UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOCOMPÓSITOS HÍBRIDOS DE POLIANILINA-NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DIAGNÓSTICO DA DENGUE

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOCOMPÓSITOS HÍBRIDOS DE POLIANILINA-NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA DIAGNÓSTICO DA DENGUE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Nutrição como requisito para a Conclusão do Curso de Bacharel em Nutrição

ALUNO: GILCELIA JANAINA LINO DA SILVA
ORIENTADOR: CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de conclusão de curso, a minha mãe, minha irmã Gilvanete, meu namorado Fred, por todo amor, carinho, por estarem sempre me apoiando e me dando forças para continuar e ao meu avô que sinto tanta falta.

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por me ajudar a ter conseguir terminar este trabalho e o curso que é tão importante para mim, por sempre atender as minhas preces e sempre me iluminar;
- A minha mãe, pois se não fosse todos os seus sacrifícios eu não teria conseguido fazer a faculdade, por seu amor, carinho, por sempre me dar seu colo quando preciso, por cuidar de mim e sempre me dar forças para continuar. MÃE EU TE AMO, MUITO OBRIGADA POR TUDO!;
- A minha irmã Gilvanete, por estar sempre do meu lado me ajudando, me apoiando, por todo o seu carinho e amor;
- A meu namorado Fred, por fazer parte da minha vida, esta comigo sempre que preciso me apoiando, me dando colo quando estou triste ou mesmo só quando estou com saudade. Fred muito obrigada pelo seu amor, carinho, compreensão, por me ajudar até mesmo nos estudos, a me ensinar a ser uma pessoa melhor e sempre me dar forças para continuar. Amor, você foi à melhor coisa que me aconteceu, TE AMO;
- A todos os meus familiares que sempre torceram por mim e me apoiaram durante essa caminhada;
- Aos meus orientadores César Augusto e Maria Danielly, agradeço por todos os ensinamentos, vocês foram de extrema importância para que eu conseguisse realizar esse trabalho, pela dedicação, confiança e amizade;
- A todos que fazem parte do TecBio;
- A Capes pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

RESUMO

A dengue é uma enfermidade causada por um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui quatro sorotipos imunológicos DENV (1-4) e para a sua detecção têm sido utilizados diversos tipos de biossensores. Nanocompósitos híbridos têm sido aplicados no desenvolvimento de sensores devido suas propriedades físico-químicas. Neste trabalho, compósitos de nanopartículas de ouro/polianilina (AuNpPANi) foram imobilizadas sob a superfície do eletrodo de ouro (EAu), para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para dengue. Inicialmente foi realizada a modificação do eletrodo por automontagem sendo obtido o sistema EAu-AuNpPANi-DNA_{sonda}. Foram realizadas medidas de voltametria cíclica (VC), com potenciais aplicados de -0,2 V a 0,7 V, velocidade de varredura de 50 m/V) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) com freqüência de 100 mHz a 100 KHz e amplitude de 10 mV numa solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) (1:1). Na VC do sistema EAu-AuNpPANi-DNA_{sonda}-$DNA_{complementar}$ foi observada uma redução nas correntes de pico anódica e catódica. Na EIS o sistema EAu-AuNpPANi-DNA_{sonda}-$DNA_{complementar}$ foi observado um aumento na resistência de transferência de elétrons (Rte). Para o sistema em contato com o sorotipo diferente ($DNA_{não\text{-}complementar}$) não houveram variações das respostas amperométrica e do Rct. Portanto, o sistema EAu-AuNpPANi-DNA_{sonda} foi capaz de detectar qualitativamente o material genético de cada sorotipo dengue.

Descritores: dengue, DNA, nanocompósitos híbridos, voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem do mosquito *Aedes aegypti.*

Figura 2 – Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti.*

Figura 3 – Imagem do mosquito *Aedes albopictus.*

Figura 4 – Representação da estrutura do vírus da dengue.

Figura 5 – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor.

Figura 7 – Variação da aplicação do potencial com o tempo em voltametria cíclica.

Figura 8 – Esquema representativo de um voltamograma cíclico.

Figura 9 – Circuito de Randles.

Figura 10 – Representação da semelhança entre um capacitor de um circuito elétrico (modelo Helmontz) com a interface eletrodo/solução de uma célula eletroquímica.

Figura 11 – Diagrama de Nyquist.

Figura 12 – Representação esquemática da síntese das AuNpPANi.

Figura 13 – Representação esquemática da montagem do biossensor.

Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNpPANi em campo escuro e claro (a). Imagem de alta resolução dos AuNpPANi (b). Detalhe difração de elétrons do AuNpPANi.

Figura 15 – Voltamograma cíclico (a) e diagrama de Nyquist (b) do sistema AuNpPANi-TS1.

Figura 16 – Voltamograma cíclico (a) e Diagrama de Nyquist (b) da avaliação da concentração de DNA.

Figura 17 – Voltamogramas cíclicos do sistema de detecção do sorotipo 1 da dengue (a); sistema de detecção do sorotipo 2 da dengue (b) e sistema de detecção do sorotipo 3 da dengue (c).

Figura 18 – Diagramas de Nyquist do sistema de detecção do sorotipo 1 da dengue (a); sistema de detecção do sorotipo 2 da dengue (b) e sistema de detecção do sorotipo 3 da dengue (c).

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

AuNpPANi – nanoparículas de ouro/polianilina

Cdl – dupla camada elétrica

cDNA – DNA complementar

DC – dengue clássica

EAu – eletrodo de ouro

EIE – espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA – ensaio imunoenzimático para detecção indireta de anticorpos IgG

FC – fixação do complemento

FHD – febre hemorrágica da dengue

HI – inibição por hemaglutinação

HLA – antígeno leucócito humano

IFN-γ – interferon γ

IL-10 – interleucina-10

IL-1β – interleucina 1β

IL-2 – Interleucina-2

IL-6 – interleucina-6

IL-8 – interleucina-8

IL-9 – interleucina-9

LT – linfócito T

MAC-ELISA – ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM

NPs – nanopartículas

NT – teste de neutralização

PAF – Fator de ativação de plaquetas

PCs – polímeros condutores

R_{ct} – resistência de carga

$_{RT}$PCR – reação em cadeia da polimerase

R_{Ω} - resistência ôhmica da solução

SCD – síndrome do choque da dengue

TFS – tampão fosfato de sódio

TNF-α – fator de necrose tumoral

TS1 – sonda do sorotipo 1 da dengue

TS2 – sonda do sorotipo 2 da dengue

TS3 – sonda do sorotipo 3 da dengue

VC- voltametria cíclica

W – impedância de Warburg

Z_f – impedância faradaica

Z_{im} – componente imaginária

Z_{re} – componente real

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13-32
1.1	Dengue.....	13-24
1.1.2	*Aedes aegypti*.....	13-15
1.1.3	*Aedes aebopictus*.....	15-16
1.1.4	Transmissão.....	16
1.15	Virologia.....	16-17
1.1.6	Manifestações Clínicas.....	18-20
1.1.6.1	Dengue Clássica (DC).....	18
1.1.6.2	Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD).....	19-20
1.1.7	Imunopatologia.....	20-21
1.1.8	Diagnóstico.....	22-24
1.2	Biossensores.....	24-25
1.3	Nanocompósitos Híbridos.....	26-27
1.4	Técnicas Eletroquímicas.....	27-32
1.4.1	Voltametria Cíclica.....	28-29
1.4.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	29-32
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	METODOLOGIA	35-38
4.1	Materiais e Reagentes.....	35
4.2	Síntese da Nanopartícula de ouro/polianilina (AuNpPANi).....	35-36
4.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	36
4.4	Medidas de impedância eletroquímica	36
4.5	Medidas de Correntes de picos catódicos e anódicos	37
4.6	Montagem do biossensor.....	37-38
4.7	Aspectos Éticos	38

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39-48
5.1	Síntese da AuNpPANi.....	39
5.2	Determinação da concentração da sonda (TS1) e do DNA.....	40-43
5.3	Detecção Eletroquímica de DEN1-3 utilizando o eletrodo modificado com AuNpPANi-TS1-3.....	43-48
6	CONCLUSÃO.....	49
7	REFERÊNCIAS.....	50-56

1 INTRODUÇÃO

1.1 DENGUE

A dengue é uma doença febril aguda que pode cursar de forma benigna ou grave, apresentando-se como dengue clássica (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD) (BRASIL, 2005). Essa patologia é atualmente a mais importante arbovirose humana e uma das grandes doenças emergentes contemporâneas, transmitida pelos mosquitos do gênero *Aedes*, sendo seus principais vetores os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus.*

1.1.2 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* é um mosquito provavelmente originário da África, onde podem ser encontradas populações selvagens e domésticas da espécie, foi originalmente descrito na região do Egito o que lhe conferiu seu nome específico (*Aedes aegypti*) (OPS,1991). Nas Américas somente são encontradas a forma doméstica do mosquito e acredita-se que o inseto foi introduzindo no Novo Mundo, transportado através de barris de água durante as primeiras colonizações e explorações européias.

A espécie *Aedes aegypti* é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, apresentando uma ampla distribuição mundial entre as latitudes 35˚ N e 35˚ S. Embora sua distribuição também seja limitada pela altitude, o inseto que geralmente não é observado acima dos 1.000 metros, foi encontrado tanto na Índia quanto na Colômbia acima dos 2.000 metros (OPS,1991; BRASIL, 2001; UNICEF/UNDP/WORLD/BANK/WHO, 2009). O *Aedes aegy*pti (Fig. 1) possui o tamanho pequeno em torno de 0,5 cm de comprimento, sua cor é preta com algumas manchas branca no dorso, nas pernas e na cabeça. O ruído que o mosquito produz é muito baixo, sendo inaudível ao ser humano.

É um mosquito essencialmente urbano, apesar de ter sido encontrado em zonas rurais, o qual se acredita que foi transportado em vasos domésticos onde se

encontravam larvas e ovos do mosquito. Geralmente não é encontrado a mais de 100 metros das habitações humanas.

Figura 1 – Imagem do mosquito *Aedes aegypti* (Disponível em: www.inmetro.gov.br)

O mosquito se desenvolve por metamorfose completa e seu ciclo de vida (Fig. 2) compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulto.

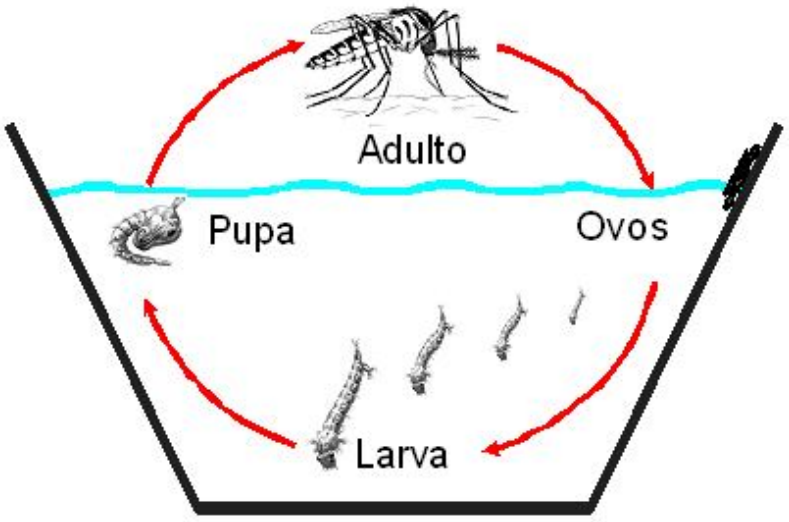


Figura 2 – Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* (Disponível em: www.cdc.gov)

O macho se alimenta de frutas ou de outros vegetais adocicados, já a fêmea alimenta-se de sangue da maioria dos vertebrados, porém exibem uma preferência por sangue humano. A ingestão de sangue fornece uma fonte de proteína para o desenvolvimento dos ovos. O repasto sanguíneo ocorre geralmente nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer, a picada ocorre nas regiões dos pés, pernas e tornozelos, pois voam baixo, geralmente a meio metro de altura do solo. Na picada, a fêmea aplica uma substância anestésica tornando a picada indolor. È através da picada que quando contaminada a fêmea do mosquito transmite o vírus da dengue para os humanos.

O *Aedes aegypti* é encontrado nas habitações e ocasionalmente no peridomicílio. As superfícies preferidas para o repouso são as paredes, mobília, peças de roupas penduradas e mosquiteiros.

1.1.3 *Aedes albopictus*

O mosquito *Aedes albopictus* (Fig. 3) é uma espécie originária das selvas asiáticas, ele está distribuído amplamente pela Ásia e no Pacífico, desde as regiões temperadas até os trópicos (OPS,1991). Sua disseminação para as Américas ocorreu devido ao intenso comércio de pneus entre os continentes (TEIXEIRA, 1999). O primeiro achado de *Aedes albopictus* no Brasil, ocorreu em 1986, em um foco localizado na Universidade Rural do Rio de Janeiro, no Município de Itaguaí (FORATINI, 1986; BRASIL, 2001).

O *Aedes albopictus*, apesar de possuir basicamente características de espécies florestais adaptou-se facilmente a ambientes urbanos. O mosquito utiliza como fonte de criadouros alguns recipientes como jarros, tanques, pneus, tambores, por ser menos doméstico do que o *Aedes aegypti* prefere os ocos de árvores para depositar seus ovos, longe dos humanos.

O inseto alimenta-se tanto de sangue de animais como de sangue humano, porém tem por preferência o sangue de animais. Ao contrário do *aegypti* é bastante resistente ao frio. Apesar de presente em várias regiões do sul e sudeste do Brasil até o momento não foi associado à transmissão de dengue nas Américas, sendo um vetor de importância na Ásia (BRASIL, 2005).

Figura 3 – Imagem do mosquito *Aedes albopictus.*(Disponível em: www.cdc.gov)

1.1.4 Transmissão

As fêmeas dos mosquitos *Aedes* transmitem o vírus aos seres humanos através da picada. O mosquito adquire o vírus após a picada em uma pessoa infectada com o vírus da dengue, este por sua vez multiplica-se no intestino do vetor após um período de incubação de 8 a 12 dias e posteriormente vai se localizar nas glândulas salivares do mosquito. Após a infecção e decorrido o período de incubação o mosquito é capaz de transmitir o vírus por todo o resto de sua vida. Um ser humano após ser infectado pode transmitir o vírus para o vetor durante o período de viremia que começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o 6˚ dia da doença (GUBLER, 1998; UNICEF/UNDP/WORLD/BANK/WHO, 2009). Outra forma pela qual vírus pode ser transmitido é pela fêmea do inseto para as larvas por transmissão trans-ovariana (OLIVEIRA *et al*, 2003).

1.1.5 Virologia

O vírus da dengue (Fig. 4) é encontrado ao longo das regiões tropicais e é estimado que cause 50-100 milhões da enfermidade por ano, incluindo 250.000-500.000 casos de FHD e 24.000 mortes (GIBBONS e VAUGHN, 2002). Este vírus pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*, podendo apresentar-se na

forma de quatro sorotipos (DENV 1-4) relacionados antigenicamente. Apesar da grande variabilidade genética, a região não-codificante 3' é relativamente conservada entre eles. Os *Flavivirus* são pequenos, esféricos com um envelope lipídico e possuem um diâmetro em torno de 40-50 mm. O genoma do vírus da dengue é um ssRNA de 11Kbs e Mr = 4000 que contém sequências para codificação de 3 proteínas estruturais e 7 não-estruturais que estão integradas a bicamada lipídica que envolve o nucleocapsídeo viral (TELES *et al*, 2005).

As proteínas estruturais que compõem o vírus são: proteína C (Nucleocapsídeo), proteína M (Membrana) e a proteína E (Envelope), as principais propriedades biológicas do vírus estão relacionadas a esta proteína, que é responsável pelo reconhecimento e ligação específica às células hospedeiras. As proteínas não-estruturais são: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (HENCHAL e PUTNAK, 1990).

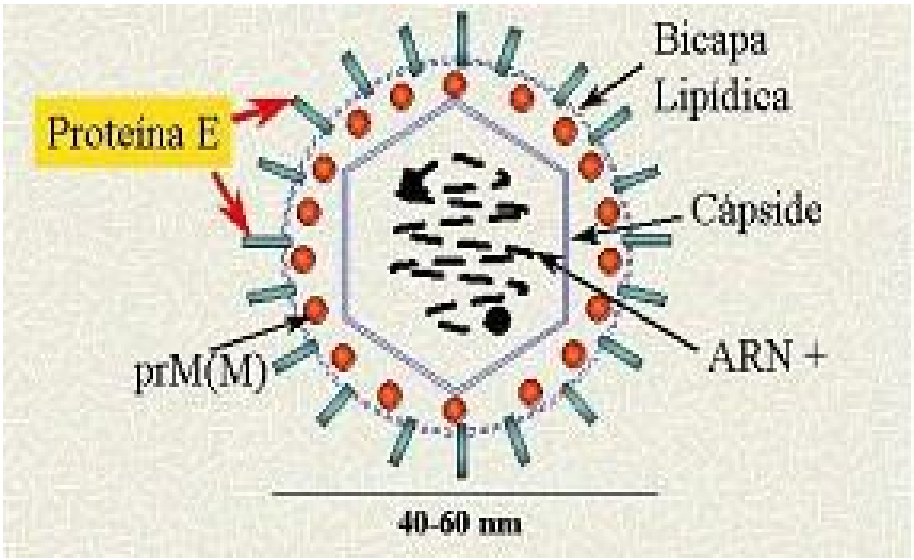


Fig. 4 – Representação da estrutura do vírus da dengue (Disponível em: www.prefeitura.sp.gov.br)

1.1.6 Manifestações Clínicas

Pacientes infectados com o vírus da Dengue podem apresentar três manifestações clínicas, as quais são denominadas de Dengue Clássica (DC), Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD). Sendo as mesmas discutidas a seguir.

1.1.6.1 Dengue Clássica (DC)

A dengue clássica é uma doença febril de início súbito com temperatura em torno de 39˚ a 40˚C que pode durar de 2 a 7 dias. A DC, além da presença de febre alta é caracterizada por uma variedade de sinais e sintomas não específicos, como cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retro-orbital, náuseas, vômitos, exantema, fraqueza, prurido cutâneo e alteração da sensação de gosto e em alguns casos pode ocorrer o aparecimento de manifestações hemorrágicas (GUBLER, 1998; TELES *et al*, 2005).

O período de duração da doença é de 5 a 7 dias, mas o período de convalescência que geralmente esta associado a debilidade física e depressão em pacientes adultos, pode perdurar por várias semanas. A dengue clássica é uma doença que acomete principalmente crianças e adultos e a presença de alguns aspectos clínicos esta associada à idade do paciente. A dor abdominal generalizada é mais observada em crianças, já as manifestações hemorrágicas como petéquias, epistaxe, gengivorragia e metrorragia são com frequência relatadas em adultos após o período febril (BRASIL, 2005).

A cefaléia nessa patologia é intensa e pode estar associada com dor retro-orbital desencadeada pela movimentação dos olhos associada com congestão conjuntival. Os pacientes com dengue clássica também podem apresentar linfoadenopatia e hepatomegalia dolorosa. Nos exames laboratoriais dos pacientes com DC são observadas alterações como neutropenia seguido por linfocitose, trombocitopenia e elevação das enzimas hepáticas Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) (GUBLER, 1998).

1.1.6.2 Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e Síndrome do Choque da Dengue (SCD)

A FHD e SCD são as formas mais graves de dengue. A Organização Mundial de Saúde define a febre hemorrágica da dengue, como sendo a presença de febre contínua, com duração de 2 a 7 dias, tendências hemorrágicas, trombocitopenia (100.000 células/ mm^3 ou menos) com hemoconcentração (hematócrito aumentado em torno de 20% ou mais) (MCBRIDE e BIELEFELDT-OHMANN, 2000).

A severidade da doença pode ser classificada de acordo com critérios clínicos sugeridos pelos peritos da OMS:

- Grau I: febre acompanhada por sintomas não-específicos, em que a única manifestação hemorrágica é o teste do laço positivo.
- Grau II: presença de sangramento espontâneo, normalmente na pele e nariz, gengivorragias, além das manifestações presentes no grau I.
- Grau III: colapso circulatório, manifestado por pulso fraco ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação.
- Grau IV: paciente apresenta-se em choque intenso com pressão sanguínea e pulso indetectável.
- A SCD ocorre nos Graus III e IV.

A FHD é uma patologia que acomete principalmente as crianças com idade menor que 15 anos, embora também possa acontecer em adultos (GUBLER, 1998). Os sinais e sintomas iniciais são bastante parecidos com os da DC, após três a quatro dias ocorre o aparecimento de manifestações hemorrágicas e colapso circulatório. Os fenômenos hemorrágicos consistem no aparecimento de petéquias, equimoses, epistaxes, gengivorragia, hemorragias em diversos órgãos. Os pacientes também podem apresentar hepatomegalia e efusão pleural (BRASIL, 2007). Acredita-se que o aumento súbito da permeabilidade vascular resultaria no extravasamento de plasma que causaria hemoconcentração, efusão serosa e hipotensão (MCBRIDE e BIELEFELDT-OHMANN, 2000).

A SCD é o resultado dessa perda intravascular de fluidos, eletrólitos e pequenas proteínas dos tecidos vasculares (MORENS e FAUCI, 2008). Geralmente

ocorre entre o 3˚ e 7˚ dias da doença e é por vezes precedida de dor abdominal. A patologia caracteriza-se por presença de pulso rápido e fraco, com diminuição da pressão de pulso e arterial, extremidades frias, pele pegajosa e agitação. Além disso, alguns pacientes podem apresentar manifestações neurológicas, como convulsões e irritabilidade (BRASIL, 2005).

1.1.7 Imunopatologia

O vírus após ser inoculado realiza a primeira replicação nos linfonodos locais, nas células musculares estriadas e lisas, passando subsequentemente para a circulação sanguínea. Durante essa fase pode ser observado a presença de mialgias e um aumento da temperatura corporal com duração de 5 a 8 dias. O segundo ciclo da replicação ocorre no monócitos/macrófagos que são os maiores sítios de replicação viral.

Os macrófagos em resposta a replicação viral produzem citocinas que interagem com os linfócitos T e produzem sintomas como febre e mal-estar (SANTOS, 2007). Durante o estado febril até o período de convalescência observam-se níveis elevados de interleucina-2 (IL-2), interferon γ (IFN-γ), fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina 1 β (IL-1β) e o fator de ativação de plaquetas (PAF). A leucopenia e depressão medular transitória são decorrentes dos altos níveis das citocinas dos macrófagos (FIGUEIREDO, 1999).

O desaparecimento da febre da dengue tanto nas formas indiferenciadas quanto na forma clássica ocorre com o aparecimento da resposta imune. Os anticorpos, principalmente os que se ligam a epítopos da proteína E, promovem lise do envelope ou bloqueio de seus receptores com conseqüente neutralização viral (FIGUEIREDO, 1999).

Anticorpos, produzidos contra NS1, promovem lise viral fixando o complemento, atuam como mediadores dos fenômenos de citotoxicidade por linfócitos, entretanto não produzem neutralização das partículas virais (AVIRUTNAN *et al*, 2006). A NS1 possui atividade na maturação viral e é encontrada na superfície da membrana da célula infectada ou secretada no sangue (YOUNG *et al*, 2000).

A resposta imune celular citotóxica por LT ocorre sob estímulo das proteínas E, NS1 e NS3 dos vírus do dengue. Os LT podem atuar de duas formas nas células infectadas com dengue, como seguem: a) nas células que expressam receptores para o antígeno leucócito humano (HLA) tipo II eles produzem IFN-γ, IL-2 e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos e; b) nas células que expressam receptores HLA tipo I, agride diretamente a célula promovendo a sua lise (FIGUEIREDO, 2006).

Os anticorpos IgM específicos são detectáveis a partir do 4° dia, atingindo os níveis mais elevados por volta do 7°ou 8° dia e podem continuar presentes após alguns meses. As IgG específicas são observadas a partir do 4° dia e o pico pode ocorrer em duas semanas, diferente das IgM, elas se mantêm no sangue por vários anos, conferindo imunidade contra um determinado sorotipo, provavelmente, por toda a vida (LUPI e TYRING, 2003).

A DH geralmente ocorre após uma infecção prévia por um dos sorotipos do vírus da dengue e fatores de virulência, fatores genéticos, a resposta imune e fatores do hospedeiro como anemia falciforme, diabetes melitus, asma brônquica são determinantes na severidade da doença (GUZMÁN e KOURÍ, 2004; CHATURVEDI *et al*, 2006). Nos casos de infecção seqüencial por dengue apresentando FHD/SCD, os anticorpos pré-existentes não neutralizam um sorotipo diferente de vírus infectante, ao contrário eles potencializam a infecção facilitando a penetração do sorotipo diferente nos macrófagos (AVIRUTNAN *et al*, 2008). O aumento do número de moléculas HLA classes I e II, nos macrófagos apresentando antígenos, facilitam o reconhecimento de múltiplos epítopos virais pelos LT citotóxicos (KURANE e TAKASAKI, 2001).

Em casos graves de FHD/SCD, o TNF-α, encontra-se em níveis séricos elevados, afetando células inflamatórias e endoteliais. Desta forma, contribuem para a trombocitopenia, induzindo IL-8, estimulando liberação de histamina pelos basófilos e aumentando a permeabilidade vascular (KURANE e TAKASAKI, 2001; FUIGUEIREDO, 2006).

Acredita-se que algumas citocinas como o fator de necrose tumoral, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10 e o IFN γ induzem o extravasamento de plasma pela parede dos capilares (KURANE e TAKASAKI, 2001).

1.1.8 Diagnóstico

A dengue é uma doença que até o momento não há nenhum tratamento terapêutico e a sua prevenção é realizada através da tentativa de erradicação do mosquito e tem sido o objetivo principal por parte dos órgãos públicos, no entanto o sucesso dessa estratégia é limitado. Outro fator importante é a similaridade dos sintomas iniciais da infecção pelo vírus da dengue com os sintomas da malária, influenza, febre amarela e outras infecções virais, levando a um problema no diagnóstico clínico da patologia e dificultando a implementação de um tratamento adequado.

Frequentemente tem sido utilizado cinco testes básicos para o diagnóstico da dengue que incluem o teste de inibição por hemaglutinação (HI), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (NT), ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM (MAC-ELISA) e ensaio imunoenzimático para detecção indireta de anticorpos IgG (ELISA).

O HI apresenta boa sensibilidade, fácil execução e, além disso, os anticorpos HI persistem por longo período sendo um teste ideal para estudos soroepidemiológicos. Entretanto, o HI não é um teste plenamente específico para infecção por dengue e o aparecimento dos anticorpos HI ocorre após cinco ou seis dias da doença dificultando o diagnóstico (AHMED, 2005; DE PAULA e FONSECA, 2004). Outro fator importante é que esse teste apresenta reações cruzadas com outros flavivírus e são necessárias duas amostras obtidas nas fases aguda e de convalescença (KAO *et al*, 2005).

O princípio do teste FC é baseado no desaparecimento do sistema complemento durante as reações antígeno-anticorpo. O anticorpo FC aparece geralmente depois do anticorpo HI e é específico para infecções primárias. Contudo, o FC não é amplamente utilizado para diagnóstico de rotina da dengue, porque o referido teste requer pessoal técnico-especializado altamente treinado, sendo de difícil execução (AHMED, 2005).

Dentre os testes supracitados, o NT é o teste mais específico e sensível para o vírus da dengue. Por possuir alta especificidade pode ser utilizado pra identificar o sorotipo do vírus da dengue em infecções primárias durante o início da convalescença, porque os anticorpos neutralizantes detectados são relativamente

monotípicos para o vírus infectante. As principais desvantagens da técnica consistem no tempo necessário para realização do teste, custo e dificuldade de execução (GUZMAN e KOURI, 1996; DE PAULA e FONSECA, 2004).

O MAC-ELISA é o teste mais útil para a vigilância epidemiológica da dengue e é utilizado para detecção de anticorpos IgM anti-dengue (DE PAULA e FONSECA, 2004). O teste ELISA é empregado para detecção de anticorpos IgG e para o vírus da dengue, sendo comumente usado para diferenciar os casos entre infecção primária ou secundária. Ambos os testes possuem grande utilidade, porém apresentam o inconveniente de reação cruzada com outros *flavivirus* e exige um tempo mínimo de cinco dias de pós-infecção para que uma resposta imune seja desenvolvida e produza uma quantidade suficiente de anticorpos para ser detectada (GUZMAN e KOURI, 2002). Além disso, a referida técnica não é capaz de identificar o sorotipo do vírus da dengue (BAEUMNER *et al*, 2002;).

Outras ferramentas utilizadas no diagnóstico da dengue, como a cultura de células e a imunofluorescência são limitadas em termos de especificidade, sensibilidade, facilidade de uso e tempo de reação (VENE *et al*, 1995).

Outros testes que tem sido descritos na literatura são o isolamento do vírus e ensaios moleculares baseados na amplificação de ácidos nucléicos. O isolamento do vírus é muito útil em estudos soroepidemiólogicos, pois é considerado o melhor método para distinguir entre os sorotipos do vírus, no entanto tem um alto custo e requer técnicos com elevada qualificação. No caso dos ensaios moleculares, estes utilizam a reação em cadeia da polimerase ($_{RT}$PCR), na qual o RNA genômico é primeiro transformado em cDNA, através de um termociclador (TELES, F.R.R.; PRAZERES, D.M.F.; LIMA-FILHO, J.L., 2005). É uma técnica muito sensível e específica, capaz de detectar não só a presença do vírus como discriminar os quatro sorotipos do vírus da dengue, evita a contaminação com complexos imunes o que é bastante importante durante a fase de convalescência da doença (WU *et al*, 2001). Esta ferramenta de diagnóstico requer cuidados durante todo o procedimento para evitar falsos positivos e possível contaminação do material. A referida técnica possui alto valor instrumental agregado, médio porte e não é susceptível para aplicação de campo (BAEUMNER *et al*, 2002).

Desta forma, se torna imprescindível o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico clínico que superem as limitações dos métodos atuais. Em adição, para a geração destes novos produtos tecnológicos devem ser observadas algumas variáveis, tais como, rapidez, especificidade, reprodutibilidade e excelente sensibilidade. Portanto, os biossensores vêm se tornando uma área estratégica como veremos a seguir.

1.2 BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos analíticos que incorporam um elemento de reconhecimento biológico conectado ao um transdutor. O elemento biológico é capaz de detectar a presença, a atividade ou a concentração da amostra em análise (D'ORAZIO, 2003). Este sensor biológico pode ser um micro-organismo, um anticorpo, oligonucleotídeos, lectinas, enzimas ou qualquer outra biomolécula que possa interagir com substrato alvo. O transdutor pode ser um eletrodo, fibra óptica ou quartzo oscilante (KAUFFMANN, 2003).

O princípio de detecção é baseado na ligação específica entre o analito e o elemento de reconhecimento complementar (Fig. 5). A interação desses dois componentes resulta em alterações de uma ou mais propriedades físico-químicas como alterações de pH, transferência de elétrons, alteração de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons específicos, essa mudanças serão captadas e transformadas em um sinal eletrônico mensurável pelo transdutor. O principal objetivo do biossensor é produzir um sinal eletrônico proporcional a concentração de uma substância específica ou grupo de substâncias (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003).

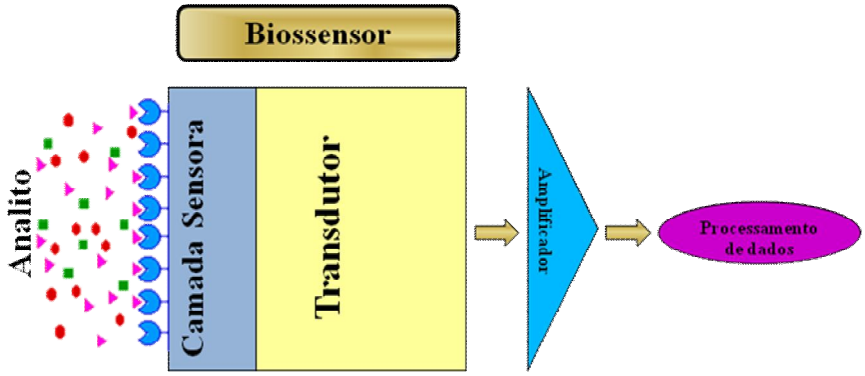


Figura 5 – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor.

O sensor biológico pode integrar-se ao transdutor de três formas: preso a uma membrana que é fixada na superfície do transdutor, adsorvido na superfície do transdutor ou ligado através de ligações covalentes diretamente no transdutor.

As aplicações dos biossensores são diversas e incluem diagnósticos clínicos, indústria farmacêutica, controle ambiental para monitoramento de substâncias como fenóis, pesticidas, e metais pesados, na indústria alimentícia para análise de composição de alimentos, teor de contaminação microbiana, concentração de nutrientes e corantes (VELASCO-GARCIA e MOTTRAM, 2003; ROGERS, 2006; BALLERSTADT *et al*, 2006; KAPPEL *et al*, 2007; VÄLIMAA *et al*, 2010; MARAGOS e BUSMAN, 2010).

No diagnóstico clínico podemos salientar a utilização dos genossensores, um tipo específico de biossensor baseado em fenômenos da química dos ácidos nucléicos como, por exemplo, o processo de hibridização. Os ácidos nucléicos têm sido bastante utilizados no desenvolvimento de biossensores para detecção de drogas, identificação de microorganismos patogênicos e outras substâncias biológicas, como também no diagnóstico de doenças (ROGERS, 2006). A técnica sensorial por meio da hibridização envolve a imobilização de uma sonda de oligonucleotídeo sobre a superfície de um transdutor e posterior exposição do sensor a uma amostra contendo a sequência complementar (oligonucleotídio alvo) com conseqüente hibridização (PEJCIC e DE MARCO, 2006). O DNA complementar (cDNA) é um DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro em uma reação catalisada pela enzima transcriptase reversa.

Para a melhoria da resposta eletroquímica vem sendo utilizados diversos sistemas, principalmente possuindo nanopartículas metálicas presentes na camada oclusora. Desta forma, podemos destacar uma nova classe de compostos que atualmente tem sido utilizado como camada sensorial, os quais são denominados de nanocompósitos híbridos, sendo formados a partir da associação de polímeros condutores e nanopartículas metálicas.

1.3 NANOCOMPÓSITOS HÍBRIDOS

Os polímeros condutores (PCs) são comumente chamados de “metais sintéticos” por combinarem as propriedades mecânicas e processabilidade dos polímeros convencionais com as propriedades elétricas, magnéticas e ópticas dos metais e semicondutores (MATTOSO, 1996). Também são chamados de polímeros conjugados, pois apresentam em suas cadeias ligações C=C conjugadas. Esta conjugação cria um fluxo de elétrons, no qual os elétrons π da dupla ligação podem ser facilmente removidos ou adicionados para formar um íon polimérico.

Os PCs são convertidos de isolantes em condutores pela adição de agentes de transferência de carga, denominados de “dopantes” em analogia aos semicondutores inorgânicos. Controlando a quantidade e o tipo de dopante é possível modelar a condutividade do material (FAEZ *et al*, 2000). Os agentes dopantes podem ser moléculas neutras, compostos ou sais inorgânicos que podem facilmente formar íons, compostos orgânicos ou poliméricos.

Os PCs apresentam diversas aplicações tecnológicas, tais como em baterias recarregáveis, dispositivos eletrônicos, sensores químicos e térmicos, biossensores, dentre outras (MATTOSO, 1996).

A polianilina (fig.6) é um polímero condutor que tem sido bastante estudado devido as suas propriedades tais como: estabilidade química, facilidade de polimerização e dopagem, baixo custo e alta condutividade, as quais possibilitam várias aplicações tecnológicas do polímero.

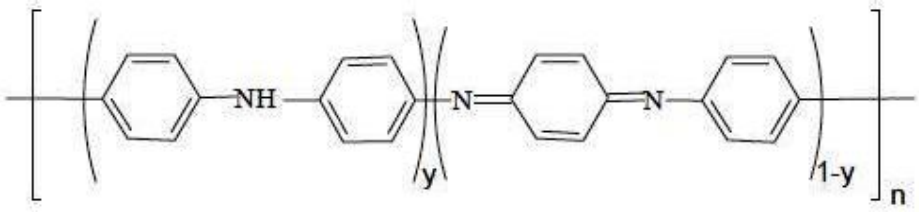


Figura 6 – Estrutura molecular da polianilina.

Outro material que tem gerado um grande interesse por apresentar grande aplicabilidade em diversas áreas da ciência são as nanopartículas (NPs). NPs são partículas de dimensões nanométricas. Esta é uma região extremamente pequena,

da ordem de 1 a 100 nanômetros. As NPs apresentam uma grande área superficial e geralmente exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. Por apresentarem tais propriedades as NPs facilitam a transferência de elétrons, podem ser modificadas por uma variedade de ligantes e biomoléculas e utilizadas na construção de sensores químicos e bioquímicos.

Através da associação de polímeros condutores e partículas metálicas são formados os compósitos híbridos. Quando pelo menos um dos componentes do compósito apresenta dimensões em escala nanométrica, este passa a ser denominado de nanocompósito. Os nanocompósitos podem ser de natureza inorgânica/inorgânica, orgânica/orgânica e inorgânica/orgânica, sendo este último denominado de nanocompósito híbrido por combinar as propriedade de materiais de naturezas distintas (ESTEVES *et al*, 2004).

Uma das principais razões da associação de diferentes compostos para formar um único material é que este novo material pode exibir propriedades distintas daquelas que caracterizam cada um de seus componentes, como também uma combinação dessas propriedades. Assim, pela adequada combinação dos componentes, um compósito pode reunir um conjunto de propriedades convenientes e desejáveis (DE MELO e PIMENTA, 2004).

Dentre as numerosas aplicações dos nanocompósitos podemos destacar eletrônica, dispositivos magnéticos, tintas e revestimentos, materiais retardadores de chama, catálise, biossensores ópticos e eletroquímicos (JIANG e KAKKAR, 1999; BURKE *et al*, 2002; FLEMING *et al*, 2001; HSIUE *et al*, 2001; GILMAN *et al*, 2000; GANGOPADHYAY e DE, 2000; WANG *et al*, 2010; XIAN *et al*, 2006).

1.4 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

Técnicas eletroquímicas são baseadas em fenômenos de óxido-redução de soluções eletrolíticas. Essas técnicas estudam propriedades elétricas mensuráveis como potencial e corrente de um analito numa célula eletroquímica submetido a uma diferença de potencial. Os métodos eletroquímicos oferecem várias vantagens como seletividades, especificidades, reprodutibilidade, precisão e tempo de resposta o que possibilita aplicação em diversas áreas (BRETT, 1999), inclusive no

desenvolvimento de sensores clínicos. Portanto nessa seção iremos abordar duas técnicas eletroquímicas, a Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) com o objetivo principal de aplicá-las para o desenvolvimento de um biossensor para dengue com alta especificidade e seletividade.

1.4.1 Voltametria Cíclica (VC)

A VC é uma técnica utilizada para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. Seu principal uso é diagnosticar os mecanismos das reações eletroquímicas para identificação de espécies presentes na solução e para análise semiquantitativa de taxas de reações. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações da termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos (BRETT e BRETT, 1996).

Esta técnica consiste em aplicar uma variação de potencial em função do tempo entre os eletrodos de trabalho e de referência, variando entre um valor máximo e mínimo de potencial que corresponde ao início e término da varredura, em cada um dos sentidos no potencial (CIRNE E PATACAS, 2007). O potencial (Fig. 7) aplicado é varrido linearmente e tem uma forma triangular (LOJOU e BIANCO, 2006). Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante desta corrente versus o potencial aplicado.

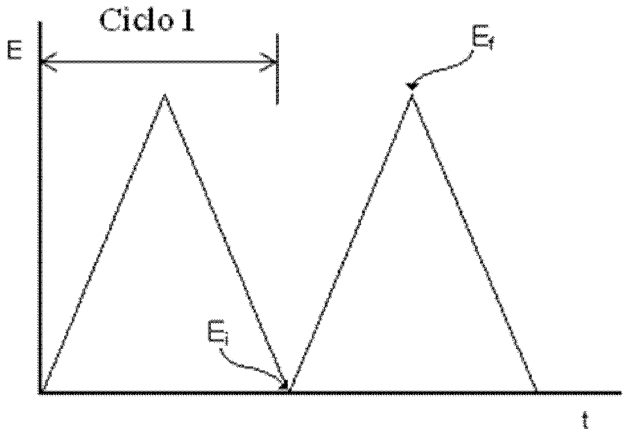


Figura 7 – Variação da aplicação do potencial com o tempo em voltametria cíclica.

Inicia-se a aplicação do potencial negativo onde nenhuma oxidação ocorre, com o aumento do potencial para regiões mais positivas (anódica) ocorre à oxidação do composto em solução. O rápido aumento da corrente anódica gera um pico de corrente proporcional à concentração deste composto, quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de oxidação ocorre. Posteriormente, o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial e, no caso de uma reação reversível, os produtos que tiveram sido gerados no sentido direto serão reduzidos, gerando um pico simétrico ao pico de oxidação (Fig.8) (KISSINGER e HEINEMAN, 1983; LOJOU e BIANCO, 2006).

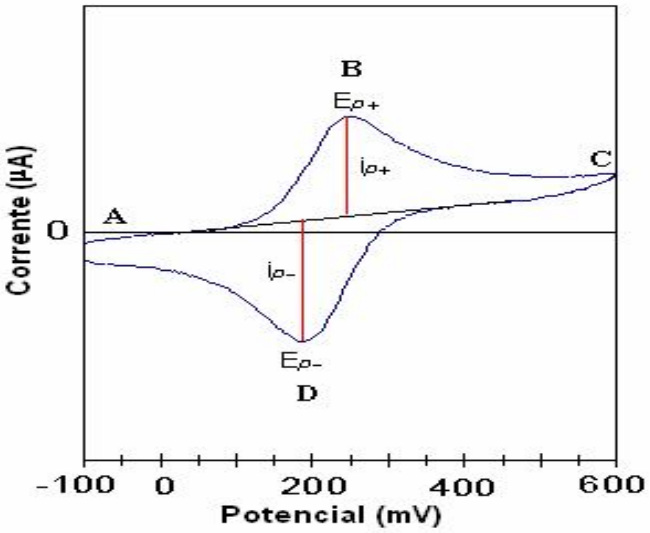


Figura 8 – Esquema representativo de um voltamograma cíclico.

1.4.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A EIE é um método efetivo para verificar as propriedades interfaciais de uma superfície modificada e é frequentemente utilizado no sentido de compreender transformações químicas e processos associados com os suportes condutores (DONG *et al*, 2001; KATZ e WILLNER, 2003). Esta técnica envolve a aplicação de uma pequena perturbação de potencial ou corrente sobre o sistema que esta sendo investigado. A perturbação do sistema é feita através da aplicação de um potencial contínuo sobre a qual é imposta uma variação senoidal de potencial de pequena amplitude. Esta por sua vez causa perturbações mínimas no sistema de ensaio

eletroquímico, reduzindo desta forma possíveis erros causados pela técnica de medição (SANTOS, 1994). Este método de aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts, de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de freqüência, pois a onda de potencial é senoidal. Como a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional (SLUYTERS-REHBECH, 1994; BRETT e BRETT, 1996).

O conceito de impedância foi inicialmente introduzido para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas eletroquímicos, uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema (SLUYTERS-REHBECH, 1994).

A obtenção de informações a partir dos dados de impedância eletroquímica pode ser conduzida mediante a utilização de diferentes modelos de medida como, por exemplo, circuitos equivalentes. A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica e um circuito elétrico de resistores, capacitores e indutores. O circuito equivalente que apresenta uma melhor equivalência com um sistema eletroquímico (interface eletrodo/solução) é o circuito de Randles (Fig. 9) (BRETT e BRETT, 1996).

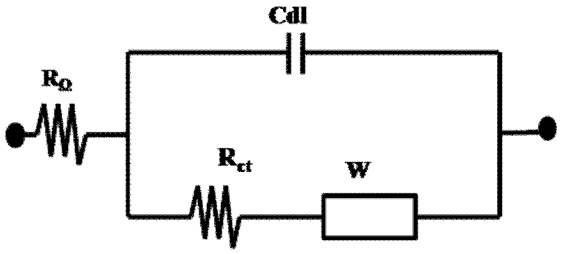


Figura 9 – Circuito de Randles.

Neste circuito estão presentes quatro elementos que representam os processos que ocorrem nos eletrodos e na solução: a capacitância de dupla camada elétrica (Cdl), que possui um comportamento similar a de um capacitor de placas paralelas (modelo Helmholtz) (Fig. 9); a resistência ôhmica da solução (R_Ω) ao transporte de íons entre os eletrodos; a impedância faradaica (Z_f) que pode ser

subdividida em uma resistência transferência de carga (R_{ct}) e a impedância de Warburg (W) que representa a resistência no transporte de massa das espécies eletroativas (BRETT e BRETT, 1996).

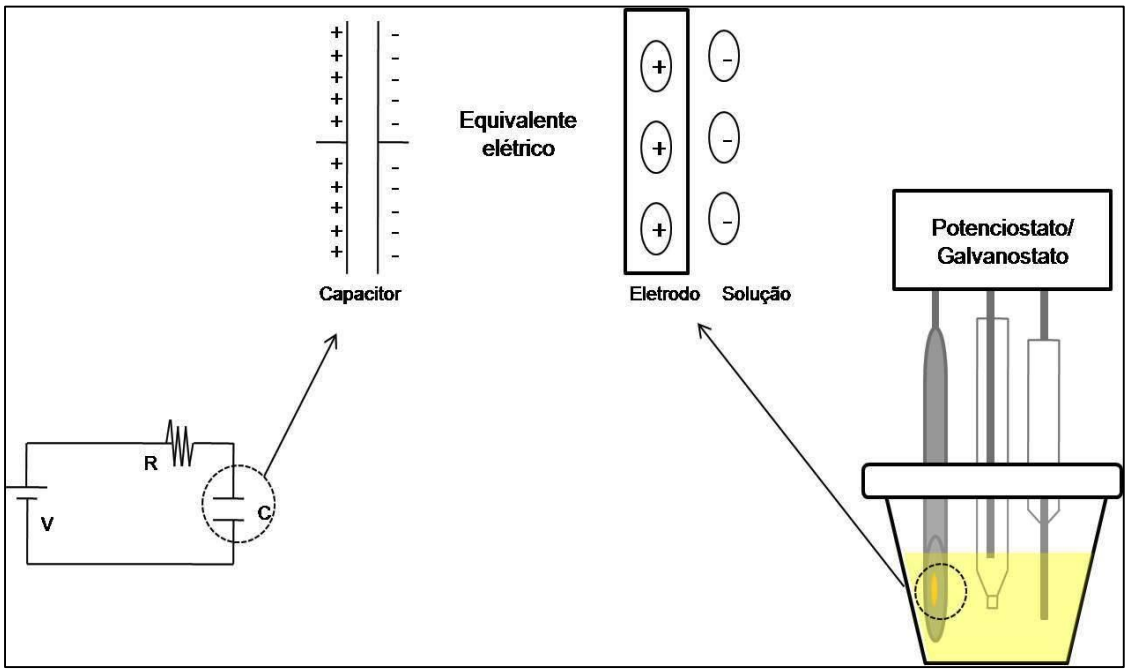


Figura 10 – Representação da semelhança entre um capacitor de um circuito elétrico (modelo Helmholtz) com a interface eletrodo/solução de uma célula eletroquímica.

A análise dos dados experimentais de impedância pode ser realizada através do diagrama de Nyquist (Fig. 11), no qual podem ser observados os valores da parte capacitiva representada pela componente imaginária (Z_{im}), em função da parte resistiva representada pela componente real (Z_{re}).

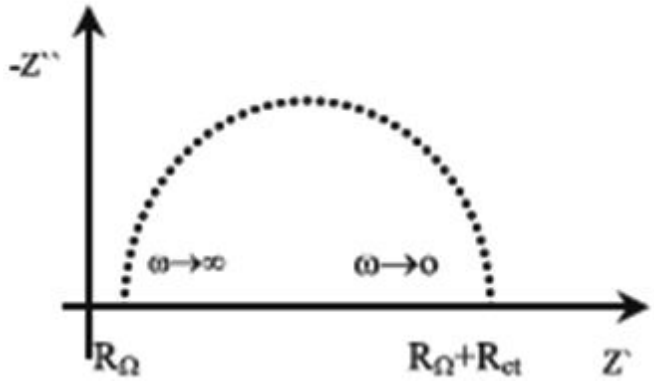


Figura 11 – Diagrama de Nyquist.

A EIE tem sido aplicada em diversos estudos, tais como cinética de eletrodo, estudos de dupla camada, processos em baterias, investigação sobre processos de corrosão, eletroquímica em estado sólido e bioeletroquímica (FEY *et al*, 2003; WANG e LI, 2001; SALKIND *et al*, 2003; CHENG *et al*, 2002).

As aplicações analíticas da EIE têm sido estendidas às investigações de hibridização de oligômeros de DNA, mediante o acompanhamento de impedância total do sistema. Estas investigações são possíveis, pois a impedância total do sistema esta associada ao aumento da componente capacitiva do sistema. Além disso, a componente capacitiva do sistema é resultante de mudanças na densidade e mobilidade de íons associados com a reação de hibridização (GUISEPPI-ELIE e GHEORGE, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a dengue é uma das mais importantes arboviroses humana e uma das grandes doenças emergentes contemporâneas. Nos últimos anos a dengue se tornou um grande problema não apenas de saúde publica, mas também de cunho econômico e social nas regiões tropicais e subtropicais que abrigam o vetor.

A preocupação do governo com relação à elevada incidência de casos de dengue cresce cada vez mais e segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, o estado registrou durante todo o ano de 2010 um crescimento de 511,46% no número de casos com suspeita de dengue clássica em comparação ao ano de 2009. Tem sido apontada como principal causa para este aumento vertiginoso a longa temporada de chuvas com baixa redução da temperatura, revelando o caráter sazonal e de baixo controle do vetor.

A principal forma de combate da doença é a prevenção, sendo a mesma realizada através da tentativa de erradicação do mosquito. Outro fator relevante é o fato de que os sinais e sintomas iniciais da infecção pelo vírus da dengue são similares com os de outras doenças o que dificulta o diagnóstico clínico e os métodos laboratoriais existentes apresentam várias limitações. Além disso, a doença até o momento não apresenta um tratamento especifico e um diagnóstico rápido e apropriado é de extrema importância para a implementação de um tratamento adequado.

Por suas características, um teste de diagnóstico impedanciométrico tem condições de vir a ser uma proposta adequada de um teste rápido, confiável e simples para dengue, que possa ser utilizado como uma ferramenta de diagnóstico complementar ao exame clínico. Por sua alta especificidade, em caso de resposta positiva o teste será idealmente também capaz de discriminar qual o subtipo do vírus presente, o que se constitui em importante informação clínica e epidemiológica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver um biossensor de diagnóstico aplicável para dengue.

3.2 Objetivos Específicos

- Síntese de nanopartículas condutoras com núcleo metálico;
- Avaliação das características eletroquímicas das sondas, *primers*, DNA e RNA viral em superfícies metálicas e modificadas quimicamente;
- Estudo das propriedades interfaciais da deposição do nanocompósito híbrido sobre superfície de eletrodo sólido (espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica);
- Determinação das correntes de pico anódicas e catódicas dos voltamogramas cíclicos;
- Utilização de técnicas de espectroscopia de impedância para caracterização da interação sonda e amostras de dengue.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e Reagentes

Para execução do presente trabalho foram adquiridos os seguintes reagentes: anilina (Ani - $C_6H_5NH_2$), 3-mercaptopropil-trimetoxi-silano (MPS - $C_6H_{16}O_6SSi$) e ácido cloroáurico hidratado ($HAuCl_4.xH_2O$) provenientes da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), e os sais foram fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ferrocianeto de potássio, ferricianeto de potássio e cloreto de potássio foram obtidos da VETEC. Todos os solventes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional. Os ácidos nucléicos foram gentilmente cedidos pela Dra. Marli Tenório (Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Lavite, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães). As sequências de bases de dengue (LANCIOTTI *et al*, 1992) para os sorotipos 1, 2 e 3 são:

Sequência tipo 1 (TS1) - 5´- CGTCTCAGTGATCCGGGGG - 3´

Sequência tipo 2 (TS2) - 5´- CGCCACAAGGGCCATGAACAG - 3´

Sequência tipo 3 (TS3) - 5´- TAACATCATGAGACAGAGC - 3´

Sequência complementar – genoma de pacientes classificado com os tipos 1, 2 e 3.

4.2 Síntese da Nanopartícula de ouro/polianilina (AuNpPANi)

Os compositos hibridos (fig. 12) foram obtidos de acordo com Melo e colaboradores (C. P *et al*, 2009). A preparação das AuNpPANi foi realizada num balão de fundo redondo contendo etanol (20 ml) e os componentes: anilina (0,030 mol/L), MPTS (6.46×10^{-2} mol/L) e $HAuCl_4.xH_2O$ (0, 81 mmol/L), os quais foram adicionados subsequentemente e mantidos sob agitação vigorosa (1,100 rpm) por um período de 48 h. Então as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12,000 rpm (para remover o ecesso de MPTS) e subsequentemente adicionado 500µL de 0,1 M de HCl para obtenção das cargas positivas da PANi e promover a hidrolise do MPTS presente no sistema AuNpPANi. O ácido cloroaurico trihidratado foi inserido para promover a oxidação do monômero, resultando na formação de uma nanopartícula metálica envolvida por um polímero condutor e o MPTS como agente estabilizante.

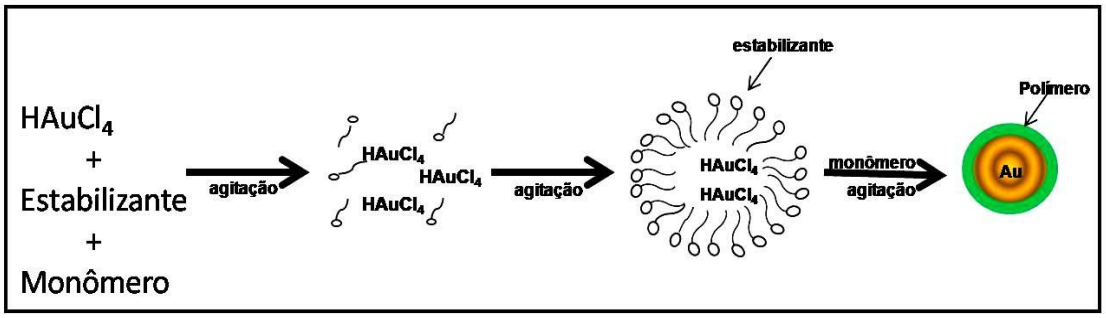


Figura 12- Representação esquemática da síntese das AuNpPANi.

4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O tamanhao e a distribuição das partículas resultantes foram avaliados através da miscroscopia eletrônica de transmissão (MET), as micrografias foram obtidas em uma aceleração de 80kV em um microscopio Tecnai G2 Spirit microscope (FEI Company, USA) euipado com uma câmera CCD.

4.4 Medidas de impedância eletroquímica

Os experimentos de EIE foram realizados no potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT302N (Holanda) com interface com um analisador *lock-in* numa célula convencional com três eletrodos.

O eletrodo de trabalho utilizado foi de ouro com diâmetro de 2mm, o contra eletrodo e o eletrodo de referência utilizados foram de platina e de Ag/AgCl saturado com KCl 3 M, respectivamente. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas numa solução de 10mM de ferro-ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) (1:1) numa faixa de frequência entre 100mHz a 100KHz com um potencial de amplitude alternada de 100mV. As medidas de impedância foram realizadas após cada etapa de modificação do eletrodo de trabalho. Após cada medida foram obtidos os diagramas de Nyquist, por meio de cálculos teóricos utilizando o programa FRA (Frequency Response Analyser) da Autolab (Eco Chemie B.V.).

4.5 Medidas de Correntes de picos catódicos e anódicos

Os experimentos de VC foram realizados utilizando o programa GPES (General Purpose Electrochemical System) da Autolab (Eco Chemie B.V.) após cada etapa de montagem do eletrodo na presença de um solução de 10mM de ferro-ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) (1:1) como indicador redox e potenciais de amplitude aplicados de -0,2V a 0,7V com velocidade de varredura de 50 mV/s. A partir desses experimentos foram obtidas as correntes de pico anódicas, catódicas e as áreas de cada voltamograma cíclico.

4.6 Montagem do Biossensor

Inicialmente o eletrodo de trabalho foi lixado, polido sobre um disco de feltro com uma suspensão de alumina com granulação de 0,05µm e colocado sob sonicação por 5 minutos sendo, posteriormente, submetido às medidas de VC e EIE. O eletrodo de trabalho foi imerso dentro de uma solução contendo AuNpPANi por um período de 5 min e em seguida submetido a medidas de VC e EIE.

Após a adsorção da AuNpPANi sob a superfície do eletrodo de ouro, o mesmo foi incubado por um período de 5 min numa solução contendo a sonda diluído em 100µL de tampão fosfato de sódio (TFS) pH 7,0 em água.

Para se determinar a concentração ideal de sonda a ser utilizado, foram avaliadas as respostas voltamétricas e impedanciométricas da sonda diluída em TFS nas concentrações de 1fM, 2fM, 3fM, 4fM e 5fM.

Posteriormente, o eletrodo de trabalho foi incubado no DNA complementar diluído em 100µL de TFS. A interação da sonda com o DNA foi avaliada através das respostas voltamétricas e impedanciométricas para as concentrações 3fM e 6fM.

Como sistema controle montou-se um sistema utilizando DNA não-complementar, de acordo com a seguinte sequência:

1. Limpeza do eletrodo de trabalho;
2. Medidas de VC e EIE;
3. Incubação do eletrodo na solução contendo AuNpPANi;
4. Medidas de VC e EIE;

5. Incubação do eletrodo na solução contendo a sonda;
6. Medidas voltamétricas e impedanciométricas;
7. Incubação do eletrodo de trabalho na solução contendo o DNA não-complementar;
8. Realização das medidas eletroquímicas.

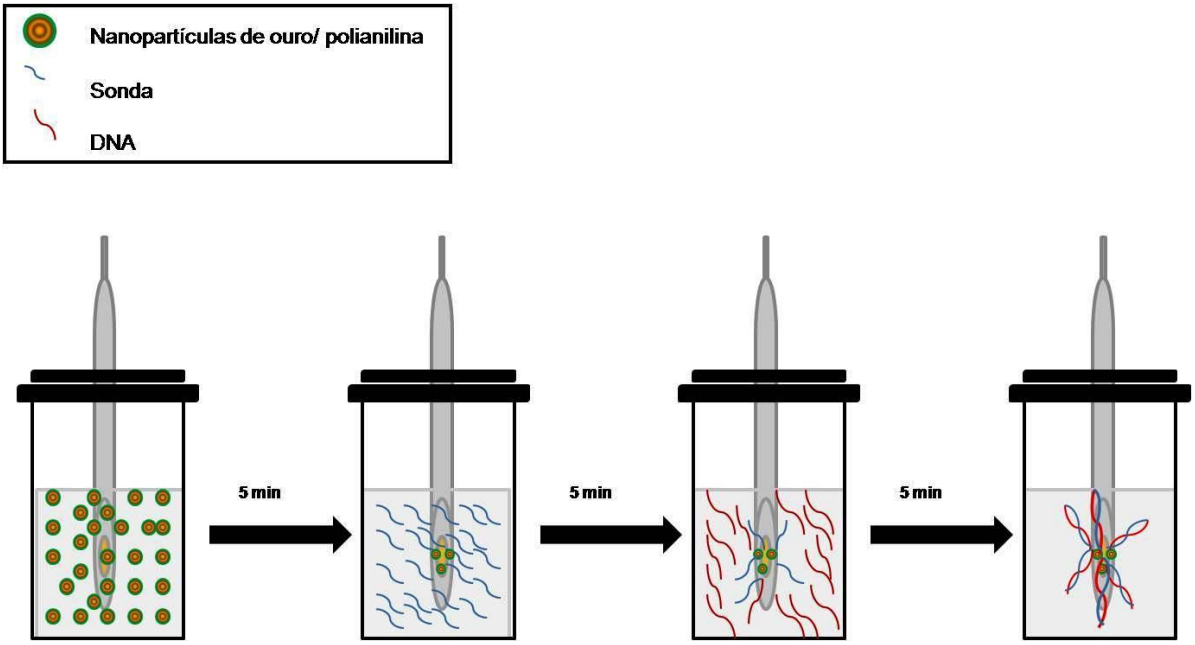


Figura 13 – Representação esquemática da montagem do biossensor.

4.6 Aspectos Éticos

Esta é uma pesquisa básica, voltado para o desenvolvimento de nanocompósitos híbridos para uso no diagnóstico rápido e como tal, não envolve qualquer experimentação com pacientes. Além disso, todo o material coletado de amostras de pacientes nos foi fornecido por colaboradores que têm as atividades de seus laboratórios devidamente autorizadas pelos Comitês de Ética de suas instituições de origem.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese das AuNpPANi

Na figura 14, temos a imagem da microscopia eletrônica de transmissão dos compósitos híbridos. Nós podemos observar na microscopia de campo claro e escuro a presença de materiais com diferentes eletrodensidades. Na microscopia de campo escuro é possível verificar a presença das nanopartículas de ouro, enquanto no campo claro é possível verificar que tais nanopartículas são envoltas pelas cadeias poliméricas. Na figura 14b observa-se partículas de ouro com pequena heterogeneidade e com diâmetro aproximado de 5nm.

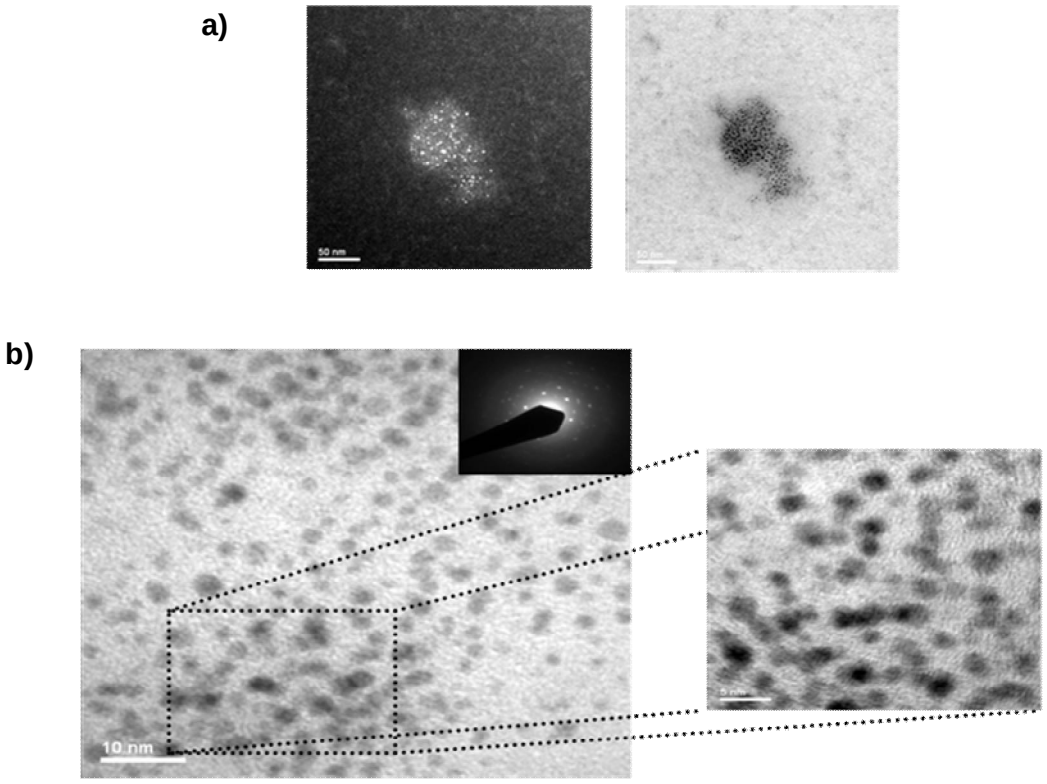


Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNpPANi em campo escuro e claro (a). Imagem de alta resolução dos AuNpPANi (b). Detalhe: difração de elétrons do AuNpPANi.

5.2 Determinação da concentração da sonda (TS1) e do DNA

Inicialmente foram realizadas análises de importantes variáveis para a construção do biossensor, tais como a concentração da sonda e a concentração do cDNA. O eletrodo foi incubado na solução contendo as AuNpPANi e, desta forma, ocorre a adsorção dessas partículas sob a superfície do eletrodo de ouro através da formação de ligações do grupo tiol (-SH) presentes na mercaptopropiltrimetoxisilano (que atua como estabilizante dos nanossistemas) com o ouro da superfície do eletrodo.

O uso de filmes poliméricos é satisfatório para imobilização de sondas de DNA, devido às características apresentadas por esses filmes como: facilidade de processamento pelo eletrodo modificado, aumento da área de contato das biomoléculas com o eletrodo o que permite uma maior acomodação da molécula, simulando uma ambiente natural e favorecendo rapidamente a conversão do sinal biológico para um sinal analítico com alta estabilidade e reprodutibilidade (SADKI *et al*, 2000; TLILI *et al*, 2005) .

Posteriormente, foram testadas várias concentrações de sonda (1fM, 2fM, 3fM, 4fM e 5fM) e em todas foi possível observar que ocorreu a imobilização da sonda sob a superfície do eletrodo modificado com as AuNpPANi (fig. 15a). Destacamos que a imobilização da sonda sob a superfície do eletrodo ocorre por meio de interação eletrostática das nanopartículas carregadas positivamente com os grupos fosfatos presentes da cadeia de DNA.

A fig. 15a apresenta os voltamogramas cíclicos para as cinco concentrações testadas, onde é possível observar uma diminuição dos picos anódicos e catódicos e um aumento na separação dos picos. A separação apresentada pode estar associada à imobilização da sonda e a perturbação na transferência de elétrons na interface eletrodo/solução.

No diagrama de Nyquist (fig. 15b) observamos que em todas as concentrações analisadas ocorreu um aumento no diâmetro do semicírculo, indicando um aumento na resistência à transferência de elétrons na superfície do eletrodo. Neste mesmo diagrama é perceptível que o limite de detecção do genoma utilizando o sistema AuNpPANi é na faixa de fentomolar.

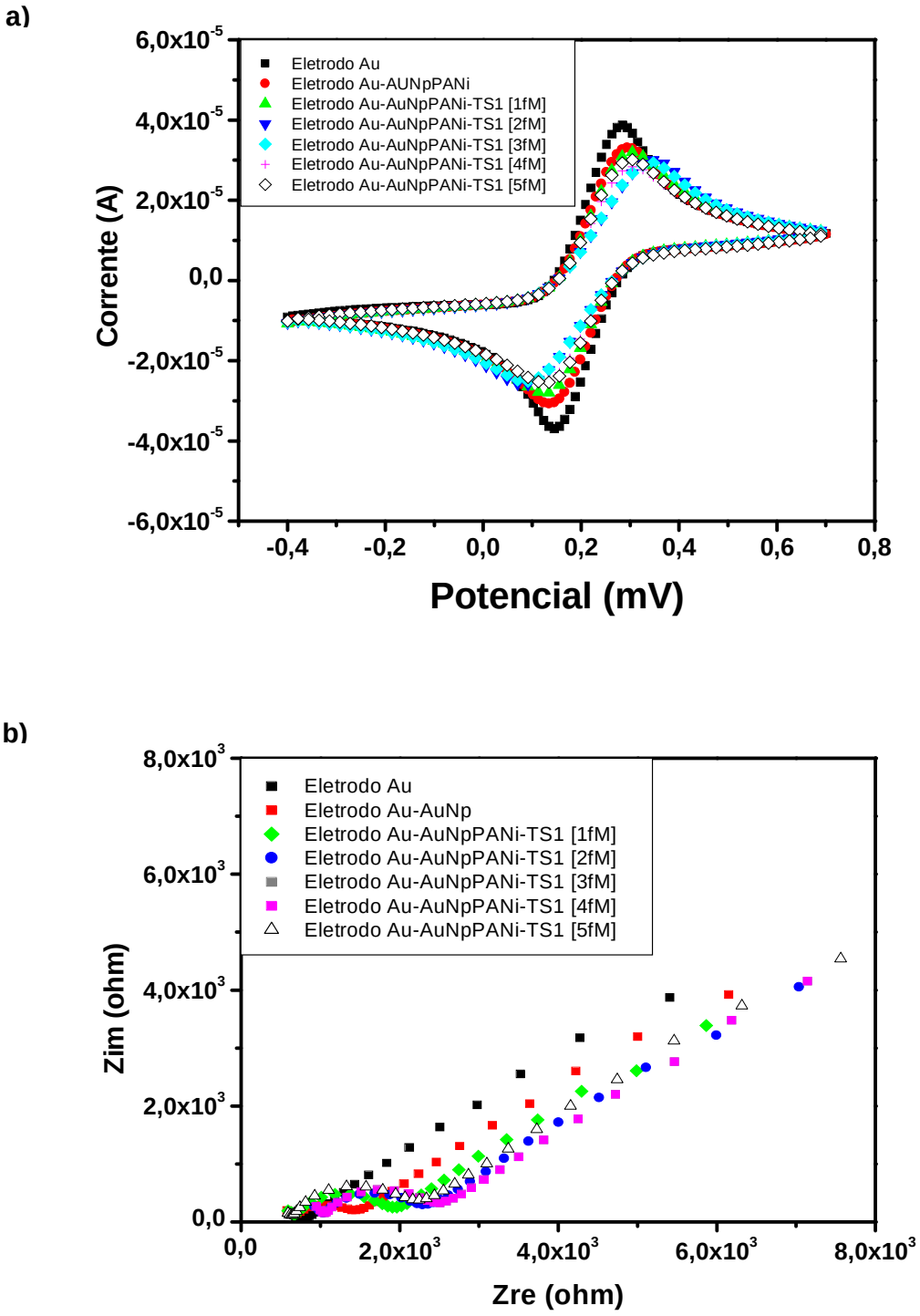
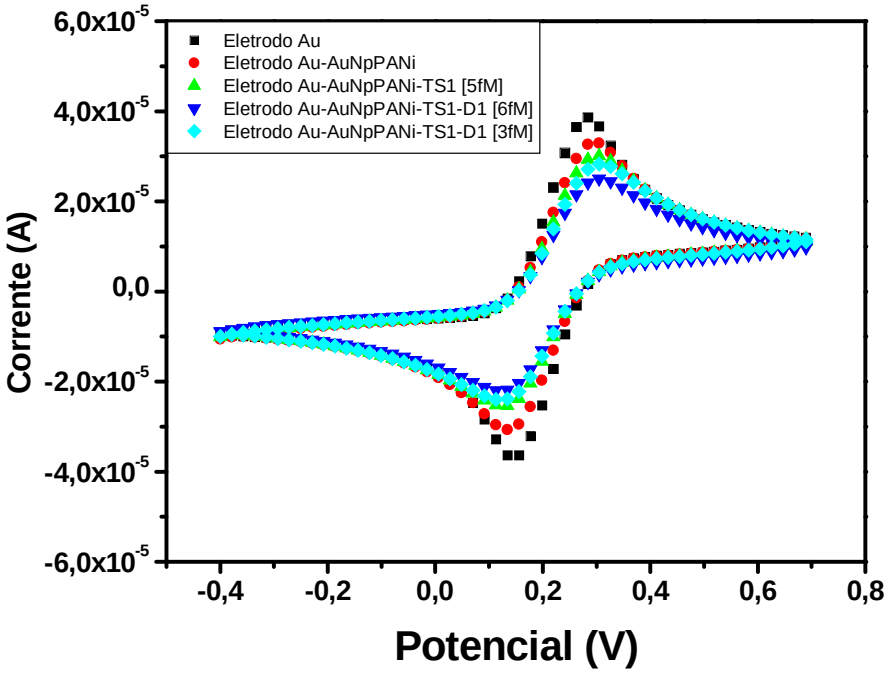


Figura 15 – Voltamogramas cíclicos (a) e diagramas de Nyquist (c) do sistema Au-AuNpPANi-TS1.

O efeito da interação da concentração do DNA com a sonda foi outro parâmetro analisado. O DNA alvo foi dissolvido em tampão fosfato de sódio pH 7,4 para garantir a neutralidade do meio e garantindo dessa forma a integridade do DNA. Para essa análise foram testadas duas concentrações: 3fM e 6fM. Podemos observar no voltamograma cíclico (fig. 16a) que para a concentração de 6fM ocorre uma diminuição dos picos anódico e catódico, indicando que houve uma diminuição na resposta amperométrica do eletrodo e resultando em uma saturação do mesmo. Resultado semelhante pode ser observado no diagrama de Nyquist (fig. 16b) que demonstra um aumento marcante da resistência a transferência de elétrons quando sistema está em contato com a concentração de 6fM, devido a um bloqueio da superfície do eletrodo. Dessa forma, passamos a trabalhar com a concentração de DNA complementar de 3fM, pois utilizando esta concentração observamos já é possível observar uma resposta do sistema, sem que ocorra a saturação do eletrodo.

a)



b)

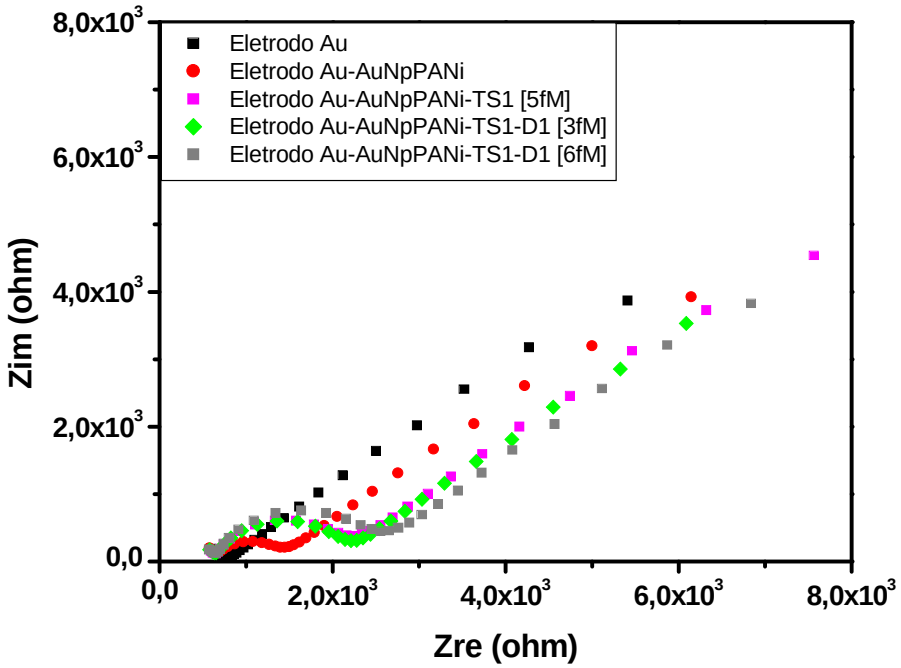


Figura 16 - Voltamogramas cíclicos (a) e Diagrama de Nyquist (b) da avaliação da concentração de DNA.

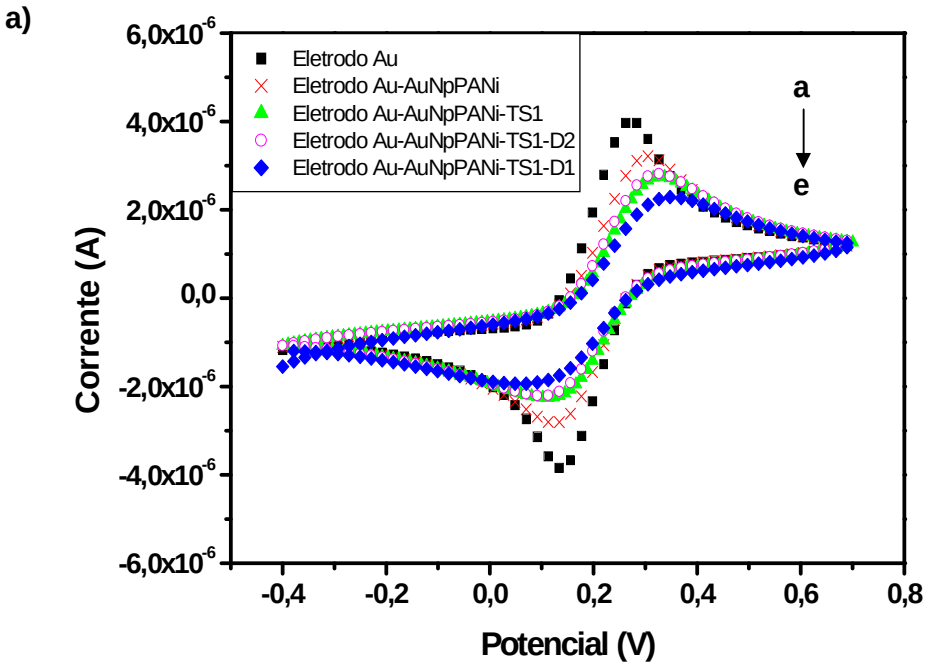
5.3 Detecção Eletroquímica de DEN1-3 utilizando o eletrodo modificado com AuNpPANI-TS1-3

A VC é uma técnica utilizada para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos, sendo a transferência de elétrons do $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ uma valiosa ferramenta para monitorar todo o processo de fabricação do eletrodo, pois quando a superfície do eletrodo é modificada ocorre uma perturbação na cinética de transferência de elétrons de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$.

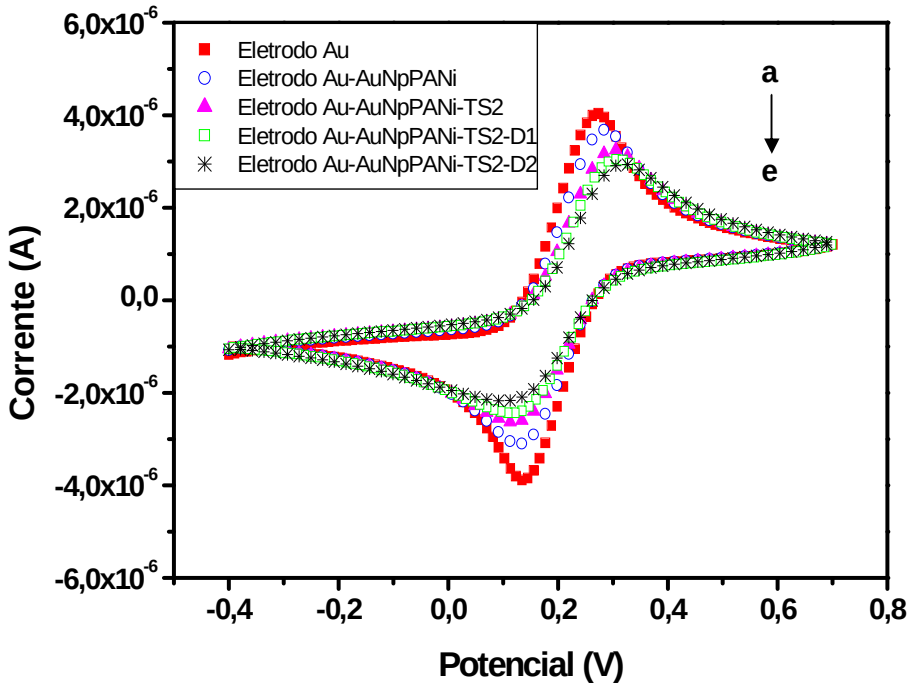
A fig. 17 mostra as mudanças na resposta voltamétrica em diferentes estágios do eletrodo modificado numa solução de tampão fosfato de sódio contendo 10mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ com uma velocidade de varredura de 50mV/s. Na figura observamos o processo de difusão de elétrons controlada pelo par redox na superfície do eletrodo de ouro característico de um eletrodo limpo, o qual apresenta valores de pico anódico de 0,274V e catódico de 0,136V (curva a). Depois que ocorreu a adsorção das nanopartículas é possível observar uma diminuição dos picos anódico e catódico resultado da modificação no processo de transferência de elétrons (curva b). A curva c mostra o comportamento eletroquímico do

$K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ após a imobilização da sonda de DNA (TS1-3) sob o eletrodo de ouro modificado. A corrente de pico da curva c é menor quando comparado com a curva b, indicando que as sondas de DNA foram imobilizadas sobre a superfície do eletrodo modificado (Fig. 17a-c). Após a imobilização da sonda ocorre uma diminuição dos picos anódico e catódico, que é resultado da formação uma camada automontada sob a superfície do eletrodo que bloqueia a passagem de elétrons e consequentemente diminuindo a resposta amperométrica do eletrodo.

Alguns autores também relatam que esta diminuição da resposta amperométrica pode estar associada ao aumento das cargas negativas provenientes dos esqueletos fosfatos do DNA que geram uma repulsão eletrostática do $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6$ (Du *et al*, 2009). Dessa forma o $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6$ não alcança a superfície do eletrodo dificultando a transferência de elétrons entre a interface eletrodo/solução. Quando ocorre o processo de hibridização na superfície do eletrodo modificado pode ser observada uma diminuição adicional nas correntes de pico, pois com a adição do DNA complementar (D1-3) aumenta as cargas negativas provenientes dos esqueletos fosfatos que são responsáveis por aumentar a repulsão do par redox. Como mostra a curva d, quando é introduzido o DNA – não complementar no sistema $AuNpPAN\text{-}DNA_{sonda}$ não é observado variação nas respostas amperométricas, demonstrando que não há reconhecimento específico do sensor para esta amostra.



b)



c)

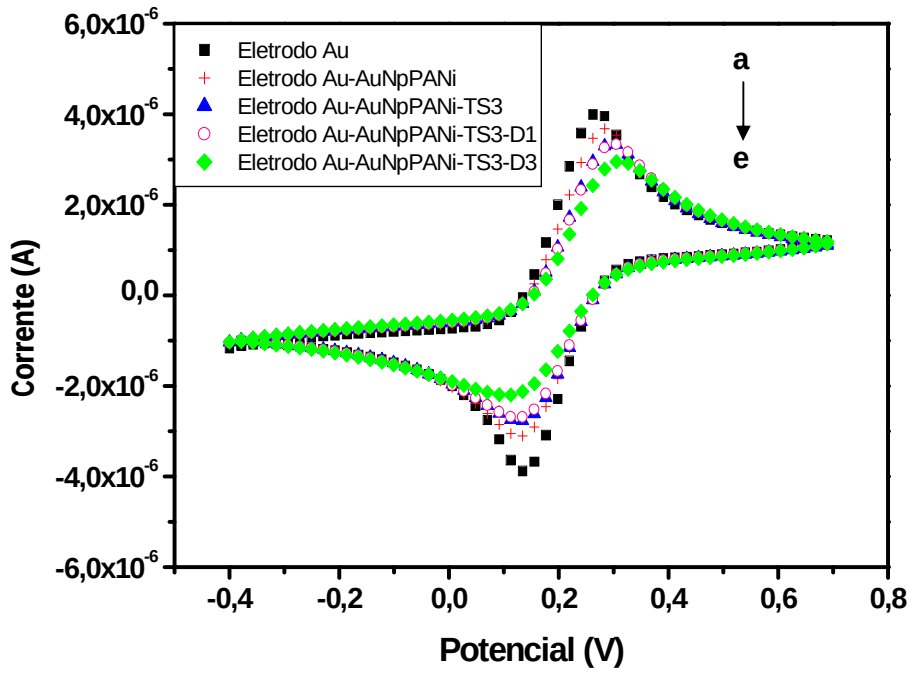


Figura 17 – Voltamogramas Cíclicos do sistema de detecção do sorotipo 1 da dengue (a); sistema de detecção do sorotipo 2 da dengue (b) e sistema de detecção do sorotipo 3 da dengue (c).

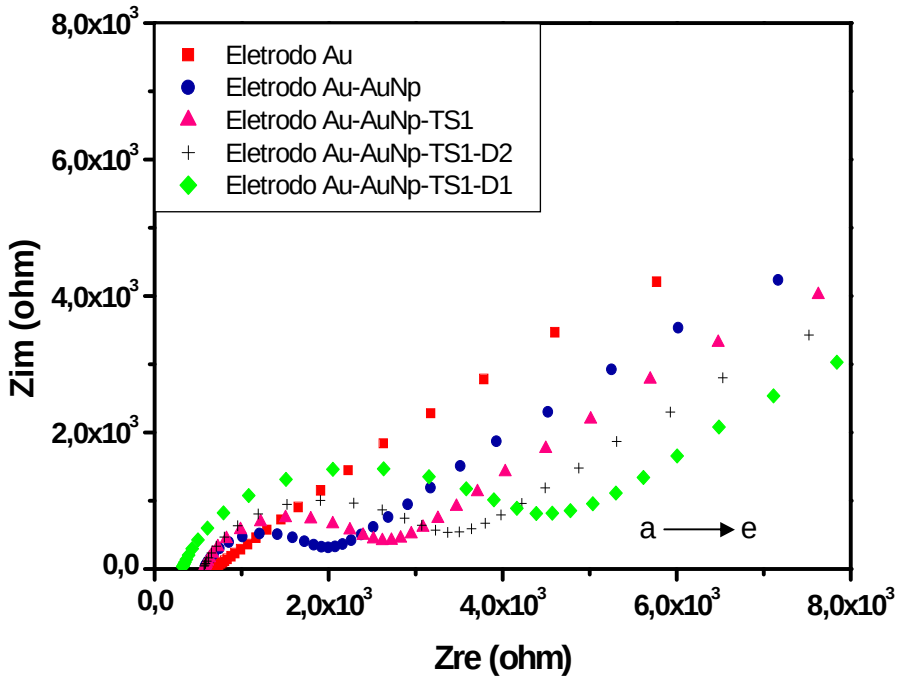
A EIE fornece informações adicionais sobre as mudanças na impedância da superfície do eletrodo modificado durante o processo de fabricação do biossensor. No diagrama de Nyquist, o diâmetro do semicírculo corresponde à resistência a transferência de elétrons, Rte. Por sua vez, esta controla a cinética de transferência de elétrons do par redox na interface do eletrodo.

Na fig. 18a-c mostra os diagramas de Nyquist após cada passo da montagem do biossensor numa solução de tampão fosfato de sódio contendo 10mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ com freqüência de 100mHz a 100KHz com amplitude alternada de 10 mV. Uma linha quase reta pode ser observada para o eletrodo de ouro limpo, característica típica de uma difusão de massa controlada pelo processo de transferência de elétrons. A montagem da camada das AuNpPANi na superfície do eletrodo induz um aumento interfacial da resistência a transferência de elétrons (curva b) quando comparado com o eletrodo de ouro limpo indicando que ocorreu um bloqueio a passagem de elétrons na superfície do eletrodo.

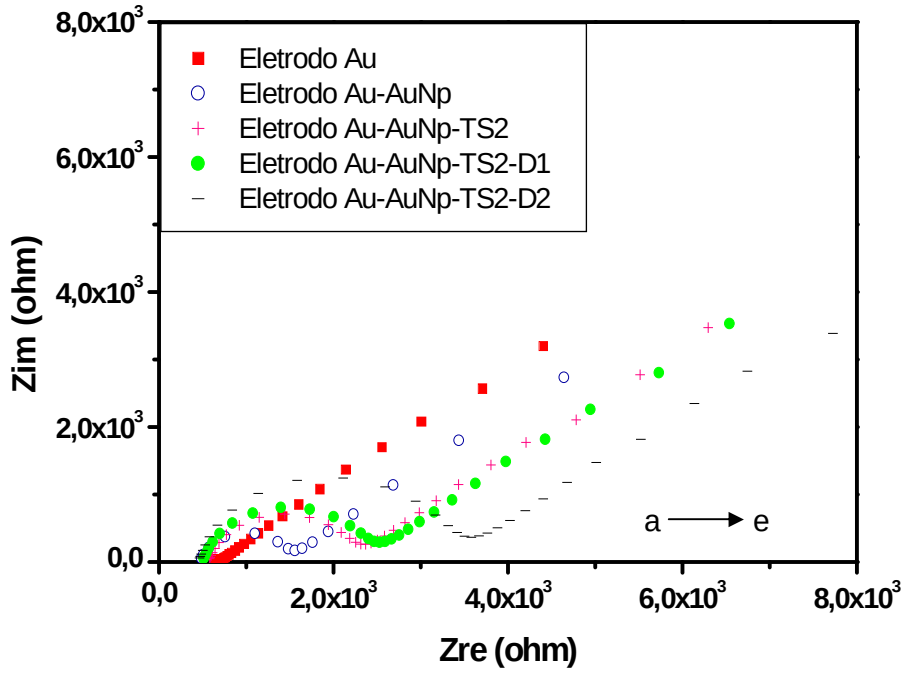
Modificações dos valores do Rte denotam a imobilização da sonda de DNA na superfície do eletrodo, porque após a imobilização da sonda de DNA ocorre um aumento de Rte (curva c). Desta forma, os grupos fosfatos do DNA negativamente carregados impedem o $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ de se aproximar da superfície do eletrodo, conduzindo a um aumento de Rte. Após o processo de hibridização da sonda de DNA (TS1-3) com o DNA complementar (D1-3) na superfície do eletrodo modificado com AuNpPANi-DNA_{sonda} é observado um aumento adicional de Rte (curva e)**.** A introdução do DNA complementar aumenta as cargas negativas dos grupos fosfatos que é responsável por aumentar a repulsão do $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$, sendo que a deposição de material na superfície do eletrodo faz com que ocorre a formação de uma camada que bloqueia parcialmente a transferência de elétrons na superfície do eletrodo (FENG *et al*, 2008; ZHANG *et al*, 2009). Dessa forma, as diferenças nos valores de Rte entre o eletrodo híbrido e o eletrodo com a sonda pode ser utilizado para avaliar o processo de hibridização. Como mostra a curva d, quando o DNA – não complementar esta em contato com o sistema AuNpPAN-DNA_{sonda} não é observado grandes variações no valor de Rte quando comparado com a curva e, demonstrando que não há reconhecimento específico do sensor para esta amostra. Na EIS dos sistemas analisados pode ser

observado que os resultados estão de acordo aos encontrados na voltametria cíclica.

a)



b)



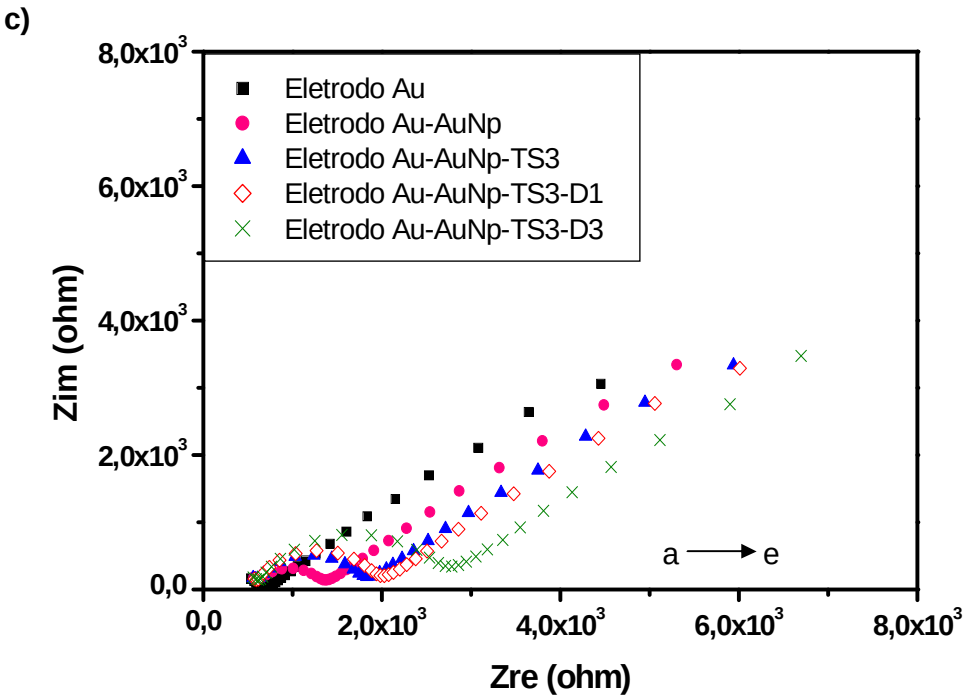


Figura 18 – Diagramas de Nyquist do sistema de detecção do sorotipo 1 da dengue (a); sistema de detecção do sorotipo 2 da dengue (b) e sistema de detecção do sorotipo 3 da dengue (c).

Os métodos de detecção eletroquímica baseados em VC e EIE têm sido amplamente utilizados na clínica como, por exemplo, detecção impedânciometrica de DNA de Influenza A (H1N1) (BONANNI *et al*, 2010), imunossensor de citocina para detecção de esclerose múltipla (LA BELLE *et al*, 2007), detecção de glicose (YAN *et al*, 2008).

Portanto, a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica são ferramentas valiosas e rotineiramente utilizadas para o desenvolvimento de biossensores clínicos. O grande interesse na aplicação dos métodos eletroquímicos para a construção de biossensores clínicos vem da elevada sensibilidade, baixo custo e compatibilidade da tecnologia de fabricação.

6 CONCLUSÃO

Os sistemas EAu-AuNpPANi-TS1-3 foram capazes de detectar qualitativamente os sorotipos I, II e III do vírus da dengue respectivamente, evidenciando que o sensor possui uma boa sensibilidade e especificidade. No processo de montagem do biossensor a deposição do material sobre a superfície do eletrodo forma uma camada automontada que bloqueia a passagem de elétrons na superfície do eletrodo. Esse processo é bem evidenciado nos voltamogramas cíclicos onde a cada passo de modificação da superfície do eletrodo ocorrem alterações das curvas de VC decorrentes da diminuição da resposta amperométrica do eletrodo. As análises de impedância eletroquímica assim como os dados de VC demonstraram o bloqueio parcial da superfície do eletrodo após a adsorção das nanopartículas e um aumento progressivo do bloqueio após cada passo de modificação, levando a um aumento da resistência a transferência de elétrons na interface eletrodo/solução.

7 REFERÊNCIAS

AHMED, Altaf. Diagnosing Dengue Fever. **Infectious Diseases Journal of Pakistan**. v.14, n. 9, p. 129-132, 2005.

AVIRUTNAN, Panisadee *et al*. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. **The Journal of Infectius Diseases**. v.193, n. 8, p.1078–1088, 2006.

AVIRUTNAN, Panisadee; MEHLHOP, Erin; DIAMOND, Michael S.; Complement and its Role in Protection and Pathogenesis of Flavivirus Infections. **Vaccine**. v.30, s.8, p.100-107, 2008.

BAEUMNER, Antje J.; SCHLESINGER, Nicole A.; SLUTZKI, Naomi S.; ROMANO, Joseph.; Lee, Eun Mi; MONTAGNA, Richard A. Biosensor for Dengue Virus Detection: Sensitive, Rapid, and Serotype Specific. **Analyical Chemistry**. v.74, n. 6, p.1442-1448, 2002.

BALLERSTADT, Ralph; EVANS, Colton; MCNICHOLS, Roger; GOWDA, Ashok. Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 22, n.2, p. 275-284, 2006.

BONANNI, A.; PIVIDORI, M. I.; DEL VALLE, M. Impedimetric detection of influenza A (H1N1) DNA sequence using carbon nanotubes platform and gold nanoparticles amplification. **Analyst**. v. 135, n.7, p.1765-1772, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas.** - 3˚. Ed., ver. - Ministério as Saúde: Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 84 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão**. Dengue: diagnóstico e manejo clínico – Adulto e Criança/** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 3. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2007. 28 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-85-334-1428-0.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 816 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). ISBN 85-334-1047-6.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Cyclic Voltammetry and Linear Sweep Techniques. **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications**. Oxford University Press, 1996, Cap. 9, p. 174.

BRETT, C. M. A. Electroanalytical Techniques for the Future: The Challenges of Miniaturization and of Real-Time Measurements. **Electroanalysis**. v. 11, n. 14, p. 1013-1016, 1999.

BURKE, Nicholas A. D.; STOVER, Harald D. H.; DAWSON, Francis P. Magnetic Nanocomposites: Preparation and Characterization of Polymer-Coated Iron Nanoparticles. **Chemistry of Materials**. v. 14, n. 11 p. 4752-4761, 2002.

C.P. de Melo; dos Santos, C.G.; Andrade, C.A.S. **Fluorescent nanoparticle composites themselves, process for the preparation of such composites, and use in rapid diagnosis systems with affinity to biological molecules,** Patent PCT/BR2009/000117, 2009.

CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, Rachna; SHRIVASTAVA, Richa. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 47, n. 2, p.155-166, 2006.

CHENG, Tzong-Jih; LIN, Tsun-Mei; CHANG, Hsien-Chang. Physical adsorption of protamine for heparin assay using a quartz crystal microbalance and electrochemical impedance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**. v.462, n. 2, p. 261-273, 2002.

CIRNE E PATACAS, Rafael. **Desenvolvimento, Caracterização e Optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de Nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. 2007. 127 f. Dissertação. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

D'ORAZIO, Paul. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**. v. 334,n. 1-2, p. 41-69, 2003.

DE MELO, C. P.; PIMENTA, Marcos. Nanociências e nanotecnologia. **Revista Parcerias Estratégicas**. n. 18, p. 9-21, 2004DE PAULA, Sérgio Oliveira; FONSECA, Benedito Antônio Lopes. Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 8, n. 6, p 390-398, 2004.

DONG, S., LUO, G., FENG, J., LI, Q.W., GAO, H. Immunoassay of Staphylococcal enterotoxin C_1 by Ftir spectroscopy and electrochemical gold electrode. **Eletroanalysis**. v.13, n. 1, p. 30-33, 2001.

DU, Ping; LI, Hongxia, MEI, Zhenhua, LIU, Shufeng. Electrochemical DNA biosensor for the detection of DNA hybridization with the amplification of Au nanoparticles and CdS nanoparticles. **Bioelectrochemistry**. v. 75, n. 1, p. 37-43, 2009.

ESTEVES, Ana Catarina C.; BARROS-TIMMONS, Ana; TRINDADE, Tito. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.

FAEZ, Roselena; REZENDE, Mirabel C.; MARTIN, Inácio M.; DE PAOLI, Marco-A. Polímeros Condutores Intrínsecos e Seu Potencial em Blindagem de Radiações Eletromagnéticas**. Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 10, n. 3, p. 130-137, 2000.

FENG, Yuanyuan; YANG, Tao; ZHANG, Wei; JIANG, Chen; JIAO, Kui. Enhanceed sensitivity for deoxyribonucleic acid electrochemical impedance sensor: Gold nanoparticle/polyaniline nanotube membranes. **Analythica Chimica Acta**. v. 616, n. 2, p. 144-151, 2008.

FEY, George Ting-Kuo; LU, Cheng-Zhang; KUMAR, T. Prem. Solid-state synthesis and electrochemical characterization of LiM*y*Cr0.5−*y*Mn1.5O4 (M = Fe or Al; 0.0 < y < 0.4) spinels. **Materials Chemistry and Physics**. v. 80, n. 1, p. 309-318, 2003.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu M. Febres Hemorrágicas por vírus no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 2, p. 203-210, 2006.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu M. **Patogenia das Infecções pelo Vírus da Dengue**. Medicina, Ribeirão Preto. v. 32, cap.1, p. 15-20, 1999.

FLEMING Michael S.; MANDAL, Tarun K.; WALT, David R. Nanosphere-Microsphere Assembly: Methods for Core-Shell Materials Preparation. **Chemistry of Materials**. v. 13, n.6, p. 2210-2216, 2001.

FORATINI, Oswaldo Paulo. Identificação de Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) no Brasil. **Revista de Saúde Pública de São Paulo.** v. 20, n. 3, p. 244-245, 1986.

GANGOPADHYAY, Rupali; DE, Amitabha. Conducting Polymer Nanocomposites: A Brief Overview. **Chemistry of Materials**. v. 12, n. 3, p. 608-622, 2000.

GIBBONS, R. V; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **British Medical Journal**. v. 324, n. 7353, p. 1563-1566, 2002.

GILMAN, Jeffrey W.; JACKSON, Catheryn L.; MORGAN, Alexander B. HARRIS, Richard Jr. Flammability Properties of Polymer-Layered-Silicate Nanocomposites. Polypropylene and Polystyrene Nanocomposites. **Chemistry of Materials**. v. 12, n. 7, p. 1866-1873, 2000.

GUBLER, Duane J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUISEPPI-ELIE, A.; GHEORGE, M. Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, n. 2, p. 95-102, 2004.

GUZMAN, Maria G.; KOURI Gustavo. Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 3, n. 8, p. 621-627, 1996.

GUZMAN, Maria G.; KOURI Gustavo. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

GUZMÁN, María G.; KOURÍ, Gustavo. Dengue: an update. **THE LANCET Infectious Diseases**. v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

HENCHAL, Erik A.; PUTNAK, J. Robert. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HSIUE, Ging Ho; LIU, Ying Ling; LIAO, Hsin Hao. Flame-Retardant Epoxy Resins: An Approach from Organic–Inorganic Hybrid Nanocomposites. **Journal of Polymer Science**. v. 39, n 7, p 986-996, 2001.

JIANG, Hongwei; KAKKAR, Ashok K. An Alternative Route Based on Acid-Base Hydrolytic Chemistry to NLO Active Organic-Inorganic Hybrid Materials for Second-Order Nonlinear Optics**. Journal of the Americam Chemistry Society**. v. 121, n. 15, p. 3657-3665, 1999.

KAO, Liang-Chuan; KING Chwan-Chuen; CHAO Day-Yu; WU, Hui-Lin; CHANG, Gwong-Jen J. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal Microbiology Immunology and Infection**. v.38, n. 1, p. 5-16, 2005.

KAPPEL, Nina D.; PROLL, Florian; GAUGLITZ, Guenter. Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 22, n.9-10, p. 2295-2300, 2007.

KATZ, E.; WILLNER, L. Probing biomolecules interections of conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: rantes to impedimetric immunosensors, DNA – sensors, and enzyme biosensors. **Eletroanalysis**. v. 15, n. 11, p. 913-947, 2003.

KAUFFMANN, Jean-Michel. Biosensors: Unique Tools in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. **FABAD Journal Pharmaceutical Sciences**. v. 28, p. 107-112, 2003.

KISSENGER, Peter T.; HEINEMAN, William R. Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**. v. 60, n. 9, p. 702-706, 1983.

KURANE, Ichiro; TAKASAKI, Tomohiko. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**. v. 11, n. 5, p. 301–311, 2001

LA BELLE, Jeffrey T.; BHAVSAR, Kinjal; FAIRCHILD, Aaron; DAS, Anusuya; SWEENEY, James; ALFORD, T. L.; WANG, Joseph; BHAVANANDAN, Veer P.; JOSHI, Lokesh. A cytokine immunosensor for multiple sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 23, n. p.428-431, 2007.

LANCIOTTI, Robert S.; CALISHER, Charles H.; GUBLER, Duane J.; CHANG, Gwong-Jen; VORDAM, Vance. Rapid Detection and Typing of Denge Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal Electroceramics**. v. 16, n.1, p. 79-91, 2006.

LUPI, O.; TYRING, S. K. Tropical dermatology: Viral tropical diseases**. Journal American Academy of Dermatology**. v. 49, n. 6, p. 979-1000, 2003.

MARAGOS, C. M.; BUSMAN, M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. **Food Additives and Contaminants**. v. 27, n. 5, p. 688-700, 2010.

MATTOSO, Luiz Henrique C. Polianilinas: Síntese, Estrutura e Propriedades. **Química Nova**. v. 19, n. 4, p. 388-396, 1996.

MCBRIDE, William J.H.; BIELEFELDT-OHMANN, Helle. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection.** v. 2, n. 9, p. 1041-1050, 2000.

MORENS, David M; FAUCI, Anthony S. Dengue and Hemorrhagic Fever: A Potential Threat to Public Health in the United States. **JAMA.** v. 299, n. 2, p. 214-216, 2008.

OLIVEIRA, R. L.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, A. M. B.; FAILLOUX, A.B. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of Aedes albopictus from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. **Americam Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 69, n. 1, p.105-114, 2003.

Organização Panamericana da Saúde. **Diretrizes relativas à prevenção e ao controle da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas.** Relatório da Reunião sobre Diretrizes para Dengue. Washington, 16-20 de dezembro 1991. Washington: 1991.

PEJCIC, Bobby; DE MARCO, Roland. Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. **Electrochimica Acta.** v. 51, n. 8, p. 6217–6229, 2006.

ROGERS, K. R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta.** v. 568, n. 1-2, p. 222–231, 2006.

SADKI, Saïd; SCHOTTLAND, Philippe; BRODIEC, Nancy; SABOURAUD, Guillaume. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**. v. 29, n. 5, p. 283-293, 2000.

SALKIND, Alvin J.; SINGH, Pritpal; CANNONE, A.; ATWATER, Terrill; WANG, Xiquan; REISNER, David. Impedance modeling of intermediate size lead–acid batteries. **Journal of Power Sources**. v. 116, n. 1-2, p.174-184, 2003.

SANTOS, Liana Rita Marques. **Estudo da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica na análise dos copolímeros de enxerto.** 1994. 66 f. Dissertação. UNICAMP. Campinas.

SANTOS, Omar Lupi Rosa, O. **Contribuição ao Estudo da Infecção pelo Vírus da Dengue com Enfoque Especial nas suas Manifestações Mucocutâneas**. 2007. 80 f. Monografia. Academia Fluminense de Medicina. Rio de Janeiro.

SLUYTERS-REHBECH, M. Impedances of electrochemical systems: terminology, nomenclature and representation. **Pure Applied Chemistry**. v. 66, n. 9. p.1831-1891, 1994.

TEIXEIRA, Maria da Glória; BARRETO, Maurício Lima; GUERRA, Zouraide. **Epidemiologia e Medidas de Prevenção da Dengue.** Informe Epidemiológico SUS. v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TELES, F.R.R.; PRAZERES, D.M.F.; LIMA-FILHO, J.L. Trends in dengue diagnosis. **Reviews in Medical Virology**. v. 15, n. 5, p. 287-302, 2005.

TLILI, Chaker; KORRI-YOUSSOUFI, Hafsa; PONSONNET, Laurence; MARTELET, JAFFREZIC-RENAULT, Claude, Nicole J. Electrchemical impedance probing of DNA hybridization on oligonucleotide-functionalised polypyrrole. **Talanta**. v. 68, n.1, p, 131-137, 2005.

UNICEF/UNDP/WORLD/BANK/WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition**.144 p., 2009. ISBN 978 92 4 154787 1.

VÄLIMAA, Anna-Liisa; KIVISTÖ, Anniina T.; LESKINEN, Piia I.; KARP, Matti T. A novel biosensor for the detection of zearalenone family mycotoxins in milk. **Journal of Microbiological Methods**. v. 80, n. 1, p.44-48, 2010.

VELASCO-GARCIA, Maria N.; MOTTRAM, Toby. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. **Biosystems Engineering**. v. 84, n.1, p. 1-12, 2003.

VENE, Sirkka; MANGIAFICO, Joseph; NIKLASSON, Bo. Indirect immunofluorescence for serological diagnosis of dengue virus infections in Swedish patients. **Clinical and Diagnostic Virology**. v. 4, n.1, p. 43-50, 1995.

WANG, Liying; SUN, Yin; WANG, Jian, WANG, Jing; YU, Aimin; ZHANG, Hanqi; Song, Daqian. Water-soluble ZnO–Au nanocomposite-based probe for enhanced protein detection in a SPR biosensor system. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 351, n. 2, p. 392-397, 2010.

WANG, Qian; LI, Nanqiang. Electrocatalytic response of norepinephrine at a thiolactic acid self-assembled gold electrode. **Talanta**. v. 55, n. 6, p. 1219-1225, 2001.

WU, Shuenn-Jue L.; LEE, Eun Mi; PUTVATANA, Ravithat; SHURTLIFF, Roxanne N.; PORTER, Kevin R.; SUHARYONO, Wuryadi; WATTS, Douglas M.; KING, Chwan-Chuen, MURPHY, Gerald S.; HAYES Curtis G.; ROMANO, Joseph W. Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 8, p. 2794-2798, 2001.

XIAN, Y.; HU, Y.; LIU, F.; XIAN, Y.; WANG, H.; JIN, L. Glucose biosensor based on Au nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 21, n. 10, p. 1996-2000, 2006.

YAN, Wei; FENG, Xiaomiao; CHEN, Xiaojun; HUO, Wenhhua; ZHU, Jun-Jie. A super highly sensitive glucose biosensor based on Au nanoparticles-AgCl@polyaniline Hybrid material. **Biosensor and Bioelectronics**. v. 23, n. ,p. 925-931, 2008.

YOUNG, Paul R.; HILDITCH, Paige A.; BLETCHLY, Cheryl; HALLORAN, Wendy. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. **Journal of Clinical Micribiology**. v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

ZHANG, Yuzhong; ZHANG, Keying; MA, Haiyan. Electrochemical DNA Biosensors Based on Gold Nanoparticles/Cysteamine/Poly(glutamic acid) Modified Electrode. **American Journal Biomedical Sciences**. v. 2, n. 2, p. 115-125, 2009.