., Baker, T.S., Kohn, R.J., Rossmann, M.G., 2004. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* 12 (9), 1607–1618.

ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO



Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers

Débora M.N. Luna^a, Karen Y.P.S. Avelino^b, Marli T. Cordeiro^c, Cesar A.S. Andrade^{a,b},
 Maria D.L. Oliveira^{b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 February 2015

Received in revised form 1 May 2015

Accepted 21 May 2015

Available online 3 June 2015

Keywords:

Dengue

Immunosensor

Label-free biosensor

Gold nanoparticles

Self-assembled monolayers

ABSTRACT

Currently, Dengue is a worldwide health problem and no effective vaccine or specific medication. Thus, the development of new diagnostic methods has been the focus of efforts to combat the disease. Immunosensor based on gold nanoparticles (AuNPs) and self-assembled monolayers of cysteine was developed for dengue virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) detection. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) were used to monitor the signal response of the each dengue serotype in different dilutions. Scanning electron microscopy was used to characterize the surface of the immunosensor before and after exposure to DENV. In this work, four different immunosensors with specificity for DENV1-4 were obtained. EIS and CV measurements demonstrate the ability of the immunosensor to recognize all four studied DENV serotypes showing sensitivity and selectivity. The real part of the impedance was higher for Cys-MBA-AuNPs-anti-DENV antibody sensor system after interaction to different concentrations of DENV (1-4) compared to the sensor system without immunoreaction on their surface, revealing an increased blockage of the electron transfer. In addition, the surface coverage values indicate a good recognition of DENV by anti-DENV antibody. The new sensor platform consists of a single method, more affordable than conventional immunoassays and creates expectation on future production of new real-time devices for diagnosis of pathologies caused by virus.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dengue virus (DENV) is one of the most serious mosquito-borne flavivirus wherein affects humans [1]. World Health Organization estimates that 50–100 million infections occur yearly and approximately 40% of the population living in tropical and subtropical areas is at risk of contracting DENV [2]. Therefore, dengue is considered a public health problem due to the high rate of morbidity and mortality [3].

The four serotypes of DENV have genetic similarity and 65% of its genome are shared [4]. Although, no new serotype has been reported in the last 50 years. Recently, a new serotype DENV-5 was discovered in October 2013 after a study of the infection contracted by 37-year old farmer in Malaysia in the year 2007 [5].

DENV is a single-stranded RNA virus, classified in antigenically distinct serotypes designated as DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 and DENV-5 [5,6]. DENV1-4 serotypes are present in endemic areas while DENV-5 was recently found in specific regions, as Malaysian and Indonesian jungles, where normally follows the sylvatic cycle and not the human cycle [5,7,8]. However, all serotypes cause serological changes that are responsible for the establishment of dengue [5,9,10].

All serotypes have capacity to cause since classical dengue fever (self-limited febrile disease) until dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (high fever and vascular permeability), resulting in hypovolemia or severe shock [10]. However, risk factors for disease severity depends on the interaction of the viral load, strain virulence and host immune response [11].

Secondary infections are potentially capable to induce the most severe manifestations of the disease, a risk conferred in part by the immune response [12]. Heterologous anti-dengue antibodies from previous infection can develop cross-reactions with DENV

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8450; fax: +55 81 2126 8547.
 E-mail address: m.danielly@yahoo.com.br (M.D.L. Oliveira).

serotypes and facilitate virus entry in myeloid cells [13]. In this process, known as antibody-dependent enhancement, the antibody is not capable of neutralizing the dengue virus and the antibody-virus complex is internalized via receptors called Fcγ (FcγR) on circulating monocytes, resulting in an increase in the overall replication of the virus [10,14,15].

There is no specific treatment for DENV and public health policies are restricted to the vector control and mapping of risk areas. In this context, the development of new diagnostic methods with more effectivity and portability becomes important to control the spread of the disease. Currently, DENV is detected by virus isolation, serological and molecular techniques. Despite individual advantages of each technique, some limitations are known, as time consuming, high cost, etc. In addition, RT-PCR requires high technological support demands, meticulous manipulation of biological specimens, high cost and specialized technicians [17].

Point-of-care biosensor has been widely researched aiming to promote rapid diagnosis with high sensitivity and facility during the manipulation by experts or non-experts [18]. Electrochemical immunosensors exhibit a certain advantage over other types of biosensors since are label free and present high specificity in antigen/antibody interaction with high sensitivity. Thus, electrochemical technique is a powerful candidate for point-of-care diagnostic. Furthermore, signal amplification and sensitivity are improved by the use of nanostructures such as carbon nanotubes, noble metal nanoparticles, polymeric nanoparticles, iron oxide nanoparticles, quantum dots and others [19].

In this work, water-soluble 4-mercaptobenzoic acid (MBA) modified gold nanoparticles (AuNps) were synthesized. Subsequently, MBA-AuNps-DENV antibody was used as a sensing platform for the development of an electrochemical immunosensor to detect different DENV serotypes. Four different immunosensors for DENV-(1-4) were obtained. The immunosensor performance was characterized by using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). Experimental parameters have been optimized to assemble MBA-AuNps on a cysteine monolayer deposited on gold electrode surface through Au-S bond.

2. Experimental

2.1. Materials

Cystein, potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$), potassium ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$), MBA, sodium citrate, chloroauric acid ($HAuCl_4$), N-hydroxysulfosuccinimide (NHS), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) and used as received. The dengue virus, yellow fever virus (YFV) and antibodies were obtained from the Department of Virology and Experimental Therapy/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz (Brazil). YF antigen was obtained by sucrose-acetone method from brains of suckling mice infected with YFV [20]. Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) was used to prepare the redox probe, solutions and dilutions. Ultrapure water was obtained from a purification system (Millipore-Synergy). All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received, without further purification.

2.2. Preparation of 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles

AuNps were synthesized by diluting 1 mL of $HAuCl_4$ in 99 mL H_2O , followed by addition of 4 mL of 1% sodium citrate and magnetic stirring at 60 °C for 35 min. AuNps were then diluted in water 1:4 (v/v) and after 0.2 mL of 10^{-3} M MBA were added and kept under

magnetic stirring for 2 h at room temperature. The particle size and zeta potential were evaluated before and after AuNps modification by using a zetasizer Nano ZS90 (Malvern instruments, England).

2.3. Preparation of the sensor system

Prior to use, the surface of the gold electrode was cleaned by a sequence of steps: polishing with $0.05 \mu m$ $\alpha-Al_2O_3$ paste, repetitive washing with ultrapure water and ultrasonication in deionized water for 5 min. Subsequently, 5 μL of Cys solution (30 mM) was dropped in the electrode surface, waiting for 15 min and then rinsed with PBS to remove non-adsorbed molecules. Then, 2 μL of 0.4 M EDC and 0.1 M NHS (1:1, v/v) were kept in contact with the surface of the Cys-modified electrode for 10 min activating the hydroxyl group. After that, 5 μL of MBA-AuNps solution was maintained in contact for 60 min and subsequently activated again with EDC:NHS in order to receive 2 μL antibody (1:50) incubated for 40 min. The immunoassays were performed by dropping 2 μL DENV solutions (1:10; 1:25; 1:50; 1:75 and 1:100) on the sensing platform for 20 min. All dilutions were performed using PBS (pH 7.4) and subsequently the samples were kept frozen at $-20^\circ C$ until use. Each layer of the biosensor was previously optimized with respect to time, concentration and exposure to DENV. A schematic illustration of the construction of the immunosensor steps is shown in Fig. 1. All measurements were performed in triplicate at room temperature. In addition, the standard deviation is $\sim 5\%$ for all measurements.

2.4. Electrochemical measurements

The electrochemical experiments were performed by using a PGSTAT 128 N potentiostat/galvanostat (Autolab, Eco Chemie, The Netherlands) associated with a cell composed by three electrodes. The gold electrode was used as working electrode. Platinum wire and Ag/AgCl saturated with KCl were used as counter and reference electrodes, respectively. CV measurements were carried out at $50 mVs^{-1}$ scan rate and potential scan range from -0.2 to 0.7 V. Impedance measurements were recorded in the frequency range of 100 MHz–100 kHz. The amplitude of the applied sine wave potential was 10 mV. The electrochemical measurements were carried out at different stages of the preparation of the modified electrode and performed in the presence of 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ (1:1) solution (used as a redox probe) in PBS (pH 7.4). All electrochemical measurements were performed in triplicate at room temperature inside a Faraday cage.

2.5. Scanning electron microscopy measurements

Morphological characterization was performed using a scanning electron microscope Superscan ss-550 (Shimadzu Corporation, Japan) with acceleration voltage 15 kV. The samples were covered with a thin layer of gold using a Quick coater-SC-701 (Sanyo Electronics, Tokyo, Japan) sputtering device.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the immunosensor

Particle size and zeta potential of MBA-modified AuNps were evaluated. Pristine AuNps showed an average size of 9.36 ± 1.23 nm and after chemical modification the average size increased to 16.83 ± 0.49 nm. In addition, the zeta potential (ζ) is varying from $-25.50 mV \pm 1.77 mV$ to $-12.60 mV \pm 0.94 mV$. MBA binds to the surface of AuNps via grouping—SH leaving free the functional group —COOH [21].

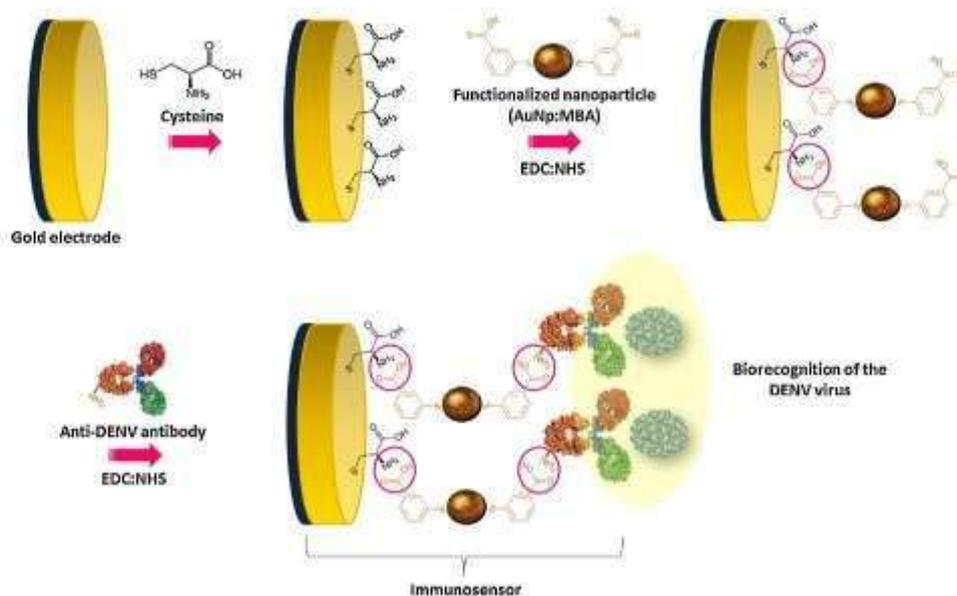


Fig. 1. Schematic representation of immunosensor fabrication.

3.2. Morphological analyses

We used scanning electron microscopy (SEM) technique to confirm the fabrication process of the sensor and its interaction with DENV (Fig. 2). Fig. 2a shows an image of the Cys monolayer, where a homogeneous distribution of the Cys can be seen. Subsequently, an image of Cys-MBA-AuNps was obtained (Fig. 2b) with the presence of a uniform shape distribution. After interaction of the Cys-MBA-AuNps system with DENV antibody some aggregation is visualized (Fig. 2c). A biomolecular interaction based on antibody-antigen binding recognition is observed during sensor analysis (Figs. 2d–g). This interaction is favorable to a preferential formation of clusters, especially for DENV-4 (Fig. 2g). The image of the negative control sample shows a homogeneous distribution on

the electrode surface without the presence of aggregates (Fig. 2h). SEM results were latter confirmed by using CV and EIS techniques.

3.3. Electrochemical detection of DENV

CV is an effective method that enables monitoring of the electrochemical behavior of the electrode after each step of modification. In addition, CV allows the characterization of the interfacial analytical processes through changes in peak currents that are related to electron transfer resistance [22,23]. Fig. 3a shows the cyclic voltammograms obtained from each step of self-assembly of the biosensor. The redox probe used in all experimental analyzes of CV was $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ in PBS (pH 7.4).

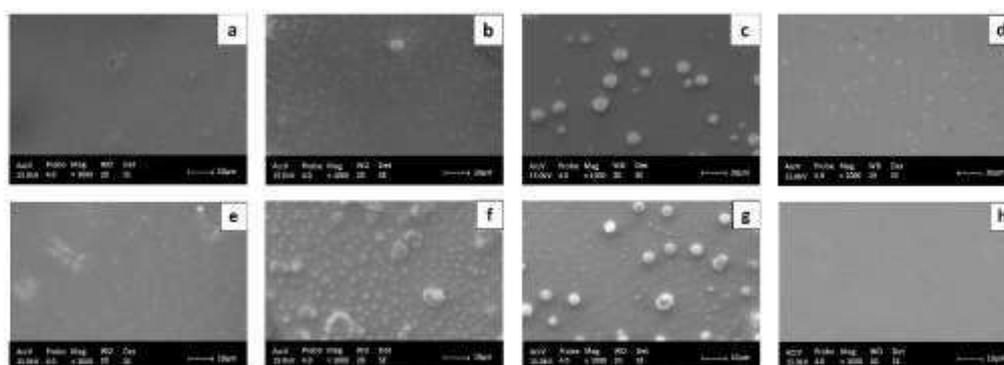


Fig. 2. SEM micrographs of Cys layer (a), Cys-MBA-AuNps (b), Cys-MBA-AuNps-anti-DENV antibody (c) and the sensor system after exposure to DENV-1 (d), DENV-2 (e), DENV-3 (f), DENV-4 (g) and YFV (h).

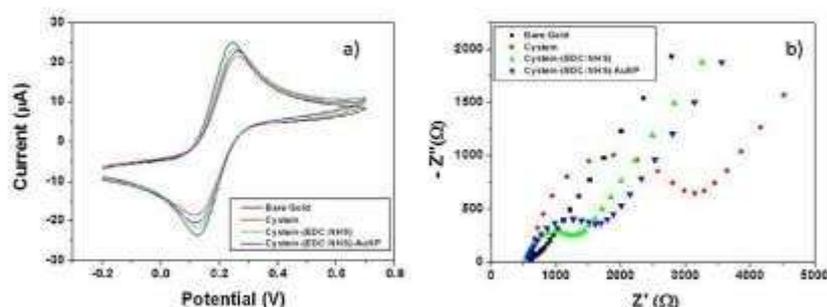


Fig. 3. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist plots (b) after each step of the immunosensor preparation. The impedance spectra were taken in 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ – $K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM PBS (pH 7.4) in the frequency range from 100 mHz to 100 kHz.

The bare gold electrode (BGE) has a reversible cyclic voltammogram with anodic and cathodic peaks well defined in the presence of electrolyte solution. After immobilization of Cys on BGE surface was observed a decrease in the amperometric response, which can be due to the formation of Cys self-assembled monolayer on the gold surface through thiol group (–SH). In addition, the electrostatic repulsion between the carboxylic group (–COOH) of the Cys and the negative charges of the electrolytes $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ contributed to the blockage of the redox process in the electrical double layer.

The amino group (–NH₂) of the Cys molecule enabled the formation of a covalent chemical bond with the carboxylic group of the MBA present in the MBA–AuNPs system. In addition, the covalent bond is obtained by using EDC:NHS coupling method. After adding nanoparticles on the Cys-modified electrode is observed an increase in the current signal. The voltammogram for Cys–MBA–AuNPs demonstrated a quasi-reversible behavior in relation to BGE. The improved charge transfer is due to the presence of an aromatic ring in the MBA molecule, facilitating the flow of electrons at the electrode–solution interface [24,25]. In addition, AuNPs have been extensively used as electron-conducting pathways between active biomolecules and electrode surface [26].

EDC and NHS were used to activate the Cys–MBA–AuNPs modified electrode. Subsequently, anti-DENV antibodies were immobilized by means of covalent binding between the amino group present in the amino acid residue of the biomolecule and the carboxylic group of the MBA. After that, a biosensitive platform is obtained resulting in a considerable decrease of the voltammetric peaks due to a low penetration of the redox couple in the sensor system.

EIS is a technological tool that provides additional information about kinetics of the electron transfer between the redox probe and the electrode surface. EIS technique was used to study the impedance of the system in each stage of the development of the sensor platform [26]. The charge transfer resistance (R_{CT}) corresponds to the semicircle diameter of the Nyquist diagram and is an effective parameter for monitoring the interfacial process [27].

Fig. 3b shows the impedance spectra for assembly steps of the biodevice obtained in a frequency range between 100 mHz and 100 kHz. The electrochemical characterization of the BGE showed a low impedimetric response (R_{CT} = 288 Ω) represented by a Nyquist diagram with small semicircle and a quasi-linear behavior. After adsorption of Cys on the BGE was verified an increase in the resistivity of the system (R_{CT} = 2420 Ω) due to the partial blockage of the charge transfer in the electrical double layer, indicating the adequate formation of the Cys monolayer.

By adding the functionalized gold nanoparticles on the Cys-modified electrode is observed a reduction of the electron transfer

(R_{CT} = 1090 Ω). This result is due to the physicochemical properties of the MBA–AuNPs system that cause an increase in the flow of electrons between the electrode surface and solution. As expected, the immobilization of anti-DENV antibodies on the Cys–MBA–AuNPs modified electrode caused a significant increase in the interfacial resistance. Thus, it is verified that EIS data allows monitoring of the anchorage process of the biomolecules.

After the sensor obtaining, the electrochemical behavior of the immobilized antibodies (Anti DENV-1, Anti DENV-2, Anti DENV-3 and Anti DENV-4) were evaluated. The electrochemical response of the sensor was evaluated after exposition to different DENV dilutions (1:10; 1:25; 1:50; 1:75 and 1:100).

We can observe that after the recognition of contaminated serum by the sensor system occurs an immune complex formation with a non-conductive nature, hindering the passage of the faradaic current to the transducer. The immunosensor response is proportional to the amount of recognized molecules by the sensor platform. CV analysis revealed that the system was capable to detect DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 (Fig. 4). After interaction with different dengue virus, the anodic peak currents decrease to 0.104 mA (DENV-1), 8.89 mA (DENV-2), 9.00 mA (DENV-3) and 9.80 mA (DENV-4) at 1:10 dilution. CV technique demonstrated that DENV-3 and DENV-4 immunosensors showed more significant responses compared to DENV-1 and DENV-2 sensors. Of note, each immunosensor was exposed to a 1:10 dilution of YFV, a virus of the same family of DENV in order to evaluate the selectivity. We observed an insignificant increase in the Cole–Cole semicircle after exposition of the sensor to YFV, demonstrating the specificity of the immunosensor (Fig. 4). Therefore, our results suggest that the developed immunosensors have low potential for cross-reactivity.

In addition, the stepwise assembly and immunoreaction are accompanied by a decrease in the amperometric response of the electrode and an increase in the peak-to-peak separation between cathodic and anodic waves of the redox probe (Fig. 4). The extent of adsorption can be expressed in a relative percent deviation,

$$I(\%) = \frac{|(1/I_b) - (1/I_a)|}{(1/I_b)} \quad (1)$$

where I_b and I_a correspond to the anodic peak current before and after immunoreaction process, respectively. Data were obtained from Cys–MBA–AuNPs–anti-DENV antibody sensor system before and after the immunoreaction at fixed concentration (1:10). Our results for each dengue immunosensor showed differences in $I(\%)$ relative values: DENV-1 (30.98%), DENV-2 (46.25%), DENV-3 (89.00%), and DENV-4 (90.64%).

Fig. 5 shows the impedance spectra of the sensor exposed to each type of dengue serotype at different dilutions and YFV. We can observe that EIS analysis were in according the CV

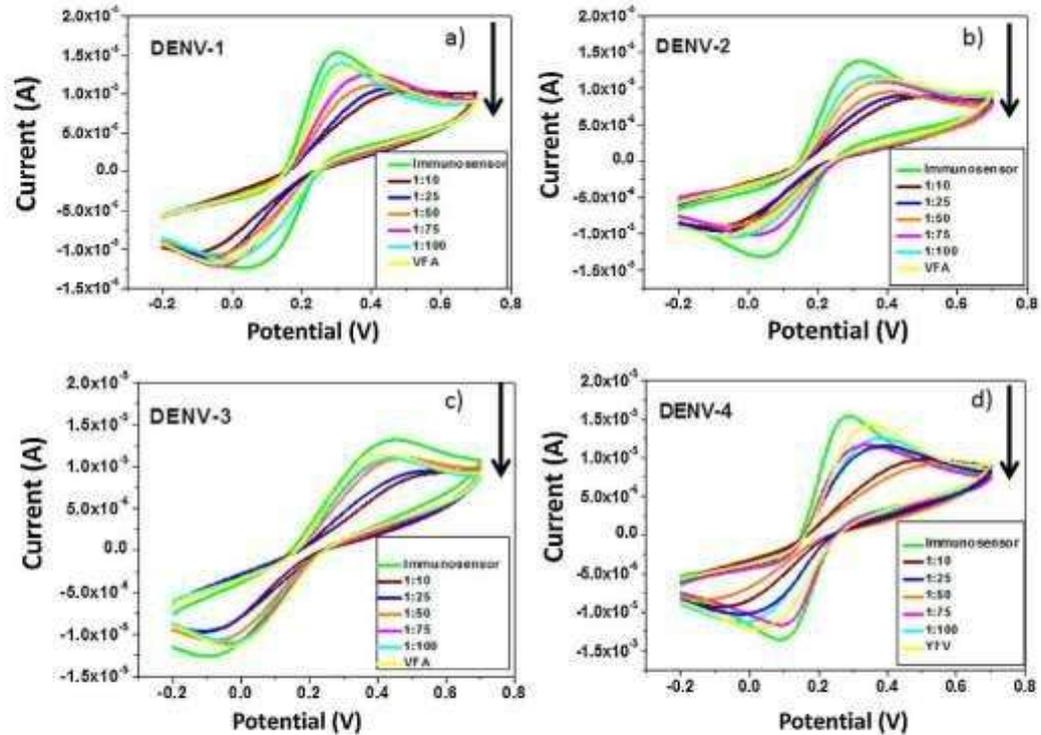


Fig. 4. Cyclic voltammograms after exposition of the sensor to DENV-1 (a), DENV-2 (b), DENV-3 (c) and DENV-4 (d) in dilution folds from 1:10 to 1:100. Supporting electrolyte: 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ in 10 mM PBS solution (pH 7.4); scan rate of 50 mV s⁻¹.

measurements. We have evaluated the immobilization of each anti-dengue antibodies for DENV-(1-4) on Cys-MBA-AuNPs modified electrode (Fig. 5). These immobilizations revealed an increasing in the resistance electron transfer especially to Anti-DENV-2 (9.18 k Ω) and Anti-DENV-3 (17.40 k Ω). The evaluation of the performance was performed and EIS plots confirmed that the biological activity of the antibodies for DENV-(1-4) (Fig. 5a-d) was maintained for recognition to dengue virus at different dilutions. This recognition is based on the antibody-antigen interaction a common phenomenon in biological systems. Of note, to obtain a good complementarity between antigen and antibody, a specific region of antibody (paratope) requires of a compatible region in the antigen (epitope) for the noncovalent interactions resulting in the formation of the antibody-antigen complex. The noncovalent interactions involved in this process are ionic bonds, hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and van der Waals forces [28].

The total impedance was determined by some parameters as electrolyte resistance, R_D ; double layer capacitance, C_{dl} ; charge transfer resistance, R_{CT} and the Warburg element, W . In this work we adopted a modified Randles equivalent circuit (Fig. 6) to fit the measured results and provide more detailed information about the impedance of the modified electrode. R_D and W , represent bulk properties of the electrolyte solution and diffusion of the applied redox probe, respectively but are not affected by chemical transformations occurring at the electrode interface. In addition, C_{dl} and R_{CT} depend on the dielectric and insulating features at the electrode/electrolyte interface.

The elements of the Randles circuit are shown in Table 1. The R_{CT} values were higher for DENV-4 (44.2 Ω) and DENV-3 (41.3 Ω)

at dilution 1:10 as compared to DENV-1 (26.6 Ω) and DENV-2 (25.2 Ω). The performance of the biosensor was measured by changes in the R_{CT} providing quantitative information about the association of DENV and the antibody. $\Delta R_{CT}(\%)$ is calculated as follows:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT}(\text{DENV}) - R_{CT}(\text{Antibody})}{R_{CT}(\text{Antibody})} \quad (2)$$

where $R_{CT}(\text{DENV})$ is the value of the electron-transfer resistance of the sensor system after DENV recognition, and $R_{CT}(\text{Antibody})$ is the value of the electron-transfer resistance of the Cys-MBA-AuNPs-anti-DENV antibody sensor system before exposure to different DENV. Fig. 7a shows the relation between ΔR_{CT} versus DENV dilution folds. We observed a linear behavior for DENV-1, 2 and 3 where at higher concentrations values of ΔR_{CT} were increased. However, a non-linear correlation between ΔR_{CT} and dilution fold is observed for DENV-4 (Fig. 7a). Moreover, analyses of linear regression results showed a correlation coefficient as follow: DENV-1 ($R=0.99042$), DENV-2 ($R=0.95423$), DENV-3 ($R=0.96896$) and DENV-4 ($R=0.90918$) at a range of dilutions of 1:10 to 1:100. According to these information the responses for each dengue immunosensor show some differences in ΔR_{CT} relative values sequences, where; DENV-4 (56.5–705%), DENV-1 (33.7–199%), DENV-2 (21–174.5%) and DENV-3 (6.4–141%). At higher concentrations were observed a good interaction antibody-antigen for all DENV immunosensors, especially to DENV-4. The degree of DENV coating (θ) on the surface of the

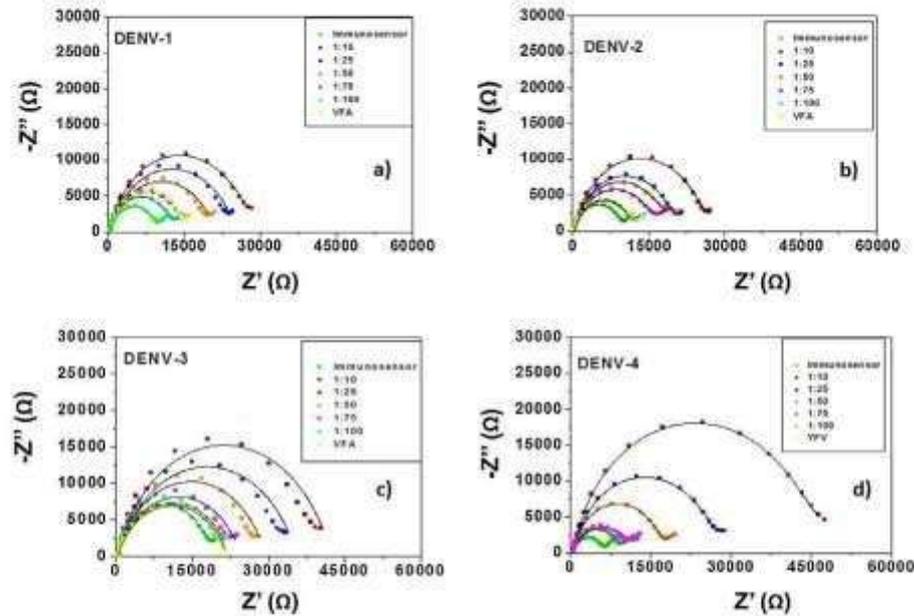


Fig. 5. Nyquist plots after exposition of the sensor to DENV-1 (a), DENV-2 (b), DENV-3 (c) and DENV-4 (d) in dilution folds from 1:10 to 1:100. Supporting electrolyte: 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]^{2-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ 1:1 in 10 mM PBS solution (pH 7.4); scan rate of 50 $mV s^{-1}$.

Table 1

Values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results.

| Modified electrode | R_{CT} (Ω) | C_{dl} (μF) | R_{CT} ($k\Omega$) | W |
|---------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----|
| Bare gold electrode | 595 | 1.73 | 0.28 | 269 |
| Cystein | 590 | 4.44 | 2.42 | 460 |
| Cystein/EDC/NHS | 533 | 6.77 | 0.77 | 458 |
| Cystein/AuNPs | 574 | 8.60 | 1.09 | 464 |
| Antibody_DENV-1 | 473 | 2.46 | 8.90 | 427 |
| DENV-1 (1:10) | 538 | 2.77 | 26.6 | 541 |
| DENV-1 (1:25) | 371 | 2.76 | 24.2 | 315 |
| DENV-1 (1:50) | 380 | 2.66 | 20.1 | 953 |
| DENV-1 (1:75) | 487 | 2.13 | 13.9 | 513 |
| DENV-1 (1:100) | 504 | 1.87 | 11.9 | 393 |
| Antibody_DENV-2 | 466 | 1.94 | 8.18 | 416 |
| DENV-2 (1:10) | 522 | 1.88 | 25.2 | 479 |
| DENV-2 (1:25) | 543 | 1.77 | 18.1 | 405 |
| DENV-2 (1:50) | 468 | 1.83 | 17.2 | 277 |
| DENV-2 (1:75) | 460 | 1.41 | 15.4 | 277 |
| DENV-2 (1:100) | 532 | 1.79 | 11.1 | 383 |
| Antibody_DENV-3 | 577 | 1.82 | 17.4 | 448 |
| DENV-3 (1:10) | 360 | 2.23 | 41.9 | 337 |
| DENV-3 (1:25) | 448 | 2.00 | 35.0 | 420 |
| DENV-3 (1:50) | 353 | 2.45 | 29.0 | 560 |
| DENV-3 (1:75) | 333 | 3.00 | 24.2 | 270 |
| DENV-3 (1:100) | 289 | 2.62 | 22.0 | 861 |
| Antibody_DENV-4 | 533 | 1.43 | 5.40 | 361 |
| DENV-4 (1:10) | 588 | 1.62 | 44.2 | 307 |
| DENV-4 (1:25) | 591 | 1.51 | 25.8 | 346 |
| DENV-4 (1:50) | 573 | 0.95 | 16.2 | 322 |
| DENV-4 (1:75) | 345 | 3.45 | 11.0 | 482 |
| DENV-4 (1:100) | 574 | 1.23 | 8.59 | 330 |
| Negative-YFV (1:10) | 554 | 1.30 | 8.02 | 377 |

Immunosensor was evaluated according to Eq. (3) for each dilution of the DENV.

$$\theta = 1 - \left(\frac{R_{CT(\text{Antibody})}}{R_{CT(\text{DENV})}} \right) \quad (3)$$

where $R_{CT(\text{Antibody})}$ is the charge transfer resistance of the Cys-MBA-AuNPs-anti-DENV antibody sensor system before exposure to different and $R_{CT(\text{DENV})}$ is the charge transfer resistance of the sensor system after exposure to different concentrations of DENV. Fig. 7b shows a plot of θ as a function of DENV dilution folds. The value of θ increases with increasing DENV concentration and is found to be ~ 0.66 (66%) for DENV-1, ~ 0.63 (63%) for DENV-2, ~ 0.58 (58%) for DENV-3 and ~ 0.87 (87%) for DENV-4. The long-term storage stability was performed during four weeks with the biosensor stored at 4 °C in PBS 10 mM (pH 7.4). The biosensor was stable for four weeks and only 22% of the initial response was lost after this period.

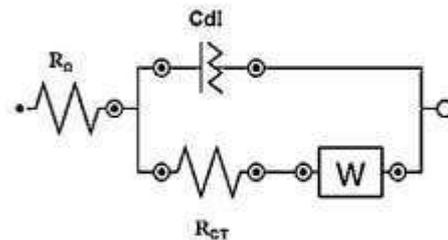


Fig. 6. Equivalent circuit used to fitted impedance results.

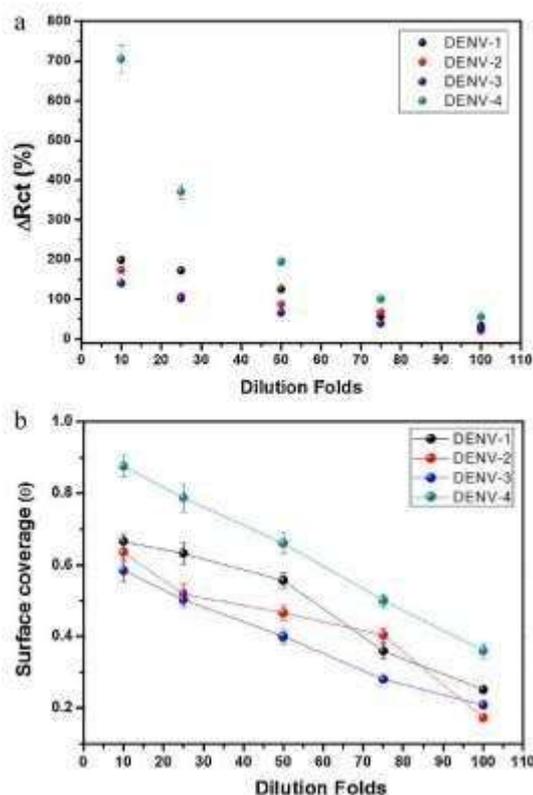


Fig. 7. (a) Relative charge transfer resistance versus dilutions folds of the immunosensor response DENV-1 (a), DENV-2 (b), DENV-3 (c) and DENV-4 (d) exposure. (b) Plot of surface coverage with different dilutions folds of DENV-1 (a), DENV-2 (b), DENV-3 (c) and DENV-4 (d).

4. Conclusions

A new sensor platform consisting of 4-mercaptobenzoic acid modified AuNPs was successfully synthesized in order to develop immunosensors for dengue diagnosis. In this work, four different immunosensors for specific detection of DENV-(1–4) were obtained. The developed system can be considered a valuable alternative as an immunosensor for label-free diagnosis of dengue, with low cost and operational simplicity. Our results suggest applicability of the immunosensor due to the high sensibility and specificity in dengue diagnosis.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Rede ELINOR de Nanobiotecnologia/CAPES, MCT/PNEP and Department of Chemistry of the Federal University of Pernambuco by the SEM images. Luna would like to thank Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) for a PhD scholarship.

References

- [1] J.L. Kyle, E. Harris, Global spread and persistence of dengue, *Annu. Rev. Microbiol.* 62 (2008) 71–92.

- [2] World Health Organization, *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*, new ed., WHO, Geneva, Switzerland, 2009.
- [3] D.J. Gubler, Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century, *Trends Microbiol.* 10 (2002) 100–103.
- [4] E.C. Holmes, S.S. Twiddy, The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus, *Infect. Genet. Evol.* 3 (2003) 18–28.
- [5] M.S. Mustafa, V. Rasotgi, S. Jain, V. Gupta, Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): a new public health dilemma in dengue control, *Med. J. Armed Forces India* 71 (2015) 67–70.
- [6] J. Whitehorn, C.P. Simmons, The pathogenesis of dengue, *Vaccine* 29 (2011) 7221–7228.
- [7] M.G. Guzman, S.B. Halstead, H. Amico, P. Buchy, J. Farrar, D.J. Gubler, E. Hunsperger, A. Kroeger, H.S. Margolis, E. Martinez, M.B. Nathan, J.L. Pelegriño, C. Simmons, S. Yoksan, R.W. Peeling, Dengue: a continuing global threat, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 57–516.
- [8] D. Normile, Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts, *Science* 342 (2013) 415.
- [9] S.B. Halstead, Dengue, *Lancet* 370 (2007) 1644–1652.
- [10] A.L. Rothman, Dengue: defining protective versus pathologic immunity, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 948–951.
- [11] D.W. Vaughn, S. Green, S. Kalayntirov, B.E. Innis, S. Nimmannitya, S. Suntayakorn, T.P. Endy, B. Raengsakulrach, A.L. Rothman, F.A. Ennis, A. Neelak, Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity, *J. Infect. Dis.* 181 (2000) 2–9.
- [12] K. Boonnak, B.M. Shike, T.H. Burgess, R.M. Mason, S.J. Wu, P. Sun, K. Porter, L.F. Radiman, D. Yuwono, P. Puthavathana, M.A. Marovich, Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection, *J. Virol.* 82 (2008) 3533–3551.
- [13] S.J. Baheti, K.L. Williams, R. Lachica, D. Flores, J.L. Kyle, E. Mehlhop, S. Johnson, M.S. Diamond, P.R. Beatty, E. Harris, Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification, *PLoS Pathog.* 6 (2010) 1–13.
- [14] S.B. Halstead, Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses, *Adv. Virus Res.* 60 (2003) 421–467.
- [15] S.S. Whitehead, J.E. Blaney, A.P. Durbin, B.R. Murphy, Prospects for a dengue virus vaccine, *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 518–528.
- [16] F.R.R. Teles, Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: a review, *Anal. Chim. Acta* 687 (2011) 28–42.
- [17] R.L. Caygill, G.E. Blair, P.A. Millner, A review on viral biosensors to detect human pathogens, *Anal. Chim. Acta* 681 (2010) 8–15.
- [18] G. Durán, J. Conde, B. Vegas, L. Gestas, C. Almeida, M. Assunção, J. Rosa, P.V. Baptista, Noble metal nanoparticles for biosensing applications, *Sensors* 12 (2012) 1657–1687.
- [19] A.B. de Melo, P. da Silva, M.C. Magalhães, L.H. Gonzales Gil, E.M. Freese de Carvalho, U.M. Braga-Neto, G.R. Bertani, E.T. Marques Jr., M.T. Carneiro, Description of a prospective 1700 yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85 (2011) 738–747.
- [20] Y. Zhou, S.X. Wang, K. Zhang, X.Y. Jiang, Visual detection of copper(II) by azide- and alkyne-functionalized gold nanoparticles using click chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 7454–7456.
- [21] K.Y.P.S. Avelino, C.A.S. Andrade, C.P. de Melo, M.L. Nogueira, M.T.S. Correia, L.C.B. Coelho, M.D.L. Oliveira, Biosensor based on hybrid nanocomposite and GramM lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples, *Synth. Met.* 184 (2014) 102–108.
- [22] D.M.N. Luna, M.D.L. Oliveira, M.L. Nogueira, C.A.S. Andrade, Biosensor based on lectin and lipid membranes for detection of serum glycoproteins in infected patients with dengue, *Chaos Phys. Lipids* 180 (2014) 7–14.
- [23] M.P. Costa, C.A.S. Andrade, R.A. Montenegro, F.L. Melo, M.D.L. Oliveira, Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor, *J. Colloid Interface Sci.* 433 (2014) 141–148.
- [24] H. Wang, H. Ohnishi, H. Endo, M. Izumi, Preparation of amperometric glucose biosensor based on 4-mercaptobenzoic acid, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2–6.
- [25] X.D. Cao, Y.K. Ye, S.Q. Liu, Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing, *Anal. Biochem.* 417 (2011) 1–16.
- [26] M.D.L. Oliveira, C.P. de Melo, O. Glauco, C.A.S. Andrade, Development of impedimetric and optical calcium biosensor by using modified gold electrode with porcine S100A12 protein, *Colloids Surf. B* 82 (2011) 365–370.
- [27] J.H.O. Dwyer, O.A. Arotiba, N. Hendricks, E.A. Songa, N. Jheoh, T.T. Waryo, R.F. Ngere, P.G.L. Baker, E.J. Iwuoha, Electrochemical immunosensor based on polythiophene/gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B1, *Sensors* 8 (2008) 8262–8274.

Biographies

Deboea M.N. Luna is graduated in odontology. In 2011 she received the MSc in Human Health and Environment at the Federal University of Pernambuco. Her current research interests are concentrated on biosensors and dengue.

Karen Y.P.S. Avelino is a graduate student in pharmacy at the Federal University of Pernambuco. Her current research interests are concentrated on Biosensors.

Dr. Marli T. Cordeiro graduated in pharmacy in 1973 at the Federal University of Pernambuco (UFPE). In 2008 she received the PhD in Public Health from the UFPE. She has large experience in dengue.

Dr. Cesar A.S. Andrade received his PhD in materials science from University Federal of Pernambuco (Recife, Brazil) in 2006. He joined in the Oakland University as a postdoctoral research fellow. Since 2008, he has been with UFPE University as professor. Currently, his research activities are focused on the development of biomolecular

interfaces, biological sensor systems and novel nanomaterials for sensor applications.

Dr. Maria D.L. Oliveira is Doctor of chemistry (PhD) from University Federal of Pernambuco (Recife, Brazil). She joined in the Oakland University as a postdoctoral research fellow. She is currently professor in departmental section of biochemistry, Center of Biology. Her research interests are electrochemistry, biosensors and lectins.

PRESENTAÇÃO DE TRABALHO E RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

- 1. LUNA, D. M. N.; AVELINO, K. Y. P. S. ; CORDEIRO, M. T. ; OLIVEIRA, M. D. L. ; (ANDRADE, C. A. S.) . IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO CONSTITUÍDO POR CAMADAS AUTOMONTADAS DE ÁCIDO MERCAPTOBENZÓICO E NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA A IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE TIPO 3. In: I Jornada da Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2014, Recife. I Jornada da Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2014.**
- 2. LUNA, D.M.N ; OLIVEIRA, M. D. L. ; LACERDA, M. N. ; ANDRADE, C. A. S. . DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE GLICOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA DENGUE ATRAVÉS DE CAMADAS LIPÍDICAS AUTOMONTADAS E LECTINA. In: 53 Congresso Brasileiro de Química, 2013, Rio de Janeiro. Química: Ampliando fronteiras, 2013.**
- 3. LUNA, D. M. N.; OLIVEIRA, M. D. L.; LACERDA, M. N. ; ANDRADE, C. A. S. . Biossensor impedimétrico para a detecção de glicoproteínas no soro de pacientes contaminados por dengue. In: 3 Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2013, Jaboatão dos Guararapes. 3 Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2013. p. 380-384.**
- 4. LUNA, D. M. N.; OLIVEIRA, M. D. L.; LACERDA, M. N. ; ANDRADE, C. A. S. . Obtenção de biossensor constituído por membranas e lectinas na detecção de glicoproteínas no soro de pacientes infectados por DEV-3. In: 3 Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2013, Jaboatão dos Guararapes. 3 Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica, 2013. p. 420-424.**

Resumos publicados em anais de congressos

- 1. LUNA, D. M. N. ; OLIVEIRA, M. D. L. ; (ANDRADE, C. A. S.) . DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PIEZOELÉTRICO BASEADO EM CAMADAS LIPÍDICAS AUTOMONTADAS E Concanavalina A PARA A DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS. In: 2 EBIT (Encontro Brasileiro para a Inovação Terapêutica), 2011. 2 Encontro Brasileiro para a Inovação Terapêutica, 2011.**

Apresentações de Trabalho

1. AVELINO, K. Y. P. S. ; **LUNA, D. M. N.** ; CORDEIRO, M. T. ; ANDRADE, C. OLIVEIRA, M. D. L. . Development of a label-free dielectric immunosensor dengue diagnosis. 2014. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
2. AVELINO, K. Y. P. S. ; **LUNA, D. M. N.** ; LACERDA, M. N. ; ANDRADE, C. A. S. ; OLIVEIRA, M. D. L. . Piezoelectrc Biosensor Based on Lipid Membrane and Lectin for Detection of Serum Glycoprotein in Infected Patients With Dengue. 2014. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
3. AVELINO, K. Y. P. S. ; **LUNA, D. M. N.** ; ANDRADE, C. A. S. ; OLIVEIRA, M. D. L. . Imunossensor nanoestruturado para a detecção voltamétrica do sorotipo II do vírus da dengue. 2014. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
4. **LUNA, D.M.N** ; OLIVEIRA, M. D. L. ; LACERDA, M. N. ; ANDRADE, C. A. S. . ASSOCIAÇÃO DE CONCANAVALINA A E BICAMADA LIPÍDICA AUTOMONTADA PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA O DIAGNÓSTICO DA DENGUE. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
5. **LUNA, D. M. N.** ; OLIVEIRA, M. D. L. ; LACERDA, M. N. ; ANDRADE, C. A. S. . DETECÇÃO IMPEDIMÉTRICA DE GLICOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS EM PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA DENGUE ATRAVÉS DE CAMADAS LIPÍDICAS AUTOMONTADAS E LECTINA. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
6. **LUNA, D. M. N.** ; OLIVEIRA, M. D. L. ; LACERDA, M. N. ; ANDRADE, C. A. S. . Obtenção de biossensor constituído por membranas e lectina na detecção de glicoproteínas no soro de pacientes infectados por DENV-3. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
7. **LUNA, D. M. N.** ; OLIVEIRA, M. D. L. ; LACERDA, M. N. ; ANDRADE, C. A. S. . Biossensor impedimétrico para a detecção de glicoproteínas no soro de pacientes contaminados por dengue. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
8. **LUNA, D. M. N.** ; OLIVEIRA, M. D. L. ; ANDRADE, C. A. S. . DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PIEZOELÉTRICO BASEADO EM CAMADAS LIPÍDICAS AUTOMONTADAS E Concanavalina A PARA A DETECÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).