



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

PRISCILA DIAS MENDONÇA

**NANO-HÍBRIDO DE CARBONO APLICADO EM
IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DA
PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DA DENGUE**

Recife - PE
2016

PRISCILA DIAS MENDONÇA

**NANO-HÍBRIDO DE CARBONO APLICADO EM
IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DA
PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DA DENGUE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco PPGEB/UFPE, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

ORIENTADORA: Profa. Rosa Amalia Fireman Dutra

Recife-PE
2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária Valdicea Alves, CRB-4 / 1260

M539n Mendonça, Priscila dias.
 Nano-híbrido de carbono aplicado em imunossensor para detecção da
 proteína ns1 do vírus da dengue / Priscila dias Mendonça. - 2016.
 70 folhas, Il., Tabs e Abr. Sigl.

 Orientadora: Profa. Dr^a Rosa Amalia Fireman Dutra.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2016.
 Inclui Referências.

 1. Engenharia Biomédica. 2. Dengue. 3. NS1. 4. Imunossensor.
 5. Nanotubos de carbono. 6. Nano-híbrido. I. Dutra, Rosa Amalia Fireman.
 (Orientadora). II. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2016-282

Priscila Dias Mendonça

NANO-HÍBRIDO DE CARBONO APLICADO EM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA NS1 DO VÍRUS DA DENGUE

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: _____

Profa. Dra. Rosa Amalia Fireman Dutra, Doutora pela
(Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo, PPGEb - UFPE
Doutor pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil

Dra. Erika Cristina de Lima Soares, LEB – UFPE
Doutora pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil

Coordenador do PPGEb: _____

Profa. Dra. Rosa Amalia Fireman Dutra

Recife, junho de 2016.

A todos os pesquisadores que passam, horas, dias, semanas, meses e anos
buscando ajudar a humanidade de forma grandiosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida, que me ajudaram durante todo o tempo deste curso possibilitando o término com êxito.

À minha orientadora Prof^a. Rosa Amalia Fireman Dutra, pela sua confiança, paciência e enorme assistência e disponibilidade em cada momento deste curso.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio e por sempre me incentivar na jornada pelo conhecimento.

À minha amiga e colega de pesquisa Elaine Vaz, pela ajuda enorme e disponibilidade para com minha pesquisa e pelos bons momentos de estudo e amizade no dia a dia.

Aos colegas de laboratório pelo auxílio e suporte quando era necessária, principalmente a Erika Lima que é mais que uma colega, uma amiga que me ajudou desde o primeiro dia que entrei no LAPED, o meu carinho agradecimento por tudo, e a Blanca Azucena por sempre me auxiliar no entendimento da pesquisa.

Ao meu amigo e namorado Reiga Ramalho pelo seu carinho, paciência e consolações nos momentos difíceis.

À minha amiga e colega de apartamento, Gabrielli Maria pelo apoio e carinho em muitos momentos desse mestrado.

Aos colegas e amigos do mestrado, principalmente a Vicente Júlio, Lorena Bezerra, Jéssika Fernanda, Diego Ricardo, Josineide Neri e Jadiel Nascimento pelo apoio e cumplicidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e CNPQ pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa, ao Instituto Federal de Maceió e ao Departamento de Física.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

RESUMO

A dengue é uma doença viral considerada um dos maiores problemas de saúde pública nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, sendo endemicamente prevalente em cerca de 112 países. Anualmente, afeta cerca de 50 a 100 milhões de pessoas, resultando em taxas de mortalidade entre 0,03% a 1,4%. É uma doença auto-limitante, caracterizada por febre, dor de cabeça, mialgia, entre outros sintomas. Na sua forma severa (síndrome do choque por dengue e febre hemorrágica), a doença pode levar ao óbito, principalmente em crianças. A proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus dengue circula abundantemente no sangue durante toda a viremia, estando em níveis maiores na fase aguda; assim esta pode ser utilizada como marcador do estado agudo. Para o controle da infecção estão disponíveis testes diagnósticos baseados em ensaios sorológicos, testes imunocromatográficos e moleculares, entretanto estes apresentam limitações. O desenvolvimento de alternativas mais práticas, quantitativas e econômicas tem resultado na crescente busca por testes baseados em biossensores. Neste trabalho foi desenvolvido um imunossensor para detecção de NS1 baseado em uma plataforma nanoestruturada, constituída de nano-híbrido formado por nanotubos de carbono e filme polimérico de polietilenoimina montado sobre sistema eletroquímico constituído por microeletrodo de ouro. Os anticorpos monoclonais anti-NS1 foram imobilizados sobre a superfície eletródica por ligações covalentes com os nanotubos de carbono, permitindo um alta estabilidade durante as medidas. Todas as etapas de modificações da superfície eletródica foram caracterizadas eletroquimicamente, estrutural e morfolologicamente através das técnicas de voltametria cíclica, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. A espessura do filme nanoestruturado foi determinada por medidas piezoelétricas, em um sistema de microbalança de cristal de quartzo de acordo com a equação de Sauerbrey. A resposta analítica do imunossensor frente a proteína NS1 foi obtida por amperometria aplicando-se a técnica de voltametria de onda quadrada (VOC). O imunossensor apresentou resposta linear entre 0,1 a 0,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NS1. Os dados ajustados para a equação de regressão linear exibiu coeficiente de correlação de 0,996 ($p \ll 0,01$, $n = 7$) e um baixo erro relativo (aproximadamente 1%). O imunossensor apresentou limite de detecção de 0,038 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e limite de quantificação de 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NS1, sendo similar aos obtidos na literatura, porém com a vantagem de não requerer antígenos ou anticorpos marcados (*label-free*) e utilizar técnica analítica mais simples (VOC). Os resultados indicam que o imunossensor apresenta sensibilidade compatível para detecção de NS1 em níveis sorológicos, permitindo ser uma ferramenta prática, rápida e econômica para o diagnóstico da dengue, sobretudo para detecção precoce da fase aguda.

Palavras-chaves: Dengue. NS1. Imunossensor. Nanotubos de carbono. Nano-híbrido.

ABSTRACT

Dengue is a viral disease considered as a major public health problems in tropical and sub-tropical world, endemically being prevalent in about 112 countries. Annually, it affects 50 to 100 million people, resulting in mortality rates of 0.03% to 1.4%. It is a self-limiting disease characterized by fever, headache, myalgia, among other symptoms. In its severe form (shock syndrome and dengue haemorrhagic fever), the disease can lead to death, especially in children. The nonstructural protein 1 (NS1) of the dengue virus circulates in blood abundantly throughout viremia, with higher levels in the acute phase; thus it can be used as a marker of the acute stage. For control of infection are available diagnostic testings based on serological assays, immunochromatographic and molecular assays, however these have limitations. The development of more practical, quantitative and economic alternatives has resulted in growing demand for tests based on biosensors. In this work, it was developed an immunosensor for NS1 detection based on a nanostructured platform consisting of nano-hybrid comprising carbon nanotubes and polymeric film polyethyleneimine mounted on electrochemical system consisting of gold microelectrode. The anti-NS1 monoclonal antibodies were immobilized on the electrode surface by covalent bonds with carbon nanotubes, allowing for a high stability during the measurements. All steps of electrode modifications were characterized by electrochemical, structural and morphologically techniques through cyclic voltammetry, infrared spectroscopy by Fourier transform (FT-IR) and scanning electron microscopy, respectively. The thickness of the nanostructured film was determined by piezoelectric system using a quartz crystal microbalance, according to the Sauerbrey equation. The analytical response of the immunosensor against NS1 protein was obtained by applying amperometry by square wave voltammetry (SWV). The immunosensor showed a linear response between 0.1 to 0.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NS1. The data set into the linear regression equation showed a correlation coefficient of 0.996 ($p < 0.01$, $n = 7$) and a low relative error (about 1%). The immunosensor presented detection limit of 0.038 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and a limit of quantification of 0.1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ NS1, being similar to those obtained in literature, but with advantage of not requiring labeled antigen or antibody (*label-free*) and to require a more simple analytical technique (VOC). The results indicate that the achieved sensitivity was similar NS1 immunosensors, allowing it to be convenient, fast and economical tool for dengue diagnosis, particularly for early detection of acute phase.

Keywords: Dengue. NS1. Immunosensor. Carbon nanotube. Nano-hybrid.

LISTA DE FIGURAS

Figura1: Áreas dos países com risco de transmissão do DENV, 2008	17
Figura 2: Número médio de casos de dengue nos 30 países/territórios mais endêmicos reportados para OMS, 2004-2010.....	18
Figura3: Genoma do vírus da dengue.....	20
Figura4: Entrada, disseminação e resposta do vírus dengue em Humanos.....	22
Figura5: Representação esquemática dos componentes de um biossensor.....	24
Figura6: Desenho esquemático da configuração dos biossensores mostrando os principais modos de transdução.....	27
Figura7 : Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. (a) nanotubo de parede simples, (b) nanotubo de parede múltipla	31
Figura8: Estrutura química da etilenodiamina	34
Figura9: Estrutura do PEI ramificado.....	34
Figura 10: Detalhe da célula (A) e frequencímetro (B) e bombas peristálticas utilizados para realização das análises do cristal de quartzo.....	39
Figura11: Voltamogramas cíclicos típico do crescimento do filme de PEI.....	40
Figura12a: Voltamograma cíclico do eletrodo em diferentes etapas: a) 10mV; b) 20mV; c) 30mV; d) 40mV e e) 50mV, em 5mmol L ⁻¹ K ₄ [Fe (CN) ₆] ⁴⁻ / K ₃ [Fe (CN) ₆] ³⁻ em solução de KCl a 0.1mol L ⁻¹	41
Figura12b: Efeito da velocidade de varredura sobre a corrente de pico anódico.....	42
Figura 13: Voltamogramas cíclicos do eletrodo limpo (preto) e do eletrodo modificado com PEI (vermelho) em 5 mmol L ⁻¹ K ₄ [Fe (CN) ₆] ⁴⁻ / K ₃ [Fe (CN) ₆] ³⁻ em solução de KCl a 0.1mol L ⁻¹	43
Figura 14a: Perfil voltamétrico do pei em 5mmol l ⁻¹ k ₄ [fe (cn) ₆] ⁴⁻ / k ₃ [fe (cn) ₆] ³⁻ sob diferentes taxas de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 e 150mv s ⁻¹) em solução de kcl a 0.1mol ⁻¹	44
Figura 14b: Corrente dos picos anódicos e catódicos versus raiz quadrada da velocidade do potencial de varredura.....	44
Figura 15: Resposta em frequência (kHz) por segundo (Filme polimérico).....	45
Figura 16: Representação do polímero polietilenoimina ramificado.....	47
Figura 17: Voltamogramas cíclicos do eletrodo limpo (a), do eletrodo modificado com PEI (b) e eletrodo modificado com nano-híbrido-PEI/NTC (c) 5mmol L ⁻¹ K ₄ [Fe (CN) ₆] ⁴⁻ / K ₃ [Fe (CN) ₆] ³⁻ em solução de KCl a 0.1mol L ⁻¹	48
Figura 18: Resposta com a média da frequência (kHz) por segundo (NTCs).....	49
Figura 19: Infravermelho por Transformada de Fourier; banda a usada como controle; banda b PEI e banda c NTCs/PEI.....	50
Figura20: Imagens de MEV (20 µm). Primeira imagem disco controle (a-b); PEI (c) e NTCs/PEI (d-e).....	51-52
Figura21: (A) Princípio do imunossensor amperométrico que mostra o passo a passo da construção gradual de imunoeletrodo e o seu princípio de imunoensaio. (B) Voltametria cíclica (a) EAU limpo, (b) PEI, (c) NTCs/PEI, (d) anti-NS1/ NTCs/PEI, (e) Glicina/anti-NS1/ NTCs/PEI (f) NS1/Glicina/anti-NS1/ NTCs/PEI. Os voltagramas foram realizados em 5 mmol L ⁻¹ K ₄ [Fe (CN) ₆] ⁴⁻ / K ₃ [Fe (CN) ₆] ³⁻ , com o potencial de velocidade de varredura em 50 mVs ⁻¹ , e o potencial variando entre -0,2 á 0,6 V.....	54
Figura 22: Curva de frequência do QCM.....	55
Figura 23: Representação esquemática do princípio de imunoensaio para a construção do biossensor eletroquímico e QCM.....	55

Figura 24a: Curvas da voltametria de onda quadrada respostas analíticas para diferentes concentrações de NS1 obtido em 5mmolL ⁻¹ de K ₃ [Fe (CN) ⁶] /K ₄ Fe(CN) ⁶ como sonda redox : (a) em branco solução , curvas b- g representam 0,1-0,6µL de NS1.....	56
Figura 24b: Fit linear da relação entre ΔI e as concentrações de NS1.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Características ideais de um biossensor	25
Tabela 2: Principais tipos de bioreceptores usados para o desenvolvimento de biossensores	27
Tabela 3. Limites de detecção relatados para biossensores de dengue referenciados pela literatura	29
Tabela 4: Medidas de frequência de diferentes eletrodos de cristal de quartzo.....	46
Tabela 5: Correspondências das bandas observadas nos espectros de FTIR do PEI e da amostra NTCs.....	50-51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C- Proteína do Capsídeo
DENV- Vírus da Dengue
DF- Dengue leve e formas graves
DMF- Dimetilformamida
DNA- Ácido desoxrribonucleico
E- Proteína do Envelope
EAu- Eletrodo de Ouro
EDA- Etilenodiamina
ELISA- Ensaio Imunoenzimático
FHD – Dengue Febre Hemorrágica
IFN- β – Interferon Beta
IFN- γ - Interferon Gama
IgG- Imunoglobulina G
IgM- Imunoglobulina M
IPa- Corrente do Pico Anódico
IPc- Corrente do Pico Catódico
M- Proteína de Membrana
NS- Proteína não-estrutural do vírus da dengue
NS1 - Proteína não-estrutural 1 do vírus da dengue
NTCs- Nanotubos de Carbono
OMS -Organização Mundial de Saúde
PBS- Solução tampão fosfato de sódio salino
pH- Potencial Hidrogênionico
prM- Proteína Precursora M
QCM- Microbalança de Cristal de Quartzo
RNA- Ácido Ribonucleico
RNAv - Ácido Ribonucleico viral

RSI- Regulamento Sanitário Internacional

RT-PCR- Reação em cadeia de Polimerase em tempo real

WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 DENGUE	17
2.2 HISTÓRICOS DA DENGUE NO MUNDO E NO BRASIL.....	19
2.3 VÍRUS DA DENGUE – AGENTE ETIOLÓGICO.....	20
2.4 DIAGNÓSTICO	22
2.5 BIOSSENSORES.....	24
2.5.1 Características Ideais de um Biossensor	25
2.5.2 Classificação dos Biossensores.....	26
2.5.3 Componentes Biológicos dos Biossensores	26
2.6 TRANSDUTORES	27
2.6.1 Transdutores Eletroquímicos	28
2.6.2 Transdutores Piezoelétricos	29
2.6.3 Biossensores para detecção de NS1.....	29
2.7 NANOTECNOLOGIA.....	30
2.7.1 Nanotecnologia e Nanobiossensores.....	30
2.7.2 Nanotubos de Carbono.....	30
2.7.3 Propriedades e Áreas de Aplicações dos CNTS.....	32
2.8 POLÍMEROS CONDUTORES.....	32
3. OBJETIVOS	35
3.1 GERAL	35
3.2 ESPECÍFICOS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 REAGENTES E MATERIAIS.....	36
4.2 OBTENÇÃO DO IMUNOSENSOR.....	36
4.2.1 Montagem do Filme Nanoestruturado	36
4.2.2 Imobilização de Anticorpos Anti-NS1 e Imunoensaio	37

4.3 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	37
4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE SENSORA.....	38
4.4.1 Análise de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.4.2 Análise por Microbalança de Cristal de Quartzo	38
4.4.3 Obtenção de Micrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 CRESCIMENTO DO FILME DE POLIETILENOIMINA	40
5.1.1 Síntese de PEI por eletropolimerização.....	40
5.1.2. Caracterização por sistema microbalança de cristal de quartzo	45
5.2 DEPOSIÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO SOBRE O FILME DE PEI (OBTENÇÃO DO NANO-HÍBRIDO).....	47
5.2.1.Caracterização Eletroquímica e por sistema microbalança de cristal de quartzo	47
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE ELÉTODICA MODIFICADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) ..	49
5.4 ANÁLISE DAS MICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	51
5.5 IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-NS1 COM NTCs/PEI NA PLATAFORMA SENSORA.....	53
5.5.1. Etapas do desenvolvimento do imunossensor Eletroquímica	53
5.5.2. Etapas do princípio do imunoensaio por sistema microbalança de cristal de quartzo	54
5.6 RESPOSTA ANALÍTICA DO IMUNOSENSOR À PROTEÍNA NS1	56
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença aguda e febril cuja transmissão se dá através do mosquito do gênero *Aedes*, sendo o *A. aegypti* seu principal vetor (MARTINIZ E NUNES, 2014). A doença é caracterizada por epidemias sazonais, a exemplo do Brasil que apresenta atualmente um comportamento endêmico nos períodos chuvosos devido ao aumento da proliferação dos mosquitos, sendo prevalente nas regiões subtropicais e tropicais (POLONI, 2009; MACHADO et al., 2013). Acomete mundialmente milhares de pessoas ao ano; aproximadamente 560 mil doentes que precisam ser hospitalizados e deste total, 20 mil chegam a óbito em consequência da doença que resulta em taxas de mortalidade entre 0,03% e 14% (WHO, 2012; SEABRA E MENDONÇA, 2011). Atualmente, não existem vacinas ou tratamentos específicos, assim a terapêutica restringe-se apenas ao tratamento de profilaxia, salvaguardando o diagnóstico precoce (FELIX et al., 2012).

O diagnóstico do vírus da dengue (DENV) é comumente realizado em duas fases da doença: a) primeiramente, no período da febre, permitindo assim a detecção de RNA, anticorpos IgM e proteína não estrutural 1(NS1) (POLONI, 2013; LIMA 2009). E, em segundo, b) logo após o período febril até algumas semanas, quando existe grandes quantidades IgG. O padrão ouro para o diagnóstico definitivo é o método do isolamento viral, entretanto, os testes sorológicos para se detectar IgM e/ou IgG ainda são os mais realizados (POLONI, 2013). Nos últimos anos, as pesquisas demonstraram que a NS1 é um importante marcador, sendo encontrada nos 4 sorotipos e relacionada à replicação viral (MACHADO et al., 2013). A NS1 é detectada desde o início dos sintomas, atingindo um máximo na fase aguda da doença e decaindo até o nono dia da infecção, enquanto o vírus estiver circulante (FRY et al., 2011; KORAKA et al., 2002). A detecção de níveis altos de NS1 pode caracterizar a possibilidade de um choque por dengue, assim este é considerado um marcador precoce da fase aguda e pode ser bastante útil no de um diagnóstico rápido, ajudando nos planos terapêuticos (KUMARASAMY et al., 2007).

Atualmente, as técnicas de biologia molecular que detectam o RNA viral são consideradas as mais sensíveis e específicas, no entanto, estas possuem um custo maior e precisam de laboratórios especializados. Devido à limitação, a pesquisa por sorologia empregando ensaio imunoenzimático ainda é a mais utilizada na rotina (BACKSELL et al., 2008, POLONI, 2013).

Atualmente, existem disponíveis kits para a realização de testes imunocromatográficos para a detecção da proteína viral NS1 (KUMARASAMY et al. 2017). Entretanto, os testes

cromatográficos são qualitativos, apresentando um sim/não como resposta, o que pode ser uma limitação, sobretudo na predição na fase aguda nos quais os níveis de NS1 são importantes indícios para a prevenção da síndrome do choque por dengue. Uma das alternativas para superar estas limitações consiste no desenvolvimento de biossensores. Estes vêm sendo explorados no diagnóstico de diversos metabólitos, antígenos, proteínas antigênicas, alérgenos, etc., tendo a vantagem de oferecerem respostas quantitativas, muitas vezes em tempo real e possibilidade de miniaturização (dispositivos point of care) (TONTULAWAT et al., 2011; CHATERJI et al., 2011). Portanto, trata-se de uma tecnologia rápida, prática e segura, além de fornecer alta sensibilidade e especificidade diagnóstica devido à transdução em sinal elétrico (MURUGAIYAN et al., 2014).

Por definição, os biossensores são dispositivos compostos por uma parte biológica (sensor) e outra eletrônica (transdutor), que juntos são capazes de detectar espécies químicas ou biológicas qualitativamente e/ou quantitativamente, imediatamente ao reconhecimento do analito, que dispensa etapas e provas bioquímicas necessárias para os métodos laboratoriais convencionais (FAN et al., 2008). Embora os biossensores demonstrem ser um dos métodos analíticos mais atrativos e práticos, estes ainda apresentam algumas limitações quanto aos limites de detecção. Sendo assim o uso de nanomateriais se mostra uma importante ferramenta de auxílio na melhoria da detecção dos analitos. Com o crescente desenvolvimento da nanotecnologia, estes materiais vêm ganhando bastante destaque (FENG et al., 2003). Dentre eles, os nanotubos de carbono (NTCs) apresentam composição química bastante simples, agregada a uma configuração estável e ótima relação área/volume, além de uma extrema riqueza funcional entre os nanomateriais disponíveis, e permitem modificações para facilitar a sua ligação com a biomolécula (WANG *et al.*, 2005, KIM *et al.*, 2006). A combinação de nanotubos a polímeros condutores tem permitido à nucleação de NTCs sobre superfícies sensoras, garantindo sua permanência e transferência eletrônica, devido ao alto sinergismo decorrente entre as duas espécies de materiais.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo desenvolver biossensor eletroquímico baseado em nano híbrido polímero condutor-nanotubo de carbono para desenvolvimento de sensor para dengue, através da detecção da proteína não estrutural NS1 do DENV. Esta proposta tem por intenção a contenção da doença e o diagnóstico precoce da fase aguda, permitindo ao paciente cuidados paliativos necessários através do diagnóstico preciso e com rapidez.

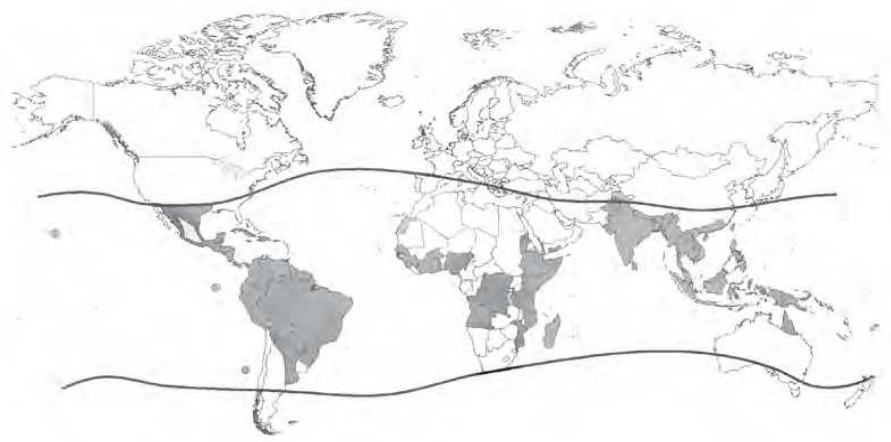
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DENGUE

A dengue viral é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por um vírus que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. O vírus da dengue (DENV) é transmitido pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A dengue é uma das arboviroses mais importantes do mundo em função da sua prevalência, sendo causada por quatro diferentes sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), todos com plena capacidade de gerar a infecção (HALSTEAD, 2007). Recentemente, a existência de um quinto sorotipo foi postulado (MUSTAFA et al, 2015; WIWANITKIT, 2015); no entanto, estes achados ainda precisam ser confirmados.

Atualmente, existe um risco de infecção por DENV superior a 2,5 bilhão de pessoas nos trópicos e subtropicais. Nos últimos anos foram registradas 390 milhões casos de dengue alastrados em 125 países em todo o mundo, atingindo as regiões tropicais e sub-tropicais (Figura 1) (BHATT et al., 2013). A prevalência aumentou 30 vezes em 50 anos, com o aumento da expansão geográfica para novos países e, na presente década, das áreas urbanas para áreas rurais.

Figura 1: Áreas dos países com risco de transmissão do DENV, 2008.



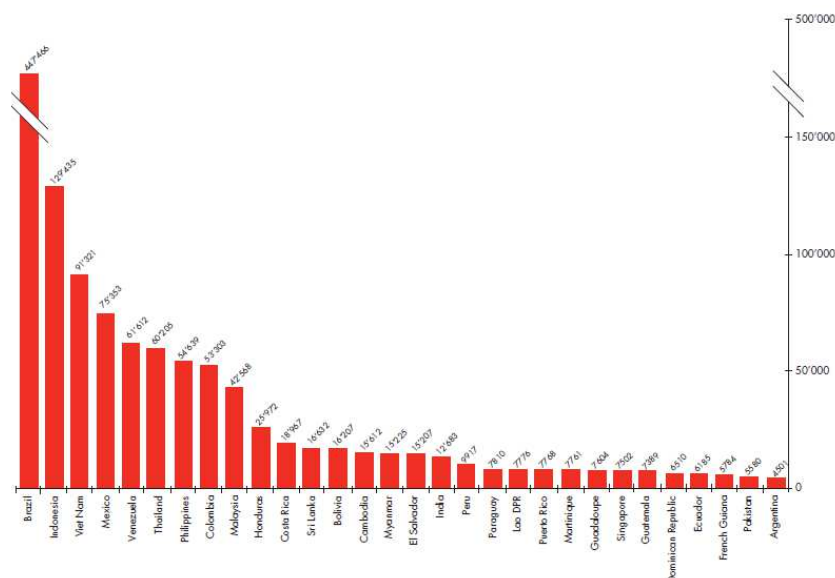
Fonte: Organização Mundial de Saúde, OMS (WHO), 2009.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 50 a 100 milhões de infecções por dengue ocorram a cada ano. Atualmente, quase metade da população mundial vive em países onde a dengue é endêmica, e mais de 390 milhões de pessoas no mundo padecem da doença a cada ano, quando, há meio século, só foram registrados 15 mil casos em nove países do sudeste asiático. A taxa de letalidade varia entre os países, mas pode ser tão elevada quanto 10 a 15% em alguns e menor que 1% em outros (NUNES, 2011). O número médio de casos de dengue, entre os anos de 2004 e 2010 nos países mais endêmicos é exibido na Figura 2.

A OMS após a Resolução da Assembleia WHA55.17 (2002) solicitou um maior empenho no combate contra a dengue. A Assembleia Mundial da Saúde de 2005 resolução WHA58.3 demonstrou uma grande importância sobre a revisão do Regulamento Sanitário Internacional (RSI), incluindo a dengue como um exemplo de uma doença emergente a algumas décadas e para a saúde pública de preocupação internacional com implicações para a segurança da saúde devido rápido avanço além das fronteiras nacionais (WHO, 2009).

O vírus da dengue (DENV) é, principalmente, transmitido pelo vetor *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Ambas as espécies estão distribuídas principalmente nas regiões tropicais da Ásia, África, Austrália, Pacífico Sul, nas Américas e algumas partes do Oriente Médio (HIGA, 2011). A dengue é uma doença autolimitada, não específica, caracterizada por febre, cefaléia, mialgia, e sintomas constitucionais, podendo evoluir das formas leves para as formas graves, fase ou dengue aguda, podendo levar ao síndrome do choque da dengue ou síndrome hemorrágica.

Figura 2: Número médio de casos de dengue nos 30 países/territórios mais endêmicos reportados para OMS, 2004-2010.



Fonte: OMS, 2012.

2.2 HISTÓRICOS DA DENGUE NO MUNDO E NO BRASIL

Conhecida há alguns séculos, a dengue é uma doença historicamente importante. Sintomas semelhantes ao da dengue foram registrados em uma enciclopédia médica chinesa em 992 D.C. e sendo provavelmente o primeiro resgistro (GUBLER, 2006). Muitos documentos relatam que a origem do DENV foi no continente Africano. Posteriormente, o vírus da dengue foi disseminado para muitas partes do mundo, através comércio de escravos (HIRSCH, 1883; SMITH, 1956). Além disso, acredita-se que o DENV pode ter se originado a partir de um ciclo florestal envolvendo primatas de pequeno porte e os mosquitos que vivem no dossel da Península Malaia (SIRISENA et al, 2014). Mais tarde, o vírus foi introduzido para aldeias através de seres humanos ou macacos que haviam sido expostos ao DENV na floresta e lá foram propagados por mosquitos peri-domésticos (*Aedes* spp.); consequentemente, os moradores o disseminaram em áreas urbanas (GUBLER, 2006).). O vetor *Aedes aegypti* também é suposto ter-se originado na África (MONATH, 1988). No entanto, sua origem é discutida por alguns pesquisadores que relatam que o DENV que acreditam ter iniciado no continente Asiático (WILDER-SMITH et al., 2008; MURRAY et al., 2013).

No Brasil, a introdução do vírus da dengue foi relatada no século XIX e desde então a população brasileira sofre com ciclos periódicos de epidemias. No século passado, há relatos em 1916, de infestação do vírus em São Paulo e em 1923, no Rio de Janeiro, sendo a primeira transmissão em massa da dengue notificada em 1986 (BRASIL, 2002). Hoje em dia, todos os quatro sorotipos do vírus da dengue circulam no país. Mais do que três décadas, desde o seu ressurgimento, o Brasil se tornou o país que relata o maior número de casos no mundo (TEIXEIRA et al., 2009). O aumento significativo da incidência, reflexo da ampla dispersão do *Aedes aegypti* no território nacional e, sobretudo nos grandes centros urbanos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, são responsáveis pela maior parte dos casos notificados. As regiões Centro-Oeste e Norte foram acometidas mais tardiamente, com epidemias registradas a partir da segunda metade da década de 90 (MACIEL et al., 2008).

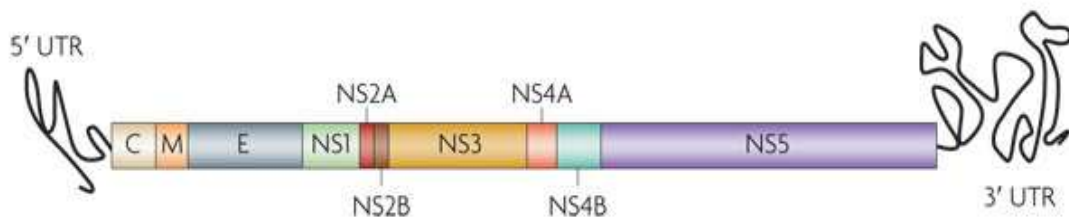
Os adultos jovens foram os mais atingidos pela doença, desde a introdução do vírus no Brasil. No entanto, a partir de 2006, alguns Estados apresentaram a recirculação do sorotipo DENV2 após alguns anos de predomínio do sorotipo DENV3. Esse cenário levou a um aumento no número de casos de formas graves e de hospitalizações em crianças, principalmente no Nordeste do país. Em 2008, foram notificados 585.769 casos; e novas epidemias causadas pelo sorotipo DENV2 ocorreram em diversos Estados do país, marcando o pior cenário da doença no Brasil, em relação ao total de internações e óbitos até a presente data. Essas epidemias de DENV2 e DENV3 foram caracterizadas por um padrão de migração,

atingindo principalmente as crianças que representaram mais de 50% dos pacientes internados nos municípios de maior contingente populacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

2.3 VÍRUS DA DENGUE – AGENTE ETIOLÓGICO

O vírion compreende uma partícula esférica, com diâmetro de 40-50 nm, e um envelope de lipopolissacarídeo. O genoma do DENV é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kb de extensão, com único quadro aberto de leitura (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) que codifica três proteínas estruturais [do capsídeo (C), da membrana (M) e o envelope (E) viral] e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2b, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (GUZMAN et al., 2010; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010) (Figura 3).

Figura 3: Genoma do vírus da dengue.



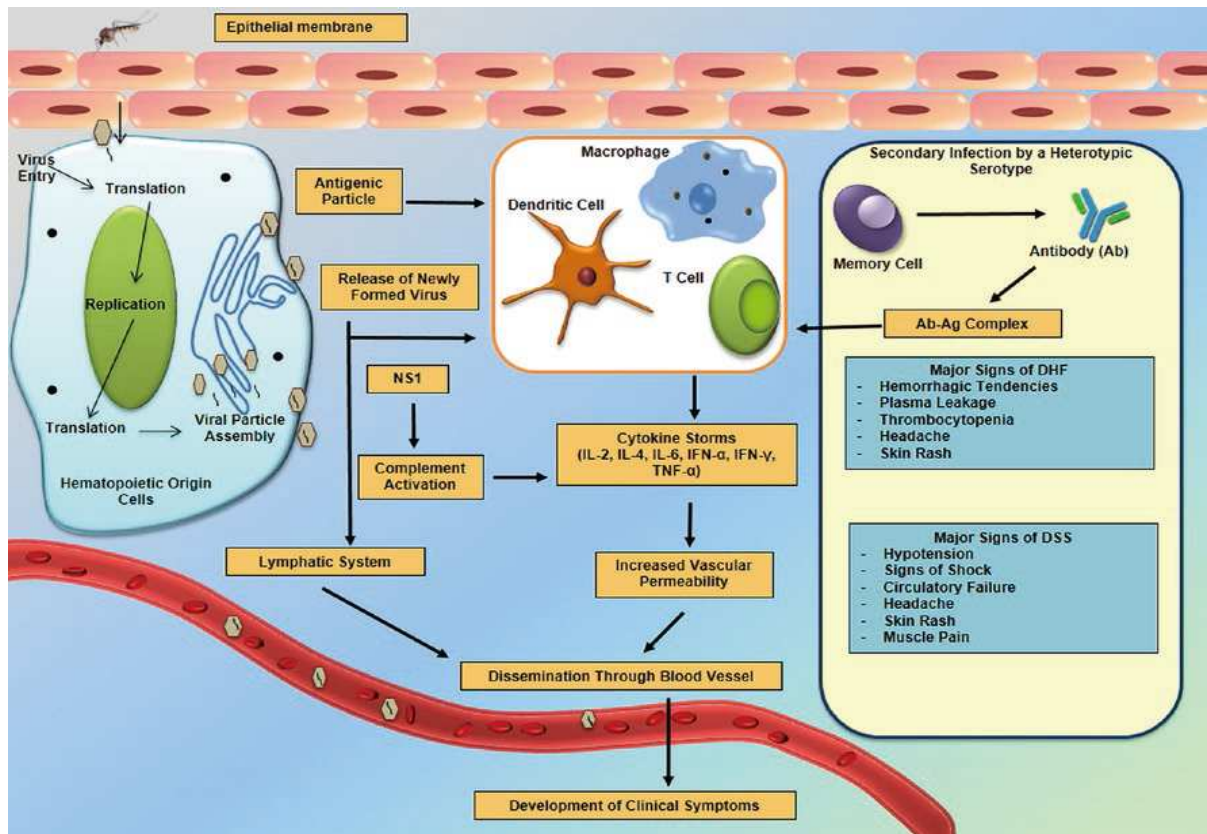
Fonte: GUZMAN et al., 2010.

A infecção com DENV começa quando o vírus é introduzido nas células hospedeiras, como resultado da obtenção do vetor em um repasto sanguíneo. A partir de vários estudos diferentes, foi sugerido que as células de origem hematopoiética, por exemplo, monócitos, macrófagos e células dendríticas, são os principais locais-alvo para a infecção do DENV, replicação e difusão (Figura 4). Os primeiros passos da infecção pelo vírus da dengue na célula podem ser categorizadas em adsorção e penetração (ISLAM et al., 2015).

A proteína E é a responsável pela fixação do vírion ao receptor celular e a fusão do envelope do vírus com a membrana da célula-alvo. Seus epítomos definem a produção de anticorpos específicos, responsáveis pela neutralização viral, e podem ser detectados por múltiplos testes sorológicos (GUZMAN et al., 2010).

Um número de fatores de fixação ou receptores das proteínas estruturais e não-estruturais foram identificados como responsáveis pela entrada vírus que começa com uma mudança conformacional da proteína E sob condições de pH baixo (6.5), seguida por endocitose mediada por clatrina (MERCER et al., 2010). Vários inibidores potentes, tais como anticorpos monoclonais, heparina e sulfato de heparina agem para suprimir o processo de penetração de carboidratos e considera-se que o sulfato de heparina consiga promover a entrada do vírus (ISLAM et al., 2015). Nesta fase, a proteína do cápsideo libera o genoma viral no citoplasma da célula e subsequentemente converte-o em uma única poliproteína em associação com membranas derivada de RE. Esta poliproteína é fragmentada em proteínas estruturais e não estruturais pela ação de diferentes proteases celulares e derivados de vírus (RODENHUIS-ZYBERT et al, 2010; Jain et al., 2014). Uma vez que a tradução e a dobragem correta das proteínas do virion são concluídas, as proteínas NS iniciam o processo de replicação usando uma cadeia negativa intermediária como um molde (ISLAM et al., 2015). Este molde é ainda mais utilizado para a produção de múltiplas cópias de positiva- RNAv vertente. Em seguida , este RNA recém-formado é embalado pela proteína C para formar um nucleocápside e , enquanto isso, um complexo heterodímero é formado pela proteína M e a proteína E que é liberada no lúmen do RE para ser envolvida no processo de brotamento virion (KUHN et al ., 2002). As partículas virais imaturas amadurecem usando o caminho secretor e complexo de Golgi, desencadeando a dissociação dos heterodímeros prM / E em um ambiente ácido. Estes virions maduros agora estão prontos para infectar as células e são transportados para fora das células por exocitose (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010)

Figura 4: Entrada, disseminação e resposta do vírus dengue em Humanos.



Fonte: Islam et al., 2015

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico eficiente e preciso da dengue é primordial para detecção precoce de casos graves, diagnóstico diferencial com outras doenças infecciosas em virtude da variabilidade e generalidade nos sintomas associados à dengue (PHUONG et al., 2009; HENNESSEY et al., 2009),

Nos casos de infecção aguda consideram-se como prováveis aqueles que o paciente apresenta febre, perda de apetite, vômito, dor, cansaço e manchas pelo corpo, como também cefaleia, náuseas e dor retro-orbital. Para os casos mais graves, o paciente deve apresentar todos os sintomas citados anteriormente e também dores abdominais fortes e contínuas, sonolência ou agitação, sangramento nasal e pela gengiva, pulso rápido e fraco, dificuldade para respirar e por vezes e perda de consciência (BRASIL, 2010; KUMARASAMY et al.,

2007). Na evolução para síndrome do choque por dengue, além dos já mencionados sintomas, tem-se a pressão baixa (< 20 mmHg), agitação, a pele fria e pegajosa (WHO, 2009).

Embora a sintomatologia seja expressiva, esta é comum a inúmeras viroses, portanto a confirmação sorológica do diagnóstico deve ser realizada através da junção dos sintomas e dos exames laboratoriais. Entre os marcadores da dengue, citam-se alterações nos níveis de anticorpos IgG e IgM e proteínas antigênicas do DENV (proteína M e E), além das proteínas não estruturais, destacando-se a NS1. Estes marcadores são detectados por imunoensaio enzimático (ELISA) e testes imunocromatográficos. Os marcadores virais, incluindo o genoma do vírus são detectados através de reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (HENNESSEY et al., 2009).

A NS1 é uma glicoproteína solúvel altamente conservada (≈ 48 kDa) e sintetizada por todos os *flavivírus*. Durante a infecção, essa glicoproteína é encontrada associada a organelas intracelulares ou alternativamente transportada através da via secretora para a superfície celular, podendo atuar no processo de replicação viral (WELSCH et al., 2009; ALCON-LEPODER et al., 2006). Estando presente nos quatro sorotipos do DENV, os níveis de circulação da NS1 no sangue são altos, tanto na infecção primária quanto na secundária, podendo ser detectada a partir do 1º dia do surgimento da febre e ficar circulante por até nove dias após o aparecimento dos sintomas (GUZMÁN & KOURI, 2002). Recentemente, a proteína não estrutural NS1 tem sido destacada como marcador de fase aguda da DENV. Nesta fase, a expressão desta proteína é máxima, portanto, sua detecção contribui decisivamente para o diagnóstico precoce/tratamento imediato, prevenindo a evolução para formas mais graves da doença, ou seja, choque ou síndrome do dengue (SOUZA, 2008). A proteína NS1 tem sido detectada em 87% e 95% de pacientes com dengue (BISORDI et al., 2011). Kits de diagnóstico para dengue, disponíveis no mercado são capazes de detectar a proteína NS1 com sensibilidade acima de 69% (SILVA et al., 2011). Na dengue, os níveis sorológicos de NS1 variam de 0.04 a 2 $\mu\text{g/mL}$ em soro de pacientes em fase aguda na primeira infecção e de 0.01 a 2 $\mu\text{g/mL}$ na segunda infecção (CECCHETTO, 2014). Durante o curso da doença, os níveis circulantes do NS1 são muito variáveis, indo de nanogramas a microgramas por mililitro, podendo atingir picos de 50 $\mu\text{g/mL}$ (ALCON et al., 2002). Durante a fase de convalescença há uma queda drástica nos seus níveis, justificando assim a sua maior taxa de detecção em soros de fase aguda (PEELING et al., 2010).

A quantidade de NS1 circulante no soro humano demonstra ser significativamente maior nos pacientes que desenvolvem dengue hemorrágica quando comparada a febre da dengue (LIBRATY et al., 2002), entretanto, este efeito não está claro se é uma causa ou uma consequência do extravasamento de plasma. Assim, além de ser um marcador diagnóstico da

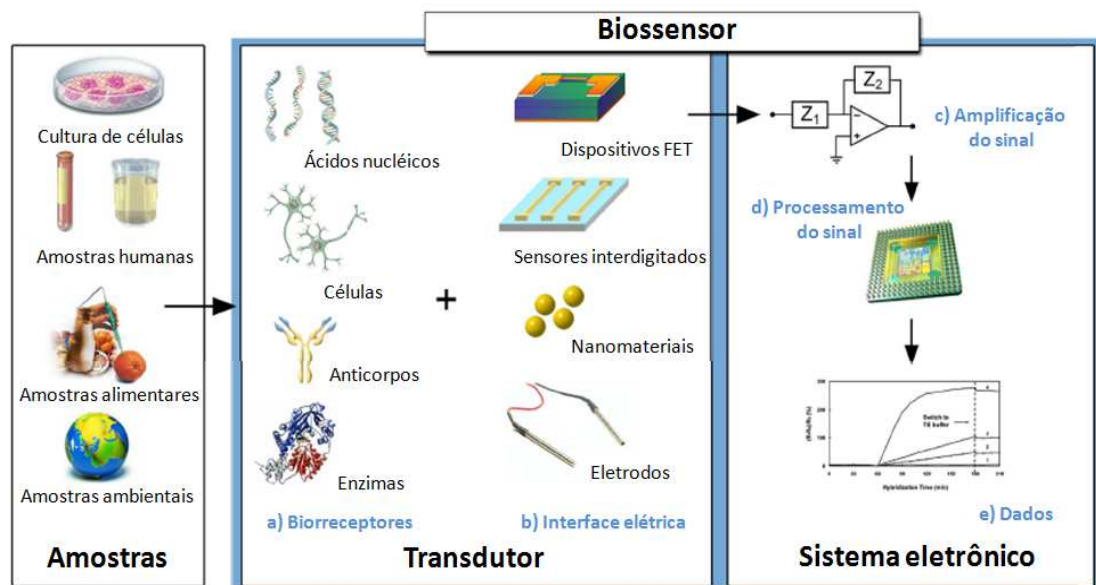
infecção pelo DENV, esta pode representar um indicador de predição de gravidade de doença (ANANDARAO et al., 2006; XU et al., 2006).

2.5 BIOSSENSORES

Em relação à nanotecnologia, as tecnologias microeletrônicas produzidas pela nanofabricação ajudaram a miniaturização de circuitos e sistemas eletrônicos que conceberam a produção de avançados e novos dispositivos para detecção molecular, por exemplo, para se ter o controle de glicose no sangue biossensores implantáveis (CASH & CLARK, 2010) e biochips para a identificação do DNA em amostras sintéticas (STAGNI et al., 2007).

Os biossensores são dispositivos compostos por uma parte biológica (sensor) e outra eletrônica (transdutor), que juntos são capazes de detectar espécies químicas ou biológicas qualitativamente e/ou quantitativamente (figura 5), imediatamente ao reconhecimento do analito que dispensa etapas e provas bioquímicas necessárias para os métodos de laboratório convencionais (FAN et al., 2008). Quando há ligação do receptor com a molécula de interesse, esta reação é convertida pelo transdutor em um sinal elétrico mensurável, uma vez que surgem eventos pela reação ocorrida, tal como: transferência de calor, mudança de distribuição de cargas elétricas, movimento de elétrons, emissão de luz (MURUGAIYAN et al., 2014).

Figura 5: Representação esquemática dos componentes de um biossensor.



FONTE: Grieshaber et al., 2008.

A relação que existe entre essas duas áreas de estudos diferenciadas, se dá pela combinação entre a sensibilidade e especificidade dos sistemas biológicos à quantidade computacional de um microprocessador (WANG, 1999). Os biossensores estabelecem uma escolha rápida e eficaz para as medidas analíticas convencionais no que se diz respeito ao monitoramento de substâncias químicas e bioquímicas aplicável em diagnóstico clínico, controle ambiental, processos de fermentação e na indústria alimentícia (YANG et al., 2005).

2.5.1 Características Ideais de um Biossensor

Segundo Diamond (1998), antes de tudo, vale ressaltar que não existe um biossensor ideal, porque um sensor pode ter utilização no monitoramento de um determinado analito para uma determinada situação, e não ter a utilidade para fazer o monitoramento do mesmo analito em uma outra situação. Podemos citar o exemplo de um eletrodo de vidro, que é um excelente dispositivo na monitorização do pH de diversos tipos de soluções, entretanto, não pode ser usado para monitoramento do sangue *in vivo* por causa da sua temperatura e da dificuldade de ser fabricado em micro dimensões (DIAMOND, 1998).

Tabela 1: Características ideais de um biossensor.

<i>Características</i>	<i>Comentários</i>
Sinal de saída proporcional à concentração ou a atividade do analito	Isto tem ocorrido com maior facilidade devido às várias opções de processamento de sinais complexos na produção de sensores modernos.
Rápido tempo de resposta	Ensaio que apresentem um longo tempo de resposta devido a um processo cinético lento, por exemplo, podem limitar suas possíveis aplicações e impedem que as respostas sejam obtidas em tempo real. Isto pode ser aprimorado utilizando um biossensor.
Seletivo	Sem a seletividade adequada, o usuário não pode relacionar o sinal obtido à concentração do analito.
Sensível	A sensibilidade determina a habilidade do dispositivo em discriminar, com confiança e precisão, pequenas diferenças na concentração do analito.

Fonte: Diamond, 1998.

Além dessas características, existem outras que também são importantes para se desenvolver um biossensor (Tabela 1), como: linearidade, limite de detecção, especificidade e tempo de vida.

Os biossensores têm uma especificidade e sensibilidade significativa, entretanto, alguns estudos de estabilidade e tempo de vida são consideravelmente restritos. A quantidade de analito que é detectada, no sistema de calibração sempre leva em consideração a concentração ativa de espécies interferentes, temperatura da amostra, força iônica, pH e osmolaridade, sendo todos eles de tal importância para os analitos que tenham ou não carga elétrica (RICARDI et al., 2002).

2.5.2 Classificação dos Biossensores

A classificação para biossensores inclui os seguintes critérios: com base na natureza do evento de reconhecimento:

- Dispositivos bioafinidade: dependem de uma ligação seletiva do analito alvo a uma superfície restrita ligante (por exemplo, anticorpo, oligonucleótido, DNA , célula, etc.) (MURUGAIYAN et al., 2014).
- Dispositivos biocatalítico: uma enzima imobilizada é utilizada para auxiliar no reconhecimento do substrato alvo, por exemplo, tiras de sensor com glicose oxidase imobilizada tem estado em voga para monitoramento pessoas com diabetes mellitus (MURUGAIYAN et al., 2014).

2.5.3 Componentes Biológicos dos Biossensores

Vários componentes biológicos apresentam-se como potenciais elementos a serem usados em sistemas de biossensores e são utilizados como biorreceptores. A tabela 2 apresenta os biorreceptores que são mais usualmente utilizados.

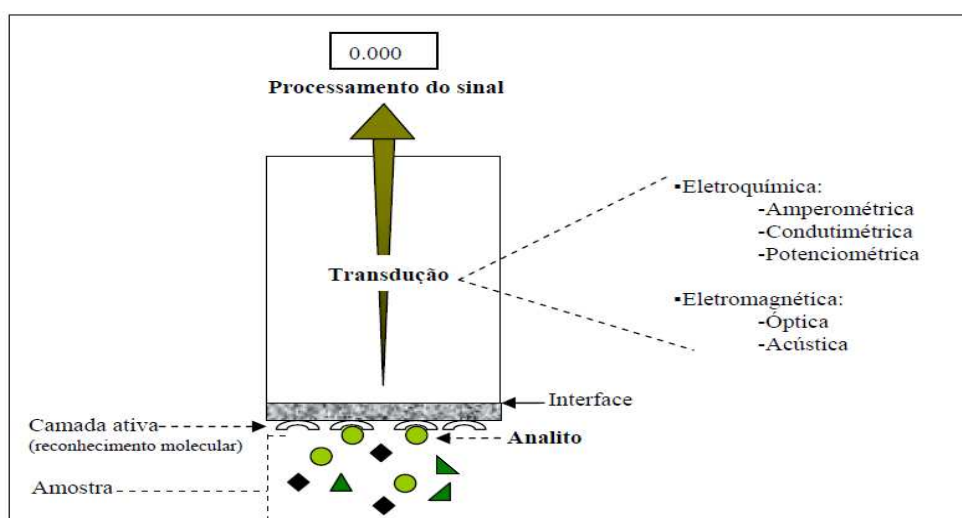
Tabela 2: Principais tipos de biorreceptores usados para o desenvolvimento de biossensores.

<i>Biorreceptores</i>	<i>Descrição</i>
Enzimas	Catalisadores de reações com um alto grau de especificidade por seus substratos.
Anticorpos	A relação entre um anticorpo e seu antígeno é muito específica.
Ácidos nucleicos	Possuem alta especificidade dos pares de bases distribuídos ao longo da dupla hélice que forma a cadeia de DNA.
Microorganismos (fungos, bactérias, etc.)	Podem assimilar compostos orgânicos e produzir enzimas que serão detectadas por um receptor.

Fonte: Kozan, 2007.

2.6 TRANSDUTORES

Os transdutores transformam a resposta biológica, resultante da junção com o analito alvo, em um sinal elétrico que seja mensurável, sabendo que a natureza do transdutor é dependente de qual tipo de receptor é utilizado para a detecção do analito, por exemplo, um sistema produzido para encontrar produtos de uma reação de oxidação ou redução não é o mesmo para encontrar a ligação entre o antígeno e um anticorpo (EDELMAN & WANG, 1992). Na figura 6 estão os parâmetros resumidos de transdução.

Figura 6: Desenho esquemático da configuração dos biossensores mostrando os principais modos de transdução.

Fonte: Araújo, 2006

2.6.1 Transdutores Eletroquímicos

Os transdutores eletroquímicos têm características importantes por serem sensíveis, simples, confiáveis e apresentar uma resposta rápida (THÉVENOT et al., 2001). As técnicas eletroanalíticas têm capacidade de fornecer limites de detecção muito baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem diferentes sistemas, sempre se baseando nas propriedades elétricas de uma solução contendo o analito, quando este está em contato com uma célula eletroquímica. Assim, essas e outras vantagens fazem com que os sensores eletroquímicos constituam grande parte dos biossensores desenvolvidos (CASTILHO, 2003).

Dependendo do seu princípio de transdução, podem ser amperométricos, potenciométricos ou condutimétricos (CHAUBEY & MALHOTRA, 2001).

Amperométricos. O princípio amperométrico acontece na medida da corrente resultante da oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa, instante em que acontece a transferência de elétrons do analito para o eletrodo ou vice-versa. (WANG et al., 2008).

Potenciométricos. O princípio está na definição da diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o de referência ou dois eletrodos de referência que são separados por uma membrana seletiva permeável, não existindo fluxo de corrente significativa entre eles (THÉVENOT et al., 2001).

Condutimétricos. O princípio se fundamenta na medida de mudanças na condutância, por causa do uso de enzimas que, ao catalisar reações, fazem ou consomem espécies iônicas, deixando alterado o número de portadores de carga móvel no eletrólito. A condutividade é a função linear da concentração iônica, entretanto, não é específica para um dado tipo iônico (WANG et al., 2008).

2.6.2 Transdutores Piezoelétricos

O princípio piezoelétrico se baseia na medida de variação do dipolo elétrico de um dado material quando este é submetido a uma deformação (LU et al., 2004).. Assim, quando a superfície do sensor é revestida pelo material biológico e este captura os analitos de modo seletivo, ou seja, quando a massa do cristal é aumentada, as frequências de ressonância das oscilações decaem proporcionalmente com a quantidade de massa adsorvida à superfície eletródica.

Os cristais de quartzo, hoje em dia são bastante utilizados em sistemas piezoelétricos devido a sua oscilação de frequência na faixa de mega-hertz (10^6 ciclos/segundo), de maneira proporcional à massa do cristal, e também são bastante sensíveis às variações de massa depositadas, por isso, sua alta sensibilidade. No sistema piezoelétrico, a microbalança de cristal de quartzo (QCM) é capaz de apresentar medidas das alterações de massa na superfície, de variações na ordem de nanogramas (WANG *et al*, 2011).

Os imunossensores QCM vêm mostrando serem mais atrativos para detectar moléculas, estudar processos de adesão celular e estimar constantes de afinidade (VIITALLA *et al.*, 2012, DENG *et al.*, 2006). Também permite a determinação de parâmetros específicos de camadas imobilizadas, como por exemplo, a densidade e viscosidade na superfície do eletrodo (FEREIRA *et al.*, 2009). O sistema QCM também possui uma alta sensibilidade, podendo medir interações monoatômicas e em relação à técnica amperométrica que tem como vantagem não necessitarem de espécies eletroativas para obtenção do sinal transduzido, ou seja antígenos ou anticorpos marcados (DU *et al.*, 2007; X.L. SU, Y. LI, 2005; MATTOS *et al.*, 2012).

2.6.3 Biossensores para detecção de NS1

Na busca de testes diagnósticos com melhor sensibilidade os biossensores analíticos vêm sendo construídos. Na Tabela 3 estão relatados alguns biossensores desenvolvidos para diagnóstico de dengue, utilizando diferentes técnicas (CECCHETTO, 2014).

Tabela 3: Limites de detecção relatados para biossensores de dengue referenciados pela literatura.

Mecanismo de Transmissão	Analito (Alvo)	Limite de detecção (LD)	Referência
Piezoelétrico	Proteína NS1 e Glicoproteína-E (Δ)	3 $\mu\text{g/mL}$ ($6,25 \times 10^{-8}$ mol/L)	Su <i>et al.</i> , 2003
	Proteína NS1 ($\bullet$)	0,740 $\mu\text{g/mL}$ ($1,39 \times 10^{-8}$ mol/L)	Wu <i>et al.</i> , 2005
	Proteína NS1 ($\bullet$)	1 -10 $\mu\text{g/mL}$ ($2,08 \times 10^{-8}$ - $2,08 \times 10^{-8}$ mol/L)	Tai <i>et al.</i> , 2006
	Proteína NS1 ($\bullet$)	12 ng/mL ($6,25 \times 10^{-8}$ mol/L)	Dias <i>et al.</i> , 2013
Eletroquímico	Proteína NS1 ($\bullet$)	0,33 ng/mL ($6,88 \times 10^{-8}$ mol/L)	Cavalcante <i>et al.</i> , 2012

(Δ) = diluição em PBS ($\bullet$) = diluição em Soro de paciente

Fonte: Adaptado de Cecchetto, 2014.

Na Tabela 3 observa-se que o biossensor com menor limite de detecção foi o eletroquímico tendo um limite de 0,33 ng/mL conforme relatado em Cavalcanti *et al.*, (2012). A

perspectiva apresentada na Tabela 3 motivou o presente trabalho a investir esforços na elaboração de métodos eletroanalíticos, utilizando técnica eletroquímica (com ênfase em técnicas de resposta em frequência), capaz de detectar a proteína NS1 do vírus da dengue com bom desempenho.

2.7 NANOTECNOLOGIA

2.7.1 Nanobiotecnologia e Nanobiossensores

Conforme Instituto Nacional de Propriedade Industrial-INPI (2010), a nanobiotecnologia é uma área da nanotecnologia que aplica ferramentas resultantes da integração das ciências físicas, engenharia molecular, biologia, biotecnologia e química. Sendo o surgimento dessa tecnologia de enorme importância, pois proporciona o desenvolvimento de dispositivos cada vez menores para análises bioquímicas e diagnósticos moleculares com grandes melhorias na eficiência, precisão e sensibilidade dos resultados (RUMAYOR et al., 2005).

Além disso, a nanobiotecnologia possibilita detectar e manipular parâmetros bioquímicos e moleculares por meio de dispositivos em nano escala – nanodispositivos, como *biochips* e nanobiossensores (INPI, 2010). Os nanobiossensores tratam-se de dispositivos desenvolvidos em nano-escala que convertem eventos em sinais processáveis. Logo, as reações bioquímicas oriundas desses eventos biológicos incorporadas aos elementos de reconhecimento (ácidos nucleicos, organelas ou células, enzimas isoladas, tecidos e anticorpos), são capazes de produzir sinais (elétricos, térmicos ou ópticos), os quais são associados a um sistema de transdução que convertem o sinal entre os elementos de reconhecimento e o analito em um efeito detectável e mensurável (RUMAYOR et al., 2005; BRANDÃO et al., 2011).

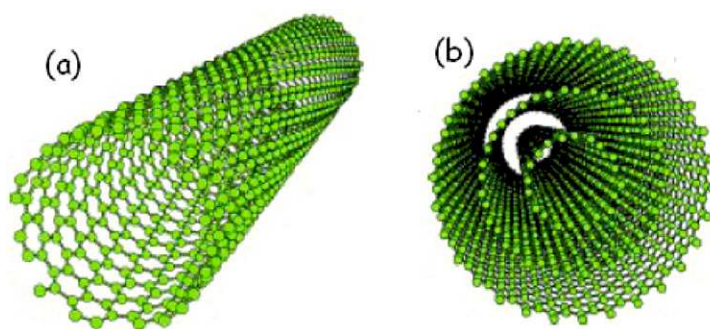
2.7.2 Nanotubos de Carbono

Segundo Justino (2013), a associação entre nanotecnologia e cuidados de saúde tem proporcionado o desenvolvimento de novas tecnologias mais eficientes, rápidas e úteis no diagnóstico, tratamento e prevenção de qualquer doença. Nesta gama de tecnologias, os biossensores associados a nanomateriais são dispositivos que têm sido desenvolvidos e

utilizados nos últimos anos, nomeadamente devido à sua alta sensibilidade, especificidade molecular, rapidez de análise, baixo custo e facilidade de utilização.

Entre os nanomateriais, os nanotubos de carbono (NTCs) são os mais utilizados e aplicados em diversas tecnologias para a melhoria dos sistemas analíticos, devido a sua grande área superficial, elevada condutividade elétrica e excelentes propriedades de transferência de elétrons. Os NTCs podem ser constituídos de diferentes cilíndricos concêntricos, contendo única ou múltiplas paredes (figura 7). Os de múltiplas paredes são de mais fácil síntese e portanto, são os mais econômicos (DIAS et al., 2013).

Figura 7: Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. (a) nanotubo de parede simples, (b) nanotubo de parede múltipla



Fonte: ZARBIN, 2007.

Segundo Katz & Wilner (2004), os NTCs podem ser funcionalizados com grupos funcionais específicos tais como a hidroxila (-OH) ou a carboxila (-COOH), alargando a gama das suas aplicações, devido à melhoria das propriedades destes pela incorporação dos grupos funcionais. Alguns exemplos quanto à importância dos NTCs funcionalizados a aplicações na saúde podem ser estudados em aplicações biológicas, por exemplo, na distribuição controlada de agentes terapêuticos, devido à elevada capacidade dos NTCs em penetrar em membranas biológicas com uma toxicidade relativamente baixa (ELHISSI et al., 2012). Quando aplicados a dispositivos eletrônicos, os NTCs também promovem uma melhoria importante na sensibilidade do sensor, por exemplo, quando aplicados à terapia de doenças virais e ao diagnóstico viral, contribuindo para a rápida detecção de agentes patogênicos humanos e animais (JUSTINO et al., 2013).

Conforme Patel (2011), o último relatório de mercado global sobre os NTCs verificou-se um aumento da produção de NTCs devido, sobretudo ao crescente desenvolvimento de dispositivos associados à saúde. Entre eles, encontram-se os sensores eletroquímicos que têm sido cada vez mais usados com incorporação de vários tipos de nanomateriais, principalmente NTCs. Melhorias na automação, miniaturização e análise

multiplexada, assim como melhorias no seu desempenho analítico têm sido levadas em conta para o progresso dos sistemas de saúde. Por exemplo, a detecção de doenças numa fase precoce é um dos objetivos no desenvolvimento e aperfeiçoamento dos sensores com NTCs, visando melhorar a sua sensibilidade, rapidez de resposta, redução do volume de amostra, apostando também em sistemas não-invasivos (JUSTINO et al., 2013). Além disso, estas nanotecnologias podem permitir a detecção de marcadores específicos em baixas concentrações e em amostras complexas, tais como o soro humano.

2.7.3 Propriedades e áreas de Aplicação dos NTCs

Os NTCs caracterizam-se, conceitualmente, pelo enrolamento de uma folha de grafeno que é um material constituído apenas por átomos de carbono arranjados hexagonalmente. Para comparação, o grafite, é um material constituído por várias folhas de grafeno empilhadas. Devido sua conformação, os NTCs apresentam interessantes propriedades químicas, físicas, mecânicas e eletrônicas, tais como:

- Configuração tubular que permite o isolamento de elétrons em torno da circunferência do NTCs, proporcionando uma condutividade elétrica notável;
- Diâmetro pequeno e comprimento elevado que proporcionam uma superfície muito grande em relação ao volume, conduzindo a excelentes propriedades eletrônicas;
- Satisfação de todas as ligações C-C covalentes, promovendo a estabilidade mecânica, térmica e química;
- Elevada resistência mecânica e resistência à ruptura.

Para aplicações em sensores eletroquímicos, os NTCs apresentam propriedades atrativas, tais como proporcionam, aumento de área eletroativa, maior transferência eletrônica, maior quantidade de biomoléculas imobilizadas à superfície sensora, entre outras (SILVA et al., 2014).

2.8 POLÍMEROS CONDUTORES

Polímeros condutores são compostos que possuem uma alta massa molar que é formado pela repetição de muitas unidades químicas, podendo ser orgânicos ou inorgânicos, sendo os orgânicos os mais estudados (AKCELRUD, 2007). Os polímeros são amplamente

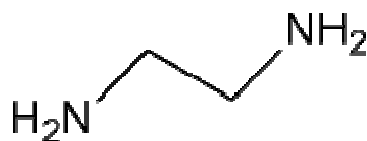
utilizados em pesquisas para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos devido à sua capacidade de alterar, de maneira reversível, seus níveis de condutividade elétrica quando expostos a diferentes substâncias químicas, atuando assim, no aumento da flexibilidade para a imobilização de biomoléculas, resistência mecânica do filme, entre outras (IONESCU et al., 2010; PINACHOA 2008; IRIMIA-VLADU et al., 2006.)

Conforme Ionescu et al., (2010) a modificação no sensor também pode ser realizada através da deposição de filmes poliméricos condutores na superfície de eletrodos. Na fabricação de um eletrodo modificado por filme polimérico, podem-se utilizar as técnicas de *dip-coating*, *spin-coating*, eletrodeposição, polimerização por plasma, eletropolimerização, dentre outras (TAO et al., 2007).

A deposição do filme utilizado neste estudo foi realizada pela técnica de eletropolimerização, pois demonstra ter facilidade no controle de formação do filme (espessura e quantidade) (KUMAR E CHEN, 2008). A eletropolimerização ocorre com a primeira etapa envolvendo a eletro oxidação do monômero utilizado com a formação de um cátion-radical (INZELT et al., 2000). A dimerização é o início da segunda etapa, chamada etapa química. O crescimento da cadeia e, conseqüentemente, formação do polímero, procede via reação do dímero resultante com outra molécula neutra e assim por diante. Por último, ocorre a eletrodeposição do polímero formado na superfície do eletrodo (KUMAR & CHEN, 2008). Estes filmes eletropolimerizados geralmente contêm grupos funcionais que após ativação podem imobilizar biomoléculas via um grupo funcional específico, podendo ser hidroxilas (-OH), carbonilas (C=O), carboxilas (CO(OH)) e aminas primárias (NH₂) (FREITAS, 2014) Dentre os monômeros aromáticos heterocíclicos encontrados na literatura com formação de filmes poliméricos, o pirrol, tiofeno, fenileno, a polianilina, o etilenodiamina e o polietilenoimina têm sido os mais estudados (TUNCAGIL et al., 2009; FREITAS, 2014).

A polialilamina (PAH) apresenta uma estabilidade química em condições ambientais e facilidade de polimerização (HO et al., 2002). O PAH é um polieletrólito fraco com natureza básica e se apresenta com partes hidrofílicas e hidrofóbicas. O tiofeno é um hidrocarboneto por quatro átomos de hidrogênio (H) e um de enxofre (S) que são ligados a quatro átomos de carbono (C), formando um pentágono regular e por isso pode ser considerado uma molécula cíclica (MCQUADE et al., 2000), possuindo boa mobilidade de cargas, capacidade doadora de elétrons, alta estabilidade química, térmica e elétrica (NOWACKI et al., 2011). A etilenodiamina (EDA) fornece grupos funcionais na superfície do polímero (figura 8), podendo ligar covalentemente as biomoléculas através de seus grupamentos amina (FREITAS, 2014).

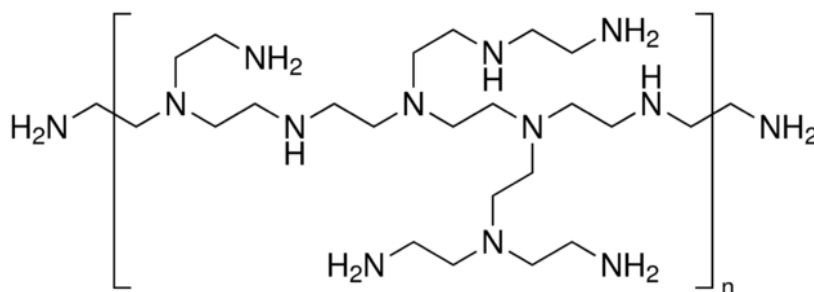
Figura 8: Estrutura química da etilenediamina.



Fonte: A autora.

O PEI é um polieletrólito catiônico rico em amina (Figura 9), com valor de pKa = 5,5, altamente ramificado com grande densidade de cargas, que contém grupos amina primários, secundários e terciários, aproximadamente na proporção 25/50/25 (NOSSER, 2013). Além de ser utilizado para funcionalização da superfície eletródica, o PEI pode ser usado engenhosamente tanto como um agente funcional como um agente redutor e protetor para formação de nanopartículas de ouro (ZHU et al., 2013).

Figura 9: Estrutura do PEI ramificado.



Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/408727?lang=pt®ion=BR>

A funcionalização de superfícies ou nanopartículas utilizando o PEI é facilitada pela sua capacidade de formar complexos com polieletrólitos catiônicos e íons metálicos. Esses polímeros agem como agente controlador de tamanho e conferem grande estabilidade aos nanocompósitos (JAHAN et al., 2014). Outra vantagem da utilização do PEI é a obtenção de grupos funcionais na superfície das nanopartículas através da síntese em uma única etapa. O PEI forma um escudo carregado positivamente ao redor das NPsAu prevenindo sua agregação em solução e fornecendo uma ligação para ancorar as nanopartículas sobre a superfície do eletrodo (FRASCA et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolvimento de imunossensor empregando plataforma uma nano-híbrida à base de nanotubos de carbono e filmes poliméricos visando o imunodiagnóstico da proteína NS1 do DENV.

3.2 ESPECÍFICOS

- Obter de filme de PEI e modificação obtendo filme compósito nanoestruturado;
- Imobilizar covalentemente de anticorpos e antígenos do DENV;
- Estudar viabilidade do biossensor nanoestruturado para detecção do DENV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

Etilenodiamina, etildimetilamino-propil-carbodiimida (EDC), hidroxisuccinimida (NHS) e glicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich, (Saint Louis, EUA). Ferrocianeto de potássio, ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) foram obtidos da VETEC (São Paulo, Br). Anticorpos monoclonais de rato contra a glicoproteína NS1 do vírus da dengue (ab138696) e a proteína recombinante do vírus da dengue NS1 de comprimento total (ab64456) e antígenos NS1 usados para a preparação do nanosensor foram adquiridos da ABCAM (Cambridge, Massachusetts, EUA). Todos os demais reagentes, sais e solventes foram de grau analítico adquiridos da F. Maia (São Paulo, Brasil). Nanotubos de carbono de múltiplas paredes foram adquiridos da Dropsens Inc. (Oviedo, ESP). Água ultra-pura utilizada no preparo de soluções e tampões foi obtida utilizando uma unidade milli-Q (Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA).

4.2. OBTENÇÃO DO IMUNOSENSOR

4.2.1. Montagem do filme nanoestruturado

✓ *Crescimento do filme de Polietilenoimina*

O filme de polietilenoimina (PEI) foi obtido por eletropolimerização de monômeros de EDA através da técnica de voltametria cíclica usando como eletrodo de trabalho um eletrodo de ouro de diâmetro aproximado de 1,12 mm, eletrodo de referência Ag/AgCl (3M KCl) e eletrodo auxiliar de fio helicoidal de platina. Estes foram conectados a um potenciostato *IviumCompactstat* (Eindhoven, Holanda) acoplados a um microcomputador e controlado por Iviumsoft. Para eletropolimerização, os eletrodos foram imersos na célula eletroquímica de volume interno de 5 mL, contendo a mistura [1:1] de 0,1 M de EDA [1:1] e 0,1 M de Perclorato de lítio preparadas em acetronitrila. A eletropolimerização foi acompanhada através dos traçados eletrográficos dos voltamogramas cíclicos aplicando-se uma velocidade de varredura de 50 mV/s, numa janela de potencial entre -1,8 e 1,9V, com potencial de passo de 10mV. Após o crescimento do filme polimérico, os eletrodos foram lavados exaustivamente com água ultra-pura para realização das caracterizações eletroquímicas.

Para realização das medidas de espessura, a eletropolimerização foi realizada sobre o eletrodo de cristal de quartzo 10 Mz (Universal Sensors, USA) utilizando-se o mesmo sistema tri-eletródico, sendo agora utilizado como eletrodo de trabalho o eletrodo de cristal de quartzo com os dois terminais curto-circuitados.

✓ **Deposição dos NTCs-COOH**

Inicialmente, 1 mg de NTCs-COOH foram dispersos em 1 mL do solvente orgânico dimetilformamida (DMF) e submetidos em banho ultrassom por 1h. Após a dispersão dos NTCs-COOH, estes foram pré-ativados incubando-os em uma solução aquosa [1:1] de 20 mM de EDC e 50 mM de NHS, em temperatura ambiente, deixada em repouso durante 1h. Após esta etapa, uma alíquota da suspensão de NTCs-COOH pré-ativados foi pipetada sobre a superfície eletródica e deixada em repouso por 30 minutos, seguida por secagem à estufa.

4.2.2 Imobilização de anticorpos anti-NS1 e imunoensaio

A imobilização do anticorpo anti-NS1 foi realizada depositando sobre a superfície eletródica uma alíquota de 2 μ L de anti-NS1 (10 μ g/mL). A concentração adotada foi baseada em estudos prévios do grupo (DIAS et al., 2014). O eletrodo foi incubado em câmara úmida por 1h, a temperatura ambiente (~ 24 °C). Anticorpos remanescentes não covalentemente ligados foram removidos com 4 lavagens com PBS seguida por lavagem com água ultra-pura. Os grupos carboxílicos remanescentes não reagentes com anti-NS1 foram bloqueados empregando-se incubação com solução de 100 mM de glicina preparada em PBS.

A interação antígeno-anticorpo na superfície do eletrodo foi medida depositando uma alíquota de 0,2 μ L de uma amostra de NS1 sobre a superfície sensora e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram preparadas em tampão PBS pH 7,2.

4.3 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As caracterizações eletroquímicas foram realizadas empregando-se as técnicas de voltametria cíclica (VC) em um potenciostato *Ivium Compactstat* (Eindhoven, Holanda) que tem interface com um sistema de computador e controlado pelo *IviumSoft*. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um sistema de três eletrodos que compreendeu um eletrodo de ouro (Au) como eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e o fio

de platina helicoidal como contra eletrodo. Estes foram imersos em uma célula eletroquímica de volume de 5mL em 5 mmol L⁻¹ K₄[Fe (CN)₆]⁴⁻/ K₃[Fe (CN)₆]³⁻ em solução de KCl a 0.1mol L⁻¹ (pH 7,0). Todas as medidas foram acompanhadas através dos traçados eletrográficos dos voltamogramas cíclicos aplicando-se uma velocidade de varredura de 50 mV/s, numa janela de potencial entre -0,2 e 0,6V, com potencial de passo de 10mV, à temperatura ambiente (aproximadamente 23°C)

As repostas analíticas à proteína NS1 foram obtidas empregando-se a técnica de voltametria de onda quadrada. As medidas foram registradas numa janela de potencial entre 0,0 a 0,5 V a 10 Hz com amplitude de pulso em 10 mV, um potencial de 10 mV e um tempo de equilíbrio de 10s. A resposta analítica para o NS1 foi obtida levando em consideração a diferença entre a corrente de pico (ΔI) do NS1. Uma diluição do antígeno NS1(0,1 µL) foi feita para obter a curva analítica do sensor. A obtenção da curva analítica deu-se pelo monitoramento em tempo real através da técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). O pulso foi de 0 a 0,5 V vs, com amplitude de pulso de 5mV, largura de 10 ms e potencial de 100 mV/s. A resposta analítica do NS1 foi obtida pela diferença entre a altura dos picos de corrente do eletrodo com o antígeno em relação a glicina (branco).

4.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA DA SUPERFÍCIE SENSORA

4.4.1 Análise de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

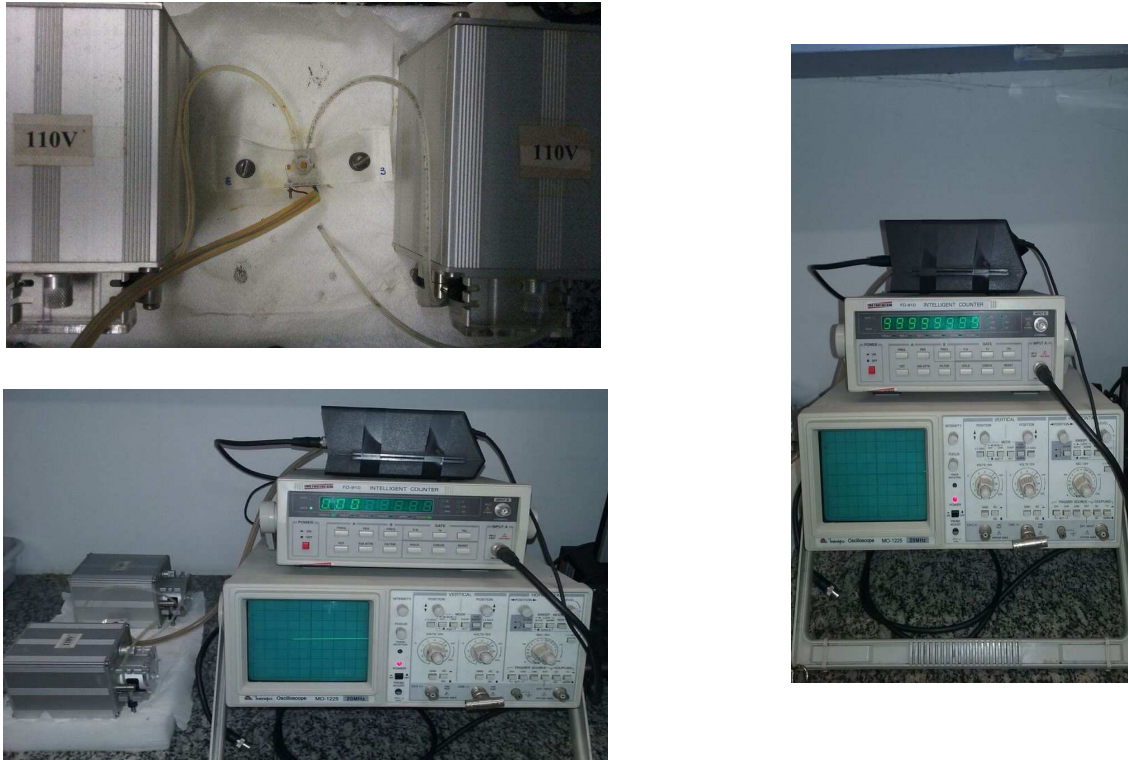
Para obtenção dos espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), foi utilizado um espectrofotômetro Bruker, Modelo IFS 66 e - Spectrum (cidade, país) no modo de reflectância total atenuada (RTA). Os espectros foram obtidos no intervalo de 500 a 4000 cm⁻¹ com 20 varreduras

4.4.2 Análise por microbalança de cristal de quartzo

As etapas de modificações da superfície sensora foram observadas em um sistema piezoelétrico de microbalança de cristal de quartzo (Figura 10). O eletrodo de cristal de quartzo (QCM - corte AT, placa de quartzo 14 mm, eletrodo de ouro 8 mm, frequência de 10 MHz) da *Universal Sensors* (Nova Orleans, EUA) foi montado em uma célula de fluxo desenvolvida no laboratório, na qual apenas um dos lados dos eletrodos foi exposto à solução.

O sistema foi operado em um fluxo contínuo auxiliado por uma bomba peristáltica (modelo Watson-Marlow SCI Q 400, Inglaterra) configuração para 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para cada etapa de modificação da superfície sensor, o fluxo das soluções foi interrompido para mensurar os valores de frequência. O sinal de saída foi registrado por um contador de frequência (Agilent, modelo 011, EUA).

Figura 10: Detalhe da célula (A) e frequencímetro (B) e bombas peristálticas utilizados para realização das análises do cristal de quartzo.



Fonte: A autora.

4.4.3 Obtenção de micrografias por microscopia eletrônica de varredura

Para obtenção das micrografias foi utilizado o equipamento de marca TESCAN, modelo VEGA 3 com compartimento tipo LM e filamento de Tungstênio com detectores de elétrons secundários e de elétrons retro espalhados. Para se obter as imagens, os eletrodos foram metalizados em um tempo de 180s (3 minutos) na metalizadora Quorum Technologies LTD, Ashford, modelo Q15OR.

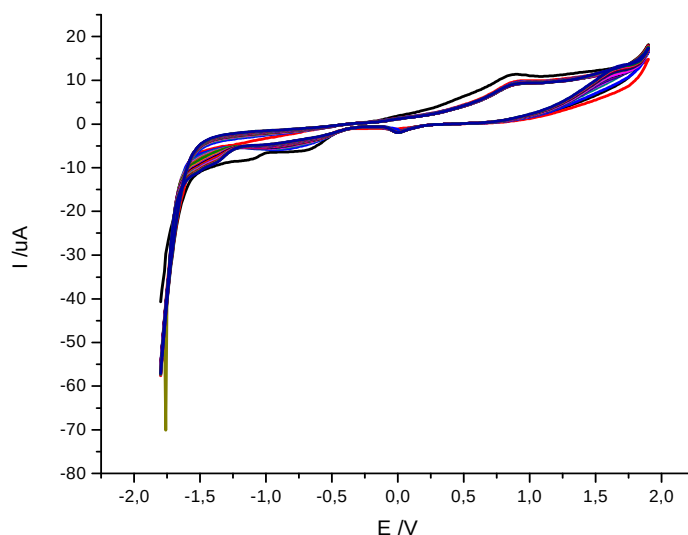
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CRESCIMENTO DO FILME DE POLIETILENOIMINA

5.1.1 Síntese de PEI por eletropolimerização

A Figura 11 exibe os voltamogramas cíclicos característicos do crescimento eletroquímico do PEI sobre o eletrodo de quartzo em uma solução de acetonitrila contendo 0,1M de EDA em 0,1 M de LiClO_4 em proporção de 1:1. Os monômeros foram eletroquimicamente oxidados, observando-se o pico de aproximadamente 0,75 V correspondente a esse processo de oxidação. Também foram observados picos de redução para os produtos formados em -0,8 V. O primeiro pico de oxidação pode ser atribuído a oxidação do grupo amino que corresponde ao radical cátion NH_2^+ . A diminuição dos picos de oxidação se deve à formação do filme sobre a superfície do eletrodo. Observou-se também, um aumento dos picos de redução mostrando que os radicais cátions foram consumidos durante a eletropolimerização do EDA (SEGUT et al., 2010; LAKARD et al., 2002).

Figura 11: Voltamogramas cíclicos típico do crescimento do filme de PEI após 25 ciclos.



✓ Otimização da velocidade de varredura da eletropolimerização do filme de PEI

A densidade de corrente fornecida para a eletropolimerização durante as voltametrias cíclicas exerce importância sobre a espessura do filme, bem como de sua natureza condutiva. Figura 12a exibe o perfil dos VCs obtidos na eletropolimerização do filme de PEI para as diferentes velocidades de varredura (10 a 50 mV/s). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em presença de 5 mmol L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/ K₃[Fe(CN)₆]³⁻ em solução de KCl a 0.1mol L⁻¹ (pH 7,0). Observou-se um incremento nos picos de corrente redox com a velocidade de varredura de potencial, indicando que a quantidade de monômeros polimerizados à superfície do eletrodo aumenta com a densidade de corrente atingindo um *plateau* em 30 mV/s (Figura12b). No presente trabalho foi adotado para todos os experimentos remanescentes a velocidade de 50 mV/s por requerer menor tempo para o crescimento do filme.

Figura 12a: Voltamogramas cíclicos em função da velocidade de varredura: a) 10 mVs⁻¹; b) 20 mVs⁻¹; c) 30 mVs⁻¹; d) 40 mVs⁻¹ e e) 50 mVs⁻¹, em 5 mmol L⁻¹ K₄[Fe (CN)₆]⁴⁻/ K₃[Fe (CN)₆]³⁻ em solução de KCl a 0.1mol L⁻¹.

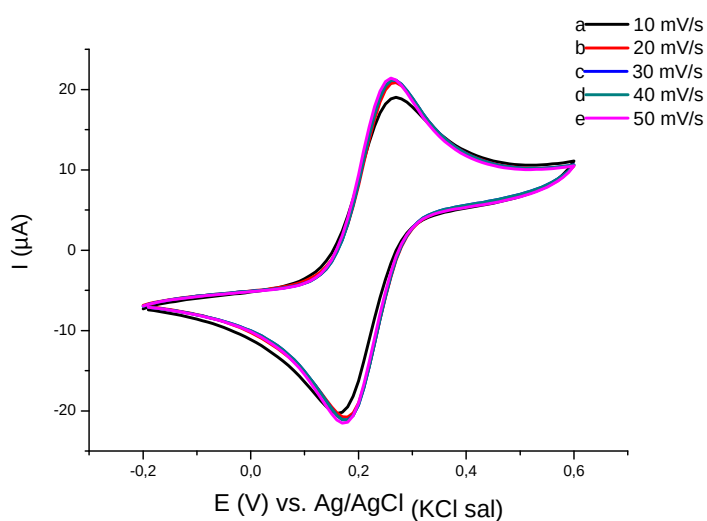
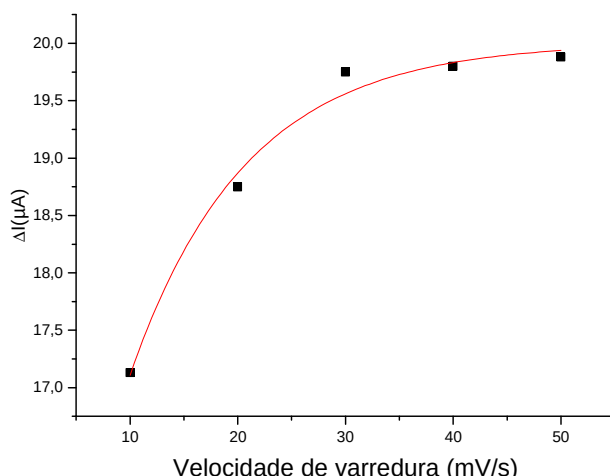


Figura 12b: Efeito da velocidade de varredura sobre a corrente de pico anódico.



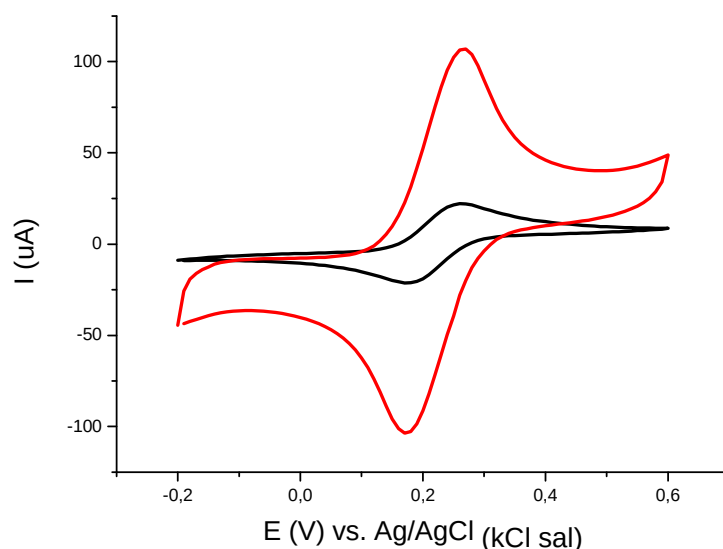
✓ Caracterização eletroquímica

A voltametria cíclica representa uma das técnicas analíticas mais utilizadas para observar modificações na superfície eletródica (CARRARA et al., 2014). A deposição do filme sobre a superfície sensora foi observada através do aumento das amplitudes dos picos redox dos voltamogramas cíclicos representados na figura 13 quando o eletrodo modificado foi imerso em uma célula eletroquímica contendo a sonda redox de ferri/ferrocianeto de potássio, estudando seu comportamento eletroquímico no processo de imersão dos três eletrodos. De acordo com a equação de Randles – Sevcik o aumento da superfície ativa do eletrodo pode ser estimado pela equação:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) A D^{1/2} n^{3/2} \nu^{1/2} C \quad [1]$$

onde i_p é o valor corrente de pico, A representa o eletrodo ativo (cm^2), D é o coeficiente de difusão da molécula em solução ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), n é o número de elétrons envolvidos na reação redox, ν é a taxa de varrimento de potencial (Vs^{-1}) e C é a concentração da molécula de sonda utilizada na solução ferri/ferrocianeto (CABRAL et al., 2016). Foi possível determinar um aumento de aproximadamente 4,5 vezes da área eletroativa, confirmando a eletropolimerização do EDA, bem como sua natureza condutiva (IONESCU et al., 2010).

Figura 13: Voltamogramas cíclicos do eletrodo limpo (preto) e do eletrodo modificado com PEI (vermelho) em $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução de KCl a 0.1 mol L^{-1} .



Neste estudo foi utilizada a técnica de eletropolimerização para a síntese e deposição do PEI, pois esta técnica demonstra ter facilidade no controle de formação do filme (espessura e quantidade) (KUMAR E CHEN, 2008). A formação do polímero pela eletropolimerização normalmente têm grupos funcionais que depois de serem ativados podem imobilizar biomoléculas via um grupo funcional específico, neste caso aminas primárias (NH_2) (TUNCAGIL et al., 2009). O EDA contém grupos amina, possuindo monômeros para a formação do polietilenoimina linear e ramificado. Os outros reagentes, o perclorato de lítio LiClO_4 e CN (acetonitrila) agiram como contra íon e catalisadores, respectivamente.

A estabilidade e alguns dos processos mecanísticos envolvidos na obtenção do filme de PEI foram avaliados variando-se a velocidade do potencial entre 10 mV s^{-1} a 150 mV s^{-1} (Figura 14a). As amplitudes dos picos de correntes anódicas e catódicas apresentaram um aumento linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando um processo de transferência de elétrons controlado por difusão. (Figura 14b).

Figura 14a: Perfil voltamétrico do PEI em $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ sob diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 e 150 mV s^{-1}) em solução de KCl a 0.1 mol L^{-1} .

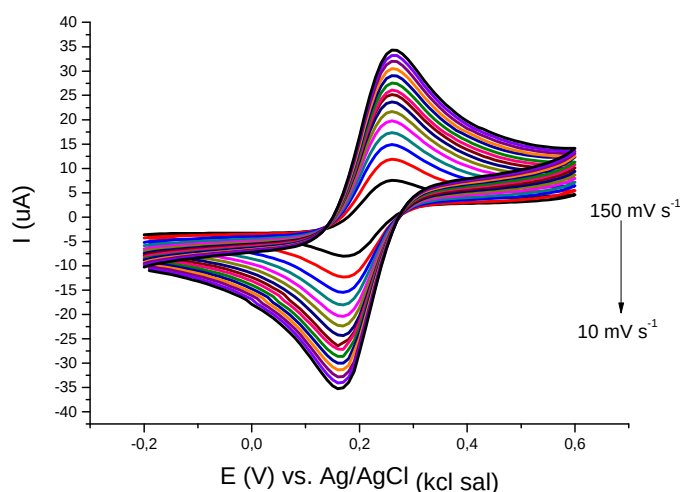
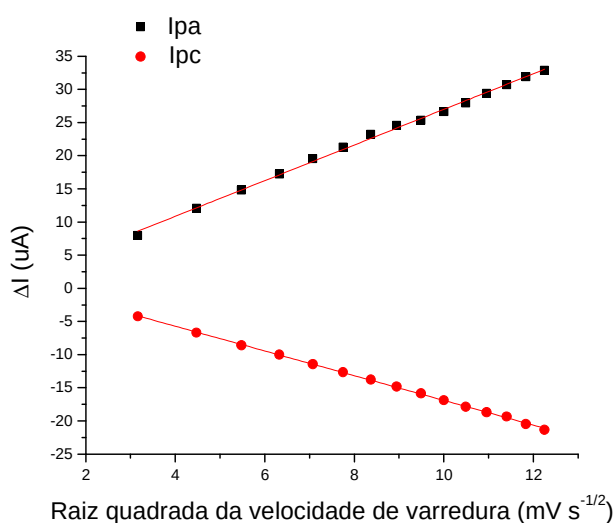


Figura 14b: Corrente dos picos anódicos e catódicos versus raiz quadrada da velocidade do potencial de varredura.



A estabilidade eletroquímica do filme de PEI polimerizado sobre o eletrodo foi avaliada submetendo-se o eletrodo em 25 varreduras cíclicas consecutivas numa gama de potencial entre $-0,2 \text{ V}$ a $0,6 \text{ V}$, a uma velocidade de varredura de potencial de $0,05 \text{ V/s}$ com sonda redox de $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Os coeficientes de variação dos picos anódicos e catódicos foram iguais a $0,01\%$ á $0,1\%$, respectivamente, demonstrando que o filme de PEI apresentou ótima estabilidade após a verificação da corrente dos picos anódicos e catódicos, sendo modificados com a velocidade de varredura (HUANG et al.,

2010). As informações que envolvem os mecanismos eletroquímicos muitas vezes podem ser obtidos pela relação da taxa de pico entre a corrente catódica / anódica (GOMES-FILHO et al., 2013).

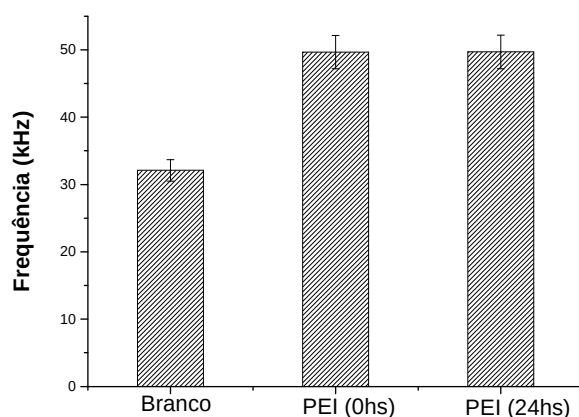
5.1.2. Caracterização por sistema microbalança de cristal de quartzo

A microbalança de cristal de quartzo é um dispositivo de extrema sensibilidade no que se diz respeito à variação de massa, portanto permite a monitoração em tempo real das modificações envolvidas nas superfícies eletródicas em função da variação de frequência elétrica (SILVA, 2004). O sistema de microbalança de cristal de quartzo mostrou ser uma ferramenta eficiente para detectar moléculas, estimar constantes de afinidade e estudar os processos de adesão celular (CARRILLO et al. , 2012; MATTOS et al. 2012).

Uma das etapas fundamentais no desenvolvimento da plataforma nanoestruturada proposta consistiu na obtenção do filme polimérico de recobrimento, devido ao seu importante papel tanto na transferência de elétrons quanto na ancoragem dos NTCs. A modificação do filme foi realizada através da eletropolimerização por voltametria cíclica em sonda redox de 5mmol L^{-1} $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, com o potencial de velocidade de varredura em 50 mVs^{-1} , e o potencial variando entre $-1,800$ a $1,900\text{ V}$, com leitura consecutiva de 25 ciclos.

A estabilidade do filme de PEI foi estudada em relação à variação de massa no sistema piezoelétrico. Na Figura 15 pode-se observar que as frequências obtidas para as medidas das camadas de PEI, $t = 0\text{h}$ e t após 24h foram praticamente idênticas. O eletrodo modificado com PEI ($t = 0\text{h}$) apresentou frequência media de $49.651 \pm 5\text{ Hz}$ e por último o QCM modificado com PEI após 24 horas com a média de $49.692 \pm 5\text{ Hz}$ ($p > 0.05$).

Figura 15: Resposta em frequência (kHz) por segundo (Filme polimérico).



A espessura do filme de PEI foi determinada por análise de alterações em relação ao aumento de frequência elétrica em Hz do sistema de microbalança de cristal de quartzo com a massa depositada, de acordo com a equação de Sauerbrey (1959):

$$\Delta f = \frac{-2 \cdot f_0^2}{A \cdot \sqrt{\rho_q \cdot \mu_q}} \cdot \Delta m \quad \text{Equação 2}$$

onde Δf representa a mudança de frequência medida em Hz, f_0 é a frequência de ressonância de oscilação fundamental do cristal de quartzo em Hz, A é a área do eletrodo em cm^2 , Δm a variação de massa devido à deposição na superfície em gramas (unidade/área), μ_q e ρ_q são o módulo de cisalhamento e densidade de quartzo ($2,95 \times 10^{11}$ dina/ cm^2 e $2,65$ g/ cm^3 respectivamente) (LIU et al., 2001; FONSECA et al., 2011).

Após a determinação da variação de massa (Δm) e com base na equação 3,

$$t_f = \frac{\Delta m}{\rho_f} \quad \text{Equação 3}$$

onde ρ_f é a densidade do filme em g/ cm^3 , Δm é a mudança na massa por unidade de área em g/ cm^2 (calculada através da equação de Sauerbrey) e t_f é a espessura do filme em cm. determinou-se a espessura do filme depositado, admitindo-se $1,08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a densidade DF do polietilenoimina. Assim, obteve-se uma variação média de espessura para 4 diferentes eletrodos de $104,00 \pm 23,84$ nm (tabela 4). O baixo coeficiente de variação apresentado ($\text{CV} < 25\%$) mostrou que o processo de obtenção do filme de PEI foi considerado controlado.

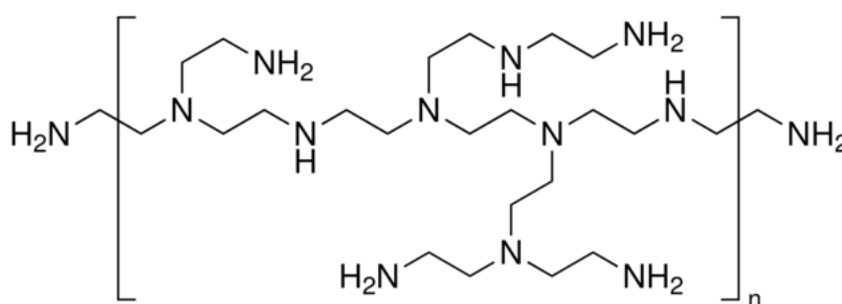
Tabela 4: Medidas de frequência de diferentes eletrodos de cristal de quartzo.

Espessura do filme de Polietilenoimina						
Eletrodo 1	Eletrodo 2	Eletrodo 3	Eletrodo 4	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (CV)
80,67nm	125,91nm	124,51nm	87,16 nm	104,00 nm	23,84 nm	22,9 nm

Dentre diversas possibilidades de escolha do polímero, o PEI foi selecionado devido a sua alta concentração de grupos amina (figura 16), permitindo o acoplamento com os NTCs carboxilados. O PEI pode, em geral, se apresentar de duas formas: linear ou ramificada. Em ambas as formas, o polímero pode ser considerado um agente bifuncional o que permite grande adequação às superfícies sensoras. A síntese do PEI de modo eletroquímico tem a

vantagem de permitir o controle do filme formado, característica que pode ser controlada pela concentração de monômeros e tempo de eletropolimerização, variáveis importantes para obtenção de uma cobertura máxima da superfície de PEI diretamente adsorvida no substrato (YUN et al., 2014). Nieblas et al., (2013) observou que as espessuras dos filmes PEI podem aumentar com o tempo da reação de eletrodeposição; no estudo, os autores observaram que aos 13 minutos de reação (0,1M EDA), o filme atingiu uma espessura média de 100 nm, sendo também muito homogêneo. No presente estudo, a espessura do PEI sintetizado obteve uma média de $104 \text{ nm} \pm 24 \text{ nm}$ de espessura, mostrando que o método de síntese utilizado aqui forneceu um filme de PEI com espessura similar.

Figura 16: Representação do polímero polietilenoimina ramificado.



Em termos gerais, quando o EDA é usado como agente de complexação, a estrutura química implica mais rapidamente a deposição do filme de PEI, quando comparada com outro filme obtido por trietanolamina. Isto pode ser explicado pelo fato do EDA ter um maior número de grupos amino presentes na sua molécula para formar centros complexos (NIEBLAS et al., 2013).

5.2 DEPOSIÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO SOBRE O FILME DE PEI (OBTENÇÃO DO NANO-HÍBRIDO)

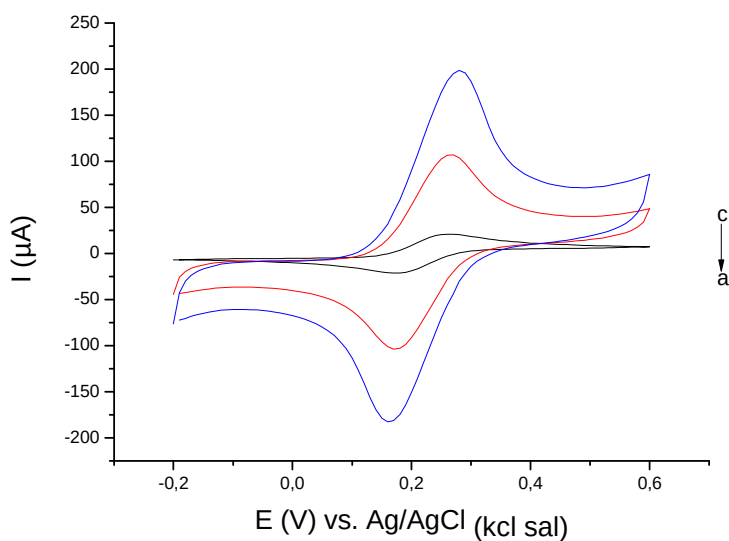
5.2.1. Caracterização Eletroquímica e por sistema microbalança de cristal de quartzo

Nos últimos anos, os NTCs têm sido bastante aplicados em sensores devido à sua boa estabilidade química, boa condutividade elétrica, força mecânica excelente e possibilidade de funcionalizar a superfície dos mesmos para interação com moléculas específicas (TAURINO et al., 2012; CARRARA et al., 2014). Os NTCs proporcionam aos eletrodos modificados uma área eletroativa maior, promovendo baixos potenciais de trabalho, melhorando assim a

reversibilidade de alguns processos e por isso permite o melhoramento de imobilização de antígeno-anticorpo, enzimas, ácidos nucleicos, proteínas (REZAEI; DAMIRI, 2008). Estas características dos NTCs apresentam impacto importante no que se diz respeito à sensibilidade e limite de detecção do sensor.

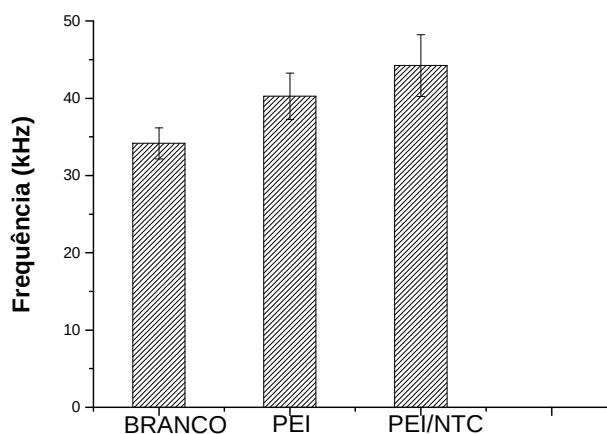
Na literatura, é estabelecido que a ligação dos NTCs à superfície sensora de modo adsorptivo pode resultar em baixa reprodutibilidade devido a este nanomaterial ser lixiviado durante as análises (SILVA et al., 2014). No presente estudo os NTCs foram depositados sobre o filme de PEI e estes NTCs são funcionalizados com grupos carboxílicos de modo que ocorra a interação com o filme polimérico. Além disso, os NTCs funcionalizados foram utilizados para promover uma ligação amida com os grupos amino presentes no PEI sintetizado sobre o eletrodo.

Figura 17: Voltamogramas cíclicos do eletrodo limpo (a), do eletrodo modificado com PEI (b) e eletrodo modificado com nano-híbrido-PEI/NTC (c) 5mmol L^{-1} $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução de KCl a 0.1mol L^{-1} .



Quando se observa a Figura 18 é notório o aumento da massa em relação ao eletrodo QCM limpo e com NTCs de acordo com a média da frequência.

Figura 18: Resposta com a média da frequência (kHz) por segundo (NTCs)



5.3 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

A técnica de FT-IR permite identificar os grupos funcionais orgânicos presentes na amostra. Neste trabalho, a técnica foi utilizada para verificar a formação do filme de PEI na superfície do eletrodo, bem como para acompanhar as etapas de modificações da superfície sensora através da caracterização estrutural dos grupos químicos dos compostos orgânicos empregados. A verificação de formação do filme polimérico e interação deste com os nanotubos é importante para garantir o desenvolvimento de uma plataforma sensora robusta.

O espectro de FTIR do disco de ouro limpo é apresentado na Figura 19 (curva a) para comparação, uma vez que não se observa bandas características de grupos funcionais no mesmo. No espectro do filme de PEI, apresentado na Figura 19 (curva b), é possível observar bandas características do filme polimérico formado, típicas dos grupos carboxílicos. A banda em 3321 cm^{-1} correspondente ao alongamento do grupo -NH (demasiado grande o que discrimina as bandas correspondentes a grupos -NH de bandas correspondente a grupos -NH_2 que apresenta bandas estreitas), a banda 2365 cm^{-1} corresponde ao alongamento C-H (LAKARD et al, 2004). Já as bandas 1640 cm^{-1} e 1563 cm^{-1} correspondem à deformação do grupo N-H de amina primária e C-H de amina secundária respectivamente. A banda 1483 cm^{-1} corresponde ao estiramento do tipo tesoura do -CH_2 . As bandas 1380 cm^{-1} e 1322 cm^{-1} são correspondentes ao estiramento do grupo de aminas terciárias e secundárias- C-N respectivamente. E no final do espectro do FTIR pode-se observar o estiramento das bandas 874 cm^{-1} e 871 cm^{-1} do grupo N-H . A curva (c) corresponde ao espectro de FTIR do filme de PEI após deposição de NTCs-COOH , observa-se bandas típicas dos nanotubos com grupos

carboxílicos a 3400 cm^{-1} correspondente ao alongamento de O-H presentes nestes grupos. As bandas em 2930 cm^{-1} e 2352 cm^{-1} correspondem ao estiramento de C-H presente no filme de PEI. A banda em 1650 cm^{-1} é relacionada ao estiramento C=O dos grupos carboxílicos, e mais adiante o pico 1436 cm^{-1} do estiramento C=C. A banda em 1414 cm^{-1} corresponde ao estiramento $-\text{CH}_2$ e a banda em 1388 cm^{-1} corresponde ao grupo $-\text{CH}$. Em 1255 cm^{-1} observa-se a banda correspondente à combinação do estiramento C-O e a deformação O-H. As banda em 1100 cm^{-1} e 1062 cm^{-1} apresentam a deformação $=\text{C-H}$ e é observado uma última banda em 650 cm^{-1} correspondente ao estiramento no plano do anel aromático. A Tabela 5 apresenta um resumo dos resultados obtidos no FT-IR. Os espectros do infravermelho confirmam a formação, por eletropolimerização, do filme de PEI e a deposição do NTCs sobre este filme indicando que houve a interação para a formação da plataforma sensora nanoestruturada, (SILVA et al., 2014).

Figura 19: Infravermelho por Transformada de Fourier; banda a usada como controle; banda b PEI e banda c NTCs/PEI.

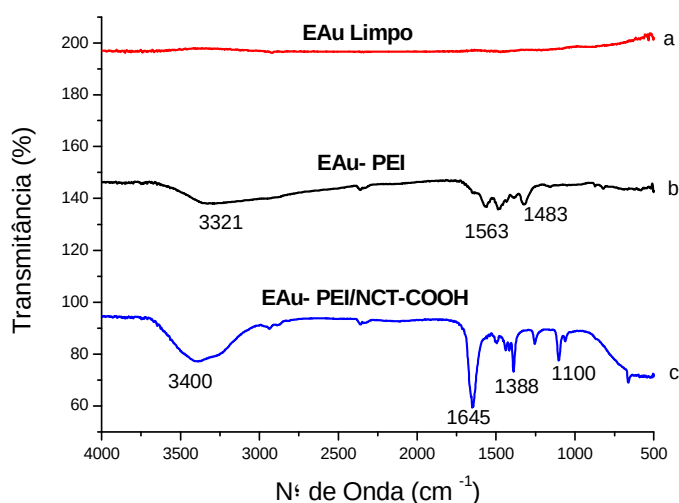


Tabela 5: Correspondências das bandas observadas nos espectros de FTIR do PEI e da amostra NTCs.

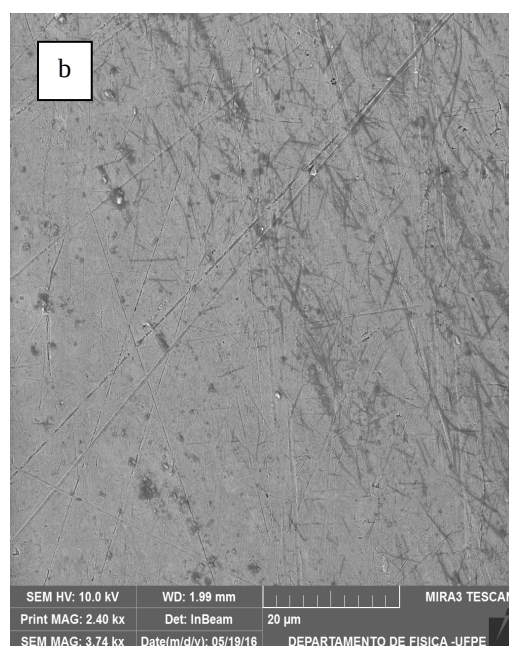
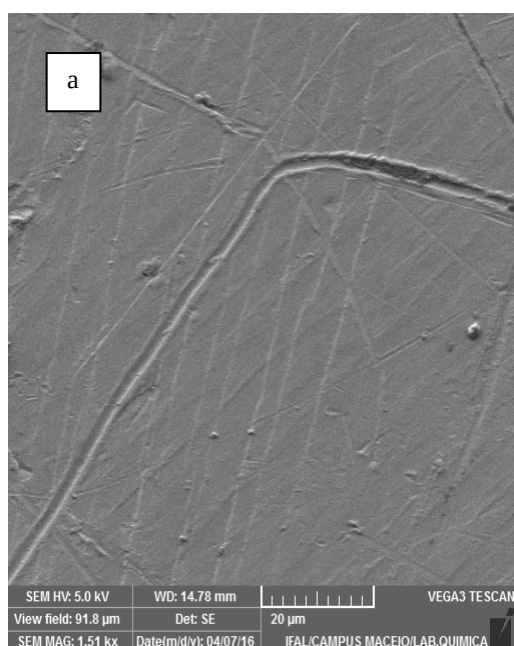
Faixa de frequência (cm^{-1})	Atribuição	Faixa de frequência (cm^{-1})	Atribuição
PEI		NTC's	
3321	Alongamento NH	3400	Estiramento N-H e O-H
2365	Alongamento e vibração C-H	2930	Estiramento C-H
1640	Deformação N-H	2352	Alongamento C-H
1563	Deformação C-H	1645	Estiramento C-C
1483	Estiramento CH_2	1436	Estiramento C-C
1380	Estiramento C-H	1414	Estiramento CH_2
1322	Estiramento C-H	1388	-C-H
874	Estiramento N-H	1255	Combinação do estiramento C-O e deformação O-H

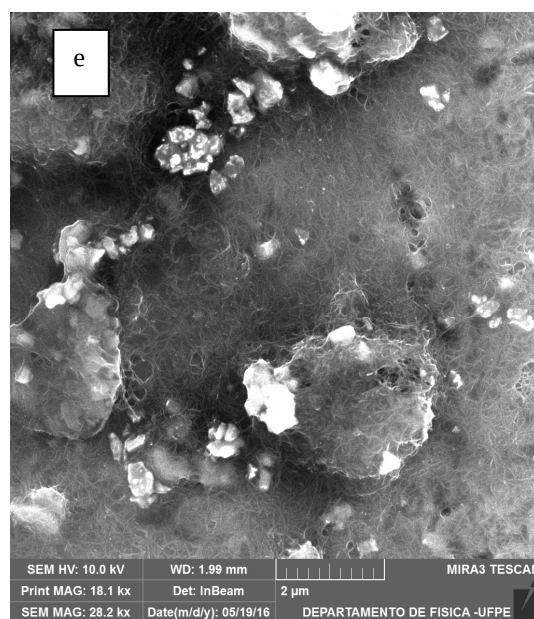
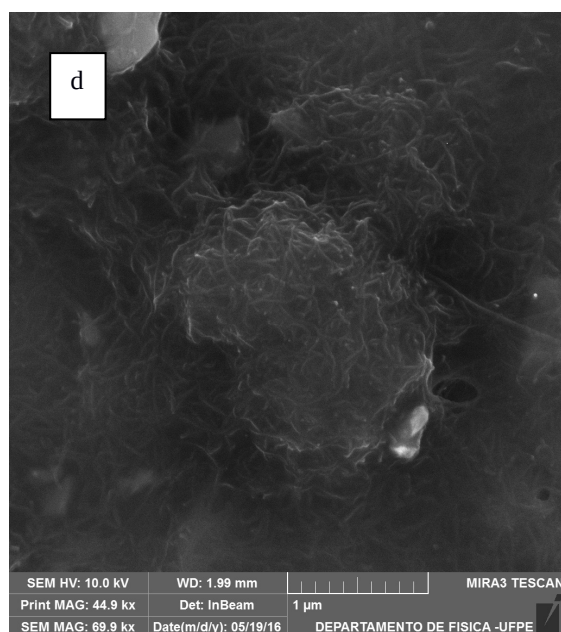
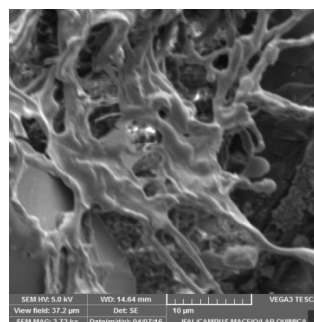
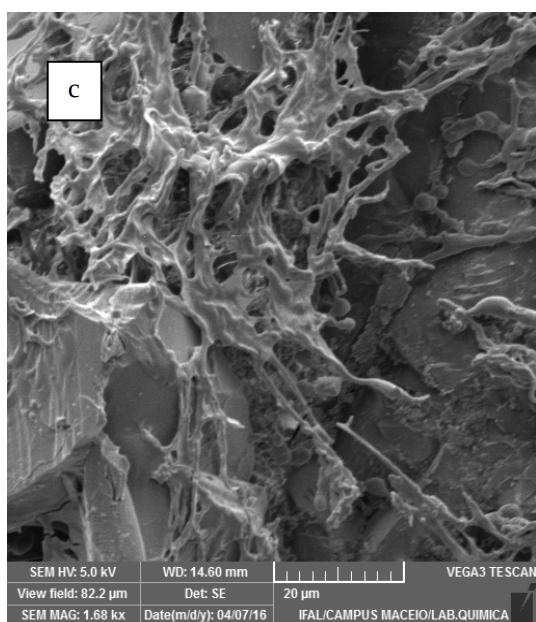
871	Estiramento N-H	1100	Deformação =C-H
		1062	Deformação =C-H
		650	Plano de estiramento do anel

5.4 ANÁLISE DAS MICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micrografias eletrônicas de varredura (MEV) foram realizadas para estudar as estruturas conformacionais do PEI e do NTCs. A modificação gradual da superfície eletródica de ouro com polímero PEI e NTCs foi realizada em condições ideais para a obtenção das micrografias. A micrografia da figura 20 a-b mostra o eletrodo de ouro, após limpeza que foi usado como controle apresentando algumas ranhuras devido ao processo de limpeza (polimento com alumina 0,5 μm), entretanto esta é uma superfície lisa na qual foi realizado o processo de eletropolimerização para obter-se o polímero de PEI. A micrografia da figura 20 c mostra o eletrodo modificado com polímero PEI; observa-se a formação de uma superfície irregular composta por ramificações discretas, sendo assim, pode-se sugerir que o polímero é suavemente ramificado. Um detalhe dessa estrutura é mostrado na figura c (vista expandida). Após a modificação do eletrodo com o PEI, foram depositados os NTCs, estes são mostrados na micrografia da figura 20 d-e. As micrografias mostram os NTCs distribuídos em estruturas aglomeradas “like- spaghetti”.

Figura 20: Imagens de MEV (20 μm). Primeira imagem disco controle (a-b); PEI (c) e NTCs/PEI (d-e).





As micrografias do filme de PEI apresentam estruturas alongadas (ZHANG et al., 2008). Após a modificação do disco com o PEI, foram depositados os NTCs na superfície do disco, como é mostrado na micrografia das figuras 20 d-e. As micrografias mostram os NTCs distribuídos em aglomerados de estruturas semelhantes a “espaguete”. Os NTCs depositados formam um nano-híbrido com o PEI, uma vez que observa-se a presença dos mesmos em meio ao filme de PEI eletrodepositado. O sombreamento visualizado nas micrografias pode indicar a modificação do filme após a deposição dos NTCs, sendo decorrente da solução de

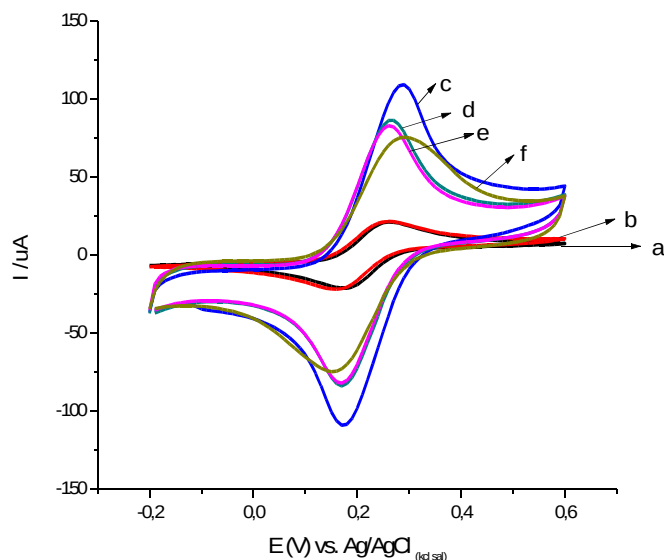
EDC/NHS, estudos da influência de solventes na morfologia do filme serão realizados posteriormente. Conforme Zestos et al., (2014) o NTCs apresentam regiões distintas do PEI que não foram completamente removidos durante o processo de deposição e com isso as regiões de menos impurezas poliméricas são observadas do lado de fora dos NTCs, como se fossem paredes das fibras para as fibras de PEI-NTCs. Os nanotubos de carbono parecem estar em feixes espessos sobre a superfície e são revestidos em PEI-R polímero, provavelmente, isso acontece devido ao processo de obtenção da solução que se deu pela formação das fitas de PEI com o NTCs.

5.5 IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-NS1 COM NTCs/PEI NA PLATAFORMA SENSORA

5.5.1. Etapas do desenvolvimento do imunossensor Eletroquímica

Pode-se observar na Figura 21, curva **a**, um par de picos redox bem definidos identificando a superfície sensora limpa (DIAS et al., 2014). Após essa etapa, foi realizada a modificação do eletrodo através do EDA-LiClO₄. O filme de PEI formado possui inúmeros grupos aminos com atividade catalítica que proporcionaram um aumento nos picos redox. Ainda na curva **b** destaca-se também um aumento da área superficial na resposta após a eletropolimerização com PEI. Na curva **c**, observa-se um aumento significativo na área superficial do eletrodo após a adição dos NTCs previamente ativados com EDC e NHS. O aumento foi de aproximadamente 75% e 80% nos picos redox anódico e catódico. Já na curva **d** foi observado uma diminuição dos picos redox da área ativa, confirmando a imobilização do anticorpo anti-NS1 e, curva **e**, foi depositada uma alíquota de 2 uL de solução de 50 mM de glicina, que age bloqueando as ligações inespecíficas à superfície sensora. A resposta sensora foi desafiada com a incubação com amostra contendo antígenos NS1 (curva f). Nas últimas curvas, devido à natureza isolante de proteínas, um decréscimo dos picos redox é observado, confirmando o bloqueio e a resposta sensora (ZHU et al., 2013).

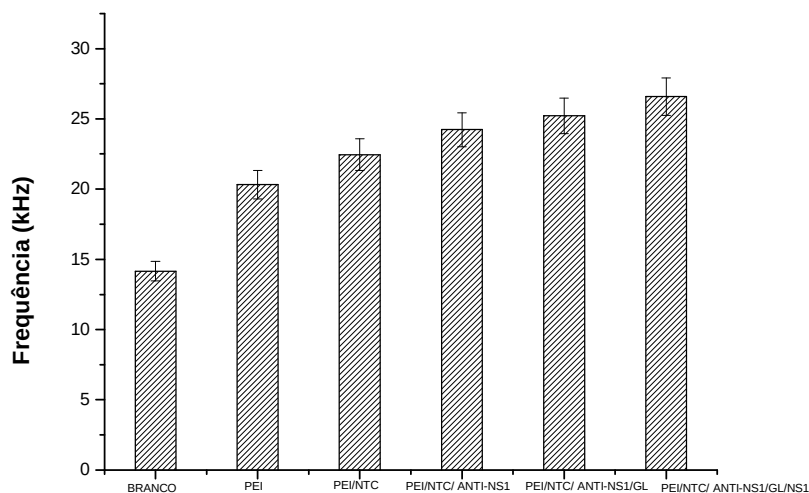
Figura 21: (A) Princípio do imunossensor amperométrico que mostra o passo a passo da construção gradual de imunoelétrodo e o seu princípio de imunoensaio. (B) Voltametria cíclica (a) EAU limpo, (b) PEI, (c)NTCs/PEI, (d) anti-NS1/ NTCs/PEI, (e) Glicina/anti-NS1/ NTCs/PEI, (f) NS1/Glicina/anti-NS1/ NTCs/PEI. Os voltagramas foram realizados em $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, com o potencial de velocidade de varredura em 50 mVs^{-1} , e o potencial variando entre $-0,2$ á $0,6 \text{ V}$.



5.5.2. Etapas do princípio do imunoensaio por sistema microbalança de cristal de quartzo

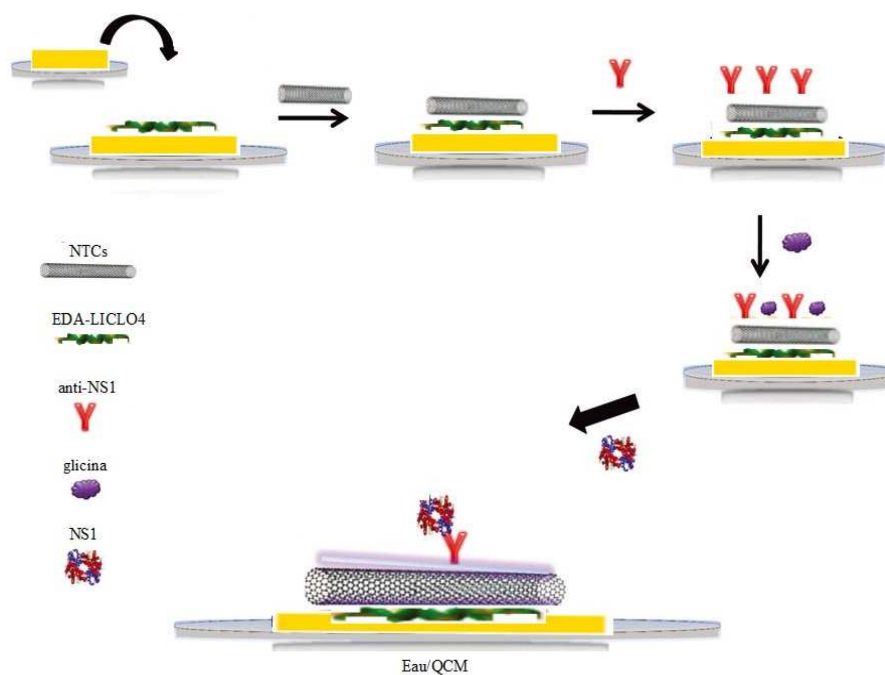
Pode-se observar na Figura 22, que o QCM limpo apresentou uma média de 14,15 kHz, após essa etapa, foi realizada a modificação do eletrodo através do PEI com a média de 20,31 kHz. Houve um aumento da massa com a deposição por fluxo contínuo nas etapas subsequentes, com a média para o QCM NTCs/PEI, 45,92, QCM anti-NS1/NTCs/PEI a média de 24,23 kHz; Glicina/anti-NS1/CNTs/PEI a média foi de 25,21 kHz; NS1 /Glicina/anti-NS1 CNTs/PEI média de 26,58 kHz. A média da frequência em kHz do eletrodo QCM até a última etapa foi de 22,48.

Figura 22: Curva de frequência do QCM.



A Figura 23 apresenta uma representação esquemática das sucessivas etapas de desenvolvimento da plataforma sensora e do princípio de imunoensaio utilizado.

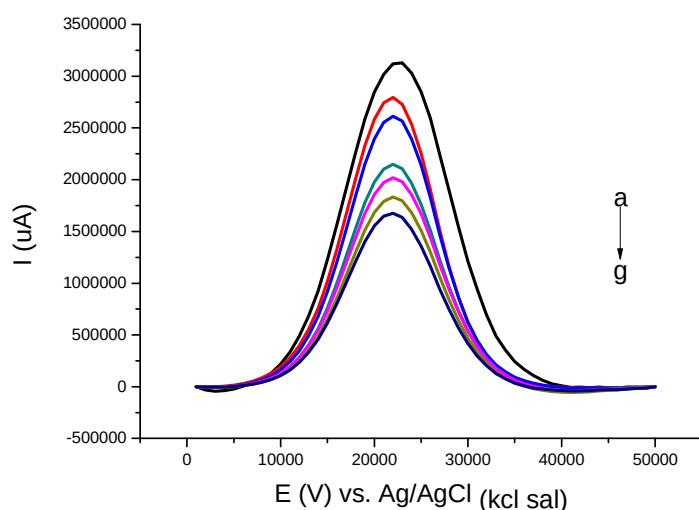
Figura 23: Representação esquemática do princípio de imunoensaio para a construção do biossensor eletroquímico e QCM. Adaptada de Silva et al. (2014).



5.6 RESPOSTA ANALÍTICA DO IMUNOSENSOR À PROTEÍNA NS1

A curva analítica foi obtida com o antígeno NS1 a partir da mesma concentração. Os experimentos foram realizados através da técnica de voltametria de onda quadrada em solução ferri/ferrocianeto utilizado como eletrólito. As respostas foram obtidas a partir dos picos catódicos após a adição da glicina a partir de diferença entre em branco, e os dados foram ajustados a uma equação de regressão linear, observando-se o decréscimo das correntes em relação ao aumento da concentração de NS1 devido a natureza isolante da proteína que impedem a transferência eletrônica.

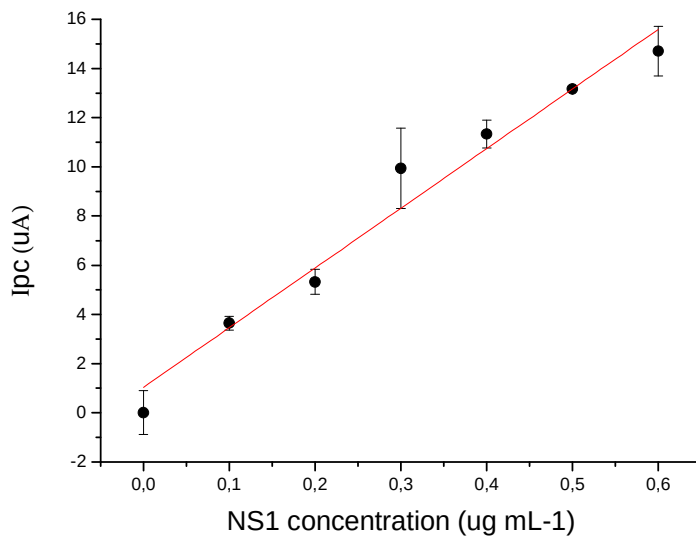
Figura 24a: Curvas da voltametria de onda quadrada respostas analíticas para diferentes concentrações de NS1 obtido em 5mmolL^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ como sonda redox : (a) em branco solução, curvas b- g representam 0,1-0,6 μL de NS1.



As reduções nas correntes de pico foram proporcionais às concentrações de NS1 em um intervalo linear de 0,1 a 0,6 $\mu\text{g/mL}$ -1 (Figura 24 a). Os dados ajustados para a equação de regressão linear mostrou um coeficiente de correlação de 0,996 ($p < 0,01$, $n = 7$) e um erro relativo baixo (1%). Com base na RSD da amostra em branco e a inclinação da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculada como: $\text{LOD} = 3 (\text{RSD} / \text{inclinação})$ (Figura 24b). O limite de detecção foi calculado de acordo com a IUPAC apresentando aproximadamente 0,038 $\mu\text{g/mL}$ -1e seu limite de quantificação real de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, sendo menor do que foi relatado por Wu et al., (2005) cujo limite de detecção foi de 0,740 $\mu\text{g/mL}$ e próximo ao limite de detecção relatado por Silva et al., (2015) que foi de 0,035 $\mu\text{g/mL}$. Alcon et al., (2002) relataram que a antígeno NS1 é encontrado na circulação a partir do primeiro dia após o início da febre até o nono dia. Na infecção primária, os níveis de NS1 variaram 0,04 a

2 $\mu\text{g/mL}$ -1 em amostras de soro de fase aguda (até 7 dias) e na infecção secundária, os níveis de NS1 variaram de 0,01 a 2 $\mu\text{g/mL}$ -1.

Figura 24b: Fit linear da relação entre ΔI e as concentrações de NS1.



Muitos biossensores relatados falam da detecção do vírus da dengue baseados na detecção viral de DNA ou RNA (BAEUMNER et al., 2002; ZAYTSEVA et al., 2004), entretanto estes materiais são envelopados e geneticamente pouco estáveis, dificultando assim o diagnóstico. O sistema piezoelétrico utilizando a microbalança de cristal de quartzo (QCM) foi anteriormente relatado por outros autores para a detecção de antígenos NS1 (TAI et al., 2006; WU et al., 2005 e apesar da sua alta sensibilidade, existem algumas preocupações que giram em torno das interações complexas entre os parâmetros interfacial (isto é, a viscosidade da superfície e solução de amostra, a energia de superfície e de rugosidade, o efeito de ondas de compressão, a força iônica e as constantes dielétricas do eletrólito) e inúmeras interferências ambientais sobre o sinal de detecção (incluindo flutuações de ar pequenas) (CAVALCANTI et al., 2012).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para o biossensor mostram um bom desempenho na aplicação desta técnica para o desenvolvimento de biossensores funcionalizados capazes de detectar antígenos NS1 do vírus dengue. Neste trabalho foi desenvolvido um método *label free* para diagnóstico da proteína NS1, pela técnica de voltametria de onda quadrada, apresentando boa sensibilidade para rastreamento de NS1 diluído em PBS.

Comparado aos métodos convencionais, é econômico e prático a partir de um ponto de vista, a imobilização de anticorpos pode ser facilmente analisada. Demonstrou uma sensibilidade eficiente e boa, facilidade de operação, amostra mínima para demonstrar um aumento na massa, e custo econômico. O imunossensor mostrou uma resposta linear de 0,1 a 0,6 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Os dados ajustados para a equação de regressão linear mostrou um coeficiente de correlação de 0,996 ($p \ll 0,01$, $n = 7$) e um erro relativo baixo (1%). Este imunossensor mostrou um limite de detecção de 0,038 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ apresentando um limite de quantificação de 0,1 $\mu\text{g/mL}$. As medidas piezoelétricas foram utilizadas para observar a espessura do polímero polietilenoimina (PEI) determinando por análise de alterações em relação ao aumento de frequência elétrica (Hz) do sistema de microbalança de cristal de quartzo com a massa depositada, de acordo com a equação de Sauerbrey.

Os resultados obtidos indicam que o biossensor desenvolvido apresenta um bom desempenho e a plataforma sensora foi promissora para o desenvolvimento do biossensor que detectou o antígeno NS1 do vírus dengue. O diagnóstico mais rápido e preciso poderá propiciar um tratamento mais específico, além de contribuir para as avaliações epidemiológicas e controle da doença.

7. REFERÊNCIAS

ACOSTA EG, KUMAR A, BARTENSCHLAGER R. Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. **Adv Virus Res**, 88: 1-109. 2014.

AKCELRUD, L. Fundamentos da ciência dos polímeros. Manole. Barueri-SP, 1-5, 2007.

ALCON-LEPODER, S.; SIVARD, P.; DROUET, M.T.; TALARMIN, A.; RICE, C.; FLAMAND, M. Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 233-247; discussion 247-253, 2006.

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections Enzyme-Linked Immunosorb. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376–381, 2002.

ANANDARAO, R.; SWAMINATHAN, S.; FERNANDO, S.; JANA, A.M.; KHANNA, N. Recombinant multiepitope protein for early detection of dengue infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 59-67, 2006.

ARAÚJO R. F.F. Aplicação de polímeros como matrizes no desenvolvimento de biossensores e na purificação de proteínas. (TESE) **Universidade Federal de Pernambuco**, 2006.

BAEUMNER, A.J.; SCHLESINGER, N.A.; SLUTZKI, N.S.; ROMANO, J.; LEE, E.M.; MONTAGNA, R.A. Biosensor for dengue virus detection: sensitive, rapid, and serotype specific. **Anal. Chem.** v. 74, p. 1442–1448, 2002.

BHATT S, GETHING PW, BRADY OJ, MESSINA JP, FARLOW AW, MOYES CL, DRAKE JM, BROWNSTEIN JS, HOEN A G, SANKOH O, MYERS MF, GEORGE DB, JAENISCH T, WINT GRW, SIMMONS CP, SCOTT TW, FARRAR JF, HAY SI. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, 496: 504–507. 2013.

BISORDI, I. et al. Evaluation of dengue NS1 antigen detection for diagnosis in public health laboratories, São Paulo State, 2009. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 6, p. 315-320, 2011.

BLACKSELL, S. D.; MAMMEN, M. P.; THONGPASEUTH, S.; et al. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 60, n. 1, p. 43–9, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue**: descrição da doença. 2002. Disponível em: <www.portalsaude.saude.gov.br/index.php/descricao-da-doenca-dengue>. Acesso em: 28 novembro, 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da

Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v44n1/23.pdf>>. Acesso em: 28 de novembro de 2015.

CARRARA, S; BAJ-ROSS, C; BOERO, C,; DE MICHELI, G .Do Carbon Nanotubes contribute to Electrochemical Biosensing? **.Electrochimica Acta**, v. 128, p.102–112, 2014.

CASTILHO, T.J. **Desenvolvimento e avaliação de um biossensor amperométrico à base de peroxidase para determinação de neurotransmissores**. 2003. 126 f.Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CECCHETTO, J. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para diagnóstico de dengue**. 2014.72 f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - . Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2014.

CHATERJI S, ALLEN JR JC, CHOW A, LEO Y-S, and OOI E. Evaluation of the NS1 Rapid Test and the WHO Dengue Classification Schemes for Use as Bedside Diagnosis of Acute Dengue Fever in Adults. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, p. 224-228, 2011.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D.; Mediated Biosensors.**Biosensorsand Bioelectronics**, v.17, p. 441-456, 2002.

COPPO, J.A. Nanotecnología, medicina veterinaria y producción agropecuaria. **Revista Veterinaria**, Corrientes, v. 20, n. 1, p 61–71, 2009.

DAVIS, A.P.; MA, G.; ALLEN, H.C. Surface vibrational sum frequency and Raman dendrimer-star polymers.**ChimicaActa**, v. 496, p.117-131, 2003.

DIAS, A. C. M. S. et al. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 216-221, 2013.

EDELMAN P. G.; WANG J. Biosensors and chemical sensors: optimizing performace through polymeric materials. **ACS Symposium Series**. Atlanta, USA. v.2, 1992.

ELHISSI, A.M.A.; AHMED, W.; HASSAN, I.U.; DHANAK, V.R.; D’EMANUELE, A. Carbon nanotubes in cancer therapy and drug delivery.**Journal of Drug Delivery**, 837327, 2012.

FELIX, A. C.; ROMANO, C. M.; CENTRONE, C. D. C.; et al. Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 19, n. 12, p. 1972–6, 2012.

FENG, L., LI, H.; LI, F.; SHI, Z., GU, Z.; F Functionalization of carbon nanotubes with amphiphilic molecules and their langmuir–blodgett films.**Carbon**, v. 41, p. 2385–2391, 2003.
FESLER P, MIMRAN A. Estimation of Glomerular Filtration Rate: What Are the Pitfalls? **CurrHypertens Rep.**, p.116–121, 2011.

FRASCA, S.; ROJAS, O.; SALEWSKI, J.; NEUMANN, B.; STIBA, K.; WEIDINGER, I. M.; TIERSCH, B.; LEIMKÜHLER, S.; KOETZ, J.; WOLLENBERGER, U. Human sulfite oxidase electrochemistry on gold nanoparticles modified electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 87, p. 33-41, 2012.

FRY, S. R.; MEYER, M.; SEMPLE, M. G.; et al. The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combined antigen and antibody testing approach. **Plos neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, p. e1199, 2011.

GOMES-FILHO, S.L.R.; DIAS, A.C.M.S.; SILVA, M.M.S.; SILVA, B.V.M.; DUTRA, R.F. A carbonnanotube-basedelectrochemicalimmunosensor for cardiactroponin T. **Microchemical Journal**, v.109, p. 10–15, 2013.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, n. 8, p. 1400-1458, 2008.

GUBLER DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Dengue and dengue hemorrhagic fever. Gubler DJ, Kuno G (eds). London: **CAB International**, pp. 1–22. 1997.

GUBLER DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp**. 277: 3–16. 2006.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 33-42, 2002.

GUZMAN MG, HALSTEAD SB, ARTSOB H, BUCHY P, FARRAR J, GUBLER DJ, HUNSPERGER E, KROEGER A, MARGOLIS HS, MARTÍNEZ E, NATHAN MB, PELEGRINO JL, SIMMONS C, YOKSAN S, PEELING RW. Dengue: a continuing global threat. **National Revisit Microbiology**, 8: S7–S16. 2010.

HALSTEAD, S. B. Seminar. Dengue. **The Lancet**, v. 370, p. 1644-1652, 2007

HAN, H.; ADAMS, D.; MAYER, J.W.; ALFORD, T.L. Characterization of the physical and electrical properties of indium tin oxide on polyethylene naphthalate. **Journal of** , v. 98, (83705), p. 1-8, 2005.

HENNESSEY, H. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, p. 45-53, 2009.

HIGA Y. Dengue Vectors and their Spatial Distribution. **Tropical Medicine health**, 39: 11–27. 2011.

HIRSCH A. Dengue a comparatively new disease: its symptom. In: Handbook of geographical and historical pathology. Creighton C, editor. London: **Sydenham Society**, pp. 55–81. 1883.

HSIEH SC, ZOU G, TSAI WY, QING M, CHANG GJ, SHI PY, WANGWK. The C-terminal helical domain of dengue virus precursor membrane protein is involved in virus assembly and entry. **Virology**, 410: 170–180. 2011.

HUANG Q, CHEN AS, LI Q, KANG C. Expression, purification, and initial structural characterization of nonstructural protein 2B, an integral membrane protein of dengue-2 virus, in detergent micelles. **Protein Expr Purif**, 80: 169–175. 2011.

HUANG, K-J.; NIU, D-J.; XIE, W-Z.; WANG, W. A disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on nano-Au/multi-walled carbon

nanotubes–chitosansnanocomposite film modified glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p.102–108, 2010.

IAMOND D. 1 Principles of chemical and biological sensors. John Wiley e Sons, Inc. New York, USA. v.3, p.166, 1998.

INPI - INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (Brasil). (Org.) PARREIRA, D. B.; LEITÃO, T. G. **Nanobiossensores**. Brasília, DF: INPI, p. 21 2010.

INZELT, G.; PINERI, M.; SCHULTZE, J.W.; VOROTYNTSE, M. A. Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects. **ElectrochimicaActa**. 45:2403-2421, 2000.

IONESCU, R.E.; GONDRAN, C.; BOUFFIER, L.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C.; COSNIER, S. Label-free impedimetricimmunosensor for sensitive detection of atrazine. **Electrochimica Acta**,v. 55, p.6228-6232, 2010.

ISLAM, R, SALAHUDDIN,M, AYUBI,S, HOSSAIN,T ,MAJUMDER,A, TAYLOR-ROBINSON,A.W, MAHMUD-AL-RAFAT,A. Dengue epidemiology and pathogenesis: images of the future viewed through a mirror of the past.**Virologica Sinica**, 30 (5): 326-343DOI: 10.1007/s12250-015-3624-1.2015.

JAHAN, S.; MANSOOR, F.; KANWAL, S. Polymers effects on synthesis of AuNPs, and Au/Ag nanoalloys: Indirectly generated AuNPs and versatile sensing applications including anti-leukemic agent. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 53, p.51-57, 2014.

JAIN B, CHATURVEDI UC, JAIN A. Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; an overview. **Microbiology Pathog**, 69-70: 45–52, 2014

JANOSKI K.; KOZAK M.; JANKOWSKA E.; GRZONK Z.; GRUB A. HumancystatinCanamyloidogenic protein, dimerizes through tree-dimensional doman swopping. **Nature Strece Biological**, v.8, p.316-20, 2001.

JUSTINO, C.I.L.; SANTOS, T.A.P.R.; DUARTE, A. Biossensores com nanotubos de carbono para aplicações clínicas: avanços tecnológicos. **CAPTAR – ciência e ambiente para todos**, v. 4(1), p. 1-12, 2013.

KATZ, E.; WILNER, I. Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. **A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**, v.5, p. 1084-1104, 2004.

KIM, J. H.; NAM. K. W.; MA, S. B.; KIM, K. B. Fabrication and electrochemical properties of carbon nanotube film electrodes. **Carbon**, v. 44, p. 1963–1968, 2006.

KORAKA, P.; ZELLER, H.; NIEDRIG, M.; OSTERHAUS, A. D. M. .; GROEN, J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 12, p. 1209–1215, 2002.

KOZAN J. V.B. Microsensor para glicose integrada a catéter. [Dissertação]. **Instituto de Química da Universidade Federal de São Paulo**, São Paulo, 2007.

KUHN RJ, ZHANG W, ROSSMANN MG, PLETNEV SV, CORVER J, LENCHES E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108: 717–725.

KUMAR, S.A.; CHEN, S.M. Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A Review. **Sensors** 8:739-766, 2008.

KUMARASAMY, V. et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 75-79, 2007.

KUMARASAMY, V.; WAHAB, A H. A.; CHUA, S. K.; et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. **Journal of virological methods**, v. 140, n. 1-2, p. 75–9, 2007.

L. QIAN, X. YANG, Composite film of carbon nanotubes and chitosan for preparation of amperometric hydrogen peroxide biosensor. *Talanta*, v. 68, p.721–727, 1/15, 2006.

LAKARD, S.; HERLEM, G.; LAKARD, B.; FAHYS, B. Theoretical study of the vibrational spectra of polyethylenimine and polypropylenimine. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 685, p. 83–87, 2004

LIBRATY, D.H.; YOUNG, P.R.; PICKERING, D.; ENDY, T.P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1165-1168, 2002.

LU, F.; LEE, H.P.; LIMA, S.P. Quartz crystal microbalance with rigid mass partially attached on electrode surfaces. **Sensors and Actuators A: Physics**, v. 112, p. 203–210, 2004.

LUO, J.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; LIU, G.; ZHAO, R. Quartz crystal microbalance biosensor for recombinant human interferon- γ detection based on antisense peptide approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 590, p. 91–97, 2007.

MACHADO, J. M.; OLIVEIRA, T. A. DE; ZÓBOLI, A. P. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de proteínas não estruturais da Dengue. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 73–75, 2013.

MACIEL, I. J., SIQUEIRA JÚNIOR, J. B., & MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 111–130, 2008.

MCQUADE,D.T.; PULLEN, A.E; SWAGER, T.M. Conjugated polymer-based chemical sensors. **Chemical reviews**, v. 100, n. 7, p. 2537-74, 2000.

MERCER J, SCHELHAAS M, HELENIUS A..Virus entry by endocytosis. **Annual Review of Biochemistry**, 79: 803–833, 2010.

MILLER S, KASTNER S, KRIJNSE-LOCKER J, BUHLER S, BARTENSCHLAGER, RASHEDUL ISLAM www.virosin.or. The nonstructural protein 4A of dengue virus is an

integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **Journou Biological Chem**, 282: 8873–8882.2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. ,2013. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/diretrizes_nacionais_dengue.pdf>

MONATH TP. The Arboviruses: ecology and epidemiology. Yellow fever. **Boca Raton: CRC Press**,v. V pp. 139–231. 1988.

MURRAY NE, QUAM MB, WILDER-SMITH A. Epidemiology of Dengue: past, present and future prospects. **Clinic Epidemiol**, 20: 299–309. 2013.

MURUGAIYAN, S. B., RAMASAMY, R., NIRANJAN GOPAL, N., KUZHANDAIVELU, V. **Adv Biomed Res**, v.3, p. 67, 2014.

MUSAP M.; PLEBANI M. Biochemisty and clinical role of human cystatin C. **Crit. RevistClinicalLaboratoryScienc**, v. 41, p.467-550, 2004.

MUSTAFA MS, RASOTGI V, JAIN S, GUPTA V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Med J Armed Forces India**, 71: 67–70. 2015.

NEVES, R. B. S. **NANOTECNOLOGIA APLICADA À INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: o uso de biossensores**. Seminário (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, 2011.

NOSSER, A. J. The characterization of AuNP-PEI conjugates for siRNA delivery to cancer cells. 2013. **Tese de Honra**. Paper 179. The University of Southern Mississippi.

NOWACKI, B.F. Síntese, Caracterização e Propriedades Fotofísicas de Copolímeros contendo unidades de Fluoreno, Fenileno e Tiofeno. **Dissertação**. Universidade Federal do Paraná, 2011.

NUNES, J. S. Dengue: Etiologia, patogênese e suas implicações a nível global. 2011. **Dissertação** (Mestrado em Medicina) – Universidade da Beira Interior, Covilhã.

NYBAKKEN GE, NELSON CA, CHEN BR, DIAMOND MS, FREMONT DH. Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, 80: 11467–11474. 2006.

OLIPHANT T, NYBAKKEN GE, ENGLE M, XU Q, NELSON CA, SUKUPOLVI- PETTY S, MARRI A, LACHMI BE, OLSHEVSKY U, FREMONTDH, PIERSON TC, DIAMOND MS. Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. **Journal of Virology**, 80: 12149–12159. 2006.

OMS (WHO) Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition. PAGINA 3-4 Capitlo 1.**WHO Library Cataloguing-in-Publication Data** .2009

PINACHOA, D.G.; GORGY, K.; COSNIER, S.; MARCO, M.P.; SÁNCHEZ-BAEZA, F.J. Electrogeneration of polymer films functionalized by fluoroquinolone models for the development of antibiotic immunosensor. **ITBM-RBM**, 29:181–186, 2008.

PEELING, R.W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J.L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M.J.; DEVI, S.; ENRIA, D.A.; FARRAR, J.; GUBLER, D.J.; GUZMAN, M.G.; HALSTEAD, S.B.; HUNSPERGER, E.; KLIKS, S.; MARGOLIS, H.S.; NATHANSON, C.M.; NGUYEN, V.C.; RIZZO, N.; VAZQUEZ, S.; YOKSAN, S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12 (Suppl.): , p.S30–S38, 2010.

POLONI, T. R. R. S. Estudo das características clínicas e laboratoriais da infecção pelo vírus da dengue em crianças atendidas em uma unidade de saúde no município de Ribeirão Preto, São Paulo. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2013.

POLONI, T. R. R. S. Detecção e tipificação do vírus da dengue. por RT-PCR em tempo real Detecção e tipificação do vírus da dengue por RT-PCR em tempo real. **Dissertação**. Universidade de São Paulo, 2009.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o Meio ambiente: Perspectivas e Riscos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

REZAEI, B.; DAMIRI, S. Voltammetric behavior of multi-walled carbon nanotubes modified electrode-hexacyanoferrate(II) electrocatalyst system as a sensor for determination of captopril. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 134, n. 1, p. 324–331, 2008.

RICCARDI C. S.; COSTA P. I.; YAMANA K. H.. Imunossensor amperometrico. **Química Nova**, v. 25, p.316-320, 2002.

RIVERA-NIEBLAS, J.O.; ALVARADO-RIVERA, J.; ACOSTA-ENRÍQUEZ, M.C.; OCHOA-LANDIN, R.; ESPINOZA-BELTRÁN, F.J.; APOLINAR-IRIBE, A.; FLORES-ACOSTA, M.A.; LEÓN, D.; CASTILLO, S.J. Resistance and Resistivities of pbs thin films using polyethylenimine by chemical bath deposition. **Chalcogenide Letters**. v. 10, n. 9, p. 349 – 358, 2013.

RODENHUIS-ZYBERT IA, WILSCHUT J, SMIT JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 67: 2773–2786. 2010.

RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAS, L. G. Aplicaciones de biosensores en La industria agroalimentaria. Madrid: **Elecé Industria Gráfica**, p. 113,2005.

SATHISH BABU MURUGAIYAN, RAMESH RAMASAMY, NIRANJAN GOPAL, V. KUZHANDAIVELU. **Biosensors in clinical chemistry**: An overview. Adv Biomed Res v. 3, p.67, 2014.

SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und Microwagung. **Z. Physik**, v.155, p. 206-222, 1959.

SCOTT, N. R. Nanoscience in Veterinary Medicine. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 31, (supl. 1), p. 139-144, 2007.

SCOTT, N. R. Nanotechnology and animal health. **Revue scientifique et technique: Office international des épizooties**, Paris, v. 24, n. 1, p.425-432, 2005.

SCOTT, N.; CHEN, H. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. **A National Planning Workshop**. Washington, DC: p. 29, 2002..

SEABRA, G.; MENDONÇA, I. Educação ambiental : Responsabilidade para a conservação da sociobiodiversidade. 2011.

SEITZ, W.R. Optical sensors based on immobilized reagents. In: Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S. (Eds.), **Biosensors: fundamentals and applications**. Oxford University Press, London and New York, p. 559-616, 1987.

SILVA, F. G. et al. Evaluation of commercial kits for detecting the antigen NS1-dengue - São Paulo. **Bepa**, v. 8, n. 91, p. 14-26, 2011.

SIRISENA PD, NOORDEEN F. Evolution of dengue in Sri Lanka- changes in the virus, vector, and climate. **Int J Infect Dis**, v.19, p.6–12, 2014.

SMITH GCE. A localized outbreak of dengue fever in Kuala Lumpur. Epidemiological and clinical aspects. **Med J Malaya**, v. 10, p. 289–303. 1956.

SOUZA, L. J.. **Dengue - Diagnóstico, Tratamento e Prevenção**. 2 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2008.

SU, X.L.; LIY, Y. A self-assembled monolayer based piezoelectric immunosensor for rapid detection of Escherichia coli O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 563-574, 2004.

TAO, S.; LI, G.; YIN, J. Fluorescent nanofibrous membranes for trace detection of TNT vapor. **Journal of Materials Chemistry**, v.17, p. 2730-2736, 2007.

TAURINO, I., CARRARA, S., GIORCELLI, M., TAGLIAFERRO, A., DE MICHELI, G. Comparison of two different carbon nanotube-based surfaces with respect to potassium ferricyanide electrochemistry. **Surface Science** v. 606, p.156–160, 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, p. 7-18, 2009. Suplemento 1.

THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and studies of PAMAM G0, G1 and acylated PAMAM G0 dendrimers. *Analytica Classification*. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p.121-131, 2001.

TONTULAWAT P, PONGSIRI P, THONGMEE C, THEAMBOONLERS A, KAMOLVARIN N and POOVORAWAN Y. Evaluation of rapid immunochromatographic NS1 test, anti-dengue IgM test, semi-nested PCR and IgM ELISA for detection of dengue virus. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 42, p. 570-578, 2011.

TUNCAGIL, S.; ODACI, D.; VARIS, S.; TIMUR, S.; TOPPARE, L. Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing. **Bioelectro chemistry**, v. 76, p.169–174, 2009.

TUNCAGIL, S.; ODACI, D.; VARIS, S.; TIMUR, S.; TOPPARE, L. Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization for microbial sensing. **Bioelectrochemistry**, v. 76, p.169–174, 2009.

WANG J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.19, p. 47-53, 1999.

WANG, G. et al. A Living Cell Quartz Crystal Microbalance. **Biosensor for Continuous**. 2011.

WANG, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Electroanalysis**, v.17, 2005.

WANG, Y. et al. Electrochemical Sensors for Clinical Analysis. **Sensors**, v.8, p.2043-2081, 2008.

WELSCH S, MILLER S, ROMERO-BREY I, MERZ A, BLECK CK, WALTHER P, FULLER SD, ANTONY C, KRIJNSE-LOCKER J, BARTENSCHLAGER R. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe*, v. 5, p. 365–375, 2009.

WELSCH S., MILLER, S.; ROMERO-BREY, I.; MERZ, A.; BLECK, C.K.E.; WALTHER, P.; FULLER, S.D.; ANTONY, C.; KRIJNSE-LOCKER, J.; BARTENSCHLAGER, R. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell Host Microbe**, v. 5, p. 365-375, 2009.

WHO, W. H. O.-. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012– 2020. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2012.

WILDER-SMITH A, GUBLER DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med Clin N Am**, v. 92, p. 1377–1390, 2008.

WIWANITKIT S, WIWANITKIT V. Acute viral hemorrhage disease: A summary on new viruses. **Journal of Acute Disease**, 2015.

WU, T-Z.; SU, C-C.; CHEN, L-K.; YANG, H-H.; TAI, D-F.; PENG, K-C. Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. **Biosens. Bioelectron.** v. 21, p. 689–695, 2005.

X.L. Su, Y. Li, A QCM immunosensor for Salmonella detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance, **Biosensors and Bioelectron**, v. 21, p.840–848, 2005.

XIE X, GAYEN S, KANG C, YUAN Z, SHI PY. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. **Journal of Virology**, v. 87, p. 4609–4622, 2013.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2872-2878, 2006.

YANG L.; WEI W.; GAO X.; XIA J.; TAO H. A new antibody immobilization strategy based on electrodeposition of nanometer-sized hydroxyapatite for label-free capacitive immunosensor. **Talanta**, v. 68, p.40-46, 2005.

YING ZHU, YAOYAO CAO, XIA SUN and XIANG YOU WANG. Amperometric Immunosensor for Carbofuran Detection Based on MWCNTs/GS-PEI-Au and AuNPs-Antibody Conjugate. **Sensors**, v.13, p. 5286-5301; 2013.

YUN, H-J.; HONG, H.; LEE, J.; CHOI, C-J. Chemical and Structural Properties of Polyethyleneimine Film Coated on a SiO₂ Substrate in Different Concentrations. **Materials Transactions**. v. 55, n. 5, p. 801-805, 2014.

ZARBIN, A.J.G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, nov. 2007.

ZAYTSEVA, N.V.; MONTAGNA, R.A.; LEE, E.M.; BAEUMNER, A.J. Multi-analyte single membrane biosensor for the serotype-specific detection of dengue virus. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 380, p. 46–53, 2004.

ZESTOS, A.G.; JACOBS, C.B.; TRIKANTZOPOULOS, E.; ROSS, A.E.; VENTON, B.J. Polyethylenimine Carbon Nanotube Fiber Electrodes for Enhanced Detection of Neurotransmitters American Chemical Society. **Anal. Chem.** v. 86, p. 8568–8575, 2014.

ZHANG, Y.; BAI, Y.; YAN, B. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. **Drug Discovery Today**, v.15, p. 428-435, 2010.

ZHU, Y.; CAO, Y.; SUN, X.; WANG, X. Amperometric immunosensor for carbofuran detection based on MWCNTs/GS-PEI-Au and AuNPs-Antibody conjugate. **Sensors**, v. 13, p. 5286-5301, 2013.