



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTEFANI PONTES SIMÃO

**NANOBIOELETRODOS BASEADOS EM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINCO, CONA E WGA PARA DETECÇÃO DE ARBOVIROSES**

RECIFE

2021

ESTEFANI PONTES SIMÃO

**NANOBIOELETRODOS BASEADOS EM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINCO, CONA E WGA PARA DETECÇÃO DE ARBOVIROSES**

Defesa de Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Química para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Simão, Estefani Pontes

Nanobioeletrodos baseados em nanopartículas de óxido de zinco, ConA e WGA para detecção de arboviroses / Estefani Pontes Simão. - 2021.

130 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Infecções por arboviroses. 2. Diagnostico. 3. Nanotecnologia. I. Oliveira, Maria Danielly Lima de. (orientadora). II. Andrade, César Augusto Souza de (coorientador). III. Título.

616.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-099

ESTEFANI PONTES SIMÃO

**NANOBIOELETRODOS BASEADOS EM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINCO, CONA E WGA PARA DETECÇÃO DE ARBOVIROSES**

Defesa de Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira/ Departamento de Bioquímica (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva / Departamento de Bioquímica (UFPE)

Prof^ª. Dr^a. Adriana Fontes/ Departamento de Biofísica (UFPE)

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade/ Departamento de Bioquímica (UFPE)

Prof. Dr. Fábio Lopes de Melo/ Aggeu Magalhães (FIOCUZ)

Dedico este trabalho primeiramente a ***Deus***, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai ***Alexandre***, minha mãe ***Valéria***, ao meu irmão ***Guilherme***, meu esposo ***Fábio*** e minha querida avó ***Nita***.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir nos meus sonhos. Mãe e Pai, a presença de vocês significou segurança e a certeza de que nunca estou sozinha nessa caminhada, vocês são os autores de todas as minhas vitórias.

Ao meu irmão Guilherme pelo apoio e paciência durante essa jornada.

À minha querida avó Maria Irenita pelo carinho e acalento nos momentos difíceis da minha vida, que apesar de não se encontrar mais presente fisicamente, continuo sentindo a sua presença em todos os momentos, meu eterno anjo da guarda.

À Fábio Maia, pelo amor, dedicação, paciência e por sua capacidade de me trazer paz em todos os momentos que passei nessa caminhada, apesar da correria entre Caruaru e Recife, sempre me trouxe equilíbrio para ultrapassar qualquer dificuldade.

Aos meus orientadores, Prof^a. Maria Danielly Lima de Oliveira e Prof^o. César Augusto de Souza Andrade, pela confiança, perseverança, paciência, apoio desde o início da minha vida acadêmica, despertando e incentivando o pensamento científico. Os senhores foram essenciais em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho, desde a iniciação científica até a finalização do doutorado.

À todos os professores do doutorado que contribuíram para a minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados pela cooperação, que me auxiliaram e contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos queridos amigos que me apoiaram e incentivaram nessa longa jornada.

A Universidade Federal de Pernambuco e toda a sua equipe técnico-administrativa, que colaboraram para esta realização.

À FACEPE pela bolsa concedida no decorrer do estudo.

RESUMO

As arboviroses dengue, zika, chikungunya e febre amarela se tornaram um problema de saúde pública mundial devido as graves consequências e sequelas que podem provocar na saúde humana, os quais variam de complicações neurológicas ao óbito. O diagnóstico clínico é limitado devido a semelhanças nos sintomas, necessitando de um diagnóstico preciso e de menor custo. A utilização de nanobioeletrodos eletroquímicos baseados em lectinas ou na imobilização viral tem como objetivo a detecção de infecções por arbovírus, apresentando-se como novos dispositivos desenvolvidos para detectar o vírus dengue (DENV), zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) e febre amarela (YFV). Os biodispositivos desenvolvidos nesse estudo, são compostos por uma camada automontada de cisteína que serve de suporte para acoplar nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx) aminadas, que servirá de ancoragem para lectinas ou até mesmo para a imobilização viral. As etapas de modificação do eletrodo de ouro foram caracterizadas pelas técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Inicialmente o perfil do eletrodo limpo foi monitorado pela presença de um comportamento eletroquímico limitado por difusão, a partir da obtenção de correntes de pico anódica e catódica características para este processo. Os nanobioeletrodos obtidos apresentaram uma excelente resposta eletroquímica quando expostos aos arbovírus, com diferentes amplitudes de respostas impedimétricas e voltamétricas. O sensor baseado na lectina ConA, WGA e imobilização do ZIKV, demonstraram que são úteis na identificação e discriminação dos vírus DENV, ZIKV, CHIKV e YFV. A EIE demonstrou um aumento da resistência a transferência de carga (RCT) para o sensor baseado em ConA quando exposto ao vírus DENV2 ($RCT = 18.6 \text{ k}\Omega$) e ao ZIKV ($RCT = 14.6 \text{ k}\Omega$), supondo-se uma maior interação com os sítios de glicose/ manose presentes na estrutura desses vírus. Enquanto o sensor baseado em WGA apresentou um resultado mais expressivo para os vírus DENV4 ($RCT = 24.9 \text{ k}\Omega$) e ZIKV ($RCT = 20 \text{ k}\Omega$), supondo a maior interação com os sítios de n-acetilglicosamina/ ácido siálico que compõe a estrutura desses vírus. Os resultados também foram satisfatórios para o sensor baseado na imobilização viral do ZIKV, obtendo uma elevada resposta impedimétrica para os anticorpos anti-ZIKV. Os resultados eletroquímicos apresentados, foram confirmados no estudo topográfico pela microscopia de força atômica que demonstrou variações de rugosidade características de superfície na detecção de cada vírus em estudo. Os biossensores baseados em lectinas desenvolvidos reforçam a inovação no diagnóstico de arbovírus pelo perfil sacarídeo das superfícies virais. O biossensor baseado na imobilização do ZIKV, demonstrou

ser um novo método útil para captura de anticorpos virais, possibilitando a aplicação para desenvolvimento de protótipos para aplicação no diagnóstico clínico.

Palavras-chave: Arboviroses. Biossensor. Eletroquímica. Lectinas. Nanopartículas

ABSTRACT

Dengue, zika, chikungunya and yellow fever arboviruses have become a worldwide public health problem due to the serious consequences and sequelae that they can cause in human health, ranging from neurological complications to death. The clinical diagnosis is limited due to similarities in symptoms, requiring an accurate and less expensive diagnosis. The use of electrochemical nanobioelectrodes based on lectins or viral immobilization aims to detect arbovirus infections, presenting themselves as new devices developed to detect dengue (DENV), zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) and yellow fever (YFV). The bio-devices developed in these studies are composed of a self-assembled layer of cysteine that serves as a support for coupling amine zinc oxide (NpZnOx) nanoparticles, which will serve as anchorage for lectins or even for viral immobilization. The gold electrode modification steps were characterized by cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIE) techniques. Initially the profile of the clean electrode was monitored by the presence of an electrochemical behavior limited by diffusion, from the obtaining of anodic and cathodic peak currents characteristic for this process. The nanobioelectrodes obtained showed an excellent electrochemical response when exposed to arboviruses, with different amplitudes of impedimetric and voltammetric responses. The sensors based on lectin ConA, WGA and immobilization of ZIKV, have demonstrated that they are useful in the identification and discrimination of DENV, ZIKV, CHIKV and YFV viruses. The EIE demonstrated an increase in load transfer resistance (RCT) for the ConA-based sensor when exposed to the DENV2 virus (RCT = 18.6 k Ω and ZIKV (RCT = 14.6 k Ω), assuming a greater interaction with glucose / mannose sites present in the structure of these viruses, while the WGA-based sensor showed a more expressive result for the DENV4 viruses (RCT = 24.9 k Ω and ZIKV (RCT = 20 k Ω , assuming greater interaction with the n-acetylglucosamine / sialic acid sites that make up the structure of these viruses. The results were also satisfactory for the sensor based on ZIKV viral immobilization, obtaining a high impedimetric response for anti-ZIKV antibodies. topographic study by atomic force microscopy that demonstrated variations in surface roughness in the detection of each virus under study. The developed lectin-based biosensors reinforce innovation in the diagnosis of a rbovirus by the saccharide profile of viral surfaces. The biosensor based on the immobilization of ZIKV, proved to be a new useful method for capturing viral antibodies, enabling the application for the development of prototypes for application in clinical diagnosis.

Keywords: Arboviroses. Biosensor. Electrochemistry. Lectins. Nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Prevalência de Dengue durante os anos de 2016 a 2017.....	20
Figura 2-	O Vírus Dengue.....	21
Figura 3-	Genoma do Dengue.....	21
Figura 4-	Genoma do vírus febre amarela.....	24
Figura 5-	O vírus Chikungunya.....	26
Figura 6-	Genoma do vírus Chikungunya.....	26
Figura 7-	O vírus Zika.....	29
Figura 8-	Genoma do vírus Zika.....	30
Figura 9-	Fluxograma do diagnóstico diferencial do dengue, zika e Chikungunya....	32
Figura 10-	Representação do processo de glicosilação de glicoproteínas.....	35
Figura 11-	Lectina <i>Concanavalina A</i>	38
Figura 12-	Representação dos aminoácidos que compõe a lectina ConA.....	38
Figura 13-	Representação estrutural da Lectina <i>WGA</i>	39
Figura 14-	Representação geral de um biossensor.....	42
Figura 15-	Ilustração da imobilização de proteínas para construção de sistemas biossensíveis.....	44
Figura 16-	Organograma de aplicação das SAMs.....	46
Figura 17-	Representação esquemática da imobilização de biomoléculas.....	47
Figura 18-	Voltamograma cíclico.....	50
Figura 19-	Diagrama de Nyquist, (Z'') parte imaginária e (Z') parte real da impedância.....	52
Figura 20-	Microscopia de força atômica.....	53

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ADE	Aumento dependente de anticorpos
APTES	(3- aminopropil) trietoxissilano
C	Capsídeo viral
CHIKV	Vírus Chikungunya
ConA	Concanavalina A
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos (do inglês Domain of carbohydrate recognition)
DENV	Vírus dengue
E	Envelope viral
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Ipa	Corrente de pico anódica
Ipc	Corrente de pico catódica
ILG	Interleucina G
INF α	Interferon alfa
NpZnOx	Nanopartículas de óxido de zinco
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	do inglês Open reading frame
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RCT	Resistência a transferência de carga
UTR	do inglês untranslated region
VC	Voltametria Cíclica
YFV	Vírus febre amarela (do inglês yellow fever vírus)
ZnOx	Óxido de zinco.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 ARBOVIROSES.....	18
3.1.1 Dengue.....	19
3.1.2 Febre amarela.....	23
3.1.3 Chikungunya.....	24
3.1.4 Zika.....	28
3.1.5 Diagnóstico de arboviroses.....	32
3.2 GLICÔMICA PARA ARBOVIROSES.....	33
3.2.1 Glicoproteínas: bases estruturais.....	33
3.2.2 Reconhecimento de glicoproteínas virais e lectinas.....	35
3.3 LECTINAS.....	36
3.3.1 Lectina Concanavalina A.....	37
3.3.2 Lectina WGA.....	39
3.3.3 Lectinas como ferramentas para diagnóstico nas ciências médicas.....	40
3.4 BIOSSENSORES.....	42
3.4.1 Biossensores baseados em lectinas.....	43
3.4.2 Biossensores eletroquímicos.....	44
3.4.3 Eletrodos quimicamente modificados.....	45
3.4.4 Nanopartículas de óxido de zinco e aplicações em biossensores.....	48
3.4.5 Técnicas eletroquímicas.....	50
3.4.5.1 Voltametria cíclica.....	50
3.4.5.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	51
3.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	53
4 RESULTADOS.....	55
4.1 ARTIGO 1: DETECTION OF ARTHROPOD-BORNE VIRUSES BASED ON ZINC OXIDE NANOPARTICLES AND WGA LECTIN	55

5 CONCLUSÃO.....	80
6 PERSPECTIVAS.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE A- ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO <i>TALANTA</i>.....	83
APÊNDICE B- PATENTE DEPOSITADA.....	129

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são atualmente consideradas um problema de saúde pública devido às diversas sintomatologias que essas infecções causam nos indivíduos infectados, que podem variar de um quadro febril ao óbito (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). No Brasil, as arboviroses apresentam-se em epidemias simultâneas por diferentes arbovírus, como o vírus da dengue (*Dengue virus*, DENV), zika (Zika virus, ZIKV) e chikungunya (*Chikungunya virus*, CHIKV) (WHO, 2016). Isso se deve principalmente à localização geográfica de algumas regiões do Brasil, como norte e nordeste, que estão próximas à região equatorial, sendo assim favorável para a multiplicação de vetores, a exemplo do *Aedes aegypti* (PERICH, 2001). O vírus da febre amarela que já havia sido erradicado no Brasil, reemergiu em animais no estado de São Paulo no ano de 2017 devido ao provável surtos das outras arboviroses (GOLDANI, 2017).

A dengue é endêmica no Brasil há anos, principalmente por conta da circulação dos quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), o que possibilita que um mesmo indivíduo seja infectado por cada um dos sorotipos em processos de infecções diferentes (WILDER-SMITH; MURRAY; QUAM, 2013b). O DENV assim como o ZIKV e YFV, pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, possuindo um genoma constituído de RNA fita simples e polaridade positiva, responsável por codificar um complexo de três proteínas estruturais compostas pelas proteínas E (glicoproteína do envelope viral), M (proteína de membrana) e C (proteína do capsídeo viral) e outras sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (CHANG, 1997).

A sintomatologia da infecção pelo DENV pode variar de um quadro de dengue clássica onde o paciente pode apresentar febre, cefaleia, dor retro-orbital, dor osteomioarticular, ao quadro hemorrágico, apresentando febre, sangramento espontâneo e extravasamento de plasma a depender da evolução da infecção (LIBRATY, 2002). As infecções pelo ZIKV podem ser assintomáticas ou sintomáticas, quando sintomáticas os sintomas se assemelham a dengue (MOULIN et al., 2016). A febre chikungunya possui uma sintomatologia semelhante a infecções pelos demais flavivírus, porém uma característica marcante dos pacientes acometidos pelo CHIKV é a artralgia (TAUIL; MEDICINA, 2014).

O diagnóstico das arboviroses atualmente é bastante diversificado devido à clínica apresentada pelo paciente. A maioria dos testes utiliza da detecção do RNA viral (qRT-PCR),

antígeno, anticorpos ou combinado antígeno/anticorpo dos fluídos corporais do paciente infectado (RAFIQUE, 2013). Os testes imunológicos são mais utilizados após o sexto dia de doença, período em que é possível identificar os anticorpos específicos contra os arbovirus, já as técnicas de identificação viral, como RT-PCR, são mais sensíveis nos primeiros dias de infecção e são mais específicas no diagnóstico quando comparada as técnicas imunológicas (CHUA, 2011).

A necessidade de um método diagnóstico inovador, tecnológico e portátil fez-se despertar o interesse no desenvolvimento de biossensores para a detecção de arboviroses. Os biossensores são dispositivos nos quais materiais de origem biológica, tais como antígenos virais e lectinas, são imobilizados junto a um transdutor para detecção de anticorpos ou partículas virais (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012).

Os biossensores eletroquímicos proporcionam a transdução de um sinal eletrônico em resposta à ocorrência de uma reação química que ocorre na interface de um eletrodo, onde a presença de analitos químicos e/ou biológicos pode ser determinada tanto de maneira qualitativa quanto quantitativa. O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos associados a nanopartículas semicondutoras, como as nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx), podem otimizar o desempenho desses dispositivos pelo aumento da área de superfície específica e excelente biocompatibilidade com biorreceptores (KUMAR et al., 2015a).

A utilização de lectinas como biomolécula integrante de um sistema sensor, vem sido aplicada para diferenciação e detecção de carboidratos de superfície de microorganismos como os arbovírus (COELHO et al., 2018; GRUBHOFFER; CENTRE; BUDEJOVICE, 1989). As lectinas ConA e WGA apresentam capacidade aglutinante e elevada biocompatibilidade, funcionando como um excelente biorreceptor quando utilizada no desenvolvimento de sistemas biossensíveis. Assim como as lectinas, a imobilização de partículas virais em sistemas eletroquímicos nanoestruturados são úteis para o desenvolvimento de metodologias para captura de anticorpos (LI; ZHANG; ZHANG, 2009; NICOLINI; MCCRACKEN; YOON, 2017).

Diante desse contexto, a presente tese tem como objetivo apresentar novos métodos de identificação de carboidratos presentes nas estruturas dos vírus DENV, ZIKV, CHIKV e YFV em amostras purificadas e sorológicas de pacientes infectados, utilizando como biomoléculas as lectinas ConA e WGA. Em adição o trabalho apresenta um biossensor baseado na imobilização do ZIKV para detecção de anti-ZIKV, com intuito de otimizar o diagnóstico

desses pacientes, tendo em vista que os métodos atuais demandam de pessoas qualificadas, além do elevado tempo de análise. Diante do exposto as novas metodologias apresentadas seriam úteis para um diagnóstico eficiente e ágil para os pacientes acometidos por arbovírus.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver biossensores eletroquímicos nanoestruturados baseados na imobilização de lectinas ConA, WGA e/ou capsídeos virais para detecção de arbovírus.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a modificação química com APTES das nanopartículas de óxido de zinco;
- Adsorver quimicamente as ZnONPs na superfície de trabalho;
- Imobilizar lectinas ConA e WGA, para avaliação da interação entre os carboidratos de superfície presentes no ZIKV, DENV, CHIKV e YFV;
- Imobilizar o ZIKV para avaliação da interação com os anticorpos anti-ZIKV;
- Caracterização eletroquímica das interações do analito na interface do biossensor;
- Estudo das propriedades interfaciais da deposição do nanomaterial sobre superfície de eletrodo sólido (uso da espectroscopia de impedância elétrica e voltametria cíclica);
- Análise estrutural e morfológica do biossensor por meio da microscopia de força atômica (AFM).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ARBOVIROSES

As doenças infecciosas possuem em sua grande maioria uma causa principal desencadeada por diversos fatores paralelos como condições climáticas, baixas condições sanitárias e socioeconômicas. Nas arboviroses, os principais patógenos envolvidos são os vírus de origem zoonótica, mantidos na natureza e que estão envolvidos em ciclos entre um vetor do ambiente e um animal silvestre (LEAKE, 1992). As características importantes das arboviroses comuns as doenças infecciosas são a transmissibilidade e o caráter imprevisível e explosivo a nível global, que se deve a modificações do ambiente por ações antrópicas, geralmente associadas a atividades econômicas, desta forma os vetores passam a ser sinantrópicos facilitando a transmissão do vírus aos humanos (IOOS et al., 2014).

As alterações que ocorrem no ecossistema favorecem um aumento da incidência ou reincidência de arboviroses. O aquecimento global, desordenada urbanização e mudanças de temperatura provocam perturbações no ecossistema acelerando o desenvolvimento de mosquitos, assim como o ciclo de desenvolvimento do vírus no vetor, favorecendo as infecções em humanos (GUEDES et al., 2016). Um fator primordial é o intercambio de pessoas entre países e continentes por motivos de trabalho, lazer, refugiados de guerra e outros tipos de deslocamentos voluntários, que podem reforçar a entrada ou reincidência de alguma cepa na região de destino, favorecendo uma maior resistência e virulência dessas cepas de vírus causando emergência ou reemergência da arbovirose (FARIA et al., 2016).

Os fatores citados podem ter contribuído para os surtos de algumas arboviroses nos últimos anos (MOULIN et al., 2016). A dengue é uma doença infecciosa que ainda se apresenta constante no Brasil, resultado dos longos períodos de chuva e da falta de saneamento básico, que favorecem o crescimento e desenvolvimento dos vetores (WILDER-SMITH; MURRAY; QUAM, 2013b). Assim como a dengue outras arboviroses como chikungunya e zika, têm registrado casos de infecções frequentes (MOULIN et al., 2016). O vírus febre amarela que até o momento havia sido erradicado em infecções humanas, foi detectado em animais na cidade de São Paulo no ano de 2017 (GOLDANI, 2017). Esses casos de reincidência obtidos no Brasil

entre 2015 e 2018, se devem principalmente as alterações ambientais aliados ao intercâmbio de pessoas, que favorecem o desenvolvimento acelerado do vetor além do aumento na circulação dos diversos arbovirus.

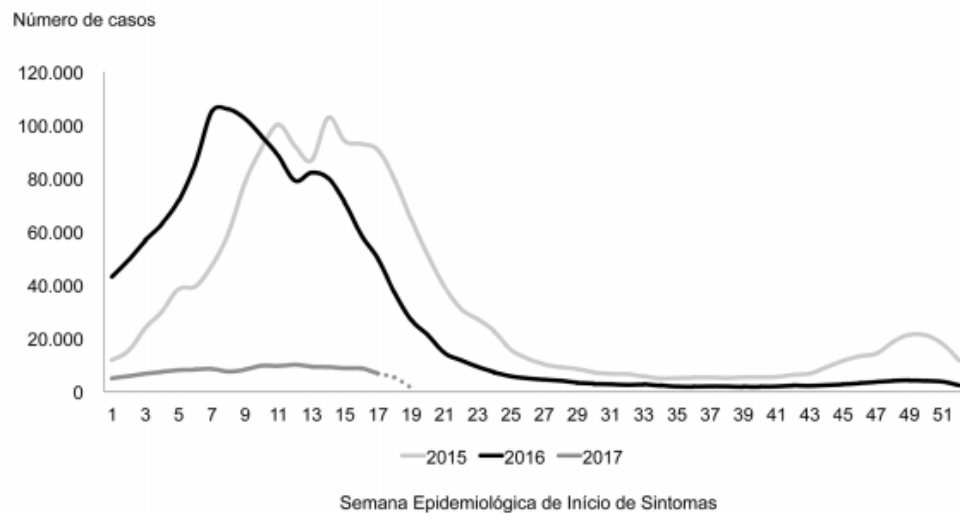
Diante do exposto, o conhecimento de características epidemiológicas, estruturais e patogênese dos vírus dengue, zika, chikungunya e febre amarela, é de extrema importância para favorecer o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, além de auxiliar na prevenção de futuros casos de reincidência desses arbovirus.

3.1.1 Dengue

O vírus Dengue (*Dengue virus*, DENV) pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. A primeira sintomatologia compatível com a infecção causada por DENV foi descrita aproximadamente em 992 D.C. quando a doença foi referida como “veneno de água” e associada a insetos voadores (WILDER-SMITH; MURRAY; QUAM, 2013b). Após esse primeiro achado ocorreram algumas epidemias no Ocidente e em 1780, ocorreu uma grande epidemia na Filadélfia que acabou por se propagar por todo os Estados Unidos das Américas. Em 1945, em Nova Orleans, a etiologia e a transmissão do vírus foram enfim determinadas (WILDER-SMITH; MURRAY; QUAM, 2013b).

O Ministério da Saúde do Brasil publicou na Semana epidemiológica (SE) 19 (2017), o monitoramento dos casos de dengue no país nos anos 2016-2017, mostrando que as regiões Centro-oeste e Norte apresentaram uma maior taxa de incidência de dengue, com 222,1 casos/100 mil habitantes e 101,6/ 100 mil habitantes, respectivamente. A região Centro-oeste apresentou um maior número de casos confirmados de dengue grave e de dengue com sinais de alarme. Segundo o boletim em 2017 ocorreu um decaimento nos casos de dengue comparado aos anos de 2015 e 2016 como demonstrado na figura 1.

Figura 1: Prevalência de Dengue durante nos anos de 2015 e 2017.

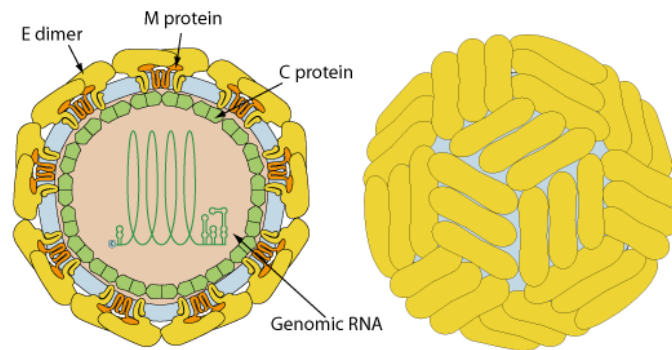


Fonte: Brasil (2016).

Na região do sudeste asiático e no pacífico ocidental a dengue é um importante problema de saúde pública, isso se deve a maioria dos países se localizarem na região equatorial onde há presença do vetor transmissor da dengue *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (WILDER-SMITH; MURRAY; QUAM, 2013a).

Estruturalmente, o DENV é esférico com cerca de 40-50 nm de diâmetro protegido por um capsídeo esférico. O genoma do vírus é constituído por uma única cadeia de RNA de fita simples de polaridade positiva, possibilitando a tradução direta das proteínas. Em adição, o DENV possui algumas proteínas estruturais ligadas à dupla camada lipídica da membrana do vírus, como as proteínas C e M, além de outras proteínas estruturais, como a proteína E do envelope viral (Figura 2) (WILDER-SMITH; OOI, 2010).

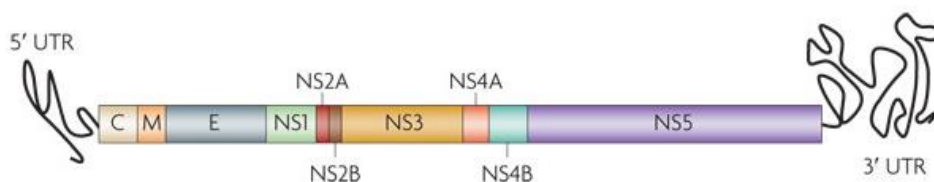
Figura 2: O vírus Dengue.



Fonte: http://www.invivo.fiocruz.br/dengue/virus_pt.htm

O genoma viral é formado por uma única fase aberta de leitura (*Open reading frame*, ORF) codificando uma longa poliproteína, que após ser processada gera três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM/M (pré-membrana/membrana) e E (envelope), além das sete proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, como ilustrado na figura 3 (CHANG, 1997). As estruturas secundárias das regiões 5'UTR (*untranslated region*, região não codificadora) e 3'UTR estão envolvidas na replicação viral, tradução e empacotamento do genoma viral.

Figura 3: Genoma do vírus dengue.



Fonte: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses22400925>. Acesso em: 15 de agosto de 2019.

No Brasil, o *Aedes aegypti* é o responsável pela transmissão de todos os sorotipos, essa transmissão se dá pela picada da fêmea em um indivíduo infectado pelo vírus, desta forma o vírus passa a se replicar no intestino do mosquito e pode ser transmitido para outro indivíduo

pela saliva do mosquito durante o repasto sanguíneo (DIAS, L.; ALMEIDA, S.; HAES, T.; MOTA, L.; RORIZ-FILHO, 2010; WILDER-SMITH; MURRAY; QUAM, 2013a).

A dengue é uma doença não contagiosa que tem o humano como hospedeiro vertebrado. Os agentes etiológicos da infecção possuem diferentes propriedades antigênicas, que são caracterizados nos sorotipos DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 (LEITMEYER et al., 1999). Apesar de existirem vários sorotipos, a infecção por qualquer um deles leva ao mesmo episódio febril da dengue clássica, porém existe a forma grave acompanhada de episódios hemorrágicos e/ ou choque hipovolêmico que é conhecido como dengue hemorrágica ou febre hemorrágica da dengue, qualquer um dos 4 sorotipos podem desenvolver a forma mais grave da dengue, porém os casos de infecção pelos sorotipos 2 e 3 são mais comuns no desenvolvimento da gravidade da doença (GUERRA, 1999).

A sintomatologia da febre clássica é geralmente acompanhada por cefaleia, dor retro-orbital, sangramentos, erupções e dores osteomioarticular. Já na febre hemorrágica da dengue os sintomas são mais intensos como febre, sangramentos espontâneos e trombocitopenia, além de uma possível diminuição do hematócrito.

O ciclo de replicação do vírus da dengue ocorre inicialmente nos linfonodos regionais e em seguida acessa a circulação sanguínea. Posteriormente o segundo ciclo de replicação passa acontecer nos monócitos, macrófagos e células musculares. A replicação do vírus estimula a produção de citocinas por macrófagos principalmente TNF- α e IL-6 (DALBEM et al., 2014).

Os linfócitos CD8 são ativados e passam a destruir as células infectadas pelo vírus. Após a primeira semana da doença os anticorpos IgM anti-dengue aumentam permanecendo elevados por meses, em seguida ocorre um aumento do IgG na segunda semana da infecção e permanecem por anos sendo responsáveis pela imunidade específica para cada sorotipo (RAFIQUE, 2013).

Quando ocorre uma segunda infecção por outro sorotipo, os anticorpos provenientes da primeira infecção não são capazes de neutralizar a nova infecção por outro sorotipo e ainda podem agravar essa segunda infecção em um evento denominado de amplificação da infecção dependente de anticorpo (Antibody-dependent enhancement, ADE), o qual é frequentemente relacionado ao quadro hemorrágico da infecção por DENV (GHOSH et al., 2008).

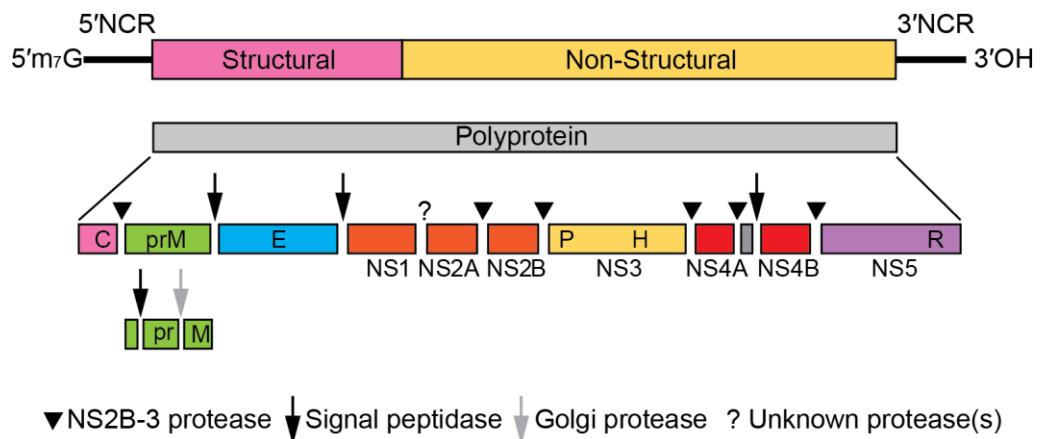
3.1.2 Febre Amarela

A febre amarela (YFV) pertence ao mesmo gênero e família de outros vírus responsáveis pelas doenças infecciosas ao homem como dengue e zika. É caracterizada como uma doença infecciosa não contagiosa que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África causando periódicos surtos isolados (DANIEL LUCEY, MD, MPH; LAWRENCE O. GOSTIN, 2016; WASSERMAN; ANANTHARAJAH; LIAN, 2016).

A origem do vírus é africana onde mais de 90% dos casos de febre amarela são notificados anualmente pela OMS. Na América do Sul são estimados a ocorrência 300 casos por ano. No Brasil a doença tem sido registrada principalmente entre lenhadores, seringueiros, garimpeiros, ribeirinhos e indígenas, que estão localizados nos focos enzoóticos amazônicos e na África. As áreas de risco na circulação do vírus no Brasil estão em sua maioria localizadas na região Norte e Centro Oeste, mas outras regiões como Sul e Sudeste já foram registrados casos da doença (DANIEL LUCEY, MD, MPH; LAWRENCE O. GOSTIN, 2016; GOLDANI, 2017).

Estruturalmente o YFV possui um nucleocapsídeo que mede cerca de 25-40nm de diâmetro envolvido por uma membrana bilaminar lipoprotéica conhecida como envelope que é originária do hospedeiro. O genoma é constituído de RNA fita simples não segmentado de polaridade positiva, composto de 10.862 nucleotídeos que codificam 3.411 aminoácidos (Figura 4). A região ORF do RNA viral expressa a síntese das proteínas não estruturais (prM, E, C) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (MONATH; VASCONCELOS, 2015). As proteínas estruturais codificam a formação da estrutura básica da partícula viral, o organismo humano responde a essas proteínas durante uma infecção para a produção de anticorpos inibidores de hemaglutinação (IH), contra as glicoproteínas do envelope e neutralizantes contra a proteína C do capsídeo. As proteínas não estruturais possuem a função de regulação da expressão do vírus incluindo replicação, virulência e patogenicidade (VOLK et al., 2010).

Figura 4: Genoma do vírus febre amarela



Fonte: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus. Acesso em 15 de agosto de 2019.

A patogenia do YFV se assemelha a dos demais arbovírus. Após a inoculação do YFV na circulação através da picada do transmissor, em poucas horas o vírus atinge os linfonodos regionais e desaparece da circulação linfática nas 24 horas seguintes. Nos linfonodos o vírus passa a afetar as células linfoides e macrófagos dando início ao ciclo replicativo. Posteriormente, com a liberação das partículas virais pelas células, elas são levadas pelos vasos linfáticos até a corrente sanguínea, iniciando o período de viremia, que logo atingem o fígado pela via hemática. O período de viremia varia de acordo com a apresentação clínica, sendo de algumas horas até dois dias e de até cinco a sete dias nas formas mais graves (BENCHIMOL, 2001).

3.1.3 Chikungunya

O CHIKV pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus* e é o agente etiológico da febre chikungunya. As primeiras epidemias causadas pelo CHIKV ocorreram em 1952 na Tanzânia e em 1953 o vírus foi isolado a partir de soros de pacientes infectados e de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* e *Culex* spp (POWERS, 2016). O primeiro surto documentado foi em 1958 na Ásia, que passaram a ocorrer com um intervalo de 7-20 anos entre duas epidemias

consecutivas. Posteriormente o vírus causou surtos emergentes e reemergentes entre 1960-1990 na África Ocidental e África Central. O vírus também causou surtos em Portugal, Guiné e no Continente Asiático (SANYAOLU et al., 2016).

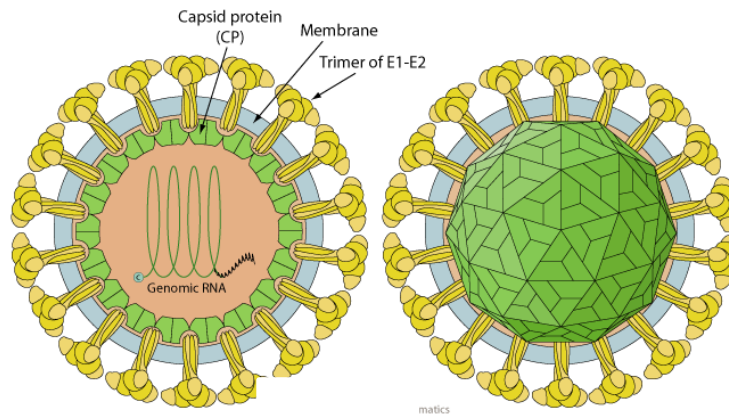
Na Índia surtos foram relatados durante os anos de 1963-1964 em Kolkata e em 1965 em Chennai. Algumas cidades do Sudeste Asiático como Bangkok foram identificadas como locais ativos de transmissão do vírus. Outros surtos foram registrados no Camboja, Vietnã e Laos (PRESTI et al., 2014).

No ano de 2004 a cepa do CHIKV com o genótipo do tipo leste/centro/sul africano (*East/Central/South African, ECSA*) causou uma grande epidemia que iniciou no Quênia e seguiu para algumas ilhas do sudeste do Oceano Índico. Esta epidemia causou mais de um milhão e meio de casos no subcontinente indiano em 2005 e 2006. Os surtos subsequentes acabaram por introduzir o vírus em locais mais temperados como a Itália, onde foi relato um surto local no ano de 2007, que não apresentou novos surtos devido as condições ambientais que não favoreceram a viabilidade do vetor (PRESTI et al., 2014; SANYAOLU et al., 2016).

Entre os anos de 2007-2013, vários casos de CHIKV foram relatados entre viajantes nos Estados Unidos, sendo a maioria dessas infecções adquiridas na Ásia, onde ocorreram os grandes surtos, e com o passar do tempo pode-se observar um aumento no número de casos importados entre 2013 e 2016. No Brasil, segundo a SE 1 e 2 foram registrados 271.824 casos prováveis de febre chikungunya em 2016, no ano de 2017 (SE 19) foram notificados 80.949 casos, em destaque para a região Nordeste onde foi apresentada a maior taxa de incidência com 93,3 casos/ 100 mil habitantes, seguida da região Norte com 45,6 casos/ 100 mil habitantes.

Estruturalmente o CHIKV é envelopado, simetria icosédrica e seu genoma é formado por uma fita simples de RNA com polaridade positiva composto por cerca de 12 kb (PRESTI et al., 2014). O vírus possui 70nm de diâmetro, composto por várias unidades de glicoproteínas transmembrana E1e E2, o capsídeo (C), além de proteínas não estruturais (nsPs) na extremidade 5' e as proteínas estruturais na extremidade 3'(Figura 5)(GALÁN-HUERTA et al., 2015).

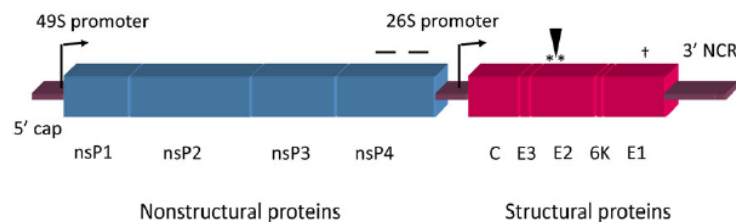
Figura 5: O vírus Chikungunya



Fonte: ViralZone (2017)

O genoma do CHIKV possui Cap na extremidade 5' e cauda poli-A na 3' (figura 6). A estrutura do genoma é composta por duas aberturas (ORFs) que codificam as poliproteínas (estruturais e não-estruturais). O primeiro ORF, de 7.422 nucleotídeos, codifica a poliproteína não estrutural (consistindo de nsP1, 2, 3 e 4), e o segundo ORF, de 3.744 nucleotídeos, codifica as proteínas estruturais (consistindo em C, E2, E3 e E1). A região de junção não traduzida entre as duas ORFs é de 65 nucleotídeos de comprimento (XIAO-FENG LI, TAO JIANG, YONG-QIANG DENG, HUI ZHAO, XUE-DONG YU, QING YE, HONG-JIANG WANG, SHUN-YA ZHU, FU-CHUN ZHANG, E-DE QIN, 2012).

Figura 6: Genoma do vírus Chikungunya



Fonte: (POWERS, 2016)

A febre chikungunya é uma virose causada pela infecção do vírus *Chikungunya* que pode ser transmitido pelos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O CHIKV assim como

outras arboviroses, possui dois ciclos biológicos, sendo um deles silvestre e outro urbano (TAUIL; MEDICINA, 2014).

O ciclo silvestre ocorre nas florestas africanas envolvendo vários mosquitos do gênero *Aedes* e primatas como macacos, roedores e aves como reservatório do vírus. Deste modo acredita-se que populações humanas próximas a essas florestas tenham sido infectadas pela virose e desta forma disseminado a nível urbano. No ciclo urbano o ser humano funciona como reservatório para o CHIKV e o mosquito *Aedes aegypti* é o vetor responsável pela transmissão desse vírus ocasionando epidemias no meio urbano (THIBERVILLE et al., 2013).

O CHIKV é clinicamente caracterizado em dois grupos de acordo com a sintomatologia: artralgogênico e encefalogênico. O artralgogênico são associados a poliartrite e erupções cutâneas, já os sintomas encefalogênicos são aqueles que afetam diretamente os neurônios. A sintomatologia de infecção pelo CHIKV inicia após o período de incubação que dura entre 2-4 dias, após esse período os sintomas se iniciam com febre, mialgia, náuseas, dores de cabeça, erupções cutâneas e poliartalgia, sendo este último o sintoma que se mantém por um longo período chegando até anos após a infecção, podendo desenvolver a artrite reumatóide (HONÓRIO et al., 2015; PRESTI et al., 2014; THIBERVILLE et al., 2013). A gravidade da infecção pelo CHIKV está associada ao prolongamento de alguns sintomas, porém não está relacionada a mortalidade (HONÓRIO et al., 2015).

Na infecção pelo CHIKV assim como em outras arboviroses, após a inoculação, o vírus passa a se multiplicar nos linfonodos mais próximos ao local da picada do vetor. Desta forma, por meio dos capilares subcutâneos o vírus é encaminhado para as articulações, tecidos musculares, fígado e cérebro. Nos tecidos as células do sistema imune inato como os monócitos, macrófagos passam a infiltrar nos tecidos iniciando o processo replicação desses vírus (YACTAYO et al., 2016).

O sistema imune apresenta algumas alterações de citocinas durante o processo infeccioso. Na fase aguda da infecção o aumento do interferon- α funciona como sinalizador da carga viral assim como interferon- γ e IL-12 (GALÁN-HUERTA et al., 2015). Algumas citocinas plasmáticas como Th1 e Th2 apresentam diminuídas durante toda a infecção. Na fase subaguda os protagonistas são os macrófagos, os mediadores pró-inflamatórios, o fator de crescimento de fibroblástico básico, o fator de crescimento de colônias granulocíticas, o fator de crescimento epidérmico e RANTES. Na fase crônica é evidenciada um aumento de IL-17,

persistência da artralgia com elevados níveis de IL-6 e fator de crescimento de colônias granulocíticas (PRESTI et al., 2014)

Os anticorpos produzidos naturalmente durante a infecção são suficientes para combater o vírus após o processo infeccioso. Os anticorpos da classe IgM se desenvolvem logo no início da infecção já os IgG neutralizantes são produzidos mais tardiamente.

3.1.4 Zika

Assim como o DENV, o vírus Zika (*Zika virus*, ZIKV) pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. O vírus foi isolado inicialmente em 1947 de macaco rhesus na floresta Zika, em Uganda (IOOS et al., 2014). O primeiro relato de infecção em humanos pelo ZIKV foi realizado no ano de 1953 na Nigéria, quando três pacientes foram diagnosticados com o vírus. Após a identificação do vírus, foram notificados vários surtos seguidos na África. No ano de 2007 foi relatado o primeiro surto de ZIKV fora da África na ilha de Yap na Micronésia e um grande surto foi registrado na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014 (IOOS et al., 2014; POWERS et al., 2016).

Viajantes infectados disseminaram o vírus por outras ilhas do Pacífico e, em meados de 2015, um novo surto foi identificado nas Américas, com destaque especial para o caso do Brasil (ZANLUCA et al., 2015).

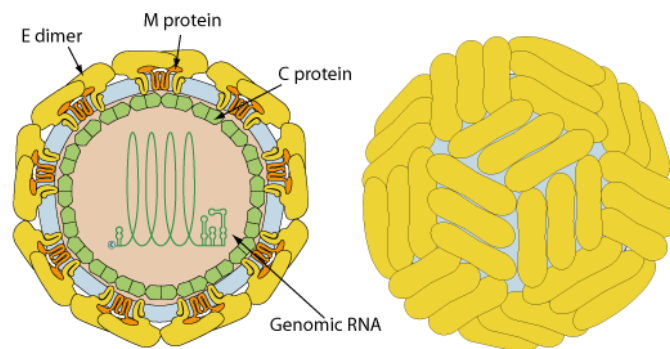
No Brasil, entre 2015-2016, pesquisadores observaram que ocorreu aumento de neonatais com microcefalia que coincidiu com o período de surto de zika no país (BRASIL et al., 2016; ZANLUCA et al., 2016). A ocorrência dessa anomalia neurológica neonatal foi relacionada com sequelas semelhantes registradas durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa em 2014. Dessa forma, esses últimos dados epidemiológicos somados à verificação do neurotropismo do ZIKV e a sua capacidade de cruzar a barreira placentária, confirmaram o ZIKV como agente etiológico responsável pelo aumento dos casos de microcefalia nos anos de 2015 e 2016.

Atualmente, utiliza-se o termo “Síndrome congênita do ZIKV” para os casos de manifestações clínicas provenientes da infecção intrauterina pelo ZIKV, a qual apresenta divergências clínicas em relação às outras síndromes congênitas (como por infecção por citomegalovírus ou toxoplasma), a exemplo da ausência ao exame clínico de

hepatoesplenomegalia (DURCE; GOMES, 2016). Em adição a essa síndrome, outras manifestações clínicas atípicas, como a Síndrome de Guillian Barré, também tem sido associadas à infecção por ZIKV (LEONE; AFRICA, 2016; OEHLER et al., 2014).

Assim como outros flavivírus, o ZIKV é composto basicamente por uma membrana lipídica, denominada envelope, oriundo do retículo endoplasmático das células onde esse vírus é capaz de se replicar, o capsídeo simétrico protege o genoma viral que codifica as proteínas C, M e E (figura 7), e as proteínas não estruturais NS1 a NS5 (figura 8), que possuem desde função regulatória durante a replicação intracelular, até o controle da replicação, transcrição, tradução e resposta imune (FARIA et al., 2016; PINTO-JUNIOR, 2015).

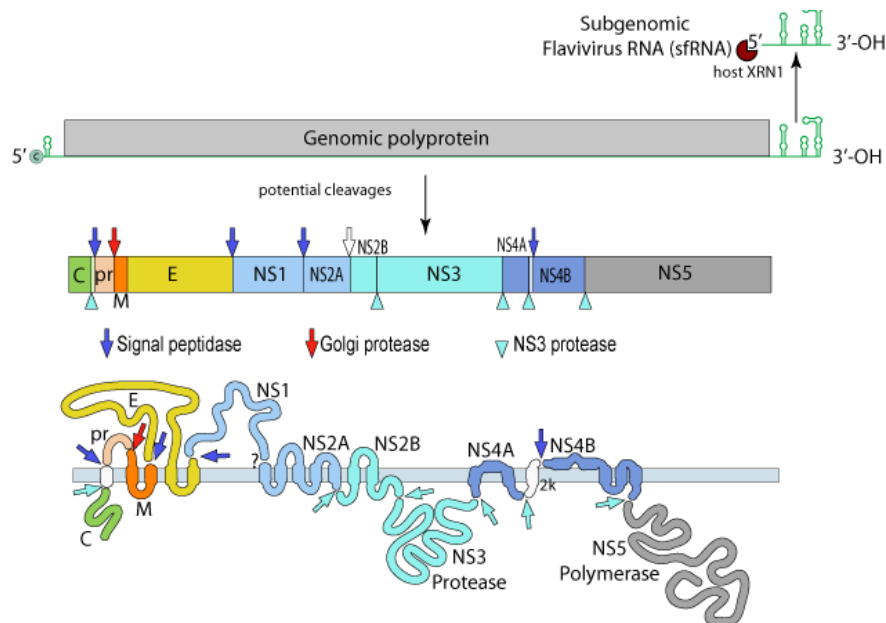
Figura 7: O Vírus Zika.



Fonte: ViralZone (2015)

O ZIKV apresenta um genoma constituído por RNA de cadeia simples de sentido positivo (RNA+) contendo 10.794 nucleotídeos (ALERA, 2015). O genoma completo do ZIKV tem aproximadamente 11 kb de comprimento, codifica uma poliproteína que é composta por proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais incluem uma proteína do capsídeo (C), a proteína PR e M, uma proteína do envelope viral (E). As proteínas não estruturais são NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. A extremidade 5' do genoma possui um tampão de nucleótido metilado para tradução celular canônica. O terminal 3' não é poliadenilado, mas forma uma estrutura de loop (figura 8) (SIROHI et al., 2016).

Figura 8: Genoma do vírus Zika.



Fonte: ViralZone (2015)

A infecção causada pelo vírus zika se dá inicialmente pela transmissão do vírus através da picada de um vetor, como os mosquitos do gênero *Aedes* de transmissão silvestre e urbana, dentre os mosquitos desse gênero destaca-se o *Aedes aegypti*, responsável pela transmissão urbana. Atualmente cogita-se a transmissão desta arbovirose por mosquitos do gênero *Culex*, que é o mosquito mais comum das áreas urbanas. (GUEDES et al., 2016; POWERS et al., 2016; ZANLUCA et al., 2015).

No mosquito, o vírus se reproduz e permanece no vetor ao longo da vida não trazendo prejuízos ao mosquito, desta forma é transmitido para os animais alimentando o ciclo do vírus. Recentemente foram relatados alguns casos de transmissão sexual, porém não foram confirmados e ainda necessitam de estudos mais aprofundados (DURCE; GOMES, 2016; FARIA et al., 2016).

A sintomatologia da infecção pelo ZIKV é pouco frequente, após a picada do mosquito infectado, o vírus permanece incubado por 3 a 12 dias no indivíduo. Apesar do quadro clínico ser de grande maioria assintomático, quando sintomático pode apresentar um grande variedade de sintomas semelhantes aos sintomas da dengue como artralgia, febre, edema nas extremidades, cefaleia, mialgia, distúrbio digestivos, dor retro orbital (LAHORGUE et al., 2016; PINTO-JUNIOR, 2015).

Além de alguns sintomas clínicos as infecções pelo ZIKV podem ocasionar algumas alterações neurológicas como a síndrome de Guillian Barré em adultos e a microcefalia na transmissão congênita. Alguns achados epidemiológicos demonstram que desde o surto que ocorreu na Polinésia Francesa em 2013, foram relatadas consequências neurológicas aos indivíduos acometidos pelo ZIKV, isso é explicado pela capacidade do vírus de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Alguns estudos demonstram que o ZIKV possui uma grande adesão a receptores celulares de uma gama de células como as células dendríticas e outras células do sistema nervoso humano (LAHORGUE et al., 2016; LEONE; AFRICA, 2016; OEHLER et al., 2014; VODUŠEK et al., 2016).

O envelope dos vírus da família *Flaviviridae* é o responsável pela ligação desses vírus a célula e por desencadear as respostas imunes no hospedeiro. O genoma do ZIKV vem sofrendo mudanças de seleção negativa, modificando as respostas imunes dos hospedeiros vertebrados (BASARAB et al., 2016).

As infecções agudas por ZIKV em humanos podem ser caracterizadas pela ativação de células T policlonais promovendo um aumento considerável de interleucinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-13 e IL-17) no soro desses pacientes, associada ao aumento de RANTES, proteína inflamatória de macrófagos 1 α e fator de crescimento endotelial vascular (BRASIL et al., 2016; ZANLUCA et al., 2016).

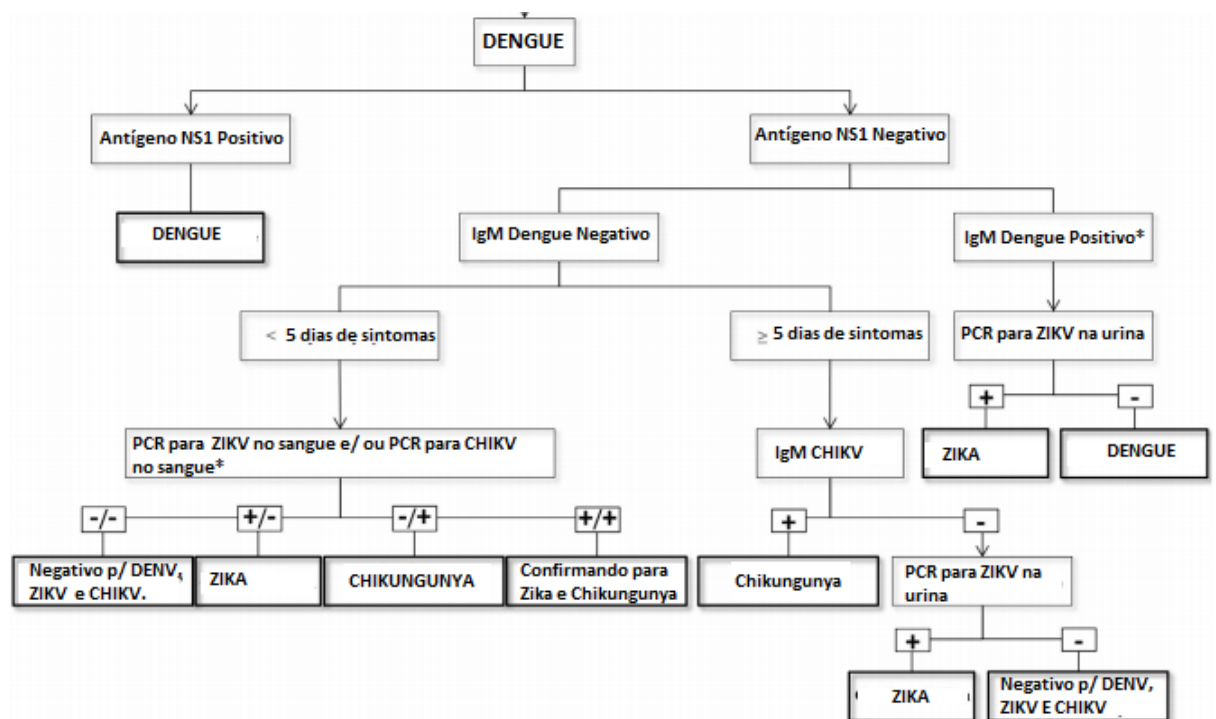
Atualmente sabe-se que algumas células humanas como os fibroblastos dérmicos, queratinócitos epidérmicos, algumas células do sistema nervoso e as células dendríticas são permissivas aos isolados recentes de ZIKV, isso se deve aos vários fatores de entrada ou adesão (DC-SIGN, AXL, Tyro3 e TIM-1) que permitem a permeabilidade do ZIKV nessas células, desta forma o vírus pode usar uma gama de receptores de hospedeiros para entrar em diferentes tipos de células (LEONE; AFRICA, 2016).

Durante a infecção aguda, em cultura celular, o ZIKV induz a transcrição do receptor Toll-like 3 (TLR3) e vários outros genes estimulados por interferons, isto reflete a importância da resposta imune inata no controle e detecção do ZIKV (ZAMMARCHI et al., 2015).

3.1.5 Diagnóstico diferencial para arboviroses

O diagnóstico clínico da dengue é inespecífico devido a grande variedade de sintomas semelhantes a outros tipos de infecções virais (POTTS, 2008). Devido a isso, é necessário se fazer um diagnóstico diferencial com influenza, enterovirose, doenças exantemáticas (sarampo, rubéola, mononucleose infecciosa, citomegalovirose, por exemplo), hepatites virais, malária, febre amarela, dentre outros (LOW, 2011). Deve-se considerar também a situação epidemiológica da região. O diagnóstico diferencial também deve ser aplicado para os vírus zika e chikungunya em locais onde ocorrem surtos simultâneos desses vírus, baseado nos sintomas clínicos e testes laboratoriais, como demonstrado na figura 9.

Figura 9: Fluxograma do diagnóstico diferencial da dengue, zika e chikungunya.



Fonte: (MOULIN et al., 2016) adaptado.

De acordo com a determinação da vigilância epidemiológica, o diagnóstico clínico da dengue clássica se baseia na apresentação dos sintomas como febre com duração máxima de sete dias, acompanhada de duas ou mais de outras manifestações clínicas como cefaleia, dor retro-orbital, artralgia, mialgia, prostração, erupção cutânea, além de o indivíduo infectado residir nos últimos 15 dias em locais endêmicos de dengue. Todos os casos suspeitos devem ser

comunicados para a Vigilância Epidemiológica do município para que seja feito o controle epidemiológico do vírus.

Existem alguns métodos diagnóstico que auxiliam confirmação das infecções pela dengue, dentre eles os testes sorológicos e de detecção viral são os mais utilizados (RAFIQUE, 2013). Os testes sorológicos identificam a presença de anticorpos contra o vírus da dengue no soro do paciente, porém esse teste geralmente só pode ser realizado após aproximadamente seis dias de doença, pois nesse período ocorre o pico de anticorpos sendo mais facilmente identificados, mas não é possível se distinguir o sorotipo do vírus.

Dentre os testes sorológicos disponíveis no mercado existem: inibição de aglutinação (IH), fixação de complemento (FC), teste de neutralização (TN) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (PEELING et al., 2010). O teste MAC-ELISA é um dos testes imunológicos mais utilizados, pois ele é capaz de identificar os anticorpos IgM específicos para as infecções por dengue, além de necessitar de uma única amostra de soro, sendo possível a detecção dos anticorpos após o sexto dia de sintomas permanecendo positivo em até 90 dias (RAFIQUE, 2013).

A detecção específica do vírus pode ser realizada pelas técnicas imunohistoquímica e RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*). A imunohistoquímica é uma técnica capaz de identificar os antígenos virais em diversos órgãos como fígado, baço, linfonodos e pulmões, porém devido à necessidade de biópsia do órgão para a identificação do antígeno, torna-se pouco utilizada (PEELING et al., 2010).

A técnica de RT-PCR é capaz de fornecer informações sobre o vírus em um tempo menor, podendo identificar o vírus em amostras clínicas, materiais de necropsia, culturas de tecido e até mesmo no mosquito ou larvas, além de não sofrer interferências pela presença de anticorpos em alguns dias após a infecção (ZHANG et al., 2015).

3.2 GLICÔMICA PARA ARBOVIROSES

3.2.1 Glicoproteínas: bases estruturais

Glicoproteínas são definidas como proteínas ligadas covalentemente a carboidratos, encontradas em todos os organismos vivos de maneira solúvel ou insolúvel apresentando

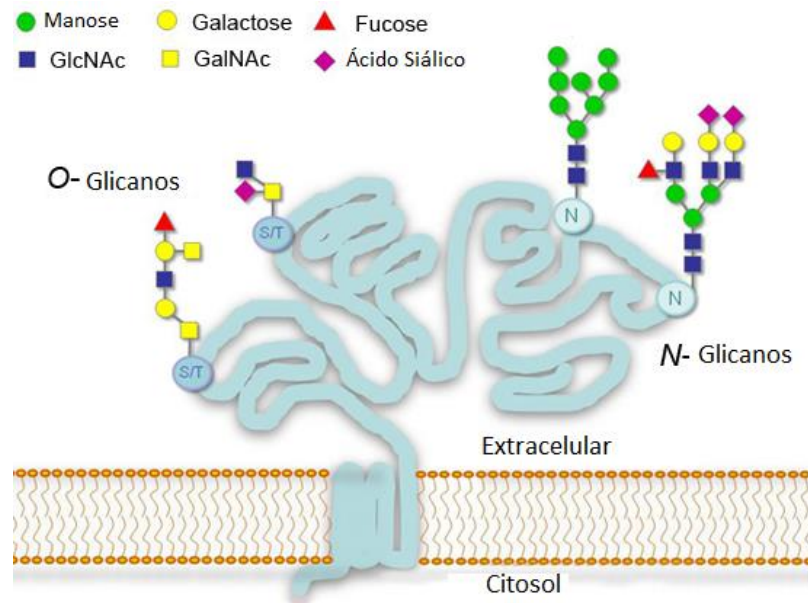
diversas funções e propriedades. Em média o conteúdo de carboidratos encontrado em glicoproteínas varia de 1% a mais de 80% da molécula, que estão envolvidas em várias atividades biológicas (CHEN et al., 2016; ROUVINSKI et al., 2017).

As glicoproteínas são classificadas pela natureza, função e suas unidades de carboidratos em: glicoproteínas típicas, glicosaminoglicanos e colágeno. As glicoproteínas típicas contêm cadeias polissacarídicas longas lineares e regulares, possuindo sequências alternadas de monossacarídeos, que envolvem monossacarídeos ácidos e básicos. Os glicosaminoglicanos contêm ácidos urônicos e grupos sulfatos. Os colágenos representam um dos principais grupos de proteínas encontradas no reino animal, que com carboidratos em sua composição desempenham importantes funções biológicas essenciais (CHEN et al., 2016).

Estruturalmente o carboidrato das glicoproteínas podem se apresentar como unidades dissacarídeas ou grande heteropolissacarídeos que podem conter de 15 a 20 resíduos de monossacarídeos. As unidades de hidratados de carbono das glicoproteínas possuem principalmente n-galactose, o-manose, D-glucose, L-fucose, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, xilose, ramnose e ácido siálico, variando o conteúdo desses açúcares de uma glicoproteína para outra (MAGNELLI; BIELIK; GUTHRIE, 2012).

Uma característica importante comum as glicoproteínas, está relacionada a ligação covalente entre o carboidratos e proteínas. A glicosilação de aminoácidos dentro da cadeia polipeptídica não é aleatória, tendo em vista que a glicosilação ocorre em locais específicos da proteína para torná-la uma glicoproteína (figura 10). Existem dois principais tipos de ligações glicosídicas: N-glicosídico e O-glicosídico, que se diferenciam pela ligação de um determinado grupo funcional de um aminoácido específico (MAGNELLI; BIELIK; GUTHRIE, 2012; TABASUM et al., 2017).

Figura 10: Representação do processo de glicosilação de glicoproteínas.



Fonte:(MAGNELLI; BIELIK; GUTHRIE, 2012) adaptado.

3.2.2 Reconhecimento de glicoproteínas virais e lectinas

A capacidade aglutinante das lectinas são de extrema importância para o estudo da glicômica principalmente quando se trata de arbovirus. O processo de interação entre lectinas e vírus já está sendo explorado no meio científico para o diagnóstico de diversas viroses (BARTON et al., 2014; COELHO et al., 2018). Entende-se que os carboidratos do tipo glicose/manose, N-acetil-galactosamina, ácido siálico, fucose, ácido neuroamínico, dentre outros presentes nas superfícies desses vírus são capazes de aglutinar a lectinas específicas (COELHO et al., 2018).

Alguns estudos já demonstram a capacidade das lectinas no ataque a vírus atuando como inibidores do vírus HIV-1, hepatite C por meio das glicoproteínas de envelope viral (BELICKY; KATRLIK; TKA, 2016). As glicoproteínas E1 e E2 presente em alguns arbovírus são alvo de muitas lectinas, devido a afinidade de resíduos de açúcares específicos do tipo N-acetil-galactosamina, glicose/manose como ocorre com a ConA e o vírus da dengue (AKAHATA; NABEL, 2012; OLIVEIRA; CORREIA; DINIZ, 2009a; REY, 2003b).

A interação entre ConA e o vírus dengue apresenta não só a capacidade de aglutinar das lectinas como indica a presença de resíduos de glicose/ manose na superfície viral do dengue (OLIVEIRA; CORREIA; DINIZ, 2009b). Estudos baseados no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos demonstram a interação entre vírus dengue e lectinas, onde a proteína reconhece resíduos de carboidratos nos sorotipos da dengue, demonstrando que cada sorotipo apresenta uma interação específica com a lectina (OLIVEIRA; CORREIA; DINIZ, 2009b). Esses estudos podem direcionar a utilização de lectina para a caracterização do perfil sacarídeo das superfícies virais.

3.3 LECTINAS

As lectinas são definidas como proteína de origem não imunológica, capazes de aglutinar células ou precipitar complexos hidratados de carbonos, não envolvendo atividade enzimática nos alvos de sua ligação (GOLDSTEIN, 2002). Esse processo de reconhecimento entre a proteína e hidratados de carbono são fundamentais nos processos biológicos como infecções virais, bacterianas, parasitárias. Elas se encontram largamente distribuídas na natureza participando da fisiologia de diversos microorganismos assim como em plantas e animais. Apesar de abundante nas plantas a grande maioria das lectinas não possui uma função definida na fisiologia desses organismos, geralmente envolvidas em armazenamento e transporte de carboidratos em sementes e atividade inseticida (CAVADA et al., 2019).

Dentre as lectinas de plantas destacam-se as lectinas da família Leguminosae, que possuem um grupo de proteínas estruturalmente similares, porém apresentam diferentes especificidades a carboidratos (HAROLD; HAROLD RUDIGER AND HANS-J. GABIUS, 2002). Os ligantes monossacarídeos pelos quais as lectinas exigem maior afinidade, são utilizados para classificá-las de acordo com a sua especificidade por carboidratos do tipo: D-manose, D-galactose/N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glicosamina, L-fucose e ácido N-acetil-D-neuramínico (BARONDES, 2012). A estrutura do açúcar é de grande importância para a ligação com a proteína, pois a especificidade do monossacarídeo deve-se a resíduos conservados da proteína, ligados aos açúcares por pontes de hidrogênio (GABIUS et al., 2011).

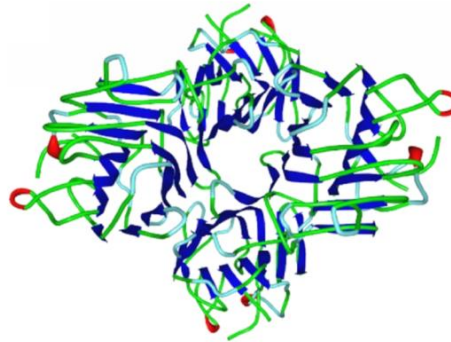
De acordo com suas características estruturais as lectinas podem ser divididas em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, superlectinas e multilectinas. As merolectinas se caracterizam por possuírem um único sítio ligante para carboidratos, já as hololectinas possuem um ou mais sítios disponíveis para ligar-se a carboidratos e precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas são identificadas como proteínas de fusão, pois possuem um sítio para aglutinar carboidratos e outro sítio para atividade catalítica ou outra atividade biológica. As superlectinas possuem dois ou mais domínios ligantes para carboidratos com especificidade açúcares diferentes, já as multilectinas possuem dois ou mais domínios idênticos ligantes a carboidratos diferentes, como são exemplos a jacalina e frutalina (GOLDSTEIN, 2002; RINI, 1995).

3.3.1 Lectina Concanavalina A

A lectina *Concanavalina A* (ConA) pertence a família *Leguminosae* e ao gênero *Canavalian*, presente na semente de *Canavalia ensiformis* (CAVADA et al., 2019). Conhecida como a primeira lectina a ser isolada e sequenciada, a qual teve sua estrutura tridimensional caracterizada por cristalografia de raio x (REEKE et al., 1975).

A ConA (figura11) é uma proteína composta de subunidades de igual peso molecular, que se associam para formar dímeros, quando o pH é abaixo de 6 e tetrâmeros quando o pH neutro (DAM et al., 2002; MANDAL; BREWER, 1993). Essa proteína possui propriedades físico-químicas bastante semelhantes e pode ser considerada estável, uma vez que suporta uma gama de pH e temperaturas sem perda da atividade, mantendo a atividade na faixa de pH de 5-8, com atividade máxima na faixa de pH 7-8 (CAVADA et al., 2019; OSTERNE et al., 2014). Em relação a temperatura podem manter a sua atividade máxima os 60°C, porém acima dessa temperatura inicia-se um processo de desnaturação até 70°C-80°C onde a lectina perde totalmente atividade aglutinante (BARONDES, 2012).

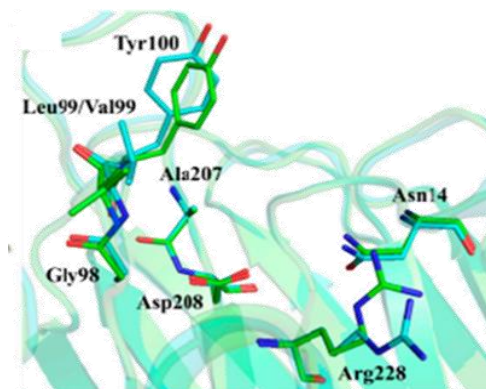
Figura 11: Lectina Concanavalina A.



Fonte: (CAVADA et al., 2019)

A ConA participa do grupo de lectinas glicose/manose onde as interações com os monossacarídeos envolvem ligações de hidrogênio com resíduos conservados de aspartato (Asp208) e uma asparagina (Asn14), que reage com o cálcio, e o grupo –NH com o resíduo Arg208 (CAVADA et al., 2019). Podem ocorrer também interações de Van der Waals, essenciais na interação com os resíduos aromáticos Tyr12 na ConA e o anel dos açúcares (Figura 12).

Figura 12: Representação dos aminoácidos que compõem a lectina ConA



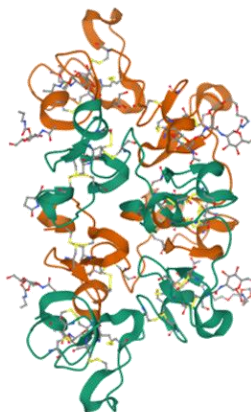
Fonte: (CAVADA et al., 2019)

Essa proteína possui propriedades inflamatórias, vasoativas, antimicrobiana, imunomoduladora e antidepressiva (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017), que estão relacionadas com a capacidade dessa proteína que interagir com carboidratos por meio do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), que pode ser influenciada pelas variadas conformações do CRD (CAVADA et al., 2019). A estrutura do CRD é influenciada pela composição dos aminoácidos e do estado de oligomerização da molécula que irá depender do pH do meio (DAM et al., 2002). A oligomerização é um importante fator a ser considerado, pois mudanças na conformação dessas proteínas podem influenciar no CRD e por consequência na afinidade da lectina a carboidratos/ receptores glicosilados (CAVADA et al., 2019). Alguns estudos demonstram que a ConA dimérica e tetramérica possuem a mesma afinidade para manose e dimmanosídeos (MANDAL; BREWER, 1993).

3.3.2 Lectina WGA

A aglutinina do germe de trigo (WGA) é uma lectina vegetal presente nas sementes de *Triticum Vulgaris*. Essa proteína foi caracterizada em 1974 por Burger e Nagata, apresentando-se como uma molécula de coeficiente de sedimentação de 2,1 S, em solução ácida, porém forma um homodímero estável de 36kDa, em pH neutro, com um duplo eixo de simetria (Figura 13). Existe em três principais isoformas WGA1, WGA2, WGA3 que diferem 5-8 de seus 171 resíduos de aminoácidos (SCHWEFEL et al., 2010).

Figura 13: Representação estrutural da Lectina WGA.



Fonte: (HARATA; NAGAHORA; JIGAMI, 1995)

A lectina WGA é encontrada em abundância no trigo, em mamíferos (cartilagem e córnea ricos em N-acetil-glucosamina). Possui sítios de ligação por com afinidade a N-acetil-glucosamina, di e trissacarídeo β -1,4 ligados, ácido siálico em glicoconjugados e oligoconjugados. Sua capacidade aglutinante é capaz de induzir a morte celular de células tumorais e alguns microorganismos (vírus e fungos) (SCHWEFEL et al., 2010).

A utilização da WGA na microbiologia clínica é comum devido a capacidade de aglutinação e diferenciação de espécies de microorganismos. Essa aplicação apresenta várias vantagens como a estabilidade, disponibilidade comercial, alta atividade específica (POVINELI; FINARDI FILHO, 2002).

3.3.3 Lectinas como ferramentas para o diagnóstico nas ciências médicas

As lectinas são caracterizadas por serem biomoléculas de origem não imunológica capazes de aglutinar as células e / ou precipitar conjugados complexos de hidratos de carbono, além da possibilidade de aglutinar a uma ou mais proteínas e carboidratos diversos (ANDRÉ et al., 2015). Essas características fazem dessa proteína uma excelente ferramenta para o diagnóstico de diversas doenças.

As lectinas vegetais são capazes de reconhecer especificamente carboidratos na membrana celular (RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS, 2018). Esta característica pode ser usada como uma ferramenta para decodificar alterações em carboidratos que são exibidos por células cancerígenas e pode ser capaz de ser usado no diagnóstico tumoral baseado no grau de glicosilação, diferenciando tumores benignos de tumores malignos (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). Devido as essas propriedades as lectinas assumiram uma nova estratégia agindo em células cancerígenas (MODY, 1993). Essas proteínas têm um duplo papel a nível do diagnóstico e podem ser utilizados como sistemas de concentração e identificação de glicoproteínas anômalas ou por sua detecção e quantificação (RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS, 2018).

As lectinas podem ser utilizadas no diagnóstico microbiológico, pela possibilidade de interação com bactérias e fungos (SLIFKINL; DOYLE, 1990). Alguns estudos demonstraram inicialmente a interação da ConA com as bactérias dos gêneros *Mycobacterium* e *Actinomyces*, e com os avanços nos estudos científicos percebeu-se que bactérias e fungos possuem muitos componentes de superfície que servem como molécula aglutinante a lectinas, como o ácido teicóico e lipoteicóico (HAROLD; HAROLD RUDIGER AND HANS-J. GABIUS, 2002; RIBEIRO; FERREIRA; FREITAS, 2018). Assim como a WGA pode interagir com peptideoglicanos através dos resíduos de N-acetilglucosamina (SLIFKINL; DOYLE, 1990).

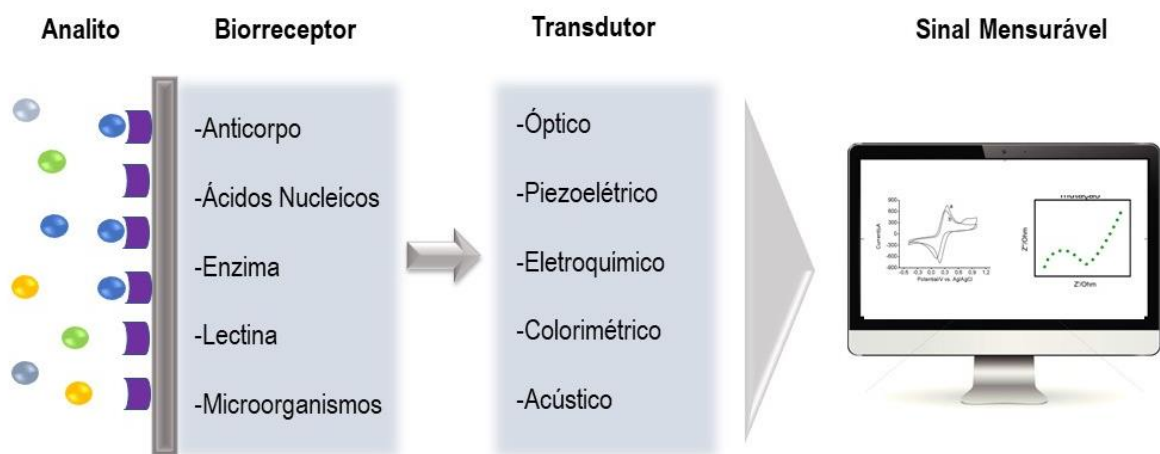
A virologia também se tornou alvo das lectinas, pois elas passaram a ser utilizadas para detecção de glicoproteínas virais em células purificadas e infectadas (J. D. ORAM, D. C. ELLWOOD, 1971). Alguns estudos informam a estrutura das glicoproteínas virais, que são importantes para a patogenicidade do vírus (SLIFKINL; DOYLE, 1990). A partir de estudos mais aprofundados foi possível identificar especificamente o agente viral por meio da utilização de lectinas aplicadas a biossensores, com a aglutinação de arbovírus, vírus da estomatite vesicular, paramixovírus, leucovírus e vírus da hepatite B (GRUBHOFFER; CENTRE; BUDEJOVICE, 1989; OLIVEIRA et al., 2011a; SILVA et al., 2016).

As diversas aplicações apresentadas das lectinas como biomolécula de detecção e quantificação de microorganismos e células tumorais, possibilitou o desenvolvimento de novas alternativas para o diagnóstico precoce de diversas doenças. Isso se deve ao fato da aplicação da inovação tecnológica, como o desenvolvimento de sistemas biossensíveis, utilizando a imobilização de lectinas em plataformas sensoras auxiliando o diagnóstico clínico.

3.4 BIOSSENSORES

Os biossensores são instrumentos biotecnológicos desenvolvidos com a finalidade de facilitar os procedimentos analíticos, como os processos de biointeração com moléculas alvo. Esses dispositivos são compostos, como ilustrado na figura 14, por um transdutor (elétrico, eletroquímico, óptico, térmico, acústico ou piezoelétrico) e um receptor de origem biológica, capazes de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas específicas a respeito de um analito de interesse.

Figura 14: Representação geral de um biossensor.



Fonte: Próprio autor (2021).

Ao transdutor é possível imobilizar um biorreceptor, esta imobilização pode ocorrer fisicamente ou até mesmo quimicamente. Os receptores biológicos utilizados em biossensores são em sua maioria biocatalíticos (enzimas, microorganismos) ou bioligantes (lectinas, proteínas, DNA, RNA) que interagem especificamente com a molécula alvo, essa interação é capaz de provocar uma reação bioquímica traduzida em um sinal mensurável. Os sinais resultantes da reação podem ser ópticos, magnéticos, acústicos, piezoelétricos, elétricos, eletroquímicos (amperométricos e potenciométricos) que irá depender do transdutor utilizado (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012).

Esses dispositivos podem ser aplicados na indústria de alimentos como no controle de toxinas alimentares (GUO et al., 2014; VASILESCU et al., 2016), diagnóstico clínico de arboviroses (CABRAL-MIRANDA et al., 2018; LUNA et al., 2015), na identificação de microrganismos (SUBRAMANIAN; IRUDAYARAJ; RYAN, 2006), proteção ao meio ambiente através da identificação de contaminantes (SIMÃO et al., 2016), desenvolvimento de drogas e na área forense (ROUSHANI; SHAHDOST-FARD, 2016).

3.4.1 Biossensores Eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos são uma subclasse dos sensores químicos, os quais utilizam um eletrodo como transdutor, onde será imobilizado o material de origem biológica capaz de reconhecer um analito específico e gerar um sinal potenciométrico, amperométrico, condutimétrico (RANDVIIR; BANKS, 2013; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010).

Os biossensores eletroquímicos amperométricos são baseados na medida de uma corrente resultante de um processo de oxidação ou redução eletroquímica de uma solução eletroativa, esse sinal é diretamente proporcional a concentração das espécies eletroativas acopladas ao transdutor. A direção do fluxo de elétrons depende das propriedades do analito e pode ser controlado pela aplicação de um potencial elétrico no eletrodo, esse processo geralmente ocorre em uma célula eletroquímica contendo dois ou três eletrodos (WANG et al., 2008).

Os sensores potenciométricos são baseados na diferença de potencial existente entre três eletrodos sendo um eletrodo íons seletivo e dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva permeável. Diferente dos potenciométricos, os sensores condutimétricos baseiam-se na mudança da condutância, que devido ao uso de enzimas, ao catalisar reações, podem produzir ou consumir espécies iônicas, alterando a quantidade de portadores de cargas móveis no eletrólito (THEVENOT et al., 2014).

As técnicas de voltametria cíclica (amperométrica) e espectroscopia de impedância eletroquímica são têm sido amplamente aplicadas com o propósito de complementar os estudos

na bioeletroquímica para desenvolvimento de biodispositivos devido a possibilidade de avaliação de diversos parâmetros, tanto químicos quanto biológicos que favorecem o processo de desenvolvimento de biossensores.

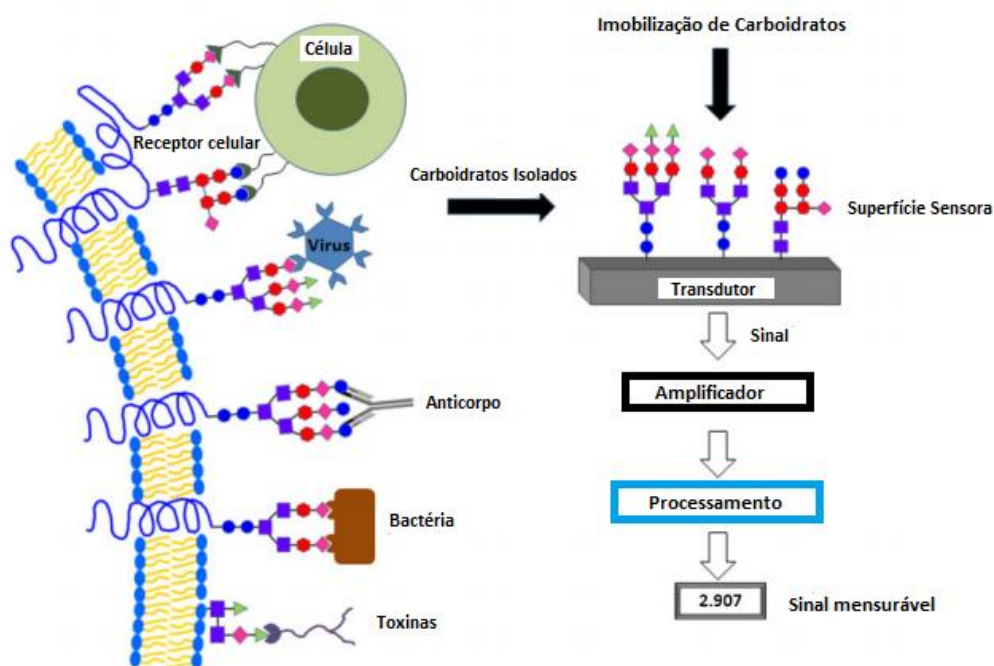
3.4.2 Biossensores Baseados em Lectinas

As lectinas participam de uma grande família envolvida em vários processos biológicos, caracterizadas por exibirem fortes ligações a hidratados de carbono específicos, que é de interesse na aplicação de biossensores. Outro fator importante está relacionado ao perfil sacarídeo de algumas doenças que podem ser reconhecido por lectinas através de interações específicas, somando para a aplicação das lectinas como ferramenta no diagnóstico de doenças (JELINEK; KOLUSHEVA, 2004).

Algumas interações entre lectina e açúcar já foram aplicadas no desenvolvimento de sensores, como sensores baseados em lectina para detecção de glicose, que seguiu para aplicação de lectinas imobilizadas em superfícies para detecção eletroquímica de monossacarídeos (BARLETT; COOPER, 1993). Na segurança alimentar existem estudos que envolvem lectinas na detecção de microorganismos e carboidratos aditivos em alimentos, sendo um campo promissor envolvendo o uso de sistemas sensíveis baseados em lectinas no controle de qualidade de alimentos (PATEL, 1992).

Os estudos fisiológicos e patológicos exploram de maneira ampla a ligação de lectina a porções de carboidratos terminais de superfícies celulares e agregados de proteínas, conhecimentos que passaram a ser aplicados no desenvolvimento de biossensores baseados em imobilização de lectinas para identificar células ou até menos patógenos que expressam carboidratos em sua superfície, como demonstrado na figura 15. Em adição, no reconhecimento molecular e interações entre receptores celulares e vírus, as glicoproteínas do envelope que apresentam atividade de ligação ao receptor, são de grande importância para a base molecular da entrada do vírus na célula, bem como para desenvolvimento de medicamentos antivirais e ferramentas de diagnóstico(JELINEK; KOLUSHEVA, 2004).

Figura 15: Ilustração da imobilização de proteínas para construção de sistemas biossensíveis.



Fonte: (ZENG et al., 2012) adaptado.

Biossensores baseados em lectinas funcionam como excelente ferramenta de diagnóstico principalmente quando aplicados à detecção de vírus. O biossensor desenvolvido por Oliveira et al. (2011) é exemplo dessa aplicação, com o desenvolvimento de um biossensor baseado na lectina Cramoll para detecção de glicoproteínas no soro de pacientes contaminados com os sorotipos DENV1, DENV2, DENV3, resultando em diferentes amplitudes de respostas eletroquímicas, destacando-se para o sorotipo DENV2, devido a maior expressão de manose na superfície desse sorotipo (ANDRADE et al., 2011; LUNA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011a).

3.4.3 Eletrodos quimicamente modificados

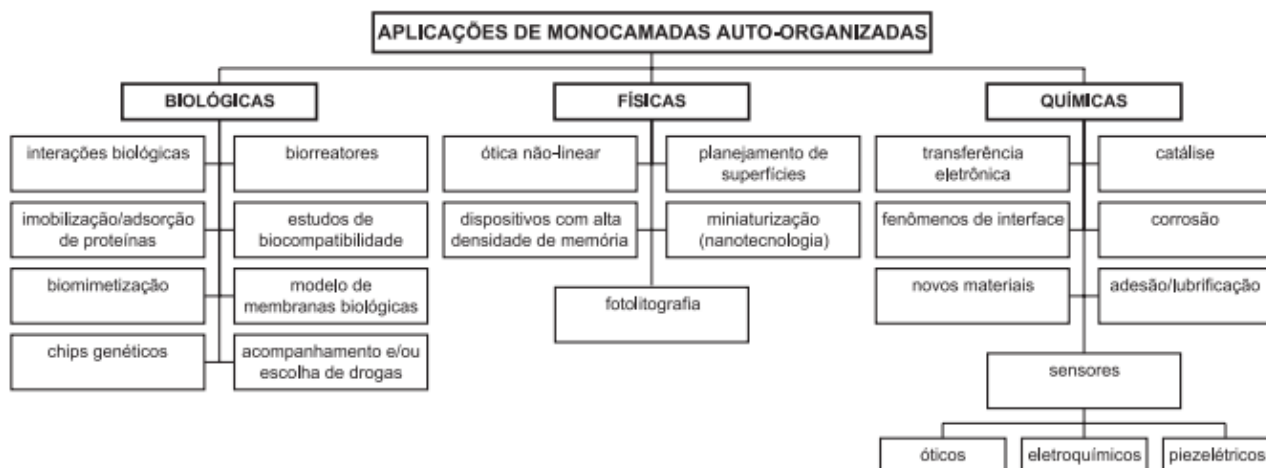
Os eletrodos quimicamente modificados (EQM) surgiram devido a necessidade de otimizar os ensaios eletroquímicos no desenvolvimento de biossensores, como minimizar a

adsorção de produtos da reação óxido-redução no processo de detecção, além dos subprodutos que podem polimerizar e se depositar sobre a superfície do eletrodo. Os fatores citados influenciam diretamente na sensibilidade dos analitos alvo do sensor, em função da cinética de transferência de elétrons entre esses compostos e o eletrodo ser excessivamente lenta (SHARMA et al., 2010).

Alguns estudos demonstram que a velocidade de transferência de elétrons pode ser afetada em função da modificação química do eletrodo, principalmente em se tratando de interações químicas fortes entre os centros de reações (GALAL; ATTA; EL-ADS, 2012). Estas interações fortes são de extrema importância para reduzir a energia de ativação e determinar a cinética de transferência de elétrons. Desta forma a utilização de estruturas ordenadas é uma alternativa onde se pode controlar a modificação química da superfície utilizando a deposição sequencial de monocamadas de moléculas funcionais (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003).

Os biossensores podem ser desenvolvidos por meio de monocamadas auto organizadas (SAM “selfassembled monolayers”) que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfóteras. A adsorção deste tipo de molécula é resultado da afinidade de um grupo funcional da molécula adsorvente, que apresenta certa especificidade para interagir com a superfície do substrato (MUNDEV; TURYAN, 1995). Diante dessa versatilidade na utilização de materiais e moléculas anfóteras, as SAMs podem ter diversas aplicações na construção de sistemas eletroquímicos organizados, como apresentado na figura 16.

Figura 16: Organograma de aplicações de SAM.



Fonte: (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003)

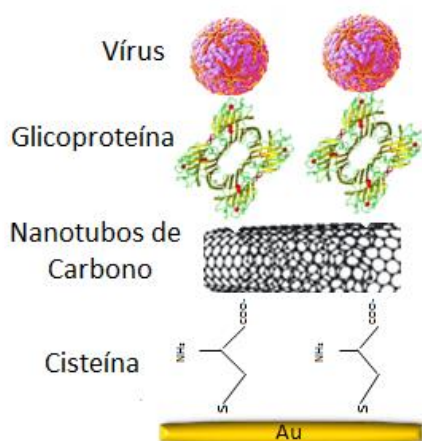
As SAMs em grande maioria são formadas por moléculas, como cadeia de átomo de carbono, capazes de promover uma maior estabilidade à superfície do sensor. Monocamadas automontadas de aminoácidos como a cisteína são capazes de modificar a superfície do sensor fornecendo grupos carboxílicos para interagir com outra molécula como anticorpos, lectinas, capsídeos virais e até mesmo nanomateriais modificados quimicamente através dos grupos aminos presentes nessas moléculas.

A interação entre os átomos de carbono e o grupos aminos só são possíveis por meio de um agentes ligantes como o 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-Hidroxisuccinimida (NHS) ou glurataldeído, capaz de ativar os grupos carboxílicos ou aminos respectivamente, presentes em camadas automontadas, favorecendo uma ligação covalente entre as moléculas adsorvidas a superfície do eletrodo a outras que serão adicionadas posteriormente.

A imobilização das biomoléculas em superfície do eletrodo é de fundamental importância para otimizar a sensibilidade do sensor. A utilização de SAMs para a orientação dessas biomoléculas é demonstrado na figura 17, onde é possível observar as moléculas ligadas quimicamente a monocamada automontada (cisteína), estabilizando quimicamente a ligação com nanomateriais (nanotubos de carbono). Essa disposição de moléculas permite a

imobilização estável de biomoléculas de reconhecimento (glicoproteínas/ vírus) capazes de interagir inteiramente com a analito alvo (vírus/ anticorpos).

Figura 17: Representação esquemática do processo de imobilização de biomoléculas.



Fonte: Elaboração própria (2021).

As ligações covalentes entre as moléculas que compõem as SAMs proporcionam uma maior estabilidade entre as ligações existentes no sistema sensor quando comparada a ligações eletrostáticas, por exemplo, possibilitando o processo de reutilização do biossensor.

3.4.4 Nanopartículas de óxido de zinco e aplicações em biossensores

Os nanomateriais, em especial as nanopartículas metálicas, têm sido aplicados nas ciências biomédicas como uma estratégia biotecnológica para o diagnóstico. O óxido de zinco (ZnOx) possui uma variedade de nanoestruturas que possuem propriedades semi-condutoras, ópticas e piezoelétricas, sendo assim aplicado em dispositivos nano-eletrônicos/nano-ópticos, armazenamento de energia, cosméticos e nanossensores (ZHANG et al., 2018).

O óxido de zinco é semicondutor de banda larga (3,37 eV) com alta energia de ligação de excitação (60 meV) a temperatura ambiente, apresenta fotocondutividade e atividade catalítica, sendo essas características bastante relevantes no desenvolvimento de biossensores enzimáticos (REN et al., 2009).

As nanopartículas de óxido de zinco são utilizadas como partículas inibidora de crescimento bacteriano na indústria de alimentos (SIRELKHATIM et al., 2015), desenvolvimento de produtos industriais (revestimento, tinta, borracha, cosméticos) (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014), potencial terapêutico (anticâncer e antibacteriano), aplicação na bioimagem (fluorescência), modificação de superfícies para imobilização de biomoléculas (ZHANG et al., 2018).

Quimicamente, a nanopartícula de óxido de zinco é rica em grupo OH, o que possibilita a funcionalização da superfície desse material por várias moléculas. Outra característica marcante desse nanomaterial é o alto ponto isoelétrico (IEP; $\sim 9,5$) que são adequados para a adsorção de algumas proteínas como enzimas e anticorpos de baixo ponto isoelétrico por interação eletrostática (ZHANG et al., 2018).

O uso de nanopartículas de óxido de zinco (NpZnOx) têm se apresentado como um nanomaterial excelente para aplicação em sistema biossensíveis, principalmente pelo fato de otimizar a sensibilidade desses sistemas por promover uma aumento de área de superfície (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014). Em adição as NpZnOx apresenta algumas características peculiares, como biocompatibilidade, estabilidade química e fotoquímica, facilidade de fabricação, elevada cinética de transferência de elétrons, além de estabilidade em pH fisiológico que faz dessa nanopartícula adequada para aplicação em sistemas in vivo (KUMAR; CHEN, 2008).

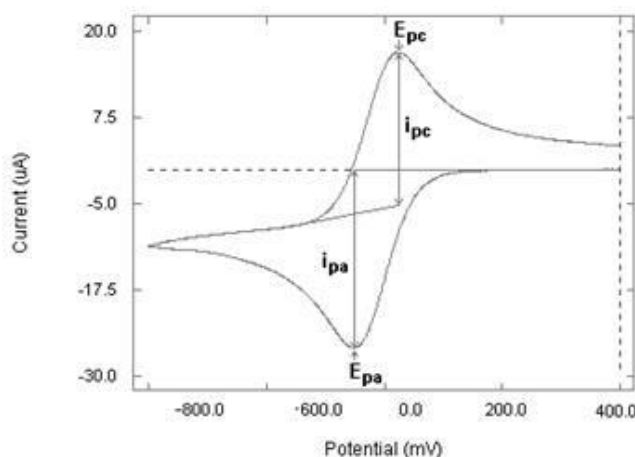
Alguns estudos já demonstram a aplicação do óxido de zinco na forma de nanoesferas, nanofilmes e nanofios na fabricação de biossensores para detecção de glicose (SHI et al., 2014), colesterol (KHAN et al., 2008), compostos fenólicos (TANIMOTO DE ALBUQUERQUE; FERREIRA, 2007), ureia (GU et al., 2009) e o presente trabalho apresenta uma nova aplicação das NpZnOx para detecção de arbovírus.

3.4.5 Técnicas Eletroquímicas

3.4.5.1 Voltametria Cíclica

A VC é uma técnica útil que fornece informação da interface do eletrodo biologicamente modificado, permitindo a monitoração da taxa de transferência de carga entre o eletrodo e a solução, essa técnica é usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, além de permitir avaliar a magnitude relativa da corrente gerada por transferência de elétrons durante o processo redox com a quantidade do analito presente na interface eletrodo-solução. Nessa técnica o Voltamograma Cíclico é a representação gráfica da corrente *versus* potencial onde é possível identificar picos de oxidação (i_{pa}) e redução (i_{pc}) durante cada etapa de processamento do biossensor, esses picos irão representar o processo redox na interface eletrodo- solução (figura 18).

Figura 18: Voltamograma Cíclico.



Fonte: (RANDVIIR et al., 2013).

As técnicas eletroquímicas podem ser aplicadas para obtenção de informações referentes à interação entre camadas sensora e analito de interesse médico, isso se deve ao potencial dessa ferramenta de amplificar o sinal eletroquímico, possibilitando uma maior

sensibilidade desses biodispositivos. Alguns biossensores aliam a utilização das técnicas eletroquímicas a nanomateriais, como nanopartículas de ouro, de óxido de zinco, grafeno, nanotubos de carbono, para otimizar o desempenho dos biossensores aumentando a superfície para imobilização de biomoléculas como anticorpos, lectinas, oligonucleotídeos.

3.4.5.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia da impedância eletroquímica é uma técnica baseada no domínio da frequência. A interface o sistema impedimétrico pode ser visto como uma combinação de elementos de um circuito elétrico passivos, composto por resistência, capacitância e indutância. Nesse sistema, quando uma corrente alternada é aplicada aos elementos citados, a corrente resultante é obtida usando a lei de Ohm (RIBEIRO, 2015). A EIE baseia-se na aplicação de um pequeno potencial AC em função do tempo para medir a corrente gerada. Nesta técnica é possível avaliar a interação entre as biomoléculas no desenvolvimento de biossensores por meio da variação das correntes geradas durante as etapas de montagem e biointeração do biossensor e o analito alvo (CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006).

O Diagrama de Nyquist que é a forma mais habitual de representação do espectro de impedância, consiste em uma série de pontos representando a grandeza e a direção do vetor de impedância para uma frequência específica. O diagrama é um plano complexo (real imaginário) de coordenadas cartesianas, em que se tem na abscissa a componente real (resistiva) e na ordenada a componente imaginária (capacitiva ou indutiva) como é possível observar na figura 22, esta técnica demonstra por meio de variações no diâmetro dos semi-círculos a variação de frequência durante cada processo (RIBEIRO, 2015).

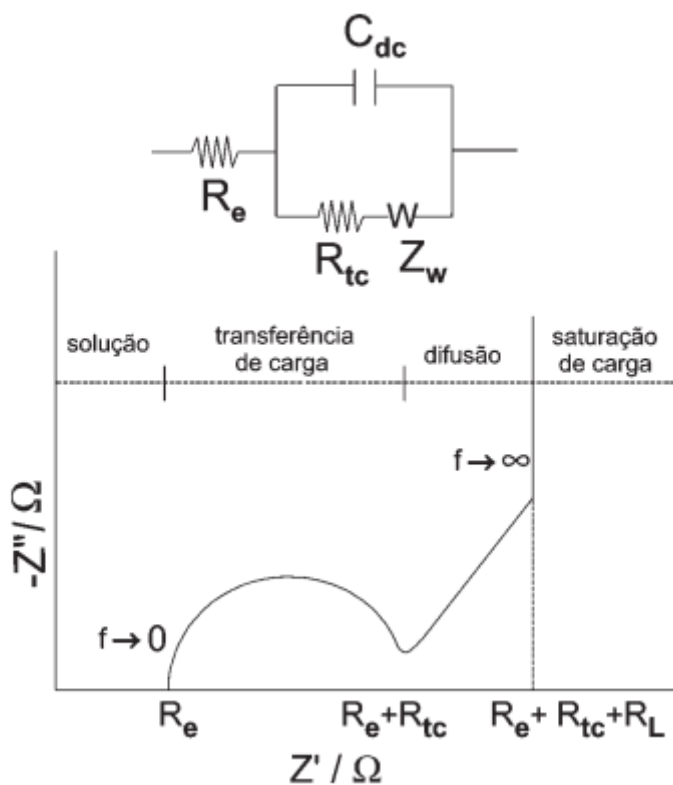
O cálculo teórico da impedância é resultado da perturbação de um circuito elétrico, representado graficamente por duas componentes Z' e Z'' , resultantes da equação:

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_{ct}^2 R_{ct}^2} \text{ e } Z'' = \frac{\omega C_{ct} R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_{ct}^2 R_{ct}^2}$$

R_Ω (resistência da solução); ω (frequência angular), C_d (capacitância da dupla camada elétrica), R_{ct} (resistência a transferência de carga)

Por meio deste cálculo é possível avaliar o comportamento da resistência à transferência de carga (R_{ct}) da interface eletrodo- solução em altas e baixas frequências. As componentes da impedância são apresentadas na forma de circuito para facilitar o entendimento dos componentes da impedância geral, onde também são utilizados para simulações computacionais de impedâncias de sistemas diversos. Nos experimentos eletroquímicos a impedância resultará das componentes de resistência da solução (R_s), capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}), resistência a transferência de carga (R_{ct}) e o elemento de Warburg (Z_w) como demonstrado no circuito inserido na figura 19. A combinação desses elementos é chamado de circuito de Randles, um dos circuitos mais utilizados para simulações com EIE.

Figura 19: Diagrama de Nyquist, (Z'') parte imaginária e (Z') parte real da impedância.

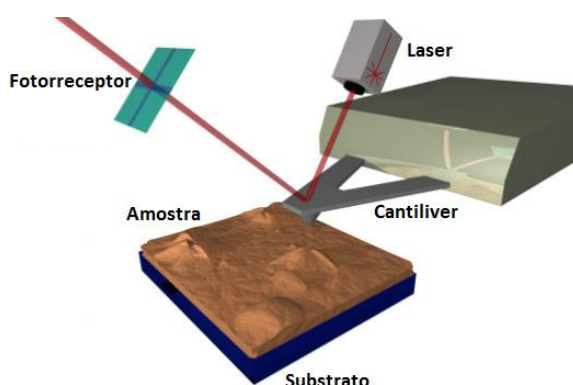


Fonte: (CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006)

3.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM BIOSSENSORES

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica útil para análise de superfície, proporcionando uma alta resolução de estruturas atômicas e nanométricas. A formação da imagens no AFM se dá pela interação de uma sonda sobre a superfície da amostra onde se detecta as forças mecânicas universais presentes entre a ponta da sonda (microcantiliveres) e a amostra (figura 20) .

Figura 20: Microscopia de força atômica.



Fonte: <http://www.education.mrsec.wisc.edu/nanoquest/afm/index.html>

O princípio da técnica baseia-se na interação entre microcantiliveres e os átomos de uma amostra por meio de forças de atração ou repulsão. A resultante dessas forças podem provocar aproximação e afastamento dos microcantiliveres refletidas em deflexões. Pequenos elementos piezoelétricos são fixados nos microcantiliveres conduzindo assim o feixe de laser na frequência de ressonância da varredura. O feixe de laser resultante são detectados pelo fotorreceptor e amplificados a um sinal elétrico. Os sinais elétricos decorrentes das variações de posições e intensidades de luz produzidas pelas deflexões, são processados em um computador e convertidos em imagens topográficas (DEDA et al., 2013).

No desenvolvimento de biossensores, são utilizados microcantiliveres capazes de varrer a superfície do biossensor identificando interações específicas de biomoléculas no processo de detecção analítica. Esse processo ocorre devido os microcantiliveres mudarem a sua frequência vibratória ou sofrerem deformação sobre moléculas na superfície do sensor, essa mudança na

frequência é detectada e pode ser utilizada para medir viscosidade, densidade e fluxo de vários sistemas .

A AFM é uma ferramenta útil na caracterização durante do desenvolvimento de sensores, pois, por meio desta técnica é possível observar modificações no relevo da superfície do biossensor durante cada processo de montagem do sistema, comparados com os resultados obtidos com as técnicas eletroquímicas. A microscopia é um complemento ao processo de caracterização de um biossensor, tendo em vista que as técnicas eletroquímicas podem fornecer informações a respeito da variação de resposta elétrica do sistema, durante todo o processo de desenvolvimento do sensor, a AFM pode auxiliar com caracterização morfológica da superfície do sensor, tanto durante o processo de montagem como no biorreconhecimento do analito alvo, como demonstrado por Singh et al. (2014). (CANBAZ; SEZGINTÜRK, 2014; SINGH; SHARMA; JANG, 2014)

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA “*MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C: MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS*”

DETECTION OF ARTHROPOD-BORNE VIRUSES BASED ON ZINC OXIDE NANOPARTICLES AND WGA LECTIN

**Estefani P. Simão¹, Dammyres B. S. Silva², Marli T. Cordeiro³,
Laura H.V. Gil³, Cesar A.S. Andrade ², Maria D.L. Oliveira^{1,2*}**

**DETECTION OF ARTHROPOD-BORNE VIRUSES BASED ON ZINC OXIDE
NANOPARTICLES AND WGA LECTIN**

Estefani P. Simão¹, Dammyres B. S. Silva², Marli T. Cordeiro³,

Laura H.V. Gil³, Cesar A.S. Andrade ², Maria D.L. Oliveira^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco,
50670-901 Recife, PE, Brazil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE,
Brazil.

³ Departamento de Virologia-Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, 50670-420 Recife, PE,
Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

ABSTRACT

The present study presents a nanostructured biosensor model based on lectin immobilization (WGA) for the identification of chikungunya (CHIKV), yellow fever (YFV), zika (ZIKV) and dengue type 4 (DENV4) viruses using structural glycoproteins. The biosensor system composed of cysteine (Cys), zinc oxide nanoparticles (ZnONp) and WGA lectin was developed with the aid of electrochemical cyclic voltammetry (CV) techniques and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). In addition, CV and EIS were essential in assessing the ability of WGA to interact with the viruses under study. The arboviruses presented different amplitudes of electrochemical response, emphasizing the possible difference in the proportion of glycoproteins of the type N-acetyl-glucosamine in the structure of virus protein E. The results obtained showed an increasing in amperometric response of the anodic region to different virus as follow, CHIKV (3.15 μ A) < YFV (1.60 μ A) < ZIKV (1.52 μ A) < DENV4 (9.26 μ A). DENV4 virus demonstrated to have more WGA-specific glycoproteins when compared to other viruses. The results obtained in this study differ in amplitude of electrochemical response, when compared with the lectin-based sensor Concanavalin A, reinforcing the difference in the saccharide profile of viral capsids. The topographic evaluation performed by means of atomic force microscopy showed the structural differences in the surface of the biosensor after the interaction of lectin with arthropod-borne viruses. The developed biosensor proved to be specific and sensitive for determining and differentiating between arboviruses in samples from infected patients.

Keywords: Lectin; Convanavalin A; Wheat germ agglutinin; Electrochemical; Biosensor; Arthropod-borne viruses.

1. Introduction

The World Health Organization (PAHO / WHO) has highlighted the various epidemics of arboviruses, with the simultaneous circulation of dengue, zika, chikungunya, and yellow fever viruses, especially in the tropical regions of Latin America and the Caribbean. The hot and humid climate regions favor the proliferation of the *Aedes aegypti* mosquito, which is a common vector for arboviruses (I et al., 2017; ZANLUCA et al., 2015).

The symptoms of arthropod-borne viruses infection are very similar, making clinical diagnosis extremely difficult, since some arboviruses can cause neurological sequelae and even lead to death in infected patients (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; LEONE; AFRICA, 2016). The diagnosis based on real-time RT-PCR virus detection is currently the gold standard for the diagnosis of arboviruses, but it is not very efficient after a few days of the onset of symptoms due to the decline in viral load, impairing the sensitivity of the virus molecular test (CDC (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION), 2016b). The need for an efficient test in the differentiation of arboviruses is emerging, in view of the clinical complications that these infections cause in the human organism

The use of lectins in diagnostic tests is an excellent alternative when it comes to glycoprotein detection because of its ability to recognize specific glycid residues in the viral capsid (BELICKY; KATRLIK; TKA, 2016; OLIVEIRA et al., 2011b). In particular, Concanavalin A (ConA) is a model lectin known for specifically recognizing mannose-rich glycosylated sites. Due to this characteristic, it has been employed in the recognition of different glycosylated sites, differentiating ZIKV, DENV and CHIKV capsids with electrochemical responses differentiated (SIMÃO et al., 2020). In addition, the oligosaccharides-containing terminal N-acetylglucosamine-binding lectin wheat-germ agglutinin WGA may be able to

interact differently in the detection of these viral capsid oligosaccharides (LI et al., 2015). Wheat-germ agglutinin (WGA) lectin is already used in the development of electrochemical biosensors as a biomolecule for specific identification of cell surface sugars (CHAUDHARY et al., 2016; ZHAO et al., 2016).

Zhao et. al. 2016 presented a study using ConA and WGA lectins as elements of recognition and discrimination of the carcinoembryonic antigen (CEA), where he observed a sugar identification profile differentiated from CEA due to the specificity of each lectin (CHAUDHARY et al., 2016). Raghu et. al. 2017 demonstrated in its study the specific binding activity and the ability to agglutinate some lectins, such as ConA and WGA, with the bacterium *Listeria monocytogenes*, as a result if ConA had greater affinity as cells of *Listeria monocytogenes*, when compared to a WGA (HV, 2017).

Electrochemical biosensors have been developed with electroanalytical methods, such as cyclic voltammetry (VC) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), where they make use of measurable electrical properties (potential, charge and current). They can be used to study interaction between biomolecules and nanostructured platforms composed of nanomaterials such as chemically modified zinc oxide nanoparticles (HAHM, 2016; RANDVIIR et al., 2013). The use of chemically modified nanomaterials promotes chemical stability between the adsorbed molecules on the sensor surface, optimizing sensitivity by providing an increase in sensor surface area for immobilization of biomolecules (HAHM, 2016; KUMAR et al., 2015b). Zinc oxide nanoparticles (NpZnOx) function as an excellent biomaterial in the development of lectin sensors for detection of viral glycoproteins (SIMÃO et al., 2020).

2. Experimental

Wheat germ agglutinin (WGA), Concanavalin A (Con A), bovine serum albumin (BSA, 10%), ZnONp, cysteine (Cys), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), and aminopropyltriethoxysilane (APTES) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Serum (from healthy and arbovirus-infected patients) were obtained from the Department of Virology of the Institute Aggeu Magalhães.

Electrochemical analyzes were performed on PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Metrohm Autolab Inc., Netherlands) using a three-electrode system in the presence of a 10 mM K₄ [Fe (CN) ₆] / K₃ [Fe (CN) ₆] (1: 1) solution, used as a redox probe in PBS (pH 7.4). The impedance spectra were recorded in the frequency range of 100 mHz to 100 kHz. The analysis of the electrical circuit was performed by the NOVA 1.11 program.

2.3 Topographic analyses

The atomic force microscopy (AFM) was used to evaluate the surface topographical from a topography of the biosensitive layer to the detection of viruses the system developed. The equipment used was SPM9700 atomic force microscope (Shimadzu Instruments Co. Ltd., Japan). The reading was performed in non-contact mode as obtained by scanning cantilevers with a silicon AFM probes at room temperature $\sim 25^{\circ}\text{C}$. The images were processed in the Gwyddion software.

2.4 Fabrication of the lectin-based electrochemical biosensor

The modification process of the working electrode was initially performed by cleaning the gold disc by polishing alumina, rinsed with deionized water and dried at room temperature. Then 2 ml of cysteine was dripped onto the gold surface and incubated for 10 minutes, consecutively, 2 mL of an EDC: NHS (v/v) solution was added to the cysteine as the anchor of the NpZnOx. After 10 minutes of addition of EDC and NHS, 2ml of ZnONp was added. In addition, lectin WGA was immobilized to the nanostructured platform and the biosensitive system was terminated with the addition of BSA for 10 minutes. After the construction of the WGA based biosensitive system the immobilized lectin was submitted to dengue, zika and chikungunya virus samples.

2.5 Biological activity evaluation of Cys-NpZnOx-WGA system

The DENV2, ZIKV and CHIKV samples were individuals newly infected by the state of Pernambuco, molecularly identified and chosen by the Department of Virology of the Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ). These samples are tested with Cys -NpZnOx-WGA system, as strategy to prove the capacity of biosensor recognition. The yellow fever virus

was obtained attenuated by the YF-17DD vaccine strain. The isolated viruses were diluted in sodium phosphate buffer in the concentrations of viral particles were $0.036 \times 10^6 < 0.045 \times 10^6 < 0.06 \times 10^6 < 0.09 \times 10^6 < 0.18 \times 10^6$, same dilution was performed in the serum of patients infected with arboviruses. Serum samples were subjected to molecular analysis and diagnostic tests for the detection of ZIKV, DENV and CHIKV.

3. Results and discussion

3.1 Surface morphological characterization

Figure 2 shows the images of atomic force microscopy, which it is possible to evaluate the surface topography of the biosensor in the detection of the viruses under study. The biosensitive system composed of Cys-ZnONp-WGA-BSA is shown in figure 2a, presenting a homogeneous surface with the formation of a biosensitive film.

A well-distributed Cys-ZnONp-WGA-BSA self-assembled layer was obtained after its adsorption on the electrode surface (Fig. 2a). WGA molecules are anchored on ZnONps surface due the presence of $-NH_3$ groups and a maximum height of ~ 74 nm was obtained.

The agglutination between lectin and ZIKV causes an increase in height (160 nm) and surface roughness demonstrating the agglutinating activity of lectin to the virus (fig 2b). The recognition of viral surface glycoproteins by WGA is shown in Figs. 2b-e. Cys-ZnONp-WGA system showed the weakest interaction to CHIKV (mean height of 85.0 ± 2.1 nm) as compared to the other studied arboviruses (Fig. 2d). A dense adsorbed layer on the sensor surface was

obtained for DENV4 (Fig. 2d), ZIKV (Fig. 2b), and YFV (Fig. 2c) with mean heights of 210 ± 3.2 nm, 160 ± 2.3 nm, and 96 ± 1.8 nm, respectively.

>>>>>>>>>>>>>>> Figure 2<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

3.2 Electrochemical characterization of the biosensor

Figure 3a shows the cyclic voltamogram describing the oxidation / reduction process of the redox probe, after each stage of modification of the working electrode surface. The voltamogram is composed of an anodic peak current (i_{pa}) and a cathodic peak current (i_{pc}) resulting from the oxidation and reduction processes of the electrolytic probe used in each analysis cycle.

Fig. 3a shows voltammetric measurements of the electrode surface modification. It was observed that peak current i_{pa} decreases with the addition of Cys (2.97 μA to 2.05 μA) characterizing the blocking of the charge passage due to the chemical characteristic of the amino acid. After the addition of ZnONp, the i_{pa} increased (2.72 μA), demonstrating the increase of the electroactivity due the presence of the nanoparticle in the system (KUMAR et al., 2015b). Later, with the immobilization of WGA lectin, the current transfer was perturbed with a decrease in the i_{pa} to 1.67 μA . Previous studies denoted that the lectin presence on the electrode surface provoke a physical modifications, blockage in the electron transfer, due to the establishment of the hydrophobic and hydrophilic interactions (MARCELINO; CASSANDRA; BARROSO, 2016; OLIVEIRA et al., 2011a). A decrease (1.06 μA) of the current in the i_{pa} occurs subsequently with the addition of BSA in the system, resulting from the blocking of remaining active sites (SIMÃO et al., 2020).

3.3 Electrochemical assay with arthropod-borne viruses

The response of arboviruses to lectin is notorious, reinforced by the decrease in peak currents of voltamograms with increased concentration, demonstrating that the viruses ZIKV, YFV, DENV4 and CHIKV are detectable and discriminable by the WGA lectin-based biosensor. The different electrical amplitudes of electrical response are related to the variable saccharide composition of each virus (DORDICK; LINHARDT, 2017; LIENEMANN et al., 2009; YAP et al., 2017).

The Figure 6 present the different amplitudes of amperometric (a) and impedimetric (b) responses in the biosensor against samples from patients contaminated with the viruses under study, demonstrating and the sensor's efficiency in discriminating viruses is in according to the structural saccharide composition. Figure 6c shows the $\Delta R_{ct}\%$ data obtained from experimental electrochemical impedance data. The R_{ct} is a numerical value obtained by analyzing the Randles equivalent circuit (insert 6b). The circuit consists of the solution resistance (R_s), constant phase element (CPE), Warburg impedance (W) and electron transfer resistance (R_{ct}) (Table 1). The numerical data of the R_{ct} of sensor system and the virus allows us to calculate the interaction between sensor and virus using the values of $\Delta R_{ct}\%$, defined as the relative variation of the R_{ct} :

$$\Delta R_{ct}\% = \frac{R_{ct}(\text{sensor}) - R_{ct}(\text{virus})}{R_{ct}(\text{sensor})} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

The numerical results of electrochemical impedance presented in Table 1, demonstrated that the viruses obtained electrochemical responses equivalent to those obtained by means of cyclic voltammetry. The DENV4 virus showed a greater range of response of the results with isolated virus and in samples from infected patients.

Figure 6d shows a graph based on the current peak i_{pa} variation of the sensor system and the virus, showing the interaction between the sensor and the virus through the amperometric variation. The values of $\Delta i_{pa}\%$ are obtained by calculating the relative variation i_{pa} :

$$\Delta i_{pa}\% = \frac{i_{pa}(\text{sensor}) - i_{pa}(\text{virus})}{i_{pa}(\text{sensor})} \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

3.4 Comparative study

The lectin-based sensor system for virus detection is based on the agglutination of saccharide residues in the viral structure. The sensor system composed of lectin ConA showed the highest response to ZIKV among the other viruses under study, demonstrating the presence

CHIKV presented a superior response when compared with YFV in the ConA system, but the result was the opposite in the WGA system. The difference in responses is due to the saccharide profile of the glucose/mannose and N-acetyl-glucosamine viral capsids that cause greater affinity to the specific sugar binding site of each lectin (AKAHATA; NABEL, 2012; SIMÃO et al., 2020; VOLK et al., 2010).

The use of ConA and WGA lectins associated with nanostructured platforms for virus detection has been reported in studies as an excellent alternative for the development of biosensors (OLIVEIRA et al., 2011a; SIMÃO et al., 2020). The comparative study demonstrates the efficiency of ConA and WGA lectins with distinct specificities for detecting the DENV4, ZIKV, CHIKV and YFV viruses, presenting itself as an excellent biomolecule for the diagnosis of arboviruses.

>>>>>>>>>>>>>>> Figure 7 <<<<<<<<<<<<<<<<<<

4. Conclusion

The nanostructured system developed showed excellent bioactivity of the immobilization of WGA lectin associated with ZnONp, providing an increase in the sensing surface for the detection of arthropod-borne viruses.

The electrochemical techniques of CV and EIS were essential in the process of biodevice construction as well as in the evaluation of the detection activity of the biosensor,

demonstrating the complementarity of the results obtained. The WGA lectin showed an excellent agglutination activity to the structural glycoproteins of DENV4, ZIKV, YFV and CHIKV, respectively. This recognition profile is based on the glycomic of arthropod-borne viruses, thus being efficient in the detection and discrimination of arboviruses in infected patients.

Acknowledgments

E.P. Simão would like to thank FACEPE for a Ph.D. scholarship. M.D.L. Oliveira and C.A.S. Andrade would like to thank CNPq (grant 314894/2018-7 and 314756/2018-3). L. H. V. G. Gil would like to thank Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (grant FACEPE-APQ-0739-2.12/17)

References

- [1] C. Zanluca, V. Campos, A. De Melo, A. Luiza, P. Mosimann, G. Igor, C. Nunes, K. Luz, First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110 (2015) 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>.
- [2] M.R.D. I, A. Ricardo, R. Freitas, A. Paula, B. Von Zuben, *Arboviroses emergentes no Brasil : desafios para a clínica e implicações para a saúde pública*, (2017) 10–15.
- [3] M.R. Donalisio, A.R.R. Freitas, A.P.B. Von Zuben, *Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health*, *Rev. Saude Publica.* 51 (2017) 10–15. <https://doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006889>.
- [4] S. Leone, W. Africa, *Zika Virus as an Emerging Global Pathogen Neurological Complications of Zika Virus*, *JAMA Neurol.* 73 (2016) 875–879.

- <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0800>.
- [5] CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention), Trioplex Real-time RT-PCR Assay, CDC. (2016).
 - [6] M.D.L. Oliveira, M.L. Nogueira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, C.A.S. Andrade, Sensors and Actuators B : Chemical Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on Cratylia mollis lectin affinity, Sensors Actuators B. Chem. 155 (2011) 789–795. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.01.049>.
 - [7] Stefan Belicky, J. Katrlík, J. Tkač, Glycan and lectin biosensors, Essays Biochem. 60 (2016) 37–47. <https://doi.org/10.1042/ebc20150005>.
 - [8] E.P. Simão, D.B.S. Silva, M.T. Cordeiro, L.H.V. Gil, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection, Talanta. 208 (2020) 120338. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120338>.
 - [9] Z. Li, Y. Fu, W. Fang, Y. Li, Electrochemical Impedance Immunosensor Based on Self-Assembled Monolayers for Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 with Signal Amplification Using Lectin, Sensors. 15 (2015) 19212–19224. <https://doi.org/10.3390/s150819212>.
 - [10] L. Zhao, C. Li, H. Qi, Q. Gao, C. Zhang, Electrochemical lectin-based biosensor array for detection and discrimination of carcinoembryonic antigen using dual amplification of gold nanoparticles and horseradish peroxidase, Sensors Actuators B Chem. 235 (2016) 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.136>.
 - [11] P.M. Chaudhary, M. Gade, R.A. Yellin, S. Sangabathuni, R. Kikkeri, Targeting label free carbohydrate-protein interactions for biosensor design, Anal. Methods. 8 (2016)

- 3410–3418. <https://doi.org/10.1039/c6ay00276e>.
- [12] R. HV, Screening of Lectins for Specific Detection of *Listeria Monocytogenes*, *J. Microbiol. Exp.* 5 (2017). <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00150>.
- [13] E.P. Randviir, J.P. Metters, J. Stainton, C.E. Banks, Electrochemical impedance spectroscopy versus cyclic voltammetry for the electroanalytical sensing of capsaicin utilising screen printed carbon nanotube electrodes., *Analyst.* 138 (2013) 2970–81. <https://doi.org/10.1039/c3an00368j>.
- [14] J. Hahm, Fundamental Properties of One-Dimensional Zinc Oxide Nanomaterials and Implementations in Various Detection Modes of Enhanced Biosensing, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 67 (2016) 691–717. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-031215-010949>.
- [15] S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi, Biosensors and Bioelectronics Graphene , carbon nanotubes , zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare, *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.062>.
- [16] M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, P.R. Singh, X. Zeng, Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition, *J. Colloid Interface Sci.* 362 (2011) 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.06.042>.
- [17] P. Marcelino, L. Cassandra, B. Barroso, Electrochemical Biosensing Strategies to Detect Serum Glycobiomarkers, 6 (2016) 1–17. <https://doi.org/10.9734/AIR/2016/24734>.
- [18] J.S. Dordick, R.J. Linhardt, Interaction of Zika Virus Envelope Protein with

- Glycosaminoglycans, 56 (2017) 1151–1162.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b01056>.
- [19] M. Lienemann, A. Paananen, H. Boer, J.M. De la Fuente, I. García, S. Penadés, A. Koivula, Characterization of the wheat germ agglutinin binding to self-assembled monolayers of neoglycoconjugates by AFM and SPR, *Glycobiology*. 19 (2009) 633–643. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp030>.
- [20] S.S.L. Yap, T. Nguyen-Khuong, P.M. Rudd, S. Alonso, Dengue virus glycosylation: What do we know?, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01415>.
- [21] S. Tabasum, A. Noreen, A. Kanwal, M. Zuber, M.N. Anjum, K.M. Zia, Glycoproteins functionalized natural and synthetic polymers for prospective biomedical applications: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 748–776.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.078>.
- [22] W. Akahata, G.J. Nabel, A Specific Domain of the Chikungunya Virus E2 Protein Regulates Particle Formation in Human Cells: Implications for Alphavirus Vaccine Design, *J. Virol.* 86 (2012) 8879–8883. <https://doi.org/10.1128/jvi.00370-12>.
- [23] D.E. Volk, F.J. May, S.H.A. Gandham, A. Anderson, J.J. Von, D.W.C. Beasley, A.D.T. Barrett, D.G. Gorenstein, Structure of yellow fever virus envelope protein domain III, *Virology*. 394 (2010) 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.001>.Structure.
- [24] A. Rouvinski, W. Dejnirattisai, P. Guardado-calvo, M. Vaney, P. Supasa, W. Wongwiwat, A. Haouz, A. Sharma, A. Rey, G.R. Screaton, Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop

- epitope, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms15411>.
- [25] F.A. Rey, Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 6899–6901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332695100>.
- [26] J. de J. Martínez-Barragán, R.M. del Angel, Identification of a Putative Coreceptor on Vero Cells That Participates in Dengue 4 Virus Infection, *J. Virol.* 75 (2001) 7818–7827. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.7818-7827.2001>.
- [27] N.K. Routhu, S.D. Lehoux, E.A. Rouse, M.R.M. Bidokhti, L.B. Giron, A. Anzurez, S.P. Reid, M. Abdel-Mohsen, R.D. Cummings, S.N. Byrareddy, Glycosylation of zika virus is important in host–virus interaction and pathogenic potential, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20205206>.
- [28] X. Zeng, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, X.L. Sun, Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3161–3176. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5594-y>.
- [29] I.J. Goldstein, Lectin structure-activity: The story is never over, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6583–6585. <https://doi.org/10.1021/jf0201879>.
- [30] C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, C.P. De

Table Captions

Table 1. Comparative analysis of the efficiency of the ConA sensor and the WGA sensor using

data obtained from the Randles equivalent circuit in the detection of arbovirus

Figure Captions

Figure 1: Representation of the construction stages of the biosensor.

Figure 2: AFM images of the stepwise modification process: Cys-ZnONp-WGA-BSA (a); Cys-ZnONp-WGA-BSA-ZIKV (b); Cys-ZnONp-WGA-BSA-YFV (c); Cys-ZnONp-WGA-BSA-CHIKV (d); Cys-ZnONp-WGA-BSA-DENV4 (e).

Figure 3: Cyclic voltammogram and Nyquist diagram of the stages of construction of the biosensor.

Figure 4: Cyclic voltammogram of the sensor system (—) and detection of diluted viruses isolated 0.036×10^6 (—), 0.045×10^6 (—), 0.06×10^6 (—), 0.09×10^6 (—), 0.18×10^6 (—).

Figure 5: θ versus the different concentrations of the DENV4 (●), ZIKV (●), YFV (●) and CHIKV (●).

Figure 6: Cyclic voltammogram (a) and Nyquist diagram (b) from patients infected with arbovirus shows Cys-ZnONp-WGA-BSA(□), CHIKV(◇), YFV(△), ZIKV(▽) and DENV4(◇). $\Delta I_{pa}\%$ (c) and $\Delta R_{ct}\%$ (d) demonstrating the numerical data obtained by means of the CV and EIE assays of the serum of patients infected with arboviruses.

Figure 7: $\Delta R_{ct}\%$ (a) and $\Delta I_{pa}\%$ (b) comparing the WGA (white bar) and ConA (gray bar) based sensors in the detection of arboviruses isolated in the fixed concentration at 0.18×10^6 viral particle.

Table 1

Electrode Modification	Rct (kΩ)	Q	n
Au	0.15 ± 0.32	19.1 ± 0.43	0.61 ± 0.16
Au-Cys	3.83 ± 0.12	1.70 ± 0.38	0.82 ± 0.21
Au-Cys-NpZnOx	0.37 ± 0.45	3.34 ± 0.57	0.75 ± 0.15
Au-Cys-NpZnOx-WGA	4.41±0.22	2.50 ± 0.42	0.78 ± 0.23
Sensor System WGA	7.66 ± 0.17	2.02 ± 0.25	0.80 ± 0.12
Sensor WGA -DENV4	24.9 ± 0.38	1.24 ± 0.31	0.83 ± 0.10
Sensor WGA- ZIKV	20.0 ± 0.23	1.59 ± 0.21	0.82 ± 0.14
Sensor WGA- YFV	12.4 ± 0.18	910 ± 0.25	0.86 ± 0.17
Sensor WGA-CHIKV	11.2 ± 0.41	935 ± 0.31	0.88 ± 0.22
Sensor system- glucose	7.59 ± 0.23	1.57 ± 0.56	0.80 ± 0.12
Negative serum	6.41 ± 0.18	646 ± 0.39	0.91 ± 0.31
Au-Cys-NpZnOx- ConA	2.34 ± 0.25	1.84 ± 0.30	0.83 ± 0.17
Sensor System ConA	5.34 ± 0.75	1.53 ± 0.33	0.85 ± 0.10
Sensor ConA-DENV4	9.86 ± 1.09	835 ± 0.55	0.89 ± 0.22
Sensor ConA –ZIKV	18.6 ± 1.01	1.26 ± 0.33	0.87 ± 0.11
Sensor ConA –YFV	5.98 ± 0.11	3.75 ± 0.52	0.74 ± 0.10
Sensor ConA -CHIKV	6.86 ± 0.23	8.80 ± 0.93	0.89 ± 0.23
Sensor system- lactose	5.59 ± 0.70	2.17 ± 0.32	8.82 ± 0.17
Negative serum	4.03 ± 0.23	1.60 ± 0.22	0.78 ± 0.20

Fig. 1

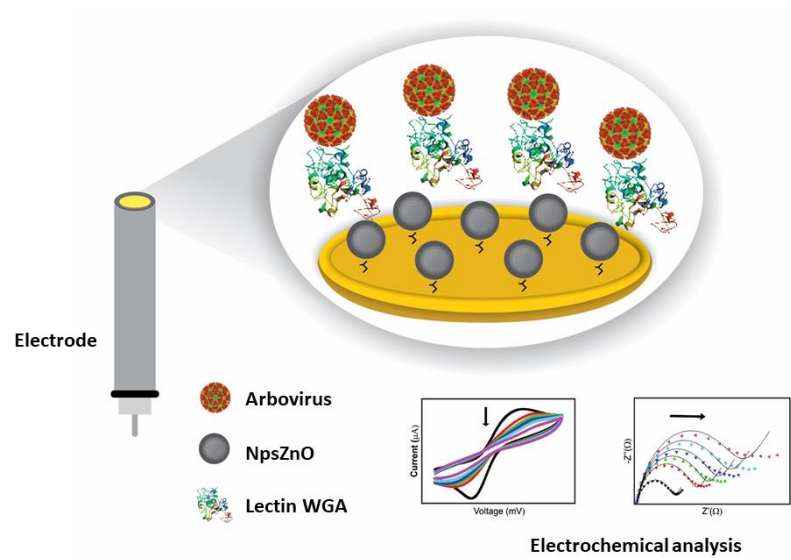


Fig.2

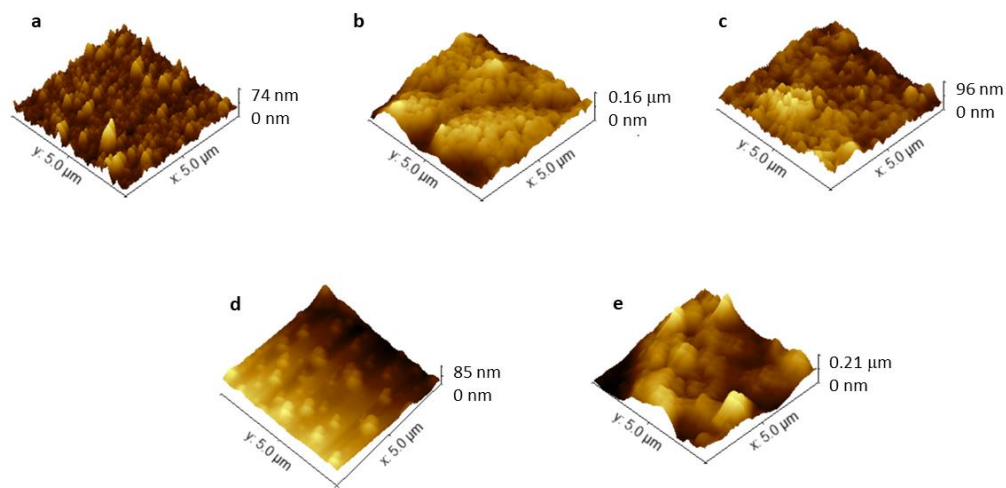


Fig. 3

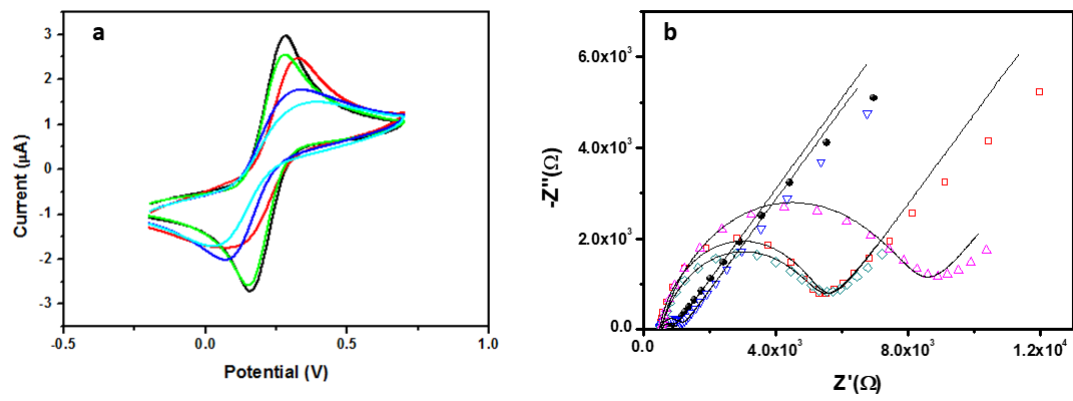


Fig. 4

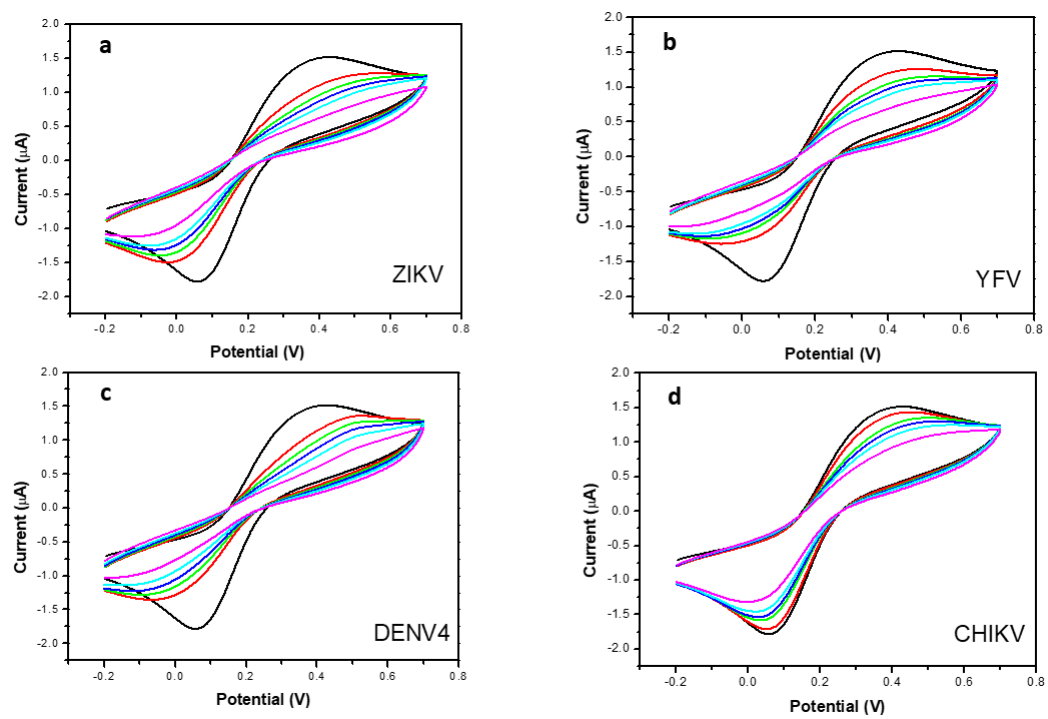


Fig. 5

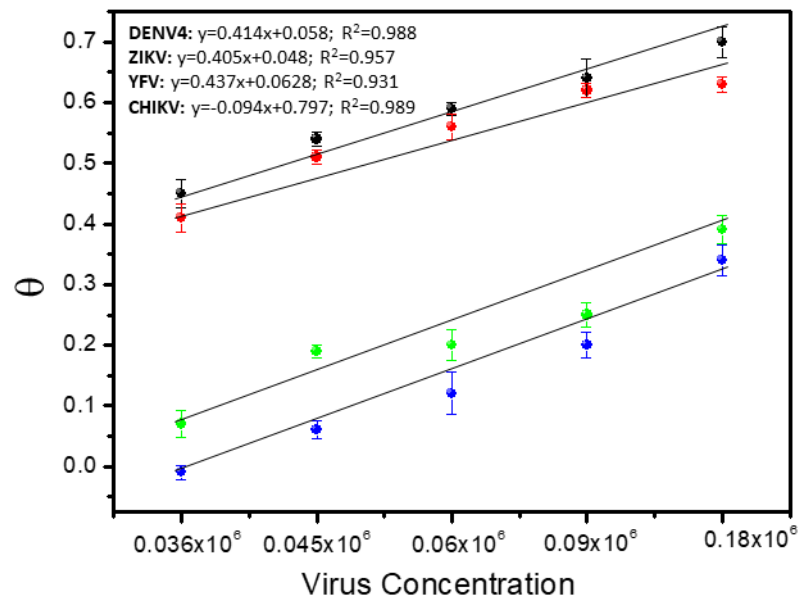


Fig. 6

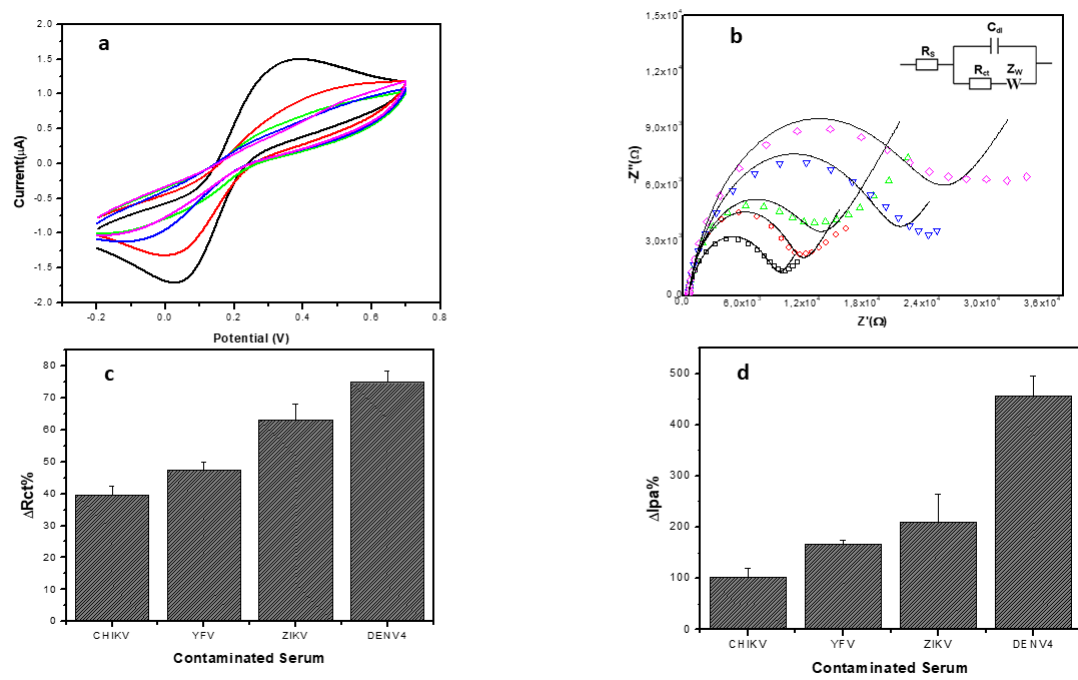
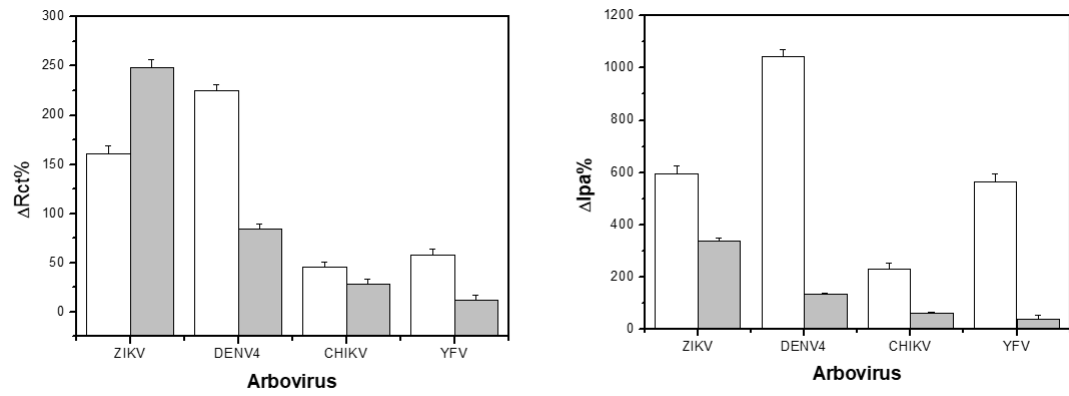


Fig. 7

5 Conclusões

- Neste trabalho, biossensores eletroquímicos simples e sensíveis para detecção e discriminação de arbovírus foram desenvolvidos utilizando a lectinas concanavalina A e WGA (como elemento de reconhecimento molecular).
- Os biossensores apresentaram excelente desempenho analítico para arbovírus testados com sensibilidade e ampla faixa linear.
- A identificação de arbovírus pelas lectinas ConA e WGA foram por meio de interações entre as cadeias laterais de carboidratos presentes nas glicoproteínas virais.
- O biossensor foi responsável pela detecção de arbovírus em amostras sorológicas de pacientes infectados, mesmo na presença de moléculas interferentes.
- O sistema desenvolvido com antígenos virais presta-se para identificação de anticorpos específicos para o ZIKA vírus e pode ser aplicado como superfície para detecção de imunoglobulinas.

6 Perspectivas

Os biossensores propostos foram capazes de identificar os diferentes arbovírus testados e de interagir com anticorpo anti-ZIKA de forma bioespecífica. Para avançar no processo de prototipagem o sistema desenvolvido será avaliado quanto a reprodutibilidade, reusabilidade e estabilidade analítica. Em seguida, espera-se realizar a miniaturização do sistema através do uso de sistemas poliméricos para a obtenção de um protótipo de baixo custo capaz de favorecer o diagnóstico diferencial das arboviroses e favorecer o tratamento adequado dos pacientes acometidos com estas infecções.

REFERÊNCIAS

- AKAHATA, W.; NABEL, G. J. A Specific Domain of the Chikungunya Virus E2 Protein Regulates Particle Formation in Human Cells: Implications for Alphavirus Vaccine Design. **Journal of Virology**, v. 86, n. 16, p. 8879–8883, 2012.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic – inorganic nanocomposite and Bauhinia monandra lectin. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 362, n. 2, p. 517–523, 2011.
- ANDRÉ, S. et al. Lectins: Getting familiar with translators of the sugar code. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1788–1823, 2015.
- ATAR, N.; MEHMET, L. Core-Shell Nanoparticles / Two-Dimensional (2D) Hexagonal Boron Nitride Nanosheets with Molecularly Imprinted Polymer for Electrochemical Sensing of Cypermethrin. v. 165, n. 5, p. 255–262, 2018.
- BARLETT, P. N.; COOPER, J. M. A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 362, n. 1–2, p. 1–12, 1993.
- BARONDES, S. D. F. A. S. H. A method for purification of proteins using specific polymer-ligands in aqueous polymer two-phase systems. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 2, p. 309–321, 2012.
- BARTON, C. et al. Activity of and effect of subcutaneous treatment with the broad- Spectrum antiviral lectin griffithsin in two laboratory rodent models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 120–127, 2014.
- BASARAB, M. et al. Vírus da Zika. **The BMJ**, v. 352, p. 1–6, 2016.
- BELICKY, TEFAN; KATRLIK, J.; TKA , J. Glycan and lectin biosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 37–47, 2016.
- BENCHIMOL, J. Febre amarela: a doença ea vacina, uma história inacabada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275–293, 2001.
- BOUCKAERT, J. et al. Sequential Structural Changes upon Zinc and Calcium Binding to Metal-free Concanavalin A Protein Chemistry and Structure : Sequential Structural Changes upon Zinc and Calcium Binding to Metal-free Concanavalin A Julie Bouckaert , Freddy Poortmans , Lode F. n. August, 1996.
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro , Brazil : Clinical Characterization , Epidemiological and Virological Aspects. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, p. 1–13, 2016.
- CABRAL-MIRANDA, G. et al. Biosensor-based selective detection of Zika virus specific antibodies in infected individuals. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 113, p. 101–107, 2018.
- CANBAZ, M. Ç.; SEZGINTÜRK, M. K. Fabrication of a highly sensitive disposable immunosensor based on indium tin oxide substrates for cancer biomarker detection. **Analytical Biochemistry**, v. 446, n. 1, p. 9–18, 2014.

CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

CAVADA, B. S. et al. ConA-like lectins: High similarity proteins as models to study structure/biological activities relationships. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, 2019.

CDC (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). **Types of Zika Virus Tests**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/zika/laboratories/types-of-tests.%0Ahtml%0A>>. Acesso em: 4 maio. 2018a.

CDC (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). **Trioplex Real-time RT-PCR Assay**.

CHAUDHARY, P. M. et al. Targeting label free carbohydrate-protein interactions for biosensor design. **Analytical Methods**, v. 8, n. 17, p. 3410–3418, 2016.

CHEN, C. et al. A carbohydrate-binding affinity ligand for the specific enrichment of glycoproteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1444, p. 8–20, 2016.

COE, D. F. et al. Mapping Putative B - Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. 2017.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins as antimicrobial agents. **J Appl Microbiol.**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, 2018.

CORDEIRO, M. T. et al. Results of a zika virus (ZIKV) immunoglobulin m-specific diagnostic assay are highly correlated with detection of neutralizing anti-ZIKV antibodies in neonates with congenital disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 12, p. 1897–1904, 2016.

DAM, T. K. et al. Binding of Multivalent Carbohydrates to Concanavalin A and Dioclea grandiflora Lectin . **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14223–14230, 2002.

DANIEL LUCEY, MD, MPH; LAWRENCE O. GOSTIN, J. A Yellow Fever Epidemic A New Global Health Emergency ?. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 24, p. 2661–2662, 2016.

DEDA, D. K. et al. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 683–687, 2013.

DEEBA, F. et al. Chikungunya virus : recent advances in epidemiology , host pathogen interaction and vaccine strategies. v. 74, p. 1–10, 2016.

DIAS, L.; ALMEIDA, S.; HAES, T.; MOTA, L.; RORIZ-FILHO, J. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 143–152, 2010.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, p. 10–15, 2017.

DORDICK, J. S.; LINHARDT, R. J. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. v. 56, p. 1151–1162, 2017.

DURCE, M.; GOMES, C. Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cad. Saúde Pública**, v. 32, n. 7, p. 1–3, 2016.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, 2016.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381–389, 2003.

GABIUS, H. J. et al. From lectin structure to functional glycomics: Principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 298–313, 2011.

GALAL, A.; ATTA, N. F.; EL-ADS, E. H. Probing cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles--towards selective electrochemical sensors. **Talanta**, v. 93, p. 264–73, 2012.

GALÁN-HUERTA, K. A. et al. Chikungunya virus: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.

GHOSH, K. et al. Biological : Full-length Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy. **J Electron Microscosc**, v. 57, n. 3, p. 113–118, 2008.

GOLDANI, L. Z. Yellow fever outbreak in Brazil , 2017. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 123–124, 2017.

GOLDSTEIN, I. J. Lectin structure-activity: The story is never over. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6583–6585, 2002.

GRASSET, F. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 360, n. 1–2, p. 298–311, 2003.

GRUBHOFFER, L.; CENTRE, B.; BUDEJOVICE, C. **Interaction of tick-borne encephalitis virus protein E with labelled lectins**. St. Louis, MO: Sigma Chemical Co., 1989.

GU, B. X. et al. Layer by layer immobilized horseradish peroxidase on zinc oxide nanorods for biosensing. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 18, p. 6553–6557, 2009.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg Microbes Infect.**, v. 6, p. e69, 2016.

GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue Epidemiology and Preventive Measures of Dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5–33, 1999.

HAHM, J. Fundamental Properties of One-Dimensional Zinc Oxide Nanomaterials and Implementations in Various Detection Modes of Enhanced Biosensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 691–717, 2016.

HARATA, K.; NAGAHORA, H.; JIGAMI, Y. X-ray structure of wheat germ agglutinin isolectin 3. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 51, n. 6, p. 1013–1019, 1995.

HAROLD, R.; HAROLD RUDIGER AND HANS-J. GABIUS. Plant lectins : Occurrence , biochemistry , functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, p. 589–613, 2002.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya : uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906–908, 2015.

HV, R. Screening of Lectins for Specific Detection of *Listeria Monocytogenes*. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 5, n. 3, 2017.

I, M. R. D. et al. Arboviroses emergentes no Brasil : desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. p. 10–15, 2017.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

J. D. ORAM, D. C. ELLWOOD, G. A. & J. L. S. Agglutination of an Arbovirus by Concanavalin A. **Nature New Biology**, v. 233, p. 50–51, 1971.

JELINEK, R.; KOLUSHEVA, S. Carbohydrate biosensors. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 5987–6015, 2004.

JORDANA, S. L. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Impedimetric sensor of bacterial toxins based on mixed (Concanavalin A)/ polyaniline films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 549–554, 2014.

KHAN, R. et al. Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p. 207–213, 2008.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 2833–2881, 9 abr. 2014.

KUMAR, S. et al. Graphene, Carbon Nanotubes, Zinc oxide and Gold as Elite Nanomaterials for Fabrication of Biosensors for Healthcare. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 70, p. 498–503, 2015a.

KUMAR, S. et al. Graphene , carbon nanotubes , zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 70, p. 498–503, 2015b.

KUMAR, S. A.; CHEN, S. Nanostructured Zinc Oxide Particles in Chemically Modified Electrodes for Biosensor Applications. **Analytical Letters**, v. 41, n. 2, p. 141–158, fev. 2008.

KUMAR, V. et al. Sensors and Actuators B : Chemical A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide / gold nanoplatfrom for detection of DNA arrays. v. 188, p. 1201–1211, 2013.

KURSTACK, E. K. C. **Comparative Diagnosis of Viral Diseases: Vertebrate Animal and Related Viruses**. 1st. ed. New York: Academic Press, 1981.

- LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: Proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1–18, 2017.
- LAHORGUE, M. et al. Microcephaly and Zika virus : a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 3, p. 230–240, 2016.
- LEAKE, C. Arbovirus-Mosquito Interactions and Vector Specificity. **Parasitol Today**, v. 8, n. 4, p. 123–128, 1992.
- LEITMEYER, K. C. et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **J Virol.**, v. 73, n. 6, p. 4738–4747, 1999.
- LEONE, S.; AFRICA, W. Zika Virus as an Emerging Global Pathogen Neurological Complications of Zika Virus. **JAMA Neurol.**, v. 73, n. 7, p. 875–879, 2016.
- LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxins. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115–1126, 2009.
- LI, Z. et al. Electrochemical Impedance Immunosensor Based on Self-Assembled Monolayers for Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 with Signal Amplification Using Lectin. **Sensors**, v. 15, n. 8, p. 19212–19224, 2015.
- LIENEMANN, M. et al. Characterization of the wheat germ agglutinin binding to self-assembled monolayers of neoglycoconjugates by AFM and SPR. **Glycobiology**, v. 19, n. 6, p. 633–643, 2009.
- LUNA, D. M. N. et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 565–572, 2015.
- LÜTFI, M.; EREN, T.; ATAR, N. Electrochimica Acta A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe @ Au nanoparticles decorated graphene oxide. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 38–47, 2014.
- LÜTFI, M.; EREN, T.; ATAR, N. Sensors and Actuators B : Chemical A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide : Application to selective determination of tyrosine in milk. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 210, p. 149–157, 2015.
- MA, X. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Construction of a Concanavalin A electrochemical sensor base on a novel sandwich capture mode. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 248, p. 201–206, 2017.
- MAGNELLI, P.; BIELIK, A.; GUTHRIE, E. Identification and characterization of protein glycosylation using specific endo-and exoglycosidases. **Methods in Molecular Biology**, v. 801, p. 189–211, 2012.
- MANDAL, D. K.; BREWER, C. F. Differences in the Binding Affinities of Dimeric Concanavalin A (Including Acetyl and Succinyl Derivatives) and Tetrameric Concanavalin A with Large Oligomannose-Type Glycopeptides. **Biochemistry**, v. 32, n. 19, p. 5116–5120, 1993.

- MANDELL, R. B.; FLICK, R. Rift Valley Fever Virus: A Real Bioterror Threat. **Journal of Bioterrorism & Biodefense**, v. 02, n. 02, 2011.
- MARCELINO, P.; CASSANDRA, L.; BARROSO, B. Electrochemical Biosensing Strategies to Detect Serum Glycobiomarkers. v. 6, n. 6, p. 1–17, 2016.
- MARTÍNEZ-BARRAGÁN, J. DE J.; DEL ANGEL, R. M. Identification of a Putative Coreceptor on Vero Cells That Participates in Dengue 4 Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 7818–7827, 2001.
- MCCLAIN., A. L. S. AND D. **Medical Microbiology**. 4th. ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston: [s.n.].
- MODY, R. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 8719, n. 94, 1993.
- MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 2015.
- MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012.
- MOREIRA, R. A. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Lectins and / or xyloglucans / alginate layers as supports for immobilization of dengue virus particles. v. 66, p. 45–52, 2008.
- MOULIN, E. et al. Simultaneous outbreaks of dengue , chikungunya and Zika virus infections : diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness. **New Microbes and New Infections**, v. 11, p. 6–7, 2016.
- MUNDEV, D.; TURRYAN, I. Applications of Self-Assembled Monolayers in Electroanalytical Chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, p. 207–213, 1995.
- NASCIMENTO, H. P. O. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces An impedimetric biosensor for detection of dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 414–419, 2011.
- NEČAS D, K. P. **Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis**Open Physics, , 2012.
- NICOLINI, A. M.; MCCracken, K. E.; YOON, J. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 7, p. 1–9, 2017.
- OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report , French Polynesia , December 2013. **Euro Surveill.**, v. 19, p. 7–9, 2014.
- OLIVEIRA, M. D. L. et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 1, p. 194–201, 2011a.
- OLIVEIRA, M. D. L. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on Cratylia mollis lectin affinity. **Sensors &**

Actuators: B. Chemical, v. 155, n. 2, p. 789–795, 2011b.

OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. A novel approach to classify serum glycoproteins from patients infected by dengue using electrochemical impedance spectroscopy analysis. **Synthetic Metals**, v. 159, p. 2162–2164, 2009a.

OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. Biosensors and Bioelectronics Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, p. 728–732, 2009b.

OLIVEIRA, N. et al. Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus. n. March, p. 15562–15577, 2015.

OSTERNE, V. J. S. et al. Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342–3353, 2014.

OZDEN, S. et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. 527, 2007.

PATEL, P. D. The applications of lectins in food analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, n. C, p. 35–39, 1992.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests : dengue. **Nature Publishing Group**, n. 12, p. S30–S37, 2010.

PIERSON, T. C.; GRAHAM, B. S. Review Zika Virus : Immunity and Vaccine Development. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 625–631, 2016.

PINTO-JUNIOR, V. L. Vírus Zika : Revisão para Clínicos Zika. **Revista Científica da Ordem dos Médicos**, v. 28, n. 6, p. 760–765, 2015.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. As múltiplas funções das lectinas vegetais. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 24, p. 135–156, 2002.

POWERS, A. M. How Chikungunya Virus Virology Affects Its Epidemiology and Transmission: Implications for Influencing Public Health. **J Infect Dis.**, v. 214, p. 5–8, 2016.

POWERS, A. M. et al. Zika Virus. **N Engl J Med**, v. 374, p. 1552–1563, 2016.

PRESTI, A. LO et al. Chikungunya virus , epidemiology , clinics and phylogenesis : A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925–932, 2014.

RAFIQUE, I. Diagnosis of Dengue Infection. v. 52, n. 3, p. 58–59, 2013.

RANDVIIR, E. P. et al. Electrochemical impedance spectroscopy versus cyclic voltammetry for the electroanalytical sensing of capsaicin utilising screen printed carbon nanotube electrodes. **The Analyst**, v. 138, n. 10, p. 2970–81, 2013.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 2013.

REEKE, G. N. et al. **Structure and Function of Concanavalin A**. Plenum Pre ed. New

York: [s.n.].

REN, X. et al. Zinc oxide nanoparticles/glucose oxidase photoelectrochemical system for the fabrication of biosensor. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, n. 2, p. 183–187, 2009.

REY, A. Dengue virus envelope glycoprotein structure : v. 100, n. 12, p. 6899–6901, 2003a.

REY, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 6899–6901, 10 jun. 2003b.

RIBEIRO, A. C.; FERREIRA, R.; FREITAS, R. **Plant Lectins : Bioactivities and Bioapplications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 58

RIBEIRO, D. V. Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **RIEM - IBRACON Structures and Materials Journal**, v. 8, n. 4, 2015.

RINI, J. M. Lectin Structure. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, n. 1, p. 551–577, 1995.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2010.

ROUSHANI, M.; SHAHDOST-FARD, F. Fabrication of an electrochemical nanoaptasensor based on AuNPs for ultrasensitive determination of cocaine in serum sample. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 599–607, 2016.

ROUTHU, N. K. et al. Glycosylation of zika virus is important in host–virus interaction and pathogenic potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, 2019.

ROUVINSKI, A. et al. Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop epitope. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–12, 2017.

SANYAOLU, A. et al. Chikungunya Epidemiology : A Global SM Journal of Public Health and Perspective Epidemiology. **SM Journal of Public Health and Epidemiology**, v. 2, n. 2, p. 1–7, 2016.

SCHWARTZ, R. M.; RUSTANDI, R.; HA, S. Characterization of N-glycosylation profiles from mammalian and insect cell derived chikungunya VLP. **Journal of Chromatography B**, v. 1032, p. 2–7, 2016.

SCHWEFEL, D. et al. Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 25, p. 8704–8719, 2010.

SHARMA, A. et al. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1213–1218, 2010.

SHI, X. et al. Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 181, n. 1–2, p. 1–22, 2014.

- SILVA, P. M. S. et al. Cratylia mollis lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 171–177, 2016.
- SIMÃO, E. P. et al. Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin b1 in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1040–1047, 2016.
- SIMÃO, E. P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, n. June 2019, p. 120338, 2020.
- SINGH, R.; SHARMA, A.; JANG, J. Electrical immunosensor based on dielectrophoretically-deposited carbon nanotubes for detection of influenza virus H1N1. **The Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5415–21, 2014.
- SIRELKHATIM, A. et al. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219–242, 2015.
- SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–70, 2016.
- SLIFKIN, M.; DOYLE, R. J. Lectins and Their Application to Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 197–218, 1990.
- SONG, H. et al. BRIEF COMMUNICATIONS Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. v. 23, n. 5, p. 3–6, 2016.
- SUBRAMANIAN, A.; IRUDAYARAJ, J.; RYAN, T. A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 998–1006, 2006.
- TABASUM, S. et al. Glycoproteins functionalized natural and synthetic polymers for prospective biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 748–776, 2017.
- TANIMOTO DE ALBUQUERQUE, Y. D.; FERREIRA, L. F. Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, n. 2, p. 210–221, 2007.
- TAUIL, P. L.; MEDICINA, F. DE. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 23, n. 4, p. 773–774, 2014.
- THEVENOT, D. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 121–131, 2014.
- THIBERVILLE, S. et al. Chikungunya fever : Epidemiology , clinical syndrome , pathogenesis and therapy. **ANTIVIRAL RESEARCH**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013.
- VODUŠEK, V. F. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, v. 374, p. 951–958, 2016.
- VOLK, D. E. et al. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. **Virology**, v. 394, n. 1, p. 12–18, 2010.

WANG, Y. et al. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2043–2081, 2008.

WASSERMAN, S.; ANANTHARAJAH, P.; LIAN, P. International Journal of Infectious Diseases Yellow fever cases in Asia : primed for an epidemic. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 98–103, 2016.

WILDER-SMITH, A.; MURRAY; QUAM, M. Epidemiology of dengue : past , present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299–309, 2013a.

WILDER-SMITH, A.; MURRAY; QUAM, M. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299, ago. 2013b.

WILDER-SMITH, A.; OOI, E. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. **Curr Infect Dis Rep.**, v. 12, p. 157–164, 2010.

XIAO-FENG LI, TAO JIANG, YONG-QIANG DENG, HUI ZHAO, XUE-DONG YU, QING YE, HONG-JIANG WANG, SHUN-YA ZHU, FU-CHUN ZHANG, E-DE QIN, AND C.-F. Q. Complete Genome Sequence of a Chikungunya Virus Isolated in Guangdong, China. **J Virol.**, v. 86, n. 16, p. 8904–8905, 2012.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **J Infect Dis**, v. 214, p. 441–445, 2016.

YANG, H. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 229, p. 297–304, 2016.

YAP, S. S. L. et al. Dengue virus glycosylation: What do we know? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–16, 2017.

YOLA, M. L.; ATAR, N. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application to the simultaneous determination of quercetin and rutin. **Electrochimica Acta**, v. 119, p. 24–31, 2014.

YOLA, M. L.; ATAR, N. A Novel Detection Approach for Serotonin by Graphene Quantum Dots/Two-Dimensional (2D) Hexagonal Boron Nitride Nanosheets with Molecularly Imprinted Polymer. **Applied Surface Science**, 2018a.

YOLA, M. L.; ATAR, N. Development of cardiac troponin-I biosensor based on boron nitride quantum dots including molecularly imprinted polymer. **Biosensors and Bioelectronic**, 2018b.

YUMAK, T. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Preparation and characterization of zinc oxide nanoparticles and their sensor applications for electrochemical monitoring of nucleic acid hybridization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 397–403, 2011.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy : Clinical , immunological and virological findings , and public health implications. **J Clin Virol.**, v. 63, p. 32–35, 2015.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569–572, 2015.

ZANLUCA, C. et al. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, v. 387, p. 2016, 2016.

ZENG, X. et al. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3161–3176, 2012.

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

ZHANG, Y. et al. Biomedical applications of zinc oxide nanoparticles. **Current Molecular Medicine**, v. 13, p. 1633–1645, 2018.

ZHAO, L. et al. Electrochemical lectin-based biosensor array for detection and discrimination of carcinoembryonic antigen using dual amplification of gold nanoparticles and horseradish peroxidase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 235, p. 575–582, nov. 2016.

APÊNDICE A**ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO *TALANTA*****ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO *TALANTA* 05/09/2019****<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120338>****NANOSTRUCTURED IMPEDIMETRIC LECTIN-BASED BIOSENSOR FOR
ARBOVIRUSES DETECTION****Estefani P. Simão¹, Dammyres B. S. Silva², Marli T. Cordeiro³,
Laura H.V. Gil³, Cesar A.S. Andrade², Maria D.L. Oliveira^{1,2*}**

Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection

Estefani P. Simão¹, Dammyres B. S. Silva², Marli T. Cordeiro³,

Laura H.V. Gil³, Cesar A.S. Andrade ², Maria D.L. Oliveira^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco,
50670-901 Recife, PE, Brazil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE,
Brazil.

³ Departamento de Virologia-Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, 50670-420 Recife, PE,
Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

ABSTRACT

Arboviruses have been emerging as a major global health problem due to the recurrent epidemics. The development of new diagnostic devices is required due to the unspecific clinical manifestation of arboviruses. Here, we report the development of a biosensor based on cysteine (Cys), zinc oxide nanoparticles (ZnONp), and Concanavalin A (ConA) lectin to differentiate between arboviruses infections. ConA is capable of interacting with the saccharide components of the viral capsid. In this study, we evaluated the reproducibility, sensitivity, and specificity of the sensor for the virus of Dengue type 2 (DENV2), Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV), and Yellow fever (YFV). Atomic force microscopy measurements confirmed the electrode surface modification and revealed a heterogeneous topography during the biorecognition process. Cyclic voltammetry (CV) and impedance spectroscopy (EIS) measurements have shown that redox probe reactions on the modified gold electrodes were partially blocked due to the adsorption of Cys-ZnONp-ConA system and its interaction with viral glycoproteins. The sensor exhibited a linear response to different concentrations of the studied arboviruses. Our study demonstrates that ConA lectin recognizes the structural glycoproteins of the DENV2, ZIKV, CHIKV, and YFV. DENV2 is the most structurally similar to ZIKV. Our results have shown that the impedimetric response correlates with the structural glycoproteins, as follow: DENV2 (18.6 k Ω) > ZIKV (14.6 k Ω) > CHIKV (6.86 k Ω) > YFV (5.98 k Ω). Thus, homologous structural regions contribute to ConA-arboviruses recognition. Our results demonstrate the applicability of the proposed system to the development of biosensors for arboviruses infections.

Keywords: Concanavalin A; Nanoparticles; Arboviruses; Biosensor; Impedance spectroscopy.

1. Introduction

Dengue (DENV), Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV), and Yellow Fever (YFV) viruses are arboviruses (arthropod-borne viruses) associated to worldwide outbreaks and a major public health problem (IOOS et al., 2014)(WILDER-SMITH; MURRAY; QUAM, 2013b)(DEEBA et al., 2016). DENV, ZIKV, and YFV are single-stranded RNA viruses of the *Flaviviridae* family and genus *Flavivirus*. These arboviruses contain an internal matrix protein and a surface glycoprotein to mediate interactions. In addition, structural (E, C, and M) and non-structural (NS) proteins are also observed. CHIKV is an RNA virus belonging to the genus *Alphavirus* of the *Togaviridae* family. Also, CHIKV structural proteins are different from the other arboviruses due to the presence of two surface glycoproteins (E1 and E2) (I et al., 2017; MCCLAIN., 1996). DENV2 is the most structurally similar to ZIKV due to the presence of homologous structural regions (COE et al., 2017). ZIKV presents radial distances of the lipid bilayer core and its envelope ectodomains are similar to those of DENV2 (SIROHI et al., 2016).

The arboviruses are structurally composed of glycoproteins and glycolipids, both with extreme importance for the infection process and penetration of the virus into the host cell (DORDICK; LINHARDT, 2017). The glycans are major components of the outermost surface of viruses. The structural glycoproteins of the DENV, ZIKV, CHIKV, and YFV are composed of mannose, galactose, and N-acetylglucosamine (J. D. ORAM, D. C. ELLWOOD, 1971; REY, 2003a; SIROHI et al., 2016).

DENV, ZIKV, CHIKV, and YFV are difficult to be diagnosed clinically due to similarities in the symptoms (MANDELL; FLICK, 2011; MOULIN et al., 2016). In addition, cross-reactions in immunological tests (e.g., MAC-ELISA) can be observed due to the late immunological stimulus and similarity between the arboviruses (CDC (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION), 2016a). Reverse transcription quantitative real-

time polymerase chain reaction (RT-qPCR) is also used to identify arboviruses. RT-qPCR is only effective to detect the virus RNA at the early stage of the infection because after this period the number of false negatives increases (CDC (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION), 2016b).

On the other hand, diverse studies have demonstrated the applicability of biosensors as diagnostic methods for arboviruses (NASCIMENTO et al., 2011; NICOLINI; MCCracken; YOON, 2017; OLIVEIRA et al., 2015). Nanostructures associated with electrochemical techniques, such as electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV), have been extensively used for the development of biosensors (KHAN et al., 2008; KUMAR; CHEN, 2008). Graphene, carbon nanotubes, carbon dots, and metallic nanoparticles are nanomaterials with outstanding characteristics such as electron transfer, chemical stability, and thermal conductivity (KUMAR et al., 2013; LÜTFI; EREN; ATAR, 2014, 2015; YOLA; ATAR, 2014, 2018a). The use of nanomaterials in electrochemical biosensors provides a high surface area, electrochemical activity, and the possibility of functionalization (ATAR; MEHMET, 2018; YOLA; ATAR, 2018b). Zinc oxide nanoparticles (ZnONp) can optimize the electrochemical responses due to fast electron transfer capability and biocompatibility (KUMAR; CHEN, 2008; YUMAK et al., 2011).

Lectins are currently being extensively explored in the field of biosensors as a biorecognition molecule because of their specific interaction properties with free or conjugated carbohydrate residues. Thus, lectins can be used for virus detection in human serological samples (MA et al., 2017; YANG et al., 2016; ZHAO et al., 2016). Concanavalin A (ConA) is a carbohydrate-binding protein with monosaccharide specificity (Gly/Man). Also, ConA is capable of differentiating glycoproteins presents in serum from arbovirus-infected patients and normal serum (OLIVEIRA; CORREIA; DINIZ, 2009a). The lectin-based sensor has shown

good sensitivity and potential to the development of new nanostructured platforms for arboviruses detection (ANDRADE et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011b).

Here, we demonstrated the development of a new sensitive electrochemical biosensor based on a self-assembled monolayer of ConA lectin and ZnONp for detection of mannose-glucose residues present in DENV2, ZIKV, CHIKV, and YFV. The proposed sensor platform for the diagnosis of arboviral infections is shown in Fig. 1.

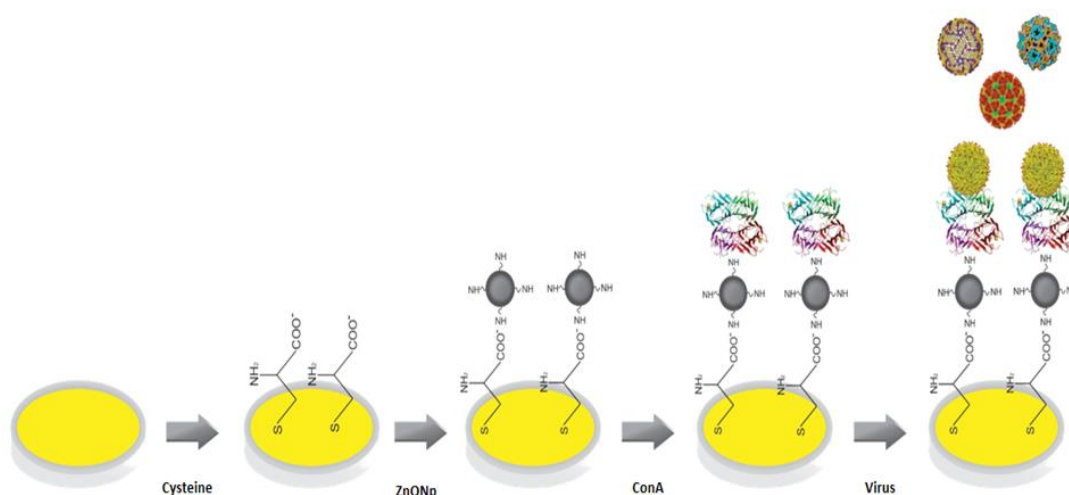


Fig. 1. Schematic representation of the surface modification.

2. Methodology

2.1. Materials

ConA lectin, bovine serum albumin (BSA), ZnONp, cysteine (Cys), 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), and aminopropyltriethoxysilane (APTES) were purchased from Sigma Chemical (St.

Louis, MO, USA). Potassium ferri- and ferrocyanide were obtained from VETEC (Brazil). All chemicals were of analytical grade and used as received without further purification. Ultrapure water was obtained from a Millipore Milli-Q system. Serum (from healthy and arbovirus-infected patients) and arbovirus strains were provided from the Department of Virology of the Institute Aggeu Magalhães.

2.2. *Electrode modification*

ZnONp were functionalized with APTES according to Grasset et al. (GRASSET, 2003). The bare gold electrode was polished with alumina, rinsed with deionized water and dried at room temperature. Subsequently, 2 μ L of 70 mM cysteine (Cys) was added on the electrode surface to obtain a self-assembled monolayer. Then, 2 μ L of EDC-NHS solution (0.4M EDC and 0.1M NHS, 1:1 v/v) was added on the electrode surface for 10 min. Subsequently, 2 μ L of ZnONp was dropped onto the Cys layer for 10 min. After, 2 μ L ConA (1 mg mL⁻¹) was dropped onto the electrode surface and incubated for 10 min. Finally, 2 μ L of BSA (10%) was used in all experiments to avoid non-specific interactions. The performance of the biosensor was tested against 2 μ L of ZIKV, CHIKV, DENV2, or YFV in a dilution 1:10 with an incubation time of 10 min.

2.3. *Dengue, Zika, Chikungunya, and Yellow fever viruses*

All viruses used in this study were provided by the Department of Virology of the Institute Aggeu Magalhães (IAM – FIOCRUZ). DENV2, ZIKV, and CHIKV were isolated from newly infected patients of the state of Pernambuco, molecularly identified and characterized, as follows: DENV2, BRPE/95-3808; ZIKV, Brazil PE243/2015; and, CHIKV, Brazil PE480/2016. The yellow fever virus was the attenuated YF-17DD vaccine strain. The

blood samples were obtained from patients with characteristic clinical symptoms. The specimens were spun down for 10 minutes at $1500 \times g$, and serum was stored at -80°C . Furthermore, molecular diagnostic assays were performed for ZIKV, DENV and chikungunya virus (CHIKV) in all samples. All viruses strains were propagated into Vero cells (African green monkey kidney), titrated and kept stored at -80°C . All viruses' samples were inactivated using BPL (Beta propiolactone) before use. Plaque reduction neutralization test (PRNT) was used to detect ZIKV at different concentrations (Fig. S1). PRNT50 values are defined as the PRNT endpoint at which the highest dilution of serum inhibits $\geq 50\%$ of the plaques (CORDEIRO et al., 2016)

2.3. Electrochemical measurements

Electrochemical analyses were performed using a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, Netherlands). CV measurements were performed at a scan rate of 50 mV s^{-1} in a range of potentials between -0.2 and $+0.7 \text{ V}$. EIS was obtained in a frequency range of 100 mHz to 100 kHz , with an amplitude of the applied sine wave potential of 10 mV . Electrochemical measurements were carried out in a conventional three-electrode electrochemical cell consisting of the auxiliary electrode (Pt wire), reference electrode (Ag/AgCl), and the working electrode (gold electrode), housed inside a Faraday cage. The analyses were performed in the presence of a 10mM ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) redox probe. All measurements were performed in triplicate using three different samples ($n=3$).

2.4 . Atomic force microscopy measurements

Topographic analyses were performed with an SPM9700 atomic force microscope (Shimadzu Instruments Co. Ltd, Japan) in a non-contact mode at room temperature ($\sim 25^{\circ}\text{C}$).

Cantilevers with a silicon AFM probes (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 190 kHz, spring constant = 42 N m⁻¹) were used. The images (512 points per line) were collected with a scan rate of 1.0 Hz in a scan area of 5 × 5 μm. Gwyddion software was used for analysis and processing of the images (NEČAS D, 2012).

3. Results and discussion

3.1. Topographic characterization

The morphology of the Cys-ZnONp-ConA film and arboviruses recognition was studied by AFM technique. Figure 2 shows AFM topographic images of the sensor system surface.

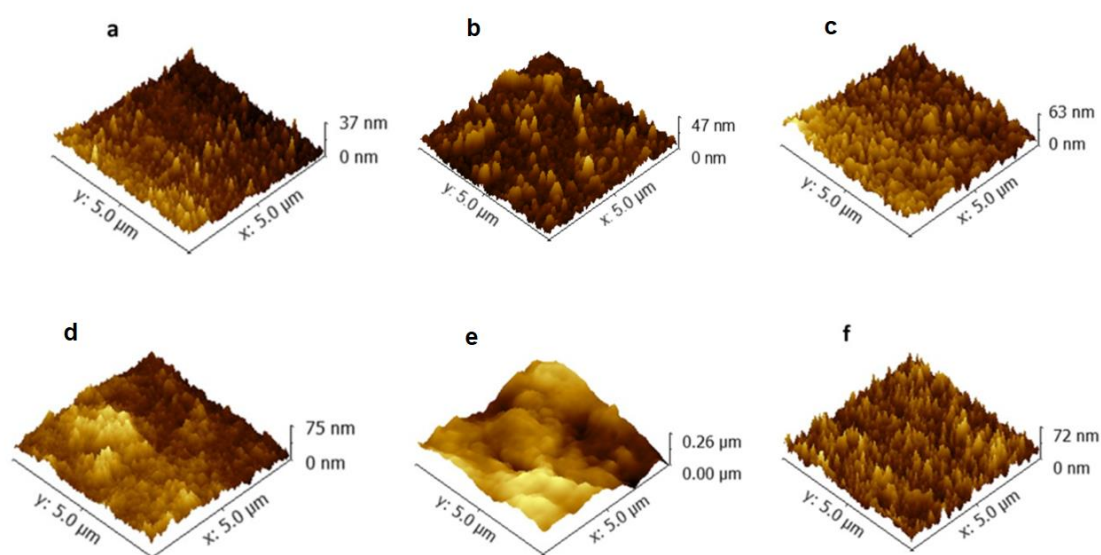


Fig. 2. AFM images of the stepwise modification process: (a) Cys-ZnONp-ConA-BSA, (b) Cys-ZnONp-ConA-BSA-DENV, (c) Cys-ZnONp-ConA-BSA-CHIKV, (d) Cys-ZnONp-ConA-BSA-ZIKV, and (e) Cys-ZnONp-ConA-BSA-YFV.

A heterogeneous covering of the electrode surface was obtained for Cys-ZnONp (Fig. 2a) and Cys-ZnONp-ConA (Fig. 2b) systems with a mean height of 37 ± 2.1 nm and 47 ± 1.5

nm, respectively. These results are following previous studies that determined the height of ~ 12 nm for the ConA tetramer (BOUCKAERT et al., 1996). Also, we also evaluate the association between ConA and viral glycoproteins (Fig. 2c-f).

Cys-ZnONp-ConA system showed the weakest interaction to YFV (mean height of 63.0 ± 3.4 nm) as compared to the other studied arboviruses (Fig. 2c). A dense adsorbed layer on the sensor surface was observed for DENV2, ZIKV, and CHIKV with mean heights of 75 ± 2.4 nm, 260 ± 3.9 nm, and 72 ± 1.2 nm, respectively (Figs. 2d-f). The difference observed in the height data is attributed to the specificity of ConA lectin to the viral glycoproteins (MOREIRA et al., 2008; OZDEN et al., 2007).

3.2. Electrochemical characterization

Figure 3a shows the cyclic voltammograms of the assembly process of the sensor and the oxidation/reduction peaks of the redox pair. The bare gold electrode showed quasi-reversible redox behavior. A decrease in the amperometric current is obtained after addition of Cys molecules on the gold electrode surface. This behavior is due to the chemical interaction between Cys and gold surface through the group thiol (-SH) (OLIVEIRA et al., 2011a; SIMÃO et al., 2016). The peak currents increased with the aminated ZnONp concentration. The ZnONp adsorption occurs through EDC:NHS. The coupling agents activate negative charge terminal carboxyl group of Cys that is substituted by NHS ester on the electrode surface. Thus, the accumulation of positive charges on the electrode surface attracts the redox probe (KHAN et al., 2008; KUMAR; CHEN, 2008). ConA is adsorbed on the Cys-ZnONp surface through electrostatic interaction. After, a decrease in the amperometric current is observed associated with the physical adsorption of the lectin (JORDANA et al., 2014; OLIVEIRA; CORREIA;

DINIZ, 2009b). BSA has been used to block the remaining active sites of the biosensor (SIMÃO et al., 2016). The redox peak currents decreased after addition of BSA.

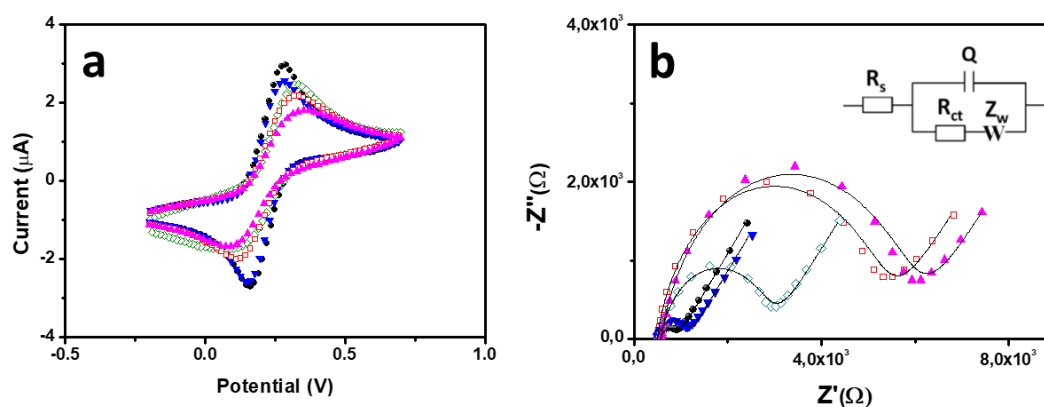


Fig. 3. Cyclic voltammogram (a) and Nyquist diagram (b) of the stepwise modification process: (●) gold electrode, (□) Cys, (▼) ZnONp, (◇) ConA, and (△) BSA.

Figure 3b shows a typical Nyquist plot of the modification of the electrode surface. The impedance data were fitted with NOVA 1.8 software by using modified Randles equivalent model (inset of Fig. 3b). The circuit includes a solution resistance (R_s), electron transfer resistance (R_{ct}), Warburg impedance element (Z_w), and phase constant element (Q). The diameter of the semicircle represents the charge transfer resistance (R_{ct}). The bare gold electrode showed a smaller semicircle ($R_{ct} = 0.35 \text{ k}\Omega$) in the Nyquist diagram compared with other measurements (NASCIMENTO et al., 2011). An increase of the R_{ct} ($4.79 \text{ k}\Omega$) was observed after addition of Cys molecules. The immobilization of the ZnONp results in a decrease of the R_{ct} ($0.66 \text{ k}\Omega$) due to a rapid electron transfer kinetics (KHAN et al., 2008). Subsequently, a further increase in the R_{ct} ($2.34 \text{ k}\Omega$) was obtained after the addition of ConA. Thus, an effective immobilization of the lectin to the developed nanostructured platform was

obtained. Finally, BSA was added to the electrode surface ($R_{ct} = 5.34 \text{ k}\Omega$). EIS results were in good agreement with those from CV measurements confirming the surface modification.

The specificity of ConA was evaluated against lactose and glycogen as negative controls. Lactose is a disaccharide composed of glucose and galactose. Glycogen is a polysaccharide consisting of glucose residues. ConA has specificity for non-reducing α -D-mannosyl and α -D-glycosyl groups. The electrochemical measurements for lactose and glycogen recognition displayed no significant response (Fig. S2).

The biological activity of the Cys-ZnONp-ConA-BSA platform was evaluated against fetuin and ovalbumin glycoproteins (Fig. S3). A further increase in the R_{ct} was obtained after electrode exposition to these glycoconjugates. Thus, ConA was capable of recognizing fetuin and ovalbumin. Similar results have been previously obtained by other authors (OLIVEIRA et al., 2011b). The lectin-glycoprotein complex can act as the inert electron and mass transfer-blocking layer. Therefore, this complex hinders the movement of ferricyanide toward the electrode surface.

3.3. Analytical performance of the biosensor on real samples

Differences in the viral envelope are an important characteristic of the differentiation of the immunological response after infection by arboviruses. The saccharide difference associated with structural components of the envelope can be used to identify and differentiate arboviruses (J. D. ORAM, D. C. ELLWOOD, 1971). Thus, ConA lectin was used in this work for the identification and differentiation of the carbohydrates on the viral envelope.

The electrochemical response of the sensor to DENV2, ZIKV, CHIKV, and YFV is shown in Fig. 4. The degree of affinity of the sensor to the virus decreased from ZIKV > DENV2 > CHIKV > YFV. The best response to ZIKV is due to the interaction of ConA with

specific residues of carbohydrates present in structural glycoprotein E of the ZIKV (DORDICK; LINHARDT, 2017; PIERSON; GRAHAM, 2016). DENV2 showed increased interaction with ConA due to the presence of glycans on its surface. Carbohydrates residues distributed on ZIKV surface differ in density and conformation as compared to DENV2 (SIROHI et al., 2016).

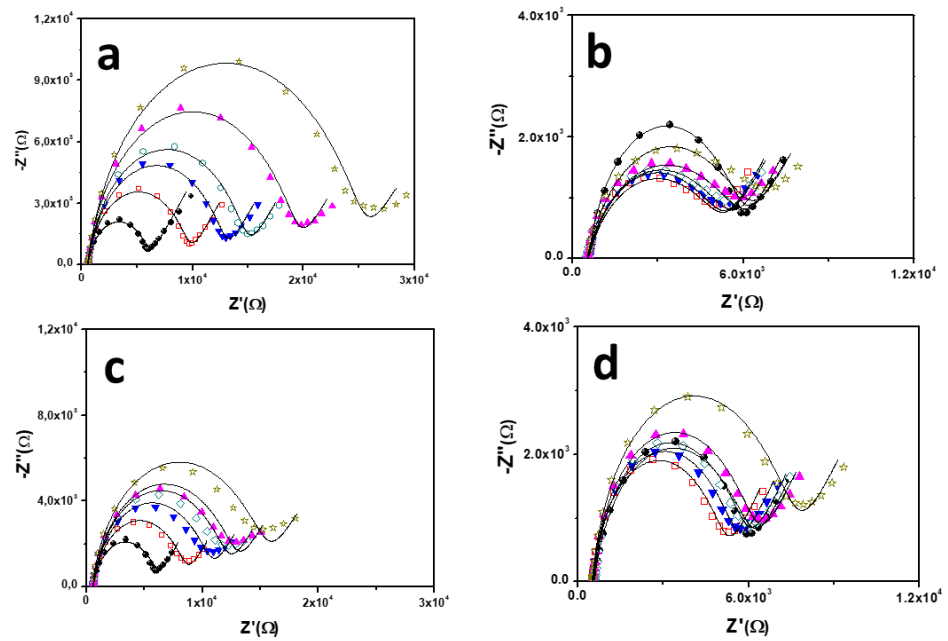


Fig. 4. Nyquist diagram of the sensor system (●) and serial dilutions of arboviruses 1:50 (□); 1:40 (▽): 1:30 (◇); 1:20 (▲); 1:10 (*) of the virus. ZIKV (a), DENV2 (b), CHIKV (c) and YFV (d).

The binding between ConA and viral glycoproteins reflects the interaction of the biomolecule with residues of carbohydrates present in the Ans¹⁵⁴ glycan monomer exposed on the surface of the DENV2 and ZIKV viruses (SIROHI et al., 2016). CHIKV is composed of a glycidic structure that contains mannose sugars favoring the lectin interaction and resulting in an increase of the resistivity (KURSTACK, 1981). ConA recognition to ZIKV is associated with positive charges in the central and negative regions in the distal portion of the non-structural protein 1 (NS1), repelling the redox probe used. The charge distribution of the

DENV2 NS1 protein is different from ZIKV. In addition, DENV2 NS1 protein is composed of positive charges throughout the surface, which reflects the lower resistivity as compared to ZIKV response (SONG et al., 2016). ConA recognized CHIKV due to the presence of mannose residues (SCHWARTZ; RUSTANDI; HA, 2016). Finally, YFV did not show significant electrochemical response due to the smallest amount of mannose or glucose in the viral structure compared to other flaviviruses (GRUBHOFFER; CENTRE; BUDEJOVICE, 1989).

YFV genome is capable of coding a polyprotein, which is post- and co-translationally processed into three structural proteins and seven non-structural proteins. The envelope (E) protein is an important YFV structural protein and has been demonstrated as the major component of the virion surface (VOLK et al., 2010). A previous study revealed that ConA and other lectins did not react with virus E protein, confirming the absence of sugar residues at side chains (GRUBHOFFER; CENTRE; BUDEJOVICE, 1989).

Table 1 shows the equivalent circuit parameters of the fitting curves for the biosensor preparation and its subsequent interaction with different arboviruses (DENV2, ZIKV, CHIKV or YFV). Our results revealed different responses for each arbovirus. In addition, our system was not responsive when negative serum was tested. This behavior demonstrated that the new biosensor is capable to recognize virus in contaminated samples. The highest R_{ct} values were obtained for ZIKV recognition due to the lectin specificity. The performance of the modified electrode for virus detection was evaluated through the relative variation of R_{ct} ($\Delta R_{ct}\%$). $\Delta R_{ct}\%$ is an analytical component used to measure a relative impedance of the system before and after the detection process, as follow: $\Delta R_{ct}\% = (R_{ct \text{ (sensor)}} - R_{ct \text{ (virus)}}) / R_{ct \text{ (sensor)}}$, where $R_{ct \text{ sensor}}$ and $R_{ct \text{ virus}}$ correspond to the sensor layer before and after arbovirus interaction, respectively (OLIVEIRA; CORREIA; DINIZ, 2009b). PRNT was used to validate the ZIKV

concentrations. Cys-ZnONp-ConA system and PRNT displayed no significant difference in response to virus detection.

Electrode Modification	Rct (k Ω)	Rs (Ω)	Q	W	n
Au	0.35	565	3.73	481	0.79
Au-Cys	4.79	494	1.69	464	0.87
Au-Cys-ZnONp	0.66	487	2.68	528	0.77
Au-Cys-ZnONp-ConA	2.34	558	1.84	474	0.83
Au-Cys-ZnONp-ConA-BSA	5.34	575	1.53	452	0.85
Sensor system-ovalbumin	14.5	506	8.00	162	0.89
Sensor system-fetuin	58.7	551	1.38	432	0.86
Sensor system-lactose	5.59	551	2.17	511	8.82
Sensor system-glycogen	6.12	511	1.29	433	0.83
ZIKV	18.6	529	1.26	517	0.87
CHIKV	6.86	510	8.80	302	0.89
YFV	5.98	543	3.75	524	0.74
DENV2	14.6	480	1.15	285	0.86
Negative sérum	4.03	501	1.60	462	0.78

Table 1. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results. The analyses were performed at 1:10 dilution.

Thus, Rct is a component of the Randles circuit (inset of Fig. 3b) used to evaluate the impedance of the modified electrode. Rs and Z_w are associated with the evaluation of the electrolytic properties and the diffusion of the redox pair, respectively. Q and Rct vary with the dielectric capacity of the electrode during the electrode surface modification phases, where Q is the constant phase element and Rct is the charge transfer resistance (ANDRADE et al., 2011).

Another component that varies with the interaction between virus and lectin is the degree of coating of the surface (θ), represented by $\theta = 1 - (R_{ct(sensor)} / R_{ct(virus)})$. In Figure 5a, we observed an increase in R_{ct} with increasing the virus' concentration. Similar behavior was observed for θ analysis (Fig. 5b), obtaining a high degree of coating ($\sim 80\%$) for ZIKV. Our results indicate a higher affinity of the sensor for ZIKV. The equation of limit of detection (LOD) can be expressed as $LOD = 3 \sigma/m$, where 's' is the standard deviation of the response and 'm' is the slope of a calibration curve. The LOD was calculated to be $0.0421 \text{ pfu mL}^{-1}$ for ZIKV, $0.0437 \text{ pfu mL}^{-1}$ for YFV, $0.062 \text{ pfu mL}^{-1}$ for CHIKV, and $0.0382 \text{ pfu mL}^{-1}$ for DENV.

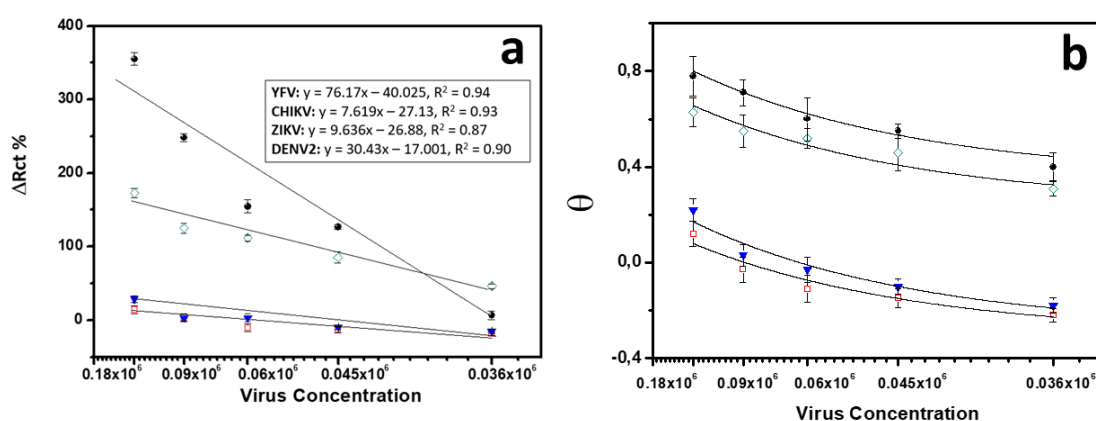


Fig. 5. $\Delta R_{ct}\%$ (a) and θ (b) as function of different dilutions of (●) ZIKV, (◇) DENV, (▽) CHIKV, and (□) YFV.

The proposed biosensor was able to detect arboviruses in serological samples from infected patients (Fig. 6). The impedimetric response of the sensor for real samples was similar to that obtained for purified virus samples. ZIKV in human samples presented a greater variation of the $\Delta R_{ct}\%$ as compared to other DENV > CHIKV > YFV viruses (Fig. 6a).

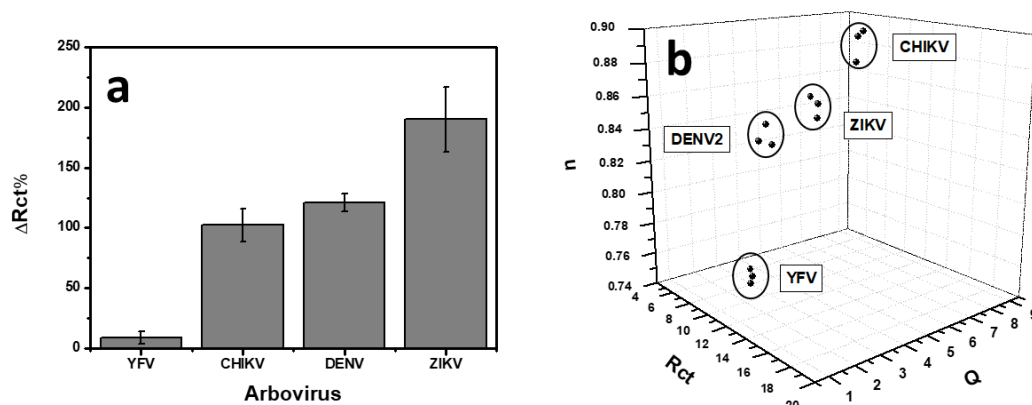


Fig. 6. $\Delta R_{ct}\%$ of the biosensor exposed to samples from arboviruses-infected patients (a) and three-dimensional plot (b) for values of R_{ct} , Q , and n given in Table 1.

An evaluation of the n , R_{ct} , and Q circuit elements revealed distinct viral profile to lectin recognition as observed in the 3D plot (Fig. 6b). Of note, YFV data are in the region of lower n , R_{ct} and Q values. Thus, YFV response is involved in a smaller blocking effect associated with smaller capacitive dispersion. CHIKV data are associated with intermediate R_{ct} values, indicating intermediate dispersion and blocking of the biosensor surface. Furthermore, DENV2 and ZIKV presented higher R_{ct} values. This behavior is associated with a larger blocking effect and smaller capacitive dispersion as a result of the lectin affinity. Therefore, the biosensor was able to differentiate arboviruses (according to saccharide structure of the viral glycoproteins) in serum from arbovirus-infected patients.

The proposed biosensor was able to identify and distinguish between arboviruses. Of note, the arboviruses produce similar proteins and therefore can generate false-positive and false-negative results. On the other hand, the developed biosensor allows a rapid diagnosis to properly treat symptoms and identify infectious outbreaks to prevent arbovirus spreading. Our results demonstrate that ConA lectin is an effective biomolecule for differentiation and

identification of arboviruses due to a good electrochemical response for different viral glycoproteins.

4. Conclusion

In this work, a simple and sensitive electrochemical biosensor for detection and discrimination of arboviruses have been developed employing *Concanavalin A* lectin (as molecular recognition element). We demonstrated the feasibility and sensitivity of the proposed platform by using ovalbumin and fetuin as model analytes. The biosensor showed excellent analytical performance for tested arboviruses with sensitivity and wide linear range. The ConA identification of arboviruses was through interactions between carbohydrates side chains present in viral glycoproteins. The biosensor was responsive to detect arboviruses in serological samples from infected patients, even in the presence of interfering molecules. The developed biosensor was effective for differential diagnosis of arboviruses.

Acknowledgments

E.P. Simão would like to thank Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for a Ph.D. scholarship. L.H.V. Gil would like to thank FACEPE (grant APQ-0739-2.12/17). M.D.L. Oliveira and C.A.S. Andrade would like to thank CNPq (grant 314894/2018-7 and 314756/2018-3).

REFERENCES

AKAHATA, W.; NABEL, G. J. A Specific Domain of the Chikungunya Virus E2 Protein

Regulates Particle Formation in Human Cells: Implications for Alphavirus Vaccine Design.

Journal of Virology, v. 86, n. 16, p. 8879–8883, 2012.

ANDRADE, C. A. S. et al. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic – inorganic nanocomposite and Bauhinia monandra lectin. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 362, n. 2, p. 517–523, 2011.

ANDRÉ, S. et al. Lectins: Getting familiar with translators of the sugar code. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1788–1823, 2015.

ATAR, N.; MEHMET, L. Core-Shell Nanoparticles / Two-Dimensional (2D) Hexagonal Boron Nitride Nanosheets with Molecularly Imprinted Polymer for Electrochemical Sensing of Cypermethrin. v. 165, n. 5, p. 255–262, 2018.

BARLETT, P. N.; COOPER, J. M. A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 362, n. 1–2, p. 1–12, 1993.

BARONDES, S. D. F. A. S. H. A method for purification of proteins using specific polymer-ligands in aqueous polymer two-phase systems. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 2, p. 309–321, 2012.

BARTON, C. et al. Activity of and effect of subcutaneous treatment with the broad- Spectrum antiviral lectin griffithsin in two laboratory rodent models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 120–127, 2014.

BASARAB, M. et al. Vírus da Zika. **The BMJ**, v. 352, p. 1–6, 2016.

BELICKY, TEFAN; KATRLIK, J.; TKA, J. Glycan and lectin biosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 37–47, 2016.

BENCHIMOL, J. Febre amarela: a doença ea vacina, uma história inacabada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275–293, 2001.

BOUCKAERT, J. et al. Sequential Structural Changes upon Zinc and Calcium Binding to Metal-free Concanavalin A Protein Chemistry and Structure : Sequential Structural Changes upon Zinc and Calcium Binding to Metal-free Concanavalin A Julie Bouckaert , Freddy Poortmans , Lode F. n. August, 1996.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro , Brazil : Clinical Characterization , Epidemiological and Virological Aspects. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, p. 1–13, 2016.

CABRAL-MIRANDA, G. et al. Biosensor-based selective detection of Zika virus specific antibodies in infected individuals. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 113, p. 101–107, 2018.

CANBAZ, M. Ç.; SEZGINTÜRK, M. K. Fabrication of a highly sensitive disposable immunosensor based on indium tin oxide substrates for cancer biomarker detection. **Analytical Biochemistry**, v. 446, n. 1, p. 9–18, 2014.

CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

CAVADA, B. S. et al. ConA-like lectins: High similarity proteins as models to study structure/biological activities relationships. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, 2019.

CDC (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). **Types of Zika Virus Tests**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/zika/laboratories/types-of-tests.%0Ahtml%0A>>. Acesso em: 4 maio. 2018a.

CDC (U.S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). **Trioplex Real-time RT-PCR Assay**.

CHAUDHARY, P. M. et al. Targeting label free carbohydrate-protein interactions for biosensor design. **Analytical Methods**, v. 8, n. 17, p. 3410–3418, 2016.

CHEN, C. et al. A carbohydrate-binding affinity ligand for the specific enrichment of glycoproteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1444, p. 8–20, 2016.

COE, D. F. et al. Mapping Putative B - Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. 2017.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins as antimicrobial agents. **J Appl Microbiol.**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, 2018.

CORDEIRO, M. T. et al. Results of a zika virus (ZIKV) immunoglobulin m-specific diagnostic assay are highly correlated with detection of neutralizing anti-ZIKV antibodies in neonates with congenital disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 12, p. 1897–1904, 2016.

DAM, T. K. et al. Binding of Multivalent Carbohydrates to Concanavalin A and Dioclea grandiflora Lectin . **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14223–14230, 2002.

DANIEL LUCEY, MD, MPH; LAWRENCE O. GOSTIN, J. A Yellow Fever Epidemic A New Global Health Emergency ?. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 24, p. 2661–2662, 2016.

DEDA, D. K. et al. The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 683–687, 2013.

DEEBA, F. et al. Chikungunya virus : recent advances in epidemiology , host pathogen interaction and vaccine strategies. v. 74, p. 1–10, 2016.

DIAS, L.; ALMEIDA, S.; HAES, T.; MOTA, L.; RORIZ-FILHO, J. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 143–152, 2010.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, p. 10–15, 2017.

DORDICK, J. S.; LINHARDT, R. J. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. v. 56, p. 1151–1162, 2017.

DURCE, M.; GOMES, C. Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cad. Saúde Pública**, v. 32, n. 7, p. 1–3, 2016.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, 2016.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381–389, 2003.

GABIUS, H. J. et al. From lectin structure to functional glycomics: Principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 298–313, 2011.

GALAL, A.; ATTA, N. F.; EL-ADS, E. H. Probing cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles--towards selective electrochemical sensors. **Talanta**, v. 93, p. 264–73, 2012.

GALÁN-HUERTA, K. A. et al. Chikungunya virus: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.

GHOSH, K. et al. Biological : Full-length Imaging the interaction between dengue 2 virus and human blood platelets using atomic force and electron microscopy. **J Electron Microscosc**, v. 57, n. 3, p. 113–118, 2008.

GOLDANI, L. Z. Yellow fever outbreak in Brazil , 2017. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 123–124, 2017.

GOLDSTEIN, I. J. Lectin structure-activity: The story is never over. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6583–6585, 2002.

GRASSET, F. Surface modification of zinc oxide nanoparticles by aminopropyltriethoxysilane. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 360, n. 1–2, p. 298–311, 2003.

GRUBHOFFER, L.; CENTRE, B.; BUDEJOVICE, C. **Interaction of tick-borne encephalitis**

virus protein E with labelled lectins. St. Louis, MO: Sigma Chemical Co., 1989.

GU, B. X. et al. Layer by layer immobilized horseradish peroxidase on zinc oxide nanorods for biosensing. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 18, p. 6553–6557, 2009.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerg Microbes Infect.**, v. 6, p. e69, 2016.

GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue Epidemiology and Preventive Measures of Dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5–33, 1999.

HAHM, J. Fundamental Properties of One-Dimensional Zinc Oxide Nanomaterials and Implementations in Various Detection Modes of Enhanced Biosensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 691–717, 2016.

HARATA, K.; NAGAHORA, H.; JIGAMI, Y. X-ray structure of wheat germ agglutinin isolectin 3. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 51, n. 6, p. 1013–1019, 1995.

HAROLD, R.; HAROLD RUDIGER AND HANS-J. GABIUS. Plant lectins : Occurrence , biochemistry , functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, p. 589–613, 2002.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya : uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906–908, 2015.

HV, R. Screening of Lectins for Specific Detection of *Listeria Monocytogenes*. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 5, n. 3, 2017.

I, M. R. D. et al. Arboviroses emergentes no Brasil : desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. p. 10–15, 2017.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

J. D. ORAM, D. C. ELLWOOD, G. A. & J. L. S. Agglutination of an Arbovirus by

Concanavalin A. **Nature New Biology**, v. 233, p. 50–51, 1971.

JELINEK, R.; KOLUSHEVA, S. Carbohydrate biosensors. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 5987–6015, 2004.

JORDANA, S. L. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Impedimetric sensor of bacterial toxins based on mixed (Concanavalin A)/ polyaniline films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 549–554, 2014.

KHAN, R. et al. Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p. 207–213, 2008.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 2833–2881, 9 abr. 2014.

KUMAR, S. et al. Graphene, Carbon Nanotubes, Zinc oxide and Gold as Elite Nanomaterials for Fabrication of Biosensors for Healthcare. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 70, p. 498–503, 2015a.

KUMAR, S. et al. Graphene , carbon nanotubes , zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 70, p. 498–503, 2015b.

KUMAR, S. A.; CHEN, S. Nanostructured Zinc Oxide Particles in Chemically Modified Electrodes for Biosensor Applications. **Analytical Letters**, v. 41, n. 2, p. 141–158, fev. 2008.

KUMAR, V. et al. Sensors and Actuators B : Chemical A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide / gold nanoplatfrom for detection of DNA arrays. v. 188, p. 1201–1211, 2013.

KURSTACK, E. K. C. **Comparative Diagnosis of Viral Diseases: Vertebrate Animal and Related Viruses**. 1st. ed. New York: Academic Press, 1981.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume

lectins: Proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1–18, 2017.

LAHORGUE, M. et al. Microcephaly and Zika virus : a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 3, p. 230–240, 2016.

LEAKE, C. Arbovirus-Mosquito Interactions and Vector Specificity. **Parasitol Today**, v. 8, n. 4, p. 123–128, 1992.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **J Virol.**, v. 73, n. 6, p. 4738–4747, 1999.

LEONE, S.; AFRICA, W. Zika Virus as an Emerging Global Pathogen Neurological Complications of Zika Virus. **JAMA Neurol.**, v. 73, n. 7, p. 875–879, 2016.

LI, P.; ZHANG, Q.; ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxins. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115–1126, 2009.

LI, Z. et al. Electrochemical Impedance Immunosensor Based on Self-Assembled Monolayers for Rapid Detection of Escherichia coli O157:H7 with Signal Amplification Using Lectin. **Sensors**, v. 15, n. 8, p. 19212–19224, 2015.

LIENEMANN, M. et al. Characterization of the wheat germ agglutinin binding to self-assembled monolayers of neoglycoconjugates by AFM and SPR. **Glycobiology**, v. 19, n. 6, p. 633–643, 2009.

LUNA, D. M. N. et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 565–572, 2015.

LÜTFI, M.; EREN, T.; ATAR, N. Electrochimica Acta A novel and sensitive electrochemical DNA biosensor based on Fe @ Au nanoparticles decorated graphene oxide. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 38–47, 2014.

LÜTFİ, M.; EREN, T.; ATAR, N. Sensors and Actuators B : Chemical A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide : Application to selective determination of tyrosine in milk. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 210, p. 149–157, 2015.

MA, X. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Construction of a Concanavalin A electrochemical sensor base on a novel sandwich capture mode. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 248, p. 201–206, 2017.

MAGNELLI, P.; BIELIK, A.; GUTHRIE, E. Identification and characterization of protein glycosylation using specific endo-and exoglycosidases. **Methods in Molecular Biology**, v. 801, p. 189–211, 2012.

MANDAL, D. K.; BREWER, C. F. Differences in the Binding Affinities of Dimeric Concanavalin A (Including Acetyl and Succinyl Derivatives) and Tetrameric Concanavalin A with Large Oligomannose-Type Glycopeptides. **Biochemistry**, v. 32, n. 19, p. 5116–5120, 1993.

MANDELL, R. B.; FLICK, R. Rift Valley Fever Virus: A Real Bioterror Threat. **Journal of Bioterrorism & Biodefense**, v. 02, n. 02, 2011.

MARCELINO, P.; CASSANDRA, L.; BARROSO, B. Electrochemical Biosensing Strategies to Detect Serum Glycobiomarkers. v. 6, n. 6, p. 1–17, 2016.

MARTÍNEZ-BARRAGÁN, J. DE J.; DEL ANGEL, R. M. Identification of a Putative Coreceptor on Vero Cells That Participates in Dengue 4 Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 75, n. 17, p. 7818–7827, 2001.

MCCLAIN., A. L. S. AND D. **Medical Microbiology**. 4th. ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston: [s.n.].

MODY, R. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. **J Pharmacol**

Toxicol Methods, v. 8719, n. 94, 1993.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 2015.

MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012.

MOREIRA, R. A. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Lectins and / or xyloglucans / alginate layers as supports for immobilization of dengue virus particles. v. 66, p. 45–52, 2008.

MOULIN, E. et al. Simultaneous outbreaks of dengue , chikungunya and Zika virus infections : diagnosis challenge in a returning traveller with nonspecific febrile illness. **New Microbes and New Infections**, v. 11, p. 6–7, 2016.

MUNDEV, D.; TURYAN, I. Applications of Self-Assembled Monolayers in Electroanalytical Chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, p. 207–213, 1995.

NASCIMENTO, H. P. O. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces An impedimetric biosensor for detection of dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 414–419, 2011.

NEČAS D, K. P. **Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis** Open Physics, , 2012.

NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 7, p. 1–9, 2017.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report , French Polynesia , December 2013. **Euro Surveill.**, v. 19, p. 7–9, 2014.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition. **Journal**

of **Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 1, p. 194–201, 2011a.

OLIVEIRA, M. D. L. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on Cratylia mollis lectin affinity. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 155, n. 2, p. 789–795, 2011b.

OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. A novel approach to classify serum glycoproteins from patients infected by dengue using electrochemical impedance spectroscopy analysis. **Synthetic Metals**, v. 159, p. 2162–2164, 2009a.

OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. Biosensors and Bioelectronics Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, p. 728–732, 2009b.

OLIVEIRA, N. et al. Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus. n. March, p. 15562–15577, 2015.

OSTERNE, V. J. S. et al. Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from Canavalia virosa seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342–3353, 2014.

OZDEN, S. et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. 527, 2007.

PATEL, P. D. The applications of lectins in food analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, n. C, p. 35–39, 1992.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests : dengue. **Nature Publishing Group**, n. 12, p. S30–S37, 2010.

PIERSON, T. C.; GRAHAM, B. S. Review Zika Virus : Immunity and Vaccine Development. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 625–631, 2016.

PINTO-JUNIOR, V. L. Vírus Zika : Revisão para Clínicos Zika. **Revista Científica da Ordem**

dos Médicos, v. 28, n. 6, p. 760–765, 2015.

POVINELI, K. L.; FINARDI FILHO, F. As múltiplas funções das lectinas vegetais. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 24, p. 135–156, 2002.

POWERS, A. M. How Chikungunya Virus Virology Affects Its Epidemiology and Transmission: Implications for Influencing Public Health. **J Infect Dis.**, v. 214, p. 5–8, 2016.

POWERS, A. M. et al. Zika Virus. **N Engl J Med**, v. 374, p. 1552–1563, 2016.

PRESTI, A. LO et al. Chikungunya virus , epidemiology , clinics and phylogenesis : A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925–932, 2014.

RAFIQUE, I. Diagnosis of Dengue Infection. v. 52, n. 3, p. 58–59, 2013.

RANDVIIR, E. P. et al. Electrochemical impedance spectroscopy versus cyclic voltammetry for the electroanalytical sensing of capsaicin utilising screen printed carbon nanotube electrodes. **The Analyst**, v. 138, n. 10, p. 2970–81, 2013.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 2013.

REEKE, G. N. et al. **Structure and Function of Concanavalin A**. Plenum Pre ed. New York: [s.n.].

REN, X. et al. Zinc oxide nanoparticles/glucose oxidase photoelectrochemical system for the fabrication of biosensor. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, n. 2, p. 183–187, 2009.

REY, A. Dengue virus envelope glycoprotein structure : v. 100, n. 12, p. 6899–6901, 2003a.

REY, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: New insight into its interactions during viral entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 6899–6901, 10 jun. 2003b.

RIBEIRO, A. C.; FERREIRA, R.; FREITAS, R. **Plant Lectins : Bioactivities and**

Bioapplications. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 58

RIBEIRO, D. V. Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **RIEM - IBRACON Structures and Materials Journal**, v. 8, n. 4, 2015.

RINI, J. M. Lectin Structure. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, n. 1, p. 551–577, 1995.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2010.

ROUSHANI, M.; SHAHDOST-FARD, F. Fabrication of an electrochemical nanoaptasensor based on AuNPs for ultrasensitive determination of cocaine in serum sample. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 599–607, 2016.

ROUTHU, N. K. et al. Glycosylation of zika virus is important in host–virus interaction and pathogenic potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, 2019.

ROUVINSKI, A. et al. Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop epitope. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–12, 2017.

SANYAOLU, A. et al. Chikungunya Epidemiology : A Global SM Journal of Public Health and Perspective Epidemiology. **SM Journal of Public Health and Epidemiology**, v. 2, n. 2, p. 1–7, 2016.

SCHWARTZ, R. M.; RUSTANDI, R.; HA, S. Characterization of N-glycosylation profiles from mammalian and insect cell derived chikungunya VLP. **Journal of Chromatography B**, v. 1032, p. 2–7, 2016.

SCHWEFEL, D. et al. Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 25, p. 8704–8719, 2010.

SHARMA, A. et al. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1213–1218, 2010.

SHI, X. et al. Enzymatic biosensors based on the use of metal oxide nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 181, n. 1–2, p. 1–22, 2014.

SILVA, P. M. S. et al. Cratylia mollis lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 85, p. 171–177, 2016.

SIMÃO, E. P. et al. Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin b1 in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1040–1047, 2016.

SIMÃO, E. P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, n. June 2019, p. 120338, 2020.

SINGH, R.; SHARMA, A.; JANG, J. Electrical immunosensor based on dielectrophoretically-deposited carbon nanotubes for detection of influenza virus H1N1. **The Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5415–21, 2014.

SIRELKHATIM, A. et al. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219–242, 2015.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–70, 2016.

SLIFKINL, M.; DOYLE, R. J. Lectins and Their Application to Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 197–218, 1990.

SONG, H. et al. BRIE F COMMUNICATIONS Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. v. 23, n. 5, p. 3–6, 2016.

SUBRAMANIAN, A.; IRUDAYARAJ, J.; RYAN, T. A mixed self-assembled monolayer-

based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157:H7. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 998–1006, 2006.

TABASUM, S. et al. Glycoproteins functionalized natural and synthetic polymers for prospective biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 748–776, 2017.

TANIMOTO DE ALBUQUERQUE, Y. D.; FERREIRA, L. F. Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, n. 2, p. 210–221, 2007.

TAUIL, P. L.; MEDICINA, F. DE. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 23, n. 4, p. 773–774, 2014.

THEVENOT, D. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 121–131, 2014.

THIBERVILLE, S. et al. Chikungunya fever : Epidemiology , clinical syndrome , pathogenesis and therapy. **ANTIVIRAL RESEARCH**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013.

VODUŠEK, V. F. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, v. 374, p. 951–958, 2016.

VOLK, D. E. et al. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. **Virology**, v. 394, n. 1, p. 12–18, 2010.

WANG, Y. et al. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2043–2081, 2008.

WASSERMAN, S.; ANANTHARAJAH, P.; LIAN, P. International Journal of Infectious Diseases Yellow fever cases in Asia : primed for an epidemic. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 98–103, 2016.

WILDER-SMITH, A.; MURRAY; QUAM, M. Epidemiology of dengue : past , present and

future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299–309, 2013a.

WILDER-SMITH, A.; MURRAY; QUAM, M. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299, ago. 2013b.

WILDER-SMITH, A.; OOI, E. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. **Curr Infect Dis Rep.**, v. 12, p. 157–164, 2010.

XIAO-FENG LI, TAO JIANG, YONG-QIANG DENG, HUI ZHAO, XUE-DONG YU, QING YE, HONG-JIANG WANG, SHUN-YA ZHU, FU-CHUN ZHANG, E-DE QIN, AND C.-F. Q. Complete Genome Sequence of a Chikungunya Virus Isolated in Guangdong, China. **J Virol.**, v. 86, n. 16, p. 8904–8905, 2012.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **J Infect Dis**, v. 214, p. 441–445, 2016.

YANG, H. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 229, p. 297–304, 2016.

YAP, S. S. L. et al. Dengue virus glycosylation: What do we know? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–16, 2017.

YOLA, M. L.; ATAR, N. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application to the simultaneous determination of quercetin and rutin. **Electrochimica Acta**, v. 119, p. 24–31, 2014.

YOLA, M. L.; ATAR, N. A Novel Detection Approach for Serotonin by Graphene Quantum Dots/Two-Dimensional (2D) Hexagonal Boron Nitride Nanosheets with Molecularly Imprinted Polymer. **Applied Surface Science**, 2018a.

YOLA, M. L.; ATAR, N. Development of cardiac troponin-I biosensor based on boron nitride

- quantum dots including molecularly imprinted polymer. **Biosensors and Bioelectronic**, 2018b.
- YUMAK, T. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Preparation and characterization of zinc oxide nanoparticles and their sensor applications for electrochemical monitoring of nucleic acid hybridization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 397–403, 2011.
- ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy : Clinical , immunological and virological findings , and public health implications. **J Clin Virol.**, v. 63, p. 32–35, 2015.
- ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569–572, 2015.
- ZANLUCA, C. et al. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, v. 387, p. 2016, 2016.
- ZENG, X. et al. Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3161–3176, 2012.
- ZHANG, B. et al. Diagnosing dengue virus infection : rapid tests and the role of micro / nanotechnologies. **Nanomedicine**, v. 11, n. 7, p. 1745–1761, 2015.
- ZHANG, Y. et al. Biomedical applications of zinc oxide nanoparticles. **Current Molecular Medicine**, v. 13, p. 1633–1645, 2018.
- ZHAO, L. et al. Electrochemical lectin-based biosensor array for detection and discrimination of carcinoembryonic antigen using dual amplification of gold nanoparticles and horseradish peroxidase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 235, p. 575–582, nov. 2016.

Supplementary Material

to

DIAGNOSIS OF ARBOVIRUSES USING NANOSTRUCTURED IMPEDIMETRIC LECTIN-BASED BIOSENSOR

Estefani P. Simão¹, Dammyres B. S. Silva², Marli T. Cordeiro³,

Laura H.V. Gil³, Cesar A.S. Andrade ², Maria D.L. Oliveira^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco,
50670-901 Recife, PE, Brazil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

³ Departamento de Virologia-Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, 50670-420 Recife, PE, Brazil.

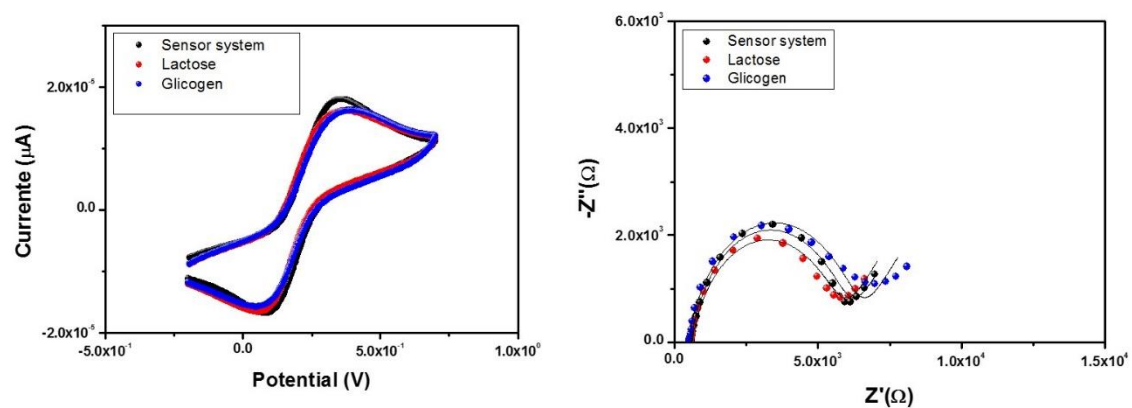


Figure S1. CV (a) and EIS (b) measured at 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ and 5.0×10^{-3} M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, in PBS (pH 7.4).

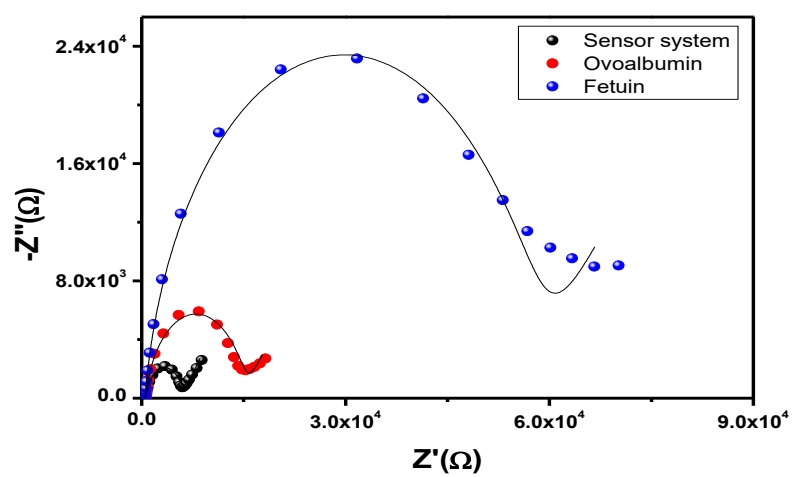


Figure S2. Nyquist diagrams of the biosensor and ConA interaction with ovalbumin and fetuin.

APÊNDICE B**PATENTE DEPOSITADA**

O presente capítulo apresenta a patente titulada “NANODISPOSITIVO IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS REACIONAIS PARA O VÍRUS ZIKA” depositada dia 30/11/2020 sob o número de processo BR 10 2020 024522 8.



30/11/2020 870200151107
20:38



29409161918340837

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 024522 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 -Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 30/11/2020 às 20:38, Petição 870200151107