



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO REDE NORDESTE EM
BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE Biotecnologia

PRISCILA DIAS MENDONÇA

**NANOBIOSSENSOR BASEADO EM PLATAFORMA POLI-
ETILENODIAMINA/NANOTUBO DE CARBONO PARA DETECÇÃO DA
PROTEÍNA NS1 DOS VÍRUS DENGUE E ZIKA**

Recife
2021

PRISCILA DIAS MENDONÇA

**NANOBIOSSENSOR BASEADO EM PLATAFORMA POLI-
ETILENODIAMINA/NANOTUBO DE CARBONO PARA DETECÇÃO DA
PROTEÍNA NS1 DOS VÍRUS DENGUE E ZIKA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde da Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Saúde

Orientadora: Professora Dr.^a Rosa Fireman Dutra

Recife
2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Mendonça, Priscila Dias

Nanobiossensor baseado em plataforma poli-etilenodiamina/nanotubo de carbono para detecção da proteína NS1 dos vírus dengue e zika / Priscila Dias Mendonça. – 2021.

104 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Fireman Dutra.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde da Rede Nordeste de Biotecnologia, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Arboviroses. 2. Dengue. 3. Vírus da Zika. I. Dutra, Rosa Fireman (orientadora). II. Título.

616.9185

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-200

Priscila Dias Mendonça

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção da Defesa
como parte para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e
aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela
Banca Examinadora.

Orientadora: _____

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

Banca Examinadora:

Dr. Marcos Vinicius Foguel, PPGEB - UFPE
Doutor pela Universidade de Araraquara– São Paulo, Brasil

Dra. Marli Tenório Cordeiro – FIOCRUZ- PE
Doutora pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Pernambuco – Recife, Brasil

Dra. Jaciana dos Santos Aguiar – RENORBIO-UFPE
Doutora pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil

Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura
Doutora pela Universidade Federal de Pernambuco

27 de outubro de 2021

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos colegas e amigos de Laboratório de Engenharia Biomédica (LEB) pelo auxílio e suporte amigo quando necessário, em especial à Lorena, Liandra, Paula, Gilvanete, Erika Trindade, Cybelli e à Blanca.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Instituto Federal de Alagoas e ao Departamento de Física pela realização das micrografias.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Já parou para pensar em qual rumo sua vida está indo? Se você escolheu o caminho certo? Ter coragem e garra para começar do zero? Acredito que todos responderiam SIM. Então, busque e faça o que lhe dá prazer, o que te deixa feliz, o que lhe é apaixonante, mesmo que seja pequeno aos outros, mas para você será magnífico. Não tenha medo de errar e sim, tenha medo de continuar errando. Viva a sua paixão intensamente, se liberte, se cure, se ame e encontre a paz interior que nos fortalece. Ame sua vida, sua família e amigos, os animais e seu trabalho, ame os loucos e desconhecidos, mas acima de tudo, ame você e viva para você.

Priscila Dias Mendonça, outubro de 2021

RESUMO

As arboviroses são reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde como um problema global de saúde, gerando impactos sociais e econômicos relevantes. Nas zonas tropicais e intertropicais do globo terrestre, a infecção por dengue tem sido a mais endemicamente prevalente, embora outras infecções, como a Zika, tenham causado efeitos devastadores, como a Síndrome da Zika Congênita. Considerando-se que o diagnóstico clínico diferencial é uma tarefa difícil, a busca por novos biomarcadores que identifiquem as arboviroses laboratorialmente é desejável. A proteína não estrutural 1 (NS1) tem sido observada nas infecções pelos vírus dengue (DENV) e Zika (ZIKV), circulando na corrente sanguínea do indivíduo infectado durante toda a viremia, com níveis mais elevados na fase inicial da doença, tendo sido detectada no soro e na urina. A proteína NS1, por ser sensível e mais específica para o diagnóstico na fase inicial dessas infecções, tem sido utilizada em muitas pesquisas visando o desenvolvimento de imunossensores, usando diferentes tipos de transdução, tais como: fluorescência, impedância, ressonância plasmônica de superfície, amperometria. Entretanto, a transdução amperométrica, por ser de fácil portabilidade e poder ser usada em pronto-atendimento, tem se mostrado a mais atrativa. Nesta tese foi desenvolvida uma plataforma imunossensora constituída pela eletrossíntese do polietilenodiamina (poli-EDA), a partir da oxidação da etilenodiamina, proporcionando uma espessura controlada e boas propriedades eletroquímicas. O filme de poli-EDA rico em grupos amino-reativos foi utilizado para estrategicamente ancorar nanotubos de carbono (NTC) que aumentam a transferência de elétrons, bem como a área eletroativa da superfície sensora. A incorporação de NTC carboxilados proporcionaram a imobilização, de modo orientado, dos anticorpos monoclonais anti-NS1 por meio de ligações covalentes, permitindo uma alta estabilidade durante as medidas. Todas as etapas de modificações da superfície eletródica foram caracterizadas eletroquímica, estrutural e morfolologicamente pelas técnicas de voltametria cíclica, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FT-IR ATR) e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Um sistema de microbalança de cristal de quartzo foi usado para controlar a espessura do poli-EDA eletrossintetizado em ordem de nanoescala (~ 100nm). As respostas analíticas do imunossensor à proteína NS1 foram obtidas por técnica de voltametria de pulso diferencial exibindo uma faixa linear entre 20 e 800 ng/mL; com limite de detecção de 6,8 ng/mL e reprodutibilidade de 97,0%. Este imunossensor foi capaz de detectar a proteína NS1 em indivíduos com dengue e com Zika em amostras de soro e urina enriquecida. A sinergia do poli-EDA e NTC resultou em um filme com grande estabilidade e potencial para imobilização estável de biomoléculas, permitindo a detecção da NS1 em níveis clínicos. O imunossensor desenvolvido mostrou-se com potencial para aplicação no diagnóstico do DENV e ZIKV, podendo ser utilizado em pronto atendimento, viabilizando a coleta de dados clínicos de indivíduos infectados, bem como ser aplicado em estudos epidemiológicos auxiliando no controle e vigilância sanitária de regiões endêmicas.

Palavras-chaves: Dengue; Zika; Nanotubos de carbono; Polietilenodiamina

2021

ABSTRACT

Arboviruses diseases are recognized by the World Health Organization as a global health problem, generating relevant social and economic impacts. In the tropics and intertropical zones of the terrestrial globe, dengue infection has been the most endemically prevalent, although other infections, such as Zika, have had devastating effects, such as congenital fetal syndrome. Considering that the clinical differential diagnosis is a difficult task, the search for new biomarkers that identify arboviruses in a laboratory manner and in large scale is desirable. Non-structural protein 1 (NS1) has been observed in infections by dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses, circulating in the bloodstream of the infected individual during the entire viremia, with higher levels in the initial phase of the disease, having been detected in serum and urine samples. Because the NS1 protein is considered sensitive among non-structural proteins and more specific for diagnosis, it is important in the clinical phase of these infections, several studies for the development of immunosensors were carried out, using different types of transduction, such as: fluorescence, impedance, surface plasmon resonance, amperometry. However, the amperometric transduction, as it is easy to be portable and can be used in emergency care, has proven to be the most attractive. In this thesis, an immunosensor platform was developed, constituted by the electrosynthesis of polyethylenediamine (poly-EDA), from the oxidation of ethylenediamine, providing a controlled thickness and good electrochemical properties. The poly-EDA film rich in amino-reactive groups was used to strategically anchor carbon nanotubes (NTC) that increase the electron transfer as well as the electroactive area of the sensor surface. The incorporation of NTC carboxylated provided an oriented immobilization of the anti-NS1 monoclonal antibodies by covalent bonds, allowing high stability during the measurements. All steps of electrode surface modifications were characterized by electrochemical, structural and morphological techniques using cyclic voltammetry, Fourier Transform Infrared with Attenuated Total Reflectance (ATR FTIR) and scanning electron microscopy, respectively. A quartz crystal microbalance system was used to control the thickness of the electrosynthesized poly-EDA in nanoscale order (~100nm). The analytical responses of immunosensor to the NS1 protein were obtained by differential pulse voltammetry technique, exhibiting a linear range between 20 and 800 ng/mL; with a limit of detection 6.8 ng/mL and reproducibility of 97.0%. This immunosensor was able to detect the NS1 protein in individuals with Dengue and Zika, in samples of serum and spiked urine samples. The synergy of the poly-EDA and NTC resulted in a film with high stability and potential for a stable immobilization of biomolecules, allowing detection of the NS1 with sensitivity at clinical levels. The developed immunosensor showed as one potential for DENV and ZIKV diagnostic, and can be used as point-of-care, enabling the clinical collect data from infected individuals, as well as being applied in epidemiological studies to assist in the control and sanitary surveillance of endemic regions.

Keywords: Dengue; Zika; NS1; Immunosensor; carbon nanotubes

LISTA DE FIGURAS - TESE

Figura 1 -	Regiões geográficas da atividade viral histórica da epidemia do DENV.....	21
Figura 2-	Linha do tempo do surgimento e disseminação do DENV.....	23
Figura 3 -	Classificação da infecção por dengue conforme a OMS, 2009.....	27
Figura 4 -	Evolução clínica e laboratorial da dengue.....	29
Figura 5 -	Linha do tempo do surgimento e disseminação da infecção pelo ZIKV. A figura mostra os principais acontecimentos sobre sua epidemiologia, desde seu primeiro relato em 1947 até 2017.....	31
Figura 6 -	(A) Genoma dos <i>Flavivirus</i> . B) Poliproteína flaviviral: topologia e domínios transmembranares.....	33
Figura 7 -	Representação esquemática do princípio básico de um biossensor.....	40
Figura 8 -	Representação esquemática de uma célula trieletródica.....	44
Figura 9 -	Voltamograma cíclico demonstrando as correntes catódica e anódica.....	46
Figura 10 -	Representação esquemática da técnica de pulso diferencial com aplicação em potencial em função do tempo. A corrente é amostrada em S1 e S2 e a diferença entre elas é que é registrada.....	47
Figura 11 -	Representação esquemática da estrutura dos NTC e imagem de microscopia eletrônica de transmissão, em: (a) NTC de parede simples, (b) NTC de paredes múltiplas.....	49
Figura 12-	Imagem ilustrativa das interações do NTC por meio de funcionalização não covalente (dispersante).....	51
Figura 13 -	Esquema da reação do EDC e EDC/NHS pela funcionalização covalente no nanotubo de carbono.....	52
Figura 14-	Estrutura química da etilenodiamina.....	54

LISTA DE FIGURAS - ARTIGO

- Figura 1 - Typical cyclic voltammogram of the electrosynthesis of the poly- EDA by 25 cycles. Polymerization was carried out at a scan rate of 50 mV s⁻¹ in a potential window between -1.8 and 1.9 V with a step potential of 10 mV.....67
- Figura 2 - (a) Cyclic voltammograms of poly-EDA film under different scanning rates of 10 → 150 mV s⁻¹ (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 and 150 mV s⁻¹) in 5 mmol L⁻¹ of the K₄ [Fe(CN)₆]₄⁻/ K₃[Fe(CN)₆]₃⁻ in 0.1 M KCl. (b) Effect of the square root of the scan rate on the anodic and cathodic peaks. (c) Curves of the logarithm of the anodic and cathodic current peaks (I_{pa}, I_{pc}) versus the logarithm of the square root of scan rates.....68
- Figura 3 - FTIR-ATR spectra in each step of the poly-EDA nanostructured film preparation: (I) bare EAU, (II) poly-EDA/EAU, (III) CNT-COOH/poly EDA/EAU.....69
- Figura 4 - Scanning electron micrographs of the (a) poly-EDA and (b1 and b2) CNT-COOH/poly-EDA in different magnitudes.....70
- Figura 5 - Stepwise modifications in the immunosensor: (1) bare Eau, (2) poly-EDA/EAU, (3) CNT-COOH/poly-EDA/EAU, (4) anti-NS1/CNTCOOH/ poly-EDA/EAU, (5) glycine/anti-NS1/CNT-COOH/poly-EDA/ Eau and (6) NS1/anti-NS1/CNT-COOH/poly-EDA/EAU. In (a): cyclic voltammograms obtained in the presence of 5 mmol L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]₄⁻/ K₃[Fe(CN)₆]₃⁻ in 0.1MKCl; and (b) Barr plot of the frequency changes in the QCM system measured in PBS.....71
- Figura 6 - Immunosensor as response to the NS1 diluted in PBS. Electrochemical DPV measurements obtained in the presence of 5 mmol L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]₄⁻/ K₃[Fe(CN)₆]₃⁻ in 0.1 M KCl. *Inset*: analytical curve of the anodic peaks.....72
- Figura 7 - DPV responses to real serum samples of (a) ZIKV-infected individuals, (b) DENV-infected individuals and (c) healthy individuals. (d) Calibration curves of anodic peaks of the ZIKV-infected, DENV-infected and healthy individuals.....73
- Figura 8 - (a) DPV curves in response to the NS1-spiked urine in different PBS dilutions, and (b) calibration curves of anodic peaks of the NS1- spiked and non-spiked urine samples.....74

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTAR – ARTIGO

Figura Suplementar 1 -	(a) Effect of poly-EDA polymerization at different scan rates (10mV, 20mV, 30mV, 40mV and 50mV); CV in presence of 5 mmol L ⁻¹ K ₄ [Fe (CN) ₆] ⁴⁻ / K ₃ [Fe (CN) ₆] ³⁻ in KCl solution at 0.1mol L ⁻¹ (b) Redox peaks of CVs as function of the scan rate (Error bars represent the standard deviation of three replicate data).....	78
Figura Suplementar 2 -	(a) Cyclic voltammetry of the modified electrode with different concentrations of NTC-COOH. (b) Effect of the NTC-COOH concentrations on the anodic redox peaks of the CVs (Error bars represent the standard deviation of three replicate data).....	79
Figura Suplementar 3 -	(a) DPV analytical curve of immunosensor in response to different concentrations of the NS1 in PBS diluted. Inset: Linear fit of the current vs. NS1 concentrations. (b) DPV analytical curve of immunosensor in the spiked NS1 serum responses, and (c) Analytical curve of immunosensor in response to spiked and non-spiked NS1 serum. All the DPV measurements were obtained in 5mmolL ⁻¹ de K ₃ [Fe (CN) ₆] /K ₄ Fe(CN) ₆	80
Figura Suplementar 4 -	Repeatability and reproducibility study of the immunosensor in response to NS1 spiked serum. Coefficient of variation for Repeatability obtained from same electrode at 10 replicates (a); and Reproducibility from 8 different electrodes (B) in measurements of DPV, SWV, CV electrochemical techniques.....	83

LISTA DE QUADROS - TESE

Quadro 1 -	Informações básicas e relevantes sobre o ZIKV.....	32
Quadro 2 -	Resumo das funções atualmente das proteínas estruturais e não estruturais dos <i>flavivírus</i>	34

LISTA DE TABELAS - TESE

Tabela 1 -	Resumo das principais características do vírus da Dengue.....	24
Tabela 2 -	Biossensores aplicados para o diagnóstico da detecção da Proteína NS1.....	43
Tabela 3 -	Organização dos Resultados obtidos.....	56

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTAR - ARTIGO

Tabela 1 -	Comparison of immunosensor performance of NS1 detection with this immunosensor.....	81
Tabela 2 -	Recovery (%) obtained in interference contaminants with designed electrochemical immunosensor for NS1 in three replicate measurements.....	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivo específico.....	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1	ARBOVIROSES: DENGUE E ZIKA.....	19
3.2	DENGUE: EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS.....	20
3.3	ZIKA: EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS.....	30
3.4	BIOMARCADORES ALVOS.....	33
3.5	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA DENGUE E ZIKA.....	36
3.5.1	Isolamento viral e diagnóstico molecular.....	36
3.5.2	Diagnóstico sorológico.....	38
3.5.3	Diagnóstico por NS1.....	39
3.6	DIAGNÓSTICO POR BIOSENSORES.....	40
3.7	TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS DE CARACTERIZAÇÃO E RESPOSTA ANALÍTICA.....	43
3.7.1	Voltametria Cíclica.....	45
3.7.2	Voltametria de Pulso Diferencial.....	46
3.8	NANOTUBOS DE CARBONO.....	48
3.9	POLÍMEROS CONDUTORES.....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE A - NS1 glycoprotein detection in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for dengue and Zika virus.....	64
	ANEXO A - A Redox-Probe-Free Immunosensor Based on Electrocatalytic Prussian Blue Nanostructured Film One-Step-Prepared for Zika Virus Diagnosis.....	89

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as arboviroses afetam mais de 128 países e as interferências humanas são consideradas fatores importantes para o aumento da propagação e disseminação dos arbovírus envolvidos (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>). Nos últimos anos, a co-circulação dos arbovírus: dengue (DENV), Zika (ZIKV), febre amarela (YFV), chikungunya (CHIKV), mayaro (MAYV) e Oeste do Nilo (WNV), tem causado grande impacto na saúde pública mundial. Dentre os vírus mencionados, os que causam maior impacto para a saúde da população são os vírus dengue e Zika, principalmente nos países de clima tropical e sub-tropical (BARRETT, A. D.T.; WEAVER, 2012).

A dengue é atualmente a mais conhecida arbovirose e com maior número de infecções anual em todo o mundo. A dengue tem um amplo espectro clínico, incluindo desde as formas brandas até os quadros graves. Os sintomas são variados, compreendendo febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia, exantema, prurido, podendo ocorrer sangramento pelo nariz, boca e gengivas, o que pode levar ao choque hipovolêmico e morte. O diagnóstico clínico da infecção por DENV é passível de confundimento com outras arboviroses, principalmente com a infecção pelo ZIKV, quando em co-circulação (HARAPAN *et al.*, 2020).

Os principais sintomas da infecção pelo ZIKV são febre baixa, erupção cutânea, conjuntivite, dores musculares e articulares, mal-estar ou dor de cabeça, além da possibilidade de causar a síndrome da Zika congênita (SZC), em particular a microcefalia, em crianças cujas mães foram infectadas pelo ZIKV durante a gestação. Este último agravo, levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016, a declarar a infecção pelo ZIKV emergência internacional após um grande surto no Brasil, pois também existe a possibilidade da sua transmissão também ocorrer pela via sexual (BRITO, Carlos Alexandre Antunes DE; CORDEIRO, Marli Tenorio, 2016).

Atualmente, o teste considerado padrão ouro para a identificação da dengue e Zika é o teste molecular da reação em cadeia da polimerase, precedida da transcrição reversa (RT-PCR) por apresentar melhor sensibilidade e especificidade na detecção do RNA viral. Entretanto, essa metodologia não é prática para aplicação em larga escala em surtos epidêmicos, principalmente por requerer profissional especializado, equipamentos específicos, ser demorada e

possuir custos relativamente altos para países em desenvolvimento (CHONG *et al.*, 2019).

Testes sorológicos para a detecção das imunoglobulinas IgM e IgG são empregados no diagnóstico laboratorial. Entretanto, os testes comerciais disponíveis para detecção de anticorpos IgM e IgG para o DENV e o ZIKV comumente apresentam significativa taxa de reação cruzada, com resultados falso-positivos e falso-negativos, o que significa que a maioria dos resultados sorológicos são presuntivos, mas não confirmatório (CHONG *et al.*, 2019).

Alternativamente, a proteína não estrutural 1 (NS1) presente no genoma do DENV e do ZIKV tem sido utilizada como um biomarcador específico para o diagnóstico da infecção causada por esses vírus (MENDONÇA *et al.*, 2021a). Na fase aguda da doença, durante a replicação viral há um aumento significativo nas concentrações de NS1 na corrente sanguínea, o que pode auxiliar no diagnóstico laboratorial e, consequentemente, na conduta terapêutica nos casos de dengue grave (RASTOGI; SHARMA, N.; SINGH, 2016). Na infecção pelo ZIKV, a NS1 também tem sido observada na corrente sanguínea durante a fase aguda da doença e na urina por um período maior. Dessa forma, a detecção da proteína NS1 pode ser muito útil como marcador de diagnóstico dessas arboviroses, sobretudo quando há co-circulação dos vírus (CARPIO; BARRETT, Alan D.T., 2021; MENDONÇA *et al.*, 2021a).

Atualmente, os testes comerciais de detecção de NS1 baseados em ensaios imunoenzimáticos e quimioluminescência disponíveis, apesar de possuírem alta sensibilidade e especificidade, são em sua maioria onerosos, demandam equipamentos e treinamento específicos para sua execução, além de não fornecer um diagnóstico rápido como é desejável.

Levando em consideração que a detecção da proteína NS1 tem se mostrado eficiente no diagnóstico das arboviroses mencionadas, imunossensores têm sido desenvolvidos para NS1 usando diferentes tipos de transdução, tais como: fluorescência, impedância, ressonância plasmônica de superfície, amperometria (CECCHETTO *et al.*, 2017). Entretanto, a transdução amperométrica, por ser de fácil portabilidade e poder ser usada em pronto-atendimento, tem se mostrado a mais promissora. Na confecção de biossensores eletroquímicos, a associação de polímeros com nanomateriais tem se mostrado uma estratégia eficiente, sobretudo pela melhoria nas propriedades

de condução elétrica, estabilidade eletroquímica e aumento da área eletroativa superficial sensora (HARSHAVARDHAN *et al.*, 2019).

Neste trabalho, foi desenvolvida uma plataforma imunossensora formada pela eletrossíntese do polietilenodiamina (poli-EDA) a partir da oxidação da etilenodiamina, proporcionando uma espessura controlada e boas qualidades eletroquímicas. O filme do poli-EDA rico em grupos amino-reativos possibilitou a imobilização, de modo orientado, dos anticorpos monoclonais anti-NS1, bem como favoreceu uma ligação covalente amida entre NTC e anti-NS1, permitindo uma alta estabilidade durante as medidas. A interação entre as estruturas poli-EDA/NTC resultaram em uma maior transferência de elétrons e aumento de área eletroativa da superfície sensora, melhorando a sensibilidade diagnóstica para a detecção da proteína NS1.

O imunossensor desenvolvido apresentou excelente potencial para aplicação no diagnóstico das infecções pelo DENV e ZIKV, evidenciando uma larga faixa linear de detecção de NS1 (20 a 800 ng/mL) e alta reprodutibilidade das medidas (97,0%). Consequentemente, esta proposta poderá resultar em um impacto positivo no diagnóstico *point-of-care*, auxiliando no controle das arboviroses incluídas na vigilância epidemiológica e investigações sanitárias do sistema de saúde pública do país.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização e desenvolvimento de plataforma sensora eletroquímica baseada em nanocompósito de poli-EDA/NTC para aplicação em imunossensor na detecção da proteína NS1 das arboviroses dengue e Zika em soro e urina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver e modificar a superfície de plataformas sensoras do dispositivo modificados com o poli-EDA e com NTC;
2. Caracterizar a matriz de imobilização de anticorpos anti-NS1 por técnicas eletroquímicas e piezoelétricas;
3. Realizar análises das superfícies nanoestruturadas desenvolvidas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e microscopia eletrônica de varredura;
4. Estabelecer curva analítica do imunossensor quanto à determinação da proteína NS1;
5. Avaliar o imunossensor frente às amostras de soro e urina, enriquecidas com NS1, de pacientes infectados por DENV e ZIKV.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ARBOVIROSES: DENGUE E ZIKA

Arbovirose é uma doença infecciosa aguda, causada por um grupo heterogêneo de vírus, denominado “arbovírus” (do inglês ***Arthropod-borne vírus***), que possui características epidemiológicas em comum. Tais vírus são transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, pertencentes às famílias Ixodidae (carrapatos), Culicidae (mosquitos), Ceratopogonidae (mosquitos-pólvora) e Psychodidae (mosquitos-palha/flebótomos) (JONES, KULKARNI, *et al.*, 2020, SEGONDY, 2016).

As interferências humanas, as modificações dos ecossistemas, a globalização, o crescimento descontrolado da população, as mudanças climáticas e as novas trajetórias utilizadas por aves migratórias são fatores considerados responsáveis pelo aumento da propagação e disseminação dos arbovírus, como o DENV e o ZIKV. A distribuição geográfica de ambos os vírus está ligada à distribuição do vetor (GIRARD, NELSON, *et al.*, 2020, MARTINS, PRATA-BARBOSA, *et al.*, 2020).

O vírus da dengue exibe um perfil estritamente urbano, tem como vetor principal mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, e em algumas localidades o *Aedes albopictus*. Com a reforma sanitária promovida por Oswaldo Cruz a partir de 1904, a fim de eliminar a febre amarela urbana, o Brasil foi decretado livre do *Aedes aegypti* em 1955. Observa-se que no período entre 1923 e 1981 não houve casos reportados de dengue no país, no entanto, a partir de 1981 os números de infecções começaram a aparecer e sua incidência e prevalência aumentaram a cada ano (MINISTERIO DA SAÚDE, 2019).

De acordo com a OMS, mais de 3 bilhões de pessoas vivem em área de risco de infecção por DENV. Aproximadamente 100 milhões de casos ocorrem por ano, destes, cerca de 250 a 500 mil são diagnosticados como dengue hemorrágica. Estima-se que 5% dos casos de dengue hemorrágica são fatais (OMS, 2020). Sugere-se que os mesmos fatores que impulsionaram a disseminação do DENV também foram responsáveis pela disseminação do ZIKV (QURESHI, 2020).

O ZIKV foi identificado inicialmente em 1947 ao ser isolado de um macaco-Rhesus (*Macaca mulata*) usado como sentinela na floresta Zika em Uganda (BERUBE, 2020). Desde sua identificação, o ZIKV apresentou baixa circulação, uma vez que pesquisas sorológicas apontaram, por meio da detecção de anticorpos específicos em várias espécies de mamíferos e roedores, que a circulação do ZIKV era caracterizada como silenciosa, apresentando uma distribuição geográfica restrita aos países africanos e do sudeste Asiático (CARVALHO, 2019). Esse cenário foi modificado em 2007 após um grave surto ser relatado nas ilhas Yap, no qual 73% da população da ilha foi infectada pelo Zika vírus em apenas quatro meses. Desde então, o Zika vírus se disseminou por todo o hemisfério ocidental e uma grande epidemia no continente da América do Sul começou a surgir (HOSSEIN, 2020).

No Brasil, o Nordeste foi a região com maior número casos de microcefalia e outras malformações congênitas associadas ao vírus Zika, tendo sido registrados mais de dois mil e quinhentos casos, representando 62,5% das ocorrências do Brasil entre 2015 e 2019. O estado de Pernambuco despontou no cenário epidemiológico nacional como epicentro inicial da epidemia (POSSAS *et al.*, 2017).

Os surtos de dengue observados todos os anos e a epidemia causada pelo Zika revelou a persistência de estruturas sociais, políticas e econômicas que reproduzem a desvantagem e vulnerabilidade de determinadas populações e grupos (MARSHALL *et al.*, 2020). As doenças negligenciadas como dengue e Zika têm sido reconhecidas como, simultaneamente, um resultado e um mecanismo perpetuador da pobreza - as denominadas, "doenças da pobreza" ou "doenças tropicais da pobreza" (CLAPHAM, 2019).

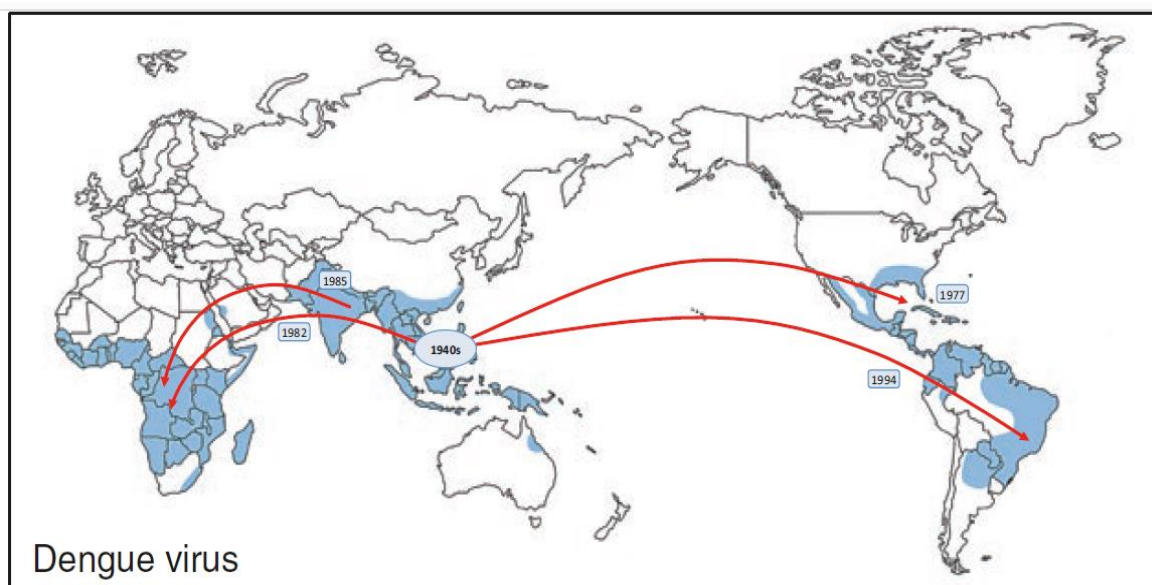
3.2 DENGUE: EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS

O vírus da dengue foi um dos primeiros arbovírus a ser relatado na literatura (WANG, W. *et al.*, 2020), evidências sugerem que sua origem foi em primatas não humanos na África e Ásia (HARAPAN *et al.*, 2020). Por volta do ano 1780, uma doença semelhante a dengue foi observada na Índia, na cidade de Madras. Posteriormente, o DENV foi disseminado para muitas partes do

mundo através do comércio (WANG, W. *et al.*, 2020) e o primeiro isolamento do DENV foi em 1943 no Japão (HARAPAN *et al.*, 2020).

Entretanto, foi a partir da Segunda Guerra Mundial (1945) que a doença foi disseminada pelo mundo. Anos depois o DENV foi reintroduzido nas Américas em meados de 1977, na cidade de Santiago de Cuba, em seguida, foi disseminado para a América do Sul (**Figura 1**), quando aconteceram os surtos da doença. Na década de 1980, esses surtos foram disseminados para a Ásia e África, porém somente a partir de 1994, eles começaram a atingir países da América do Sul, que não tinham casos registrados e, até hoje, o continente é acometido por inúmeros casos desta doença todos os anos, tendo o Brasil como uma das principais áreas endêmicas do vírus (WEAVER, SCOTT C; CHARLIER, CAROLINE; NIKOS, 2018).

Figura 1: Regiões geográficas da atividade viral histórica da epidemia do DENV.



Fonte: Fonte: Paul R. Young (2018)

No Brasil, nos anos de 1916 e 1923 foram registrados casos sugestivos de dengue em São Paulo e no Rio de Janeiro, respectivamente. Já no final do ano de 1981 e início de 1982, na cidade de Boa Vista, Roraima, localizada na Região Norte do país, foram registrados casos da doença com confirmação laboratorial, tendo sido identificados os sorotipos 1 e 4 do vírus (DENV-1 e

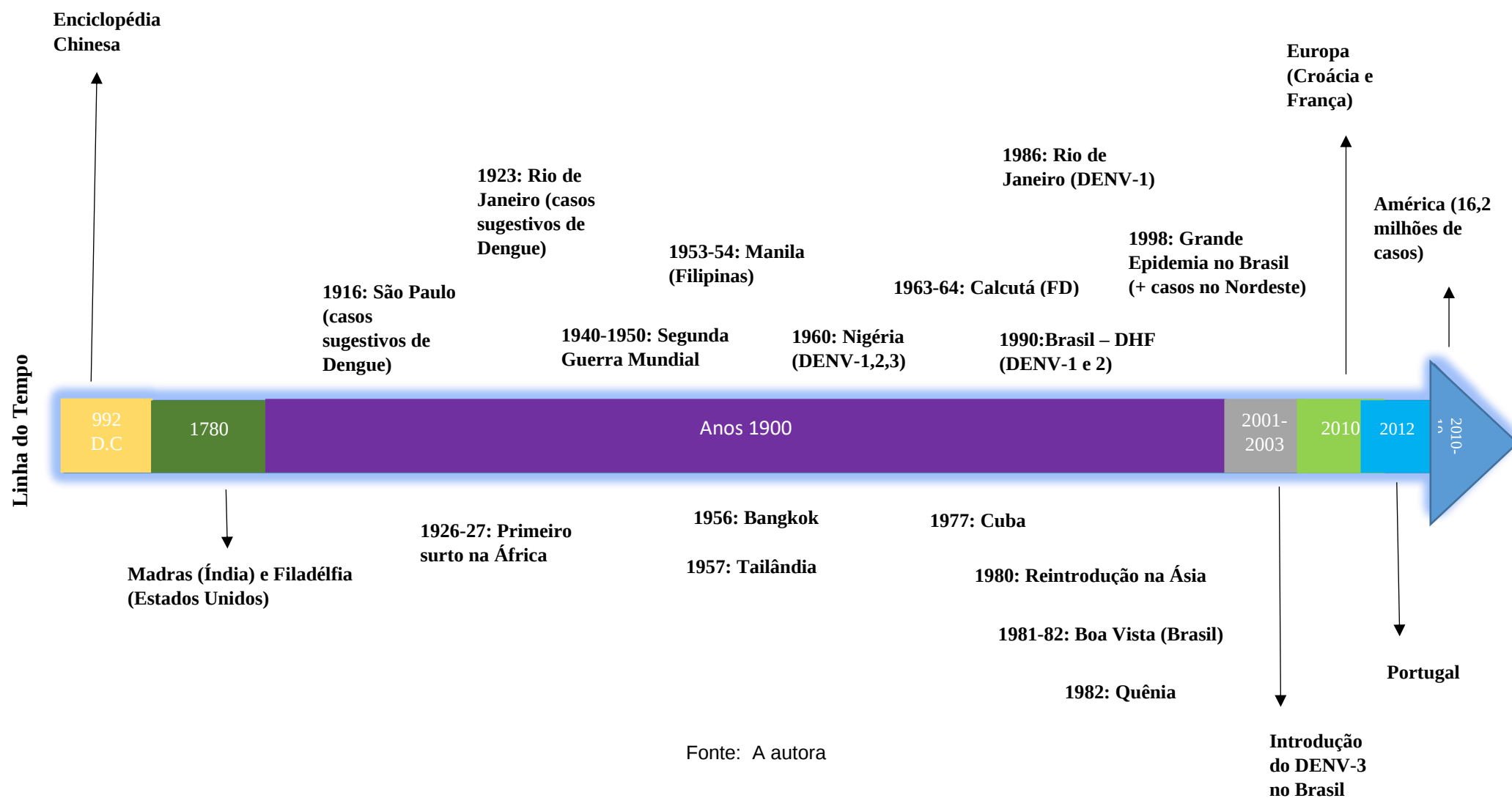
DENV-4). Dos anos de 1983 até 1985 não foram registrados casos de dengue no Brasil, porém em 1986, no Estado do Rio de Janeiro, uma epidemia causada pelo DENV-1 foi registrada e se espalhou para outros estados e levou a cinco casos fatais neste ano. **(Figura 2)** Os primeiros casos de febre hemorrágica do dengue (FHD) foram registrados no ano de 1990 causados pelo DENV2, assim sendo, as epidemias seguintes foram oriundas dos DENV-1 e DENV-2 que circulavam ao mesmo tempo por todo o Brasil (NUNES *et al.*, 2019).

Em 1998, uma epidemia acometeu mais de 500.000 pessoas no Brasil, principalmente no Nordeste. Entre os anos de 2001 e 2003 uma nova epidemia se disseminou pelo país, e o sorotipo DENV-3 causou este surto, visto que o mesmo começou a circular no ano 2000 (SALLES *et al.*, 2018).

Com a rápida disseminação do DENV por todo o continente americano, em 2010 começaram a surgir casos esporádicos em alguns países da Europa (Croácia e França) oriundos dos Estados Unidos e, em 2012, foi relatado um surto considerado grande em Madeira, Portugal (WILDER-SMITH *et al.*, 2019).

Essa rápida disseminação do DENV em todos os continentes é o resultado do aumento da mobilidade humana por meio de transporte e sua transmissão vem acontecendo muito rápido para novas regiões, causando epidemias consideradas graves (KUMAR, R. P.; , R. SUNITH; KUMAR, And V. P.,2020).

Figura 2: Linha do tempo do surgimento e disseminação do DENV.



A dengue é considerada uma doença negligenciada e sua disseminação depende das condições sanitárias e sazonais. A transmissão da doença se dá por meio de artrópodes hematófagos contaminados, principalmente mosquitos, cujos ciclos de vidas estão relacionados às condições de temperatura e habitat de reprodução (DA SILVA *et al.*, 2019, MERLE, DONNIO, *et al.*, 2018). Neste contexto, a prevalência da dengue oscila conforme o controle dos vetores de infecção, tendo aumentado 30 vezes em 50 anos, passando também da zona urbana para a zona rural (WANG, Wen-hung, NAYIM, *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, um estudo sobre a carga global da doença observou que a dengue aumentou consideravelmente em relação às outras doenças transmissíveis. Esse aumento foi de 400% em 13 anos (2000-2013). De acordo com a OMS, estima-se que aconteçam de 100-400 milhões de infecções por dengue anualmente. Os casos de infecções pelo DENV vêm aumentando todos os anos; no ano 2000 foram registrados 505.430 casos, em 2010 aumentaram para 2,4 milhões e em 2019 o número de infecções foi de 4,2 milhões (ELTOM *et al.*, 2021). Na tabela 1 observa-se algumas das principais características do DENV em relação a sua distribuição geográfica, sintomatologia, prevalência anual, vetor, entre outras (BURDMANN, 2019; CHONG *et al.*, 2019b).

Tabela 1: Resumo das principais características do vírus da Dengue

DENV	
Vírus	Quatro sorotipos
Principal gênero do mosquito	<i>Aedes</i>
Hospedeiros relevantes	Humanos
Distribuição geográfica	Principalmente na América Latina, África, Sul e Sudeste Asiático e Oceania. Espalhando para América do Norte e Europa. Presente em mais de 128 países.
Carga estimada / ano	390 milhões (96 milhões sintomáticos) no mundo todo
Quadro clínico	Febre leve e grave, Doença multissistêmica
Vacina	Em desenvolvimento (já está sendo testada em alguns países)

Fonte: BURDMANN (2019) e CHONG, LEOW, *et al.*, (2019)

Antes do final da década de 60, a dengue foi considerada uma doença que apenas deixava o paciente debilitado e não era fatal (SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2011), porém, após um surto que causou a morte de várias crianças no Sudeste Asiático, essa classificação foi reavaliada. Convém salientar que a gravidade da doença não depende do sorotipo do DENV responsável pela infecção (WALIA; ARIF; LIAQAT, 2019).

Grande número das pessoas infectadas pelo DENV são assintomáticas ou apresentam sintomas leves, 25% destes tem uma doença febril autolimitada. São poucos os casos de dengue que podem evoluir para a forma mais grave, que é uma inflamação multissistêmica de alta mortalidade; apenas cerca de 5% a 30% das pessoas infectadas que adoecem. (WANG, Wen-hung, NAYIM, *et al.*, 2020).

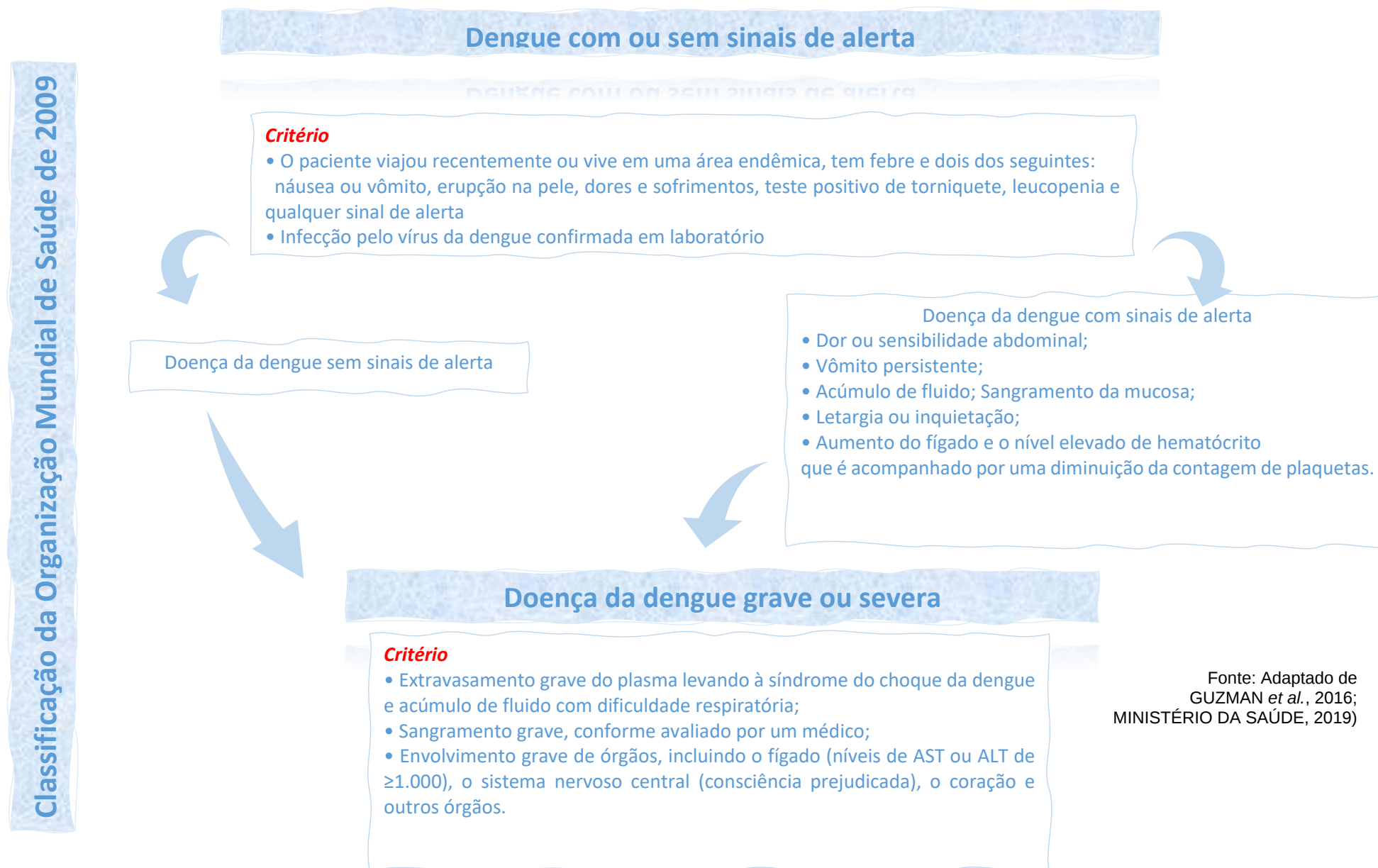
Em 1975, a OMS publicou uma diretriz sobre as formas clínicas da dengue que perdurou até sua atualização em 1997, considerada a primeira classificação da dengue. A OMS classificou a dengue em três formas clínicas, seus sinais e sintomas foram as referências usadas para se realizar essa divisão: Febre da dengue (FD), Febre hemorrágica da dengue (FHD) e Síndrome do choque da dengue (SCD), (SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2011; WALIA; ARIF; LIAQAT, 2019). Na febre da dengue, o paciente apresentava: febre, dor nas articulações, dor muscular, dor de cabeça, erupção na pele e leucopenia, consideradas como sintomas da fase aguda da doença. Já na FHD, o indivíduo apresentava os mesmos sintomas clínicos da forma branda, além de outros mais graves tais como: febre alta persistente, hemorragias, trombocitopenia, níveis do hematócrito aumentados, derrame pleural ou ascite eram observados devido ao extravasamento do plasma e pelo desenvolvimento do choque hipovolêmico, e também insuficiência circulatória em alguns casos considerados mais graves (WANG, W. *et al.*, 2020). Em relação à SCD, a doença era classificada como dengue hemorrágica que causava um colapso devido ao extravasamento do plasma, estreitamento da pressão do pulso, hipotensão de sinal tardio, pulso rápido e fraco e a pele se apresentava fria e úmida. Entretanto, essa classificação não apresentava uma aplicação prática na clínica médica, por ser muito complexa quando se pretendia notificar o caso (WALIA; ARIF; LIAQAT, 2019).

Considerando a dificuldade para se classificar as formas clínicas da dengue, a OMS realizou um amplo estudo internacional e, em 2009, passou a classificar a dengue da seguinte forma: dengue (doença sem sinais de alerta), dengue com sinais de alerta e dengue grave (CDC/WHO, 2021). A subdivisão da dengue, com ou sem sinais de alerta, foi elaborada com o intuito de auxiliar os profissionais da saúde em relação aos cuidados dispensados aos pacientes (GUZMAN *et al.*, 2016).

A partir de janeiro de 2014 o Brasil passou a adotar a nova classificação de caso de dengue revisada da OMS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Um caso suspeito de dengue com sinais de alerta é todo caso de dengue que, no período da remissão da febre, apresenta um ou mais dos seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, ou dor à palpação do abdômen; vômitos persistentes; acúmulo de líquidos (ascites, derrame pleural, derrame pericárdico); sangramento de mucosas; letargia ou irritabilidade; hipotensão postural; hepatomegalia maior do que 2 cm; aumento progressivo do hematócrito. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; WALIA; ARIF; LIAQAT, 2019).

A classificação vigente adotada encontra-se detalhada na **Figura 3**.

Figura 3: Classificação da infecção por dengue conforme a OMS, 2009.



Os sintomas da dengue se manifestam após o período de incubação do vírus, que é de 4 a 7 dias, podendo chegar a 14 dias; após esse período o paciente começa a apresentar sintomas, em três fases: fases febril, fase crítica e fase de recuperação. (MURUGESAN; MANOHARAN, 2019; WILDER-SMITH *et al.*, 2019). A fase febril é a etapa inicial do curso da doença e seu primeiro sintoma é a febre que normalmente é acima de 38 °C, podendo durar entre 2 e 7 dias. Essa febre vem acompanhada de outros sintomas, além dos acima mencionados para a FD, os quais podem estar presentes: vômito, náuseas, diarreia, dores abdominais, dor de garganta, paladar modificado, constipação e rinorreia. Crianças podem ter quadros de convulsões quando a febre chega a 40 °C, nos primeiros dias (MURUGESAN; MANOHARAN, 2019).

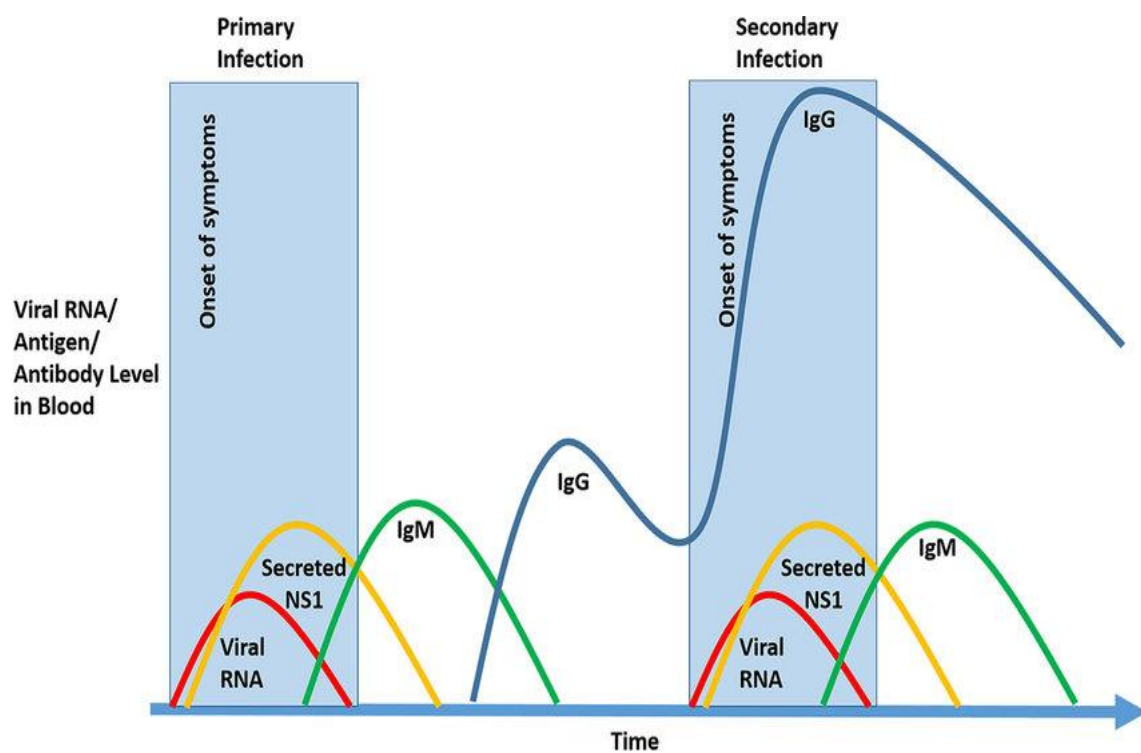
A maioria dos pacientes apresenta lesões exantemáticas do tipo maculopapular que se espalha pela face, tronco e membros, com ou sem prurido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Quando a febre cessa há uma melhora do paciente, no entanto, pode acontecer complicações que levam a desenvolver outros sintomas, fazendo-se necessário uma identificação rápida e marcando o início da fase crítica (WILDER-SMITH *et al.*, 2019b).

A fase crítica começa após a redução da febre, geralmente entre o 3º e 7º dia do início dos sintomas e é nessa fase (entre o 4º e o 5º dia) que os sinais graves podem aparecer (**Figura 4**). Na fase crítica, que pode durar de 24 a 48 horas, é de extrema importância a realização de testes específicos para verificar se há extravasamento plasmático, assim como testes para diagnosticar o dengue, a fim de realizar o tratamento adequado, evitando, assim, a evolução das formas graves da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Os sintomas graves são vários, como já citados para a FHD, também podem ocorrer sangramentos onde foi realizado coleta de sangue; a dispneia e letargia estão presentes em quase todos os casos. (WALIA; ARIF; LIAQAT, 2019).

Crianças e jovens geralmente desenvolvem uma síndrome chamada extravasamento vascular sistêmico, manifestando-se com sangramento, extravasamento do plasma, podendo levar a uma falência dos órgãos (WALIA; ARIF; LIAQAT, 2019). A recuperação total do paciente se dá em torno de 1 a 2 semanas, mas o paciente pode ficar cansado por vários dias, pois a fase de recuperação em adultos é longa (GARCÍA *et al.*, 2011). Na fase de

recuperação, acontece uma reabsorção constante do fluido extracelular, estabilização do hematócrito e o aumento dos leucócitos, retorno progressivo do apetite e redução dos sintomas gastrointestinais (HARDEEP; REEMA, 2019).

Figura 4: Evolução clínica e laboratorial da dengue



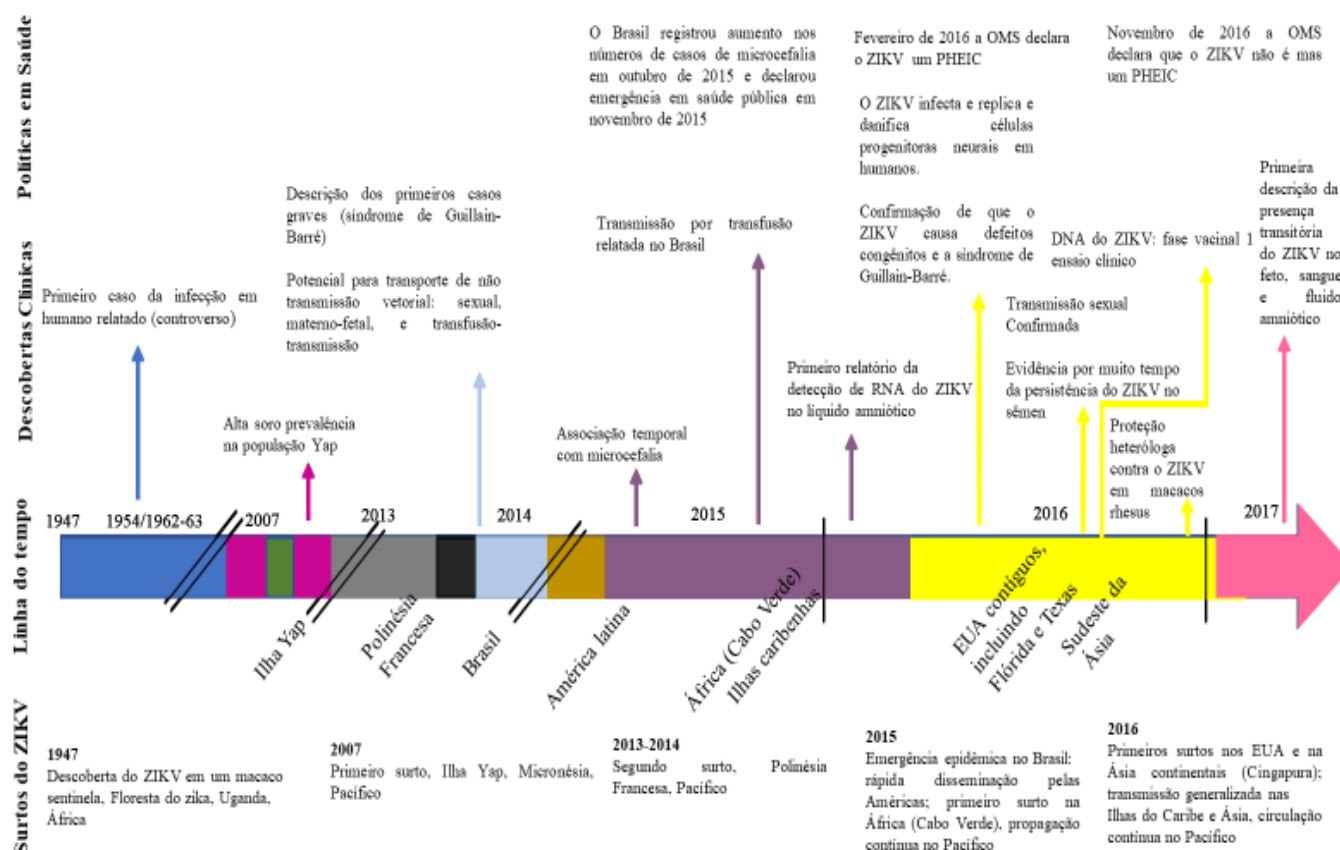
Fonte: (CONCEIÇÃO; DINIZ, 2010).

3.3 ZIKA: EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS

A Zika é uma doença febril aguda, causada pelo vírus Zika, um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, transmitida por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *A. aegypti* e *A. albopictus* infectados. O vírus Zika foi identificado pela primeira vez em Uganda no ano de 1947, em amostra de sangue coletada de um macaco Rhesus que servia como sentinela para o vírus da febre amarela, na floresta denominada Zika. Não havia relatos de surtos na população humana; a circulação do vírus acontecia há muitas décadas, principalmente em primatas não humanos, por transmissão esporádica ou silenciosa. Após o seu descobrimento em 1947, só em 1954 é que foi isolado e identificado o primeiro caso em uma menina, porém foi questionado sua veracidade, e em 1962-63 o primeiro caso de infecção por ZIKV em humanos foi confirmado, clínica e laboratorialmente. (MUSSO, KO, et al., 2019, SHARMA, SHARMA, et al., 2020).

No Brasil, em 2015, o ZIKV foi introduzido causando uma doença febril, semelhante a dengue, em seguida se disseminou para quase todo o país. No Brasil, a Zika assumiu grande importância epidemiológica e para a saúde pública em virtude de ser uma doença que causa sérios problemas neurológicos aos fetos de mulheres que contraem a infecção durante a gestação (ARORA, 2020). Posteriormente, o vírus foi confirmado em outros países das Américas e foram confirmados 223.000 casos até o final de 2017 nas ilhas do Pacífico e nas Américas conforme podemos observar na **Figura 5** (BRITO, CORDEIRO, 2016).

Figura 5: Linha do tempo do surgimento e disseminação da infecção pelo ZIKV, mostrando os principais acontecimentos sobre sua epidemiologia, desde seu primeiro relato em 1947 até 2017.



Fonte: A autora

O Zika vírus é um exemplo de vírus emergente que pertence à linhagem asiática e africana, que causa surtos e apresenta grande capacidade de se disseminar e infectar o *Aedes* com eficiência, afetando regiões em todo o mundo pelo movimento da população humana. Nos surtos ocorridos nos últimos anos, cepas da linhagem asiática foram identificadas em todo o continente americano. O ZIKV foi confirmado em 87 países e territórios com climas subtropicais e tropicais, como no caso da Flórida e Texas e todos esses locais relataram transmissão autóctone (RODRIGUEZ-BARRAQUER, COSTA, *et al.*, 2019).

O período de incubação do vírus Zika varia de 3 a 14 dias, até o aparecimento dos sintomas, tais como: febre, mal-estar, tontura, náusea, vômitos, cefaleia, dores estomacais, anorexia, conjuntivite, erupção cutânea maculopapular, diarreia e edema. Geralmente os infectados passam até uma

semana com os sintomas, em casos mais graves alguns sintomas persistem por mais tempo, porém de 50% a 80% dos casos, as pessoas são assintomáticas (ARORA, 2020, KAZMI, ALI, *et al.*, 2020).

Grande parte dos casos de Zika são assintomáticos, ou com sintomas leves. As manifestações clínicas na Zika possuem muitas semelhanças com a dengue, em relação a sintomas como: febre, mialgia, prostração e erupção cutânea. Na maioria dos casos de Zika não se faz necessária internação do paciente, entretanto, nos casos graves, como as complicações neurológicas (síndrome de Guillain-Barré, microcefalia e Meningoencefalite) se faz necessário uma maior atenção e cuidados especiais com o paciente (SHUAIB, STANAZAI, *et al.*, 2016). No **Quadro 1**, são apresentadas informações importantes sobre sintomas, tratamento e prevenção da Zika.

Quadro 1: Informações básicas e relevantes sobre o ZIKV

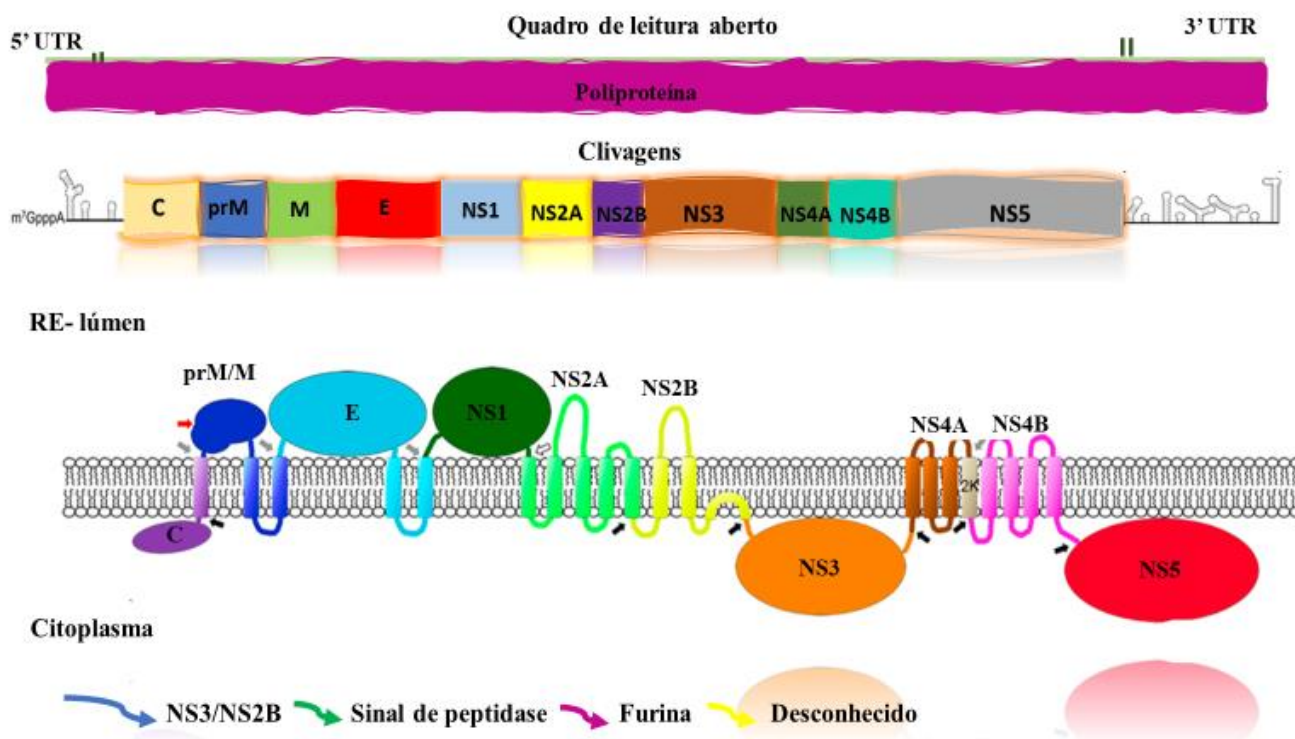
Duração dos sintomas (período de incubação)	Sintomas	Tratamento	Profilaxia
3 a 14 dias	Dor de cabeça Artralgia Mialgia Conjuntivite Febre Vômito Erupção maculopapular Prostração Edema das extremidades Microcefalia Síndrome de Guillain-Barré Hepatomegalia Aumento das transaminases	Acetaminofeno Ingestão de água, amplo descanso e tratamento da dor e febre com soluções líquidas para alívio sintomático podem ser considerados como o paracetamol para aliviar a dor e a febre Homeopatia	Telas da casa Ar-condicionado Remoção de detritos Repelentes Mulheres grávidas não viajar para áreas com risco de transmissão ZIKV Evitar a picada de mosquito durante a 1ª semana de doença para evitar a transmissão humano / mosquitos (transmissão humana)
Fonte: (ARORA, 2020, KAZMI, ALI, <i>et al.</i> , 2020, MARTÍNEZ DE SALAZAR, SUY, <i>et al.</i> , 2016, SHUAIB, STANAZAI, <i>et al.</i> , 2016)			

3.4 BIOMARCADORES ALVOS

A dengue e a Zika são doenças infecciosas causadas por arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (WILDER-SMITH et al., 2019a). O DENV apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) com plena capacidade de produzir a infecção. (TIAN et al., 2018; WANG, W. et al., 2020).

A partícula viral é esférica, medindo de 40-50 nm. O genoma dos *Flavivirus*, (tais como DENV e ZIKV) consiste em uma fita simples de RNA (ssRNA) de sentido positivo, possui um único quadro aberto de leitura (ORF, do inglês Open Reading Frame) e longo (extremidades 3' e 5'), e que codifica as proteínas estruturais e não estruturais (NS). A ORF codifica uma poliproteína pelas proteases dos hospedeiros e proteases do vírus e é dividida em três proteínas estruturais que são do capsídeo (C), da membrana (M) e o envelope (E) viral e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2b, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (**Figura 6**). (BARROWS, CAMPOS, et al., 2018, CHONG, LEOW, et al., 2019).

Figura 6: (A) Genoma dos *Flavivirus*. B) Poliproteína flaviviral: topologia e domínios transmembranares.



Fonte: A autora

As regiões das extremidades (UTRs) 5' e 3' apresentam estruturas complexas por terem vários “grampos” e estes, por sua vez, têm importância na tradução, na síntese do RNA e na formação de sfRNA. A membrana do retículo endoplasmático faz parte da poliproteína dos flavivírus. Algumas das proteínas do vírus são encontradas geralmente na parte luminal e essas proteínas são a prM, E e NS1, já na parte do citoplasma as proteínas encontradas são as de C, NS3 e NS5. As proteínas não estruturais NS2A e B e as NS4A e B apresentam muitas propriedades nos domínios das transmembranas, englobando o retículo endoplasmático, dessa maneira, grande parte das proteínas fica no lúmen da membrana do retículo endoplasmático. O peptídeo 2K codificado pelas proteínas NS4A e B é todo incluso na membrana do retículo endoplasmático e a poliproteína é clivada em co- e pós-traducional em muitos locais (**Quadro 2**) (BARROWS, CAMPOS, *et al.*, 2018).

Quadro 2: Resumo das funções atualmente das proteínas estruturais e não estruturais dos *flavivírus*.

Proteínas Estruturais	
Proteínas	Funções
Capsídeo - C	Capsídeo associado ao genoma do RNA
prM (pr eM)	Protege a proteína E da indução de alterações do pH conformacionais no virião imaturo
Envelope -E	Ligação e entrada de receptores celulares
Proteínas não-estruturais	
NS1	Replicação do genoma do vírus, evasão sistema imunológico, pode facilitar a dependência de anticorpos da infecção
NS2A	Componente do complexo replicase, montagem do virião, modulação do sistema imunológico e evasão
NS2B	Cofator para protease NS3
NS3	Protease responsável pela clivagem de poliproteínas, enzima multifuncional envolvida em replicação do genoma dos vírus (helicase, NTPase)
NS4A	Cofator NS3, componente do complexo da replicase
NS4B	Componente do complexo replicase, modulação imunológica e evasão do sistema
NS5	Componente do complexo replicase, dependente do RNA Polimerase, de RNA (RdRp) para síntese do genoma, RNA metiltransferase (MTase), modulação do sistema imunológico e evasão

Fonte: BIDET, GARCIA-BLANCO (2018) e CHONG, LEOW, *et al.*, (2019)

A proteína não estrutural 1 (NS1) é de grande importância na patogênese das infecções virais por *Flavivírus*, principalmente o DENV e ZIKV, pois nos últimos anos vem sendo considerada um marcador ideal para o seu diagnóstico. A NS1 é considerada uma proteína conservada e possui 352 aminoácidos (CARPIO; BARRETT, Alan D.T., 2021). Seu peso molecular é de 40 a 50 kDa multifuncional (depende do estado de glicosilação), no entanto, sua funcionalidade ainda precisa ser bastante estudada, pois grande parte é desconhecida (NASAR, RASHID, et al., 2020).

Inicialmente, a NS1 intracelular desempenha um papel de monômero, no entanto, no retículo endoplasmático, este forma um dímero resultante dos resíduos de cisteína, que formam ligações dissulfeto (CARPIO et al; 2021). Estudos realizados por pesquisadores da Universidade Nacional de Cheng Kung (Taiwan) observaram, por meio da microscopia crioeletrônica, que a NS1 possui três domínios em cada monômero (LAI et al., 2017), os quais são: domínio de dimerização hidrofóbico β -roll (possui os aminoácidos 1 a 29), domínio *wing* (WD) (aminoácidos 30 a 180), possuindo dois locais de glicosilação (Asn130 e Asn175), um dissulfeto interno e dos subdomínios e um domínio central, o β -ladder, sua formação acontece na posição do C-terminal da NS1 e os aminoácidos que o compõem são os das posições 181 a 352 (AKEY et al., 2014).

A ligação da NS1 se dá pela junção de células via sulfato de heparina e sua internalização acontece pelas vias de dinamina ou clatrina e essa internalização é essencial para a alteração da barreira do endotélio (WANG, C. et al., 2019).

Durante a fase aguda da doença, os níveis de NS1 estão altos (BHATT et al., 2021) e a NS1 é secretada a partir das células que são infectadas e são detectadas no hospedeiro até 9 dias após a doença (WALIA, ARIF, et al., 2019).

Em relação ao ZIKV, a NS1 também age nas células endoteliais. A NS1 pode causar hiperpermeabilidade das células endoteliais do cérebro e da veia umbilical e modifica os glicosaminoglicanos da matriz extracelular das células trofoblásticas, resultando no mal funcionamento da barreira endotelial (PUERTA-GUARDO et al., 2020). A NS1 é uma glicoproteína que apresenta alta homologia dos aminoácidos e nucleotídeos dos flavivírus (DHALL, KALYANI, et al., 2020).

A NS1, na fase aguda das infecções causadas tanto pelo DENV quanto pelo ZIKV, apresenta-se em níveis altos na corrente sanguínea. Apesar da NS1 ter alta sensibilidade de detecção nos casos da dengue grave, um dos problemas para o diagnóstico é quando ocorre a co-infecção por outros *flavivírus*. Em muitos países onde a dengue é endêmica tem ocorrido infecção pelo ZIKV, o que pode significar que os testes sorológicos para detecção da proteína NS1 podem não serem eficientes o bastante para diferenciar ambos os vírus, exigindo o teste de RT-PCR complementar para fechar o diagnóstico laboratorial. No entanto, a NS1 tem se mostrado um excelente marcador biológico empregado no diagnóstico sorológico da dengue e da Zika (LUSTIG *et al.*, 2020).

3.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA DENGUE E ZIKA

As infecções por arbovírus trazem sérias consequências para a saúde pública em todo o mundo e é de suma importância ter instituições públicas de diagnóstico que possam suprir as necessidades da população e para o gerenciamento dos dados, que sejam específicos e de fácil detecção em ambientes urbanos e rurais (remotos). O diagnóstico é de grande importância para o atendimento clínico, suporte de vigilância, estudos de patogênese e tratamentos oportunos para ser administrado a pacientes antes que a infecção se agrave (CHONG, LEOW, *et al.*, 2019b).

A infecção por DENV e ZIKV é identificada por meio do isolamento viral, detecção do RNA viral por testes moleculares, detecção do antígeno NS1, testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos IgM e IgG, bem como pela pesquisa de anticorpos neutralizantes por outras metodologias.

3.5.1 Isolamento viral e diagnóstico molecular

Para se realizar o isolamento dos vírus dengue e Zika as amostras biológicas devem ser obtidas o mais precocemente possível, de preferência nos primeiros 5 a 6 dias de sintomas, pois a viremia (presença do vírus no sangue) normalmente é fugaz, a partir do 6º dia a carga viral começa a diminuir. No que se diz respeito ao DENV, este pode ser detectado no sangue total, soro,

plasma e tecidos obtidos de autópsias de fígado, baço, nódulos linfáticos, pulmão e timo (KABIR *et al.*, 2021). Quanto ao ZIKV, os mesmos espécimes acima podem ser utilizados, além de urina, leite materno, secreção vaginal, esperma, líquido amniótico, líquido céfalo raquidiano (LCR), etc. (MUSSO; DESPRÈS, 2020)

Por exigir laboratório de virologia apropriado e o procedimento ser demorado, o isolamento viral foi substituído pelas técnicas moleculares, a RT-PCR convencional e a em tempo real (RT-qPCR), para o diagnóstico ser mais rápido; os mesmos espécimes biológicos podem ser utilizados. Dado que os vírus da dengue e da Zika apresentam similaridades, as infecções causadas por estes vírus são confirmadas por testes moleculares (detecção de ácidos nucleicos – NATs, RT-PCR e RT-qPCR) (MUSSO; DESPRÈS, 2020).

Os testes de amplificação de ácido nucleico são considerados padrão ouro quando se quer realizar a detecção do DENV e ZIKV, pois apresentam maior sensibilidade e especificidade. Inicialmente, o RNA do vírus é extraído da amostra biológica a ser analisada e, após a extração do RNA, ele será transcrito em cDNA, em seguida, amplificado em equipamentos apropriados e realizada a leitura da amostra amplificada (KABIR *et al.*, 2021).

Estudos realizados empregando a técnica RT-PCR para detecção do ZIKV, em amostras de soro e urina, observaram que a urina é confiável para confirmar a infecção pelo ZIKV, principalmente quando a carga viral no sangue está com níveis altos. Estudos realizados mostrou que a concentração de RNA é detectável na urina e apresentou carga viral maior (GOURINAT *et al.*, 2015) e quando se compara com amostras de soro, a urina é detectada por um período mais longo no pós infecção (7 ou mais dias após se tornar indetectável no soro) (LAMB *et al.*, 2016). Um estudo realizado em Nova Caledônia (é um território francês que abrange dezenas de ilhas no sul do Oceano Pacífico) com amostras de urina de pacientes infectados pelo ZIKV mostrou resultados positivos e sua carga viral máxima foi estimada de 0,7–220.106 cópias/mL (GOURINAT *et al.*, 2015). Isso mostra que a urina pode ser usada como a amostra ideal para detectar o vírus sem ser invasiva (KAUSHIK *et al.*, 2017).

Os testes moleculares, como a RT-PCR, apresentam alta sensibilidade e especificidade para realizar o diagnóstico com rapidez já na fase aguda da

doença, apresentando uma confiabilidade alta, porém, convém ressaltar que o seu emprego se limita à fase inicial da infecção (MUSSO; DESPRÈS, 2020).

3.5.2 Diagnóstico Sorológico

Vários testes sorológicos estão disponíveis para a detecção de anticorpos para os vírus dengue e Zika, tais como: Western-blotting, teste de imunofluorescência indireta e imunoensaios enzimáticos (ELISA) para detecção de IgM e IgG, teste de neutralização por redução de placa (PRNT), ensaio dot-blot. Em relação ao ELISA (IgM), esta técnica proporciona um resultado mais rápido e de fácil acesso para diagnosticar infecções causadas pelo arbovírus, como o DENV e o ZIKV. Estudos mostram que os testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos devem levar em conta o período da doença, pois entre a fase aguda e a convalescença existe uma janela imunológica, quando os anticorpos não podem ser detectados. O ideal é realizar os testes sorológicos em duas amostras de soro coletadas na fase aguda da infecção e outra após 14 dias do início dos sintomas (amostras pareadas). Por exemplo, no caso do dengue, na fase aguda da doença, o IgG não é detectável nas infecções primárias causadas pelos flavivírus, entretanto, em uma segunda infecção, a detecção do IgG pode ser realizada três dias após o início dos sintomas, e isso se dá devido o IgG reconhecer epítomos que compartilham várias proteínas virais de diferentes sorotipos (CHONG, LEOW, *et al.*, 2019a).

Os imunoensaios (IgM e IgG) para diagnosticar os *flavivírus* podem apresentar uma limitação por conta da reatividade cruzada dos anticorpos que são conservados na região da proteína E. Portanto, resultados falsos positivos para determinada infecção podem ser confundidos em áreas endêmicas (BARRETT, WEAVER, 2012). Como aconteceu na epidemia provocada pelo ZIKV em 2016, os imunoensaios (testes comerciais) foram imprecisos para diferenciar as infecções causadas pelos arbovírus, pois o surto de ZIKV acometeu áreas endêmicas do DENV (MUSSO; DESPRÈS, 2020). Neste caso específico, o teste *in house* MAC ELISA (do CDC), para detecção de IgM, é capaz de diagnosticar e diferenciar, com certa precisão, um caso de Zika ou de

dengue, ao testar a amostra de soro, simultaneamente, para ambos os vírus (CORDEIRO *et al.*, 2016).

3.5.3 Diagnóstico por NS1

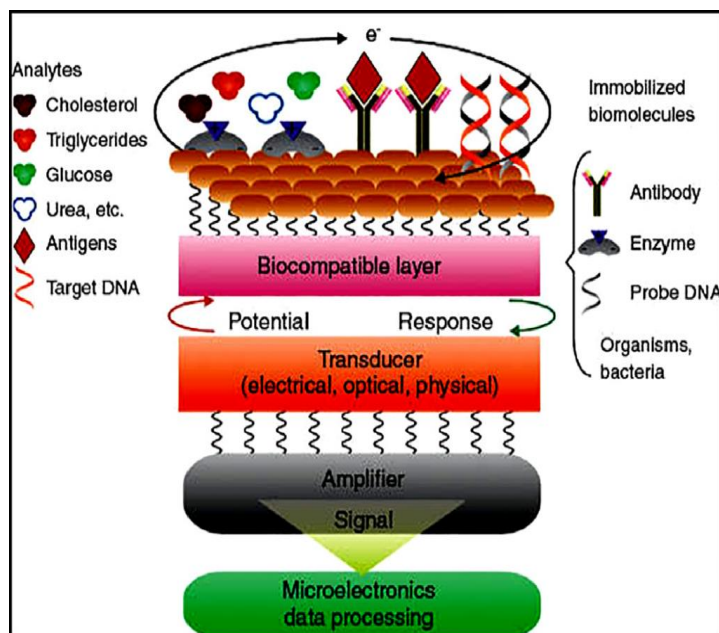
Estando presente nos quatro sorotipos do DENV, os níveis de circulação da NS1 no sangue são altos, tanto na infecção primária quanto na secundária, podendo ser detectada a partir do 1º dia do surgimento da febre e ficar circulante por cerca de nove dias após o aparecimento dos sintomas, em alguns casos por mais tempo (CHONG *et al.*, 2019b). Recentemente, a proteína NS1 tem sido destacada como marcador de fase aguda da DENV (KABIR *et al.*, 2021). Nesta fase, a expressão desta proteína é máxima, portanto, sua detecção contribui decisivamente para o diagnóstico precoce e tratamento imediato, prevenindo a evolução para a dengue grave, evitando o choque por dengue (NASAR; RASHID; IFTIKHAR, 2020). A NS1 tem sido detectada em 87% e 95% de pacientes com dengue (RAAFAT; BLACKSELL; MAUDE, 2019). Durante o curso da doença, os níveis circulantes do NS1 podem variar. Durante a fase de convalescença há uma queda drástica nos seus níveis, justificando assim a sua maior taxa de detecção em soros de fase aguda (ALCALÁ; PALOMARES; LUDERT, 2018).

A concentração de NS1 circulante no soro humano demonstra ser significativamente maior nos pacientes que desenvolvem dengue grave quando comparada a febre da dengue, entretanto, este efeito não está claro se é uma causa ou uma consequência do extravasamento de plasma. Assim, além de ser um marcador diagnóstico da infecção pelo DENV, a NS1 pode representar um indicador de predição de gravidade de doença (KHAN *et al.*, 2020). A detecção da proteína NS1 também tem se mostrado muito útil no diagnóstico da Zika, principalmente durante a fase aguda da doença, da mesma forma que é empregada para o diagnóstico da dengue. Atualmente, estão disponíveis testes comerciais, imunoenzimáticos (ELISA) e por imunocromatografia (teste rápido).

3.6 DIAGNÓSTICOS POR BIOSENSORES

Biossensor é um dispositivo analítico que compreende um componente biológico (enzima, anticorpos, antígeno, fita de DNA, etc) imobilizado à superfície sensora, em íntimo contato com um transdutor que converterá a resposta da interação bioquímica do componente biológico com o analito em um sinal elétrico quantificável (**Figura 7**). No biossensor, quando ocorre a interação do componente biológico com a molécula de interesse, a reação da conversão da energia bioquímica pelo transdutor pode ocorrer sob diferentes formas, por exemplo, transferência de calor, mudança de distribuição de cargas elétricas, movimento de elétrons, emissão de luz, alteração de massa (OBERLEITNER, THESES, 2018). As vantagens dos biossensores em relação aos métodos analíticos convencionais incluem a possibilidade de realização de análises diretas, uso de pequenas quantidades de amostras biológicas e fácil manuseio. Os biossensores podem ser aplicáveis ao diagnóstico clínico, controle ambiental, processos de fermentação e na indústria alimentícia (BHALLA, JOLLY, *et al.*, 2016).

Figura 7: Representação esquemática do princípio básico de um biossensor.



Fonte: (BHALLA, JOLLY, *et al.*, 2016)

Nos últimos anos, os biossensores que utilizam a transdução eletroquímica têm despertado interesse, mostrando-se atrativos por possibilitarem o desenvolvimento de métodos analíticos versáteis, econômicos e de tecnologia prática para diagnóstico à beira do leito. Este tipo de transdução combina a sensibilidade com baixos limites de detecção e alta especificidade nos processos de bioreconhecimento.

Em relação ao elemento de bioreconhecimento, os biossensores são classificados em duas categorias: catalítico e de afinidade (CURULLI, 2021). Os biossensores catalíticos são aqueles em que a interação resulta no desenvolvimento de um novo produto de reação bioquímica. Este biossensor inclui enzimas, microrganismos, tecidos e células inteiras. No caso de afinidade (não catalítico) biossensor, o analito é ligado ao receptor irreversivelmente, e durante a interação nenhum novo produto de reação bioquímica é formado. Biossensores de afinidade são baseados na interação de um analito alvo, por exemplo, um antígeno que será detectado por meio da formação do imunocomplexo entre o antígeno e o anticorpo como agente de captura do anticorpo, resultando em um sinal gerado por um tipo de transdutor (ANALYSIS, 2019).

Biossensores do tipo afinidade utilizam, por exemplo, anticorpos e antígenos, fitas de DNA e RNA, explorando a forte afinidade entre as biomoléculas, não gerando espécies eletroativas após suas interações (SHUI, TAO, *et al.*, 2018). Particularmente, quando os biossensores de afinidade realizam a ligação antígeno-anticorpo são chamados de “imunossensores”. Estes vêm sendo muito estudados nas últimas décadas por oferecerem baixos limites de detecção e, devido a isto, eles muitas vezes são utilizados para detectar traços de micro-organismos, hormônios, etc. (CURULLI, 2021). Os imunossensores apresentam ótima qualidade em diagnósticos clínicos e utilizam diferentes biomarcadores que estão relacionados a infecções detectando a presença de anticorpos e antígenos em soro, urina, leite e entre outros (HARSHAVARDHAN *et al.*, 2019).

Os imunossensores também estão classificados em relação ao seu modo de transdução, possuindo três classes categorizadas, ótica (luminescência, fluorescência, índice de refração), eletroquímica (amperométrica, potenciométrica, impedância, capacitivo e condutimétrica) e

piezoelétrica (HARSHAVARDHAN *et al.*, 2019).entre os transdutores para imunossensores, os eletroquímicos são os mais comumente utilizados e integram um grande grupo dos sensores, apresentando alta sensibilidade e seletividade em relação as interações antígeno-anticorpo, visto que têm potencial para um diagnóstico rápido, podendo direcionar a um tratamento imediato aos pacientes. Ele emprega o uso de um antígeno ou anticorpo que age como agente de captura, medindo quantitativamente o sinal elétrico gerado pela interação do anticorpo imobilizado com a molécula alvo (analito)(HARSHAVARDHAN *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, com o advento da nanotecnologia, o número de pesquisas para desenvolver métodos de diagnósticos por imunossensores aumentou consideravelmente. O progresso no desenvolvimento de novos materiais e técnicas de funcionalização das superfícies nanoestruturadas, bem como o uso de biomoléculas teve um grande avanço, possibilitando a aplicação dos imunossensores em inúmeras áreas, tais como: saúde, meio ambiente, alimentação e entre outras (RODRIGUEZ *et al.*, 2015).. Particularmente, em relação à detecção da NS1, muitos imunossensores foram desenvolvidos, visto que a proteína pode ser utilizada tanto para o diagnóstico do DENV como para a ZIKV na fase aguda da doença, como previamente mencionado. Em relação ao diagnóstico por imunossensores, os limites de detecção encontrados para NS1 corroboram com os descritos na literatura para o diagnóstico do DENV (ALCON *et al.*, 2002; MULLER; YOUNG, 2013). Na **Tabela 2** estão relatados alguns biossensores para a aplicação no diagnóstico da dengue, utilizando diferentes técnicas de transdução eletroquímica (MENDONÇA *et al.*, 2021b).

Tabela 2: Biossensores aplicados para o diagnóstico da detecção da Proteína NS1

Descrição	Limite de detecção (ng/mL)	Faixa linear (ng/mL)	Referência
Imunoensaio impedimétrico	0.5	10-25	(SINAWANG <i>et al.</i> , 2016)
Poli(alilamina) – nanotubo de carbono: ensaio sanduíche	35	100-2500	(SILVA, M.M.S. <i>et al.</i> , 2015)
Eletrodo de nanotubo de carbono impresso	12	0-2000	(DIAS, Ana Carolina M S <i>et al.</i> , 2013)
Eletrodo impresso/tiofeno- Nanopartículas de ouro/Proteína A	15	40-600	(SILVA, M.M.S. <i>et al.</i> , 2014)
Imunosensor eletroquímico híbrido baseado em anticorpo-nanopartícula	35	5-4000	(DARWISH <i>et al.</i> , 2016)
Imunosensor impedimétrico	30	10-1000	(CECCHETTO <i>et al.</i> , 2015)
Imunosensor eletroquímico amperométrico	6.2	20-800	(MENDONÇA <i>et al.</i> , 2021b)

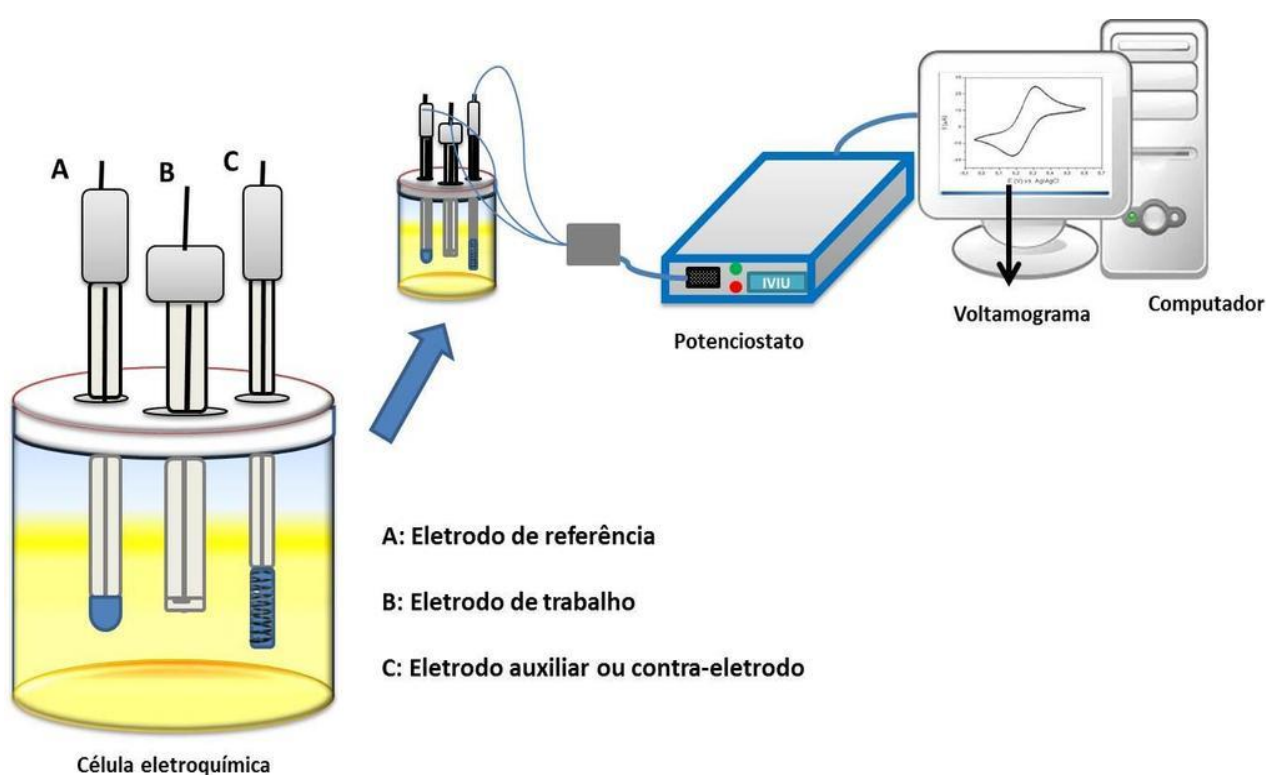
Fonte: (MENDONÇA *et al.*, 2021b)

3.7 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS DE CARACTERIZAÇÃO E RESPOSTA ANALÍTICA

No desenvolvimento de imunossensores, técnicas eletroquímicas usam propriedades elétricas mensuráveis submetendo-se os eletrodos em uma em uma célula eletroquímica para realização das medidas de caracterização de procedimentos de modificação, bem como de respostas analíticas (HARVEY, 2019). As medidas que acontecem neste processo são: alteração de potencial, condutância, impedância, alterações de corrente, capacitância e entre outras. Para se realizar esses processos, as medidas são realizadas em uma célula eletroquímica, sendo esta célula composta por três eletrodos, que são eles: eletrodo de trabalho, o eletrodo ou auxiliar e o eletrodo de referência (**Figura 8**). No eletrodo de trabalho são gerados mecanismos eletroquímicos com a espécie biológica imobilizada à superfície sensora. Usa um potenciostato para controlar o potencial aplicado no eletrodo de trabalho em função do eletrodo de

referência (ELGRISHI *et al.*, 2018). Em relação ao eletrodo auxiliar, aplica-se um potencial no eletrodo de trabalho de modo que a redução ou oxidação do analito de interesse venha a acontecer e a corrente possa fluir. A função do eletrodo auxiliar é de se ter um circuito elétrico completo, sendo direcionado para descarga de potência. E, por último, o eletrodo de referência é usado contra o potencial do eletrodo de trabalho, apresentando um potencial equilibrado definido e estável (CYNTHIA G. ZOSKI; KEYES; FORSTER, 2007).

Figura 8: Representação esquemática de uma célula eletroquímica trieletródica.



Fonte: Marcelino, 2015

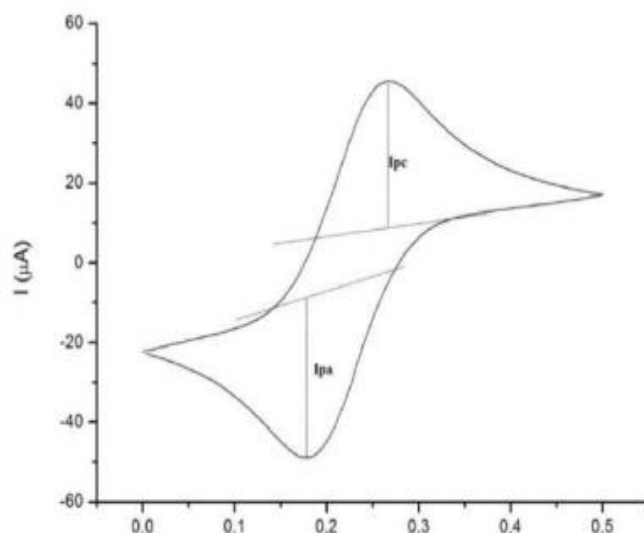
No desenvolvimento de imunossensores, são comumente usadas técnicas de voltametria, optando-se pelas voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria linear e voltametria de onda quadrada. A seguir iremos decorrer sobre a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial que utilizam o sistema tri-eletródico nas medidas eletroquímicas (UGO; MORETTO, 2017).

3.7.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV) é conhecida como a marca registrada da análise eletroquímica, tendo grande impacto em várias áreas fora da química, tais qual ciência dos materiais, fotônica, biologia celular, neurociência, engenharia elétrica e física de fase condensada. Os voltamogramas proporcionam uma vasta gama de informações em relação a transferência de carga e transporte de massa de processos nas superfícies dos eletrodos de trabalho (ESPINOZA *et al.*, 2019), bem como na termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas e reações química juntas ao processo adsorptivo.

A voltametria cíclica dispõe da interação dos eletrodos com a solução de contato, proporcionando varredura de potencial em muitos ciclos sucessivos em duas direções, como oxidação e redução, atuando no desempenho eletroquímico das espécies que foram geradas no eletrodo (HARVEY, 2019). Nesse processo, uma corrente capacitiva é gerada, proporcionando modificações na dupla camada do eletrodo após aplicação do potencial, resultando na rápida queda do sinal (PACHECO, W. F. *et al.*, 2013). A diferença de pico de potencial e de pico de corrente dos parâmetros catódico e anódico (**Figura 9**) de ambos são essenciais para analisar os dados obtidos, mostrando o sistema eletroquímico como reversível, sendo a voltametria cíclica importante para analisar superfícies e reações que acontecem por meio dela (REZAEI; IRANNEJAD, 2019).

Figura 9: Voltamograma cíclico demonstrando as correntes catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}).



Fonte: Trindade, 2015.

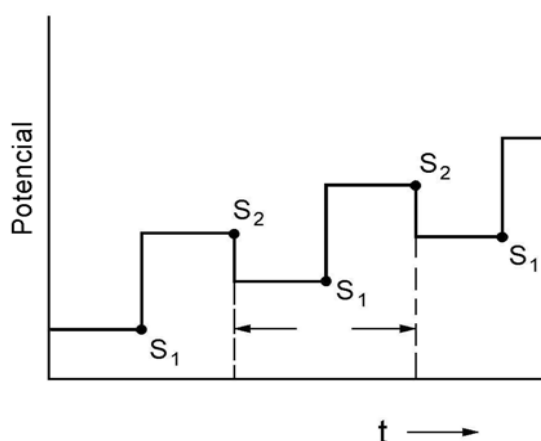
3.7.2. Voltametria de Pulso Diferencial

A técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) deriva da varredura linear e consiste na aplicação de uma série de pulsos de potenciais, com cada pulso sendo fixo e de pequena amplitude aplicando-se um pulso de potencial superposto em uma rampa de potencial linearmente crescente lentamente ao potencial de base (por exemplo, 10-100 mV). A corrente do eletrodo de trabalho é medida em dois pontos para cada pulso, o primeiro ponto antes do pulso ser aplicado e o segundo ao final do pulso. Esses pontos são escolhidos, permitindo a decadência não-Faradaica, eliminando efeitos de fundo, tais quais carga de camada dupla e capacitância inadequada (THEODORIDIS; LAMBROU, 2019). A diferença entre a medida de corrente nos dois pontos de pulso é determinada e plotada contra o potencial de base. A corrente de pico indica presença de ferri/ferrocianeto de potássio.

A diferença entre as medidas de corrente é apresentada em dois intervalos de tempo; o primeiro intervalo imediatamente antes da aplicação do pulso (S1) e o segundo próximo do final do tempo de vida (S2). O valor final da

corrente é a diferença entre esses dois valores medidos (**Figura 10**). A corrente de pico pode ser indicativa da presença de um marcador redox, como por exemplo, o par redox ferri/ferrocianeto de potássio. As vantagens de uma medição VPD é sua velocidade, sensibilidade relativa e facilidade de análise. Esta medição é usada para estudar as propriedades redox de analitos com valores de concentração muito baixos. Isso é alcançado devido a baixas correntes de carga que fornecem alta sensibilidade (BLAIR, CORRIGAN, 2019, GILL, SINGH, *et al.*, 2019).

Figura 10: Representação esquemática da técnica de pulso diferencial com aplicação em potencial em função do tempo. A corrente é amostrada em S1 e S2 e a diferença entre elas é que é registrada.



Fonte: Luiz Manoel Aleixo

As técnicas eletroquímicas apresentadas são comumente usadas para desenvolver imunossensores, no qual apresentam bom desempenho quando aplicadas no desenvolvimento de plataformas sensoras. Dentre estes compostos citados, os nanomateriais apresentam grande área na superfície e isso proporciona uma maior desempenho de carga e o transporte de reagentes, resultando em um aumento do sinal. Neste trabalho, focamos em nanomateriais funcionais a base de carbono, utilizado em biossensores eletroquímicos. Estes nanomateriais a base de carbono melhorou a qualidade analítica em termos de sensibilidade, pois combinam propriedades como alta área superficial, propriedade eletrocatalítica, capacidade de movimento elétron, estabilidade química e eletroquímica, boa condutividade elétrica e biocompatibilidade. Os

nanotubos de carbono são os nanomateriais a base de carbono mais utilizados e muito atrativos e usados na área de bioeletroanalítica na caracterização de plataformas sensoras (CHO; KIM; PARK, 2020). Pode-se, por meio desses processos, estudar as propriedades eletroquímicas dos nanotubos de carbono, assim como estimar certos parâmetros físicos destes, como a reatividade e a capacitância eletroquímica da interface eletrodo-eletrólito. Além disso, pode-se por meio do processo de eletrodeposição fazer deposições de partículas em escala nanométrica (YELLAMPALLI, 2012). A seguir, iremos descrever um pouco sobre os

3.5 NANOTUBOS DE CARBONO

De acordo com o Instituto Nacional de Propriedade Industrial-INPI, o surgimento da nanotecnologia foi de enorme importância, pois proporcionou o desenvolvimento de dispositivos cada vez mais robustos para análises bioquímicas e diagnósticos moleculares, com grandes melhorias na eficiência, precisão e sensibilidade dos resultados (BAYDA, ADEEL, *et al.*, 2020). Os nanobiossensores, dispositivos desenvolvidos em nano-escala, recebem este nome por utilizarem nanomaterias em suas plataformas sensoras, sendo capazes de manipular parâmetros bioquímicos e moleculares com um limite de detecção mais baixo, uma vez que os nanomaterias proporcionam aumento na área da superfície sensora, aumento na transferência de elétrons, no aumento na condutividade, entre outros (MAYRA BELTRÁN-PINEDA, 2021; BANIGO, AZEEZ, *et al.*, 2020).

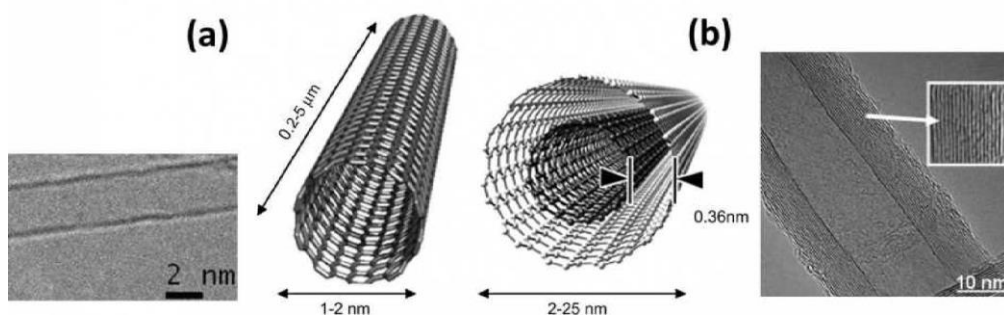
Nanomaterial, simplificadaamente, pode ser definido como um material que possui ao menos uma de suas dimensões na escala nanométrica, mais exatamente entre 1 e 100 nm. Um exemplo clássico são nanopartículas metálicas de ouro, prata ou cobre que têm seus espectros eletrônicos dependentes do tamanho e forma de suas partículas, quando as dimensões dessas são reduzidas à escala nanométrica (WU, Qiong, MIAO, *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, os nanomaterias vêm sendo amplamente usados, construindo uma nova geração para a biotecnologia. Uma das áreas que mostra maior avanço é a biomedicina, com aplicações na terapia e nos métodos

diagnósticos que têm grande potencial, pois proporcionam soluções que são muitas vezes inovadoras e superam as limitações existentes (BAYDA, ADEEL, *et al.*, 2020). Com o advento dos nanomateriais, foi possível observar propriedades físico-químicas e fotofísicas antes não observadas em escala macroscópica, como: pureza, estabilidade, peso molecular, solubilidade e atividade catalítica, entretanto, essas propriedades podem ser modificadas por meio da síntese utilizada e funcionalização da superfície do nanomaterial (MAYRA BELTRÁN-PINEDA, 2021). Quando os nanomateriais são utilizados juntamente com materiais biológicos, eles são envoltos por proteínas, anticorpos e outras biomoléculas (BHATTACHARYA, MUKHERJEE, *et al.*, 2017).

Uma classe de nanomateriais muito utilizada no desenvolvimento de biossensores é a dos nanotubos de carbono (NTC). Descobertos em 1991 por Sumio Iijima, os NTCs apresentam ótimas propriedades elétricas e mecânicas. Nanotubos de carbono são túbulos de grafeno compostos de camadas monoatômicas de átomos de carbono em estruturas hexagonais. Os NTC podem ser constituídos de diferentes cilíndricos concêntricos, contendo única ou múltiplas paredes (**Figura 11**) (BHATTACHARYA, MUKHERJEE, *et al.*, 2017). Os NTC de múltiplas paredes são de fácil síntese e, portanto, são os mais econômicos. Eles absorvem luz infravermelha, dando as propriedades, como amplificadores de sinal de biorreconhecimento e transdutores.

Figura 11: Representação esquemática da estrutura dos NTC e imagem de microscopia eletrônica de transmissão, em: (a) NTC de parede simples, (b) NTC de paredes múltiplas.



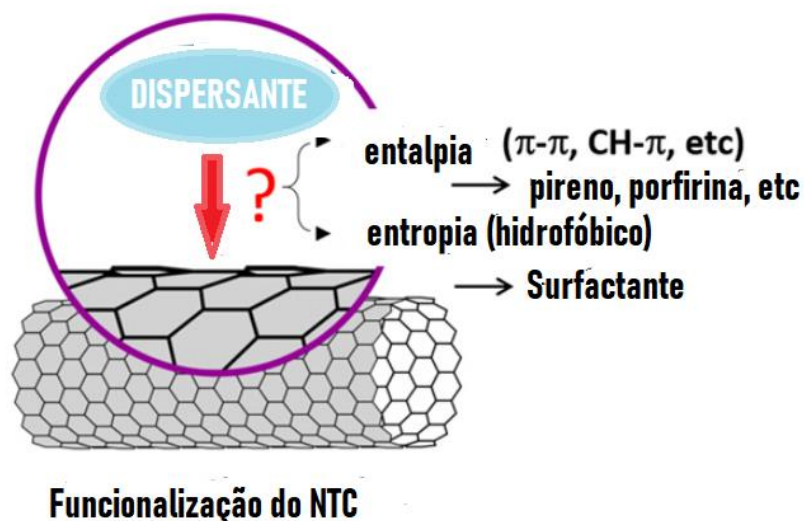
Fonte: Gupta *et al.* (2019)

Os NTC são aplicados em biossensores eletroquímicos devido à sua grande área superficial por volume, elevada condutividade elétrica e excelentes propriedades de transferência de elétrons (MAYRA BELTRÁN-PINEDA, 2021). Sabe-se que os NTC podem ser bio-persistentes, mantendo suas características físico-químicas inalteradas no meio ambiente, sem se degradar e tendo a capacidade de gerar efeitos adversos nos organismos expostos. A biocompatibilidade de NTC pode ser melhorada com a funcionalização por sua modificação com grupos reativos que favoreçam a imobilização de biomoléculas. O processo de funcionalização dos NTC é realizado, em geral, pela formação do grupo reativo ácido carboxílico, a partir de uma dispersão do nanomaterial em solução com a mistura de ácidos sulfúrico e nítrico [3:1] (BRITO, C. L.; FERREIRA, E. I.; LA-SCALEA, 2020).

Na literatura, são descritos diversos processos de funcionalização de NTC empregando métodos químicos e físicos. Dentre os métodos físicos, podem ser empregados: ultrassom, moagem, trituração e fricção que ativam sua superfície (processos físicos modificam a estrutura da superfície dos NTC) (ALIM, VEJAYAN, *et al.*, 2018).

Em relação aos métodos químicos, têm-se por funcionalizações covalentes e não covalentes. A funcionalização não covalente permite que a estrutura original dos NTC seja conservada e suas propriedades não rompa o sistema π (ALIM, VEJAYAN, *et al.*, 2018), ou seja, a ligação não covalente é baseada em forças de *Van der Waals* e suas interações hidrofóbicas não são invasivas, preservando assim, os NTC (GUPTA, N.; GUPTA, S. M.; SHARMA, 2019). Em relação a funcionalização não covalente, são dispostas duas caracterizações para obter as interações necessárias, sendo elas por entalpia e entropia. A interação caracterizada pela entalpia acontece por ligações do tipo $\pi - \pi$, $\text{CH} - \pi$, $\text{NH} - \pi$, em meio a superfície dos NTC e seus dispersantes. Já a interação por entropia se dá pela interação hidrofóbica usando surfactantes (**Figura 12**) (FUJIGAYA; NAKASHIMA, 2015).

Figura 12: Imagem ilustrativa das interações do NTC por meio de funcionalização não covalente (dispersante)



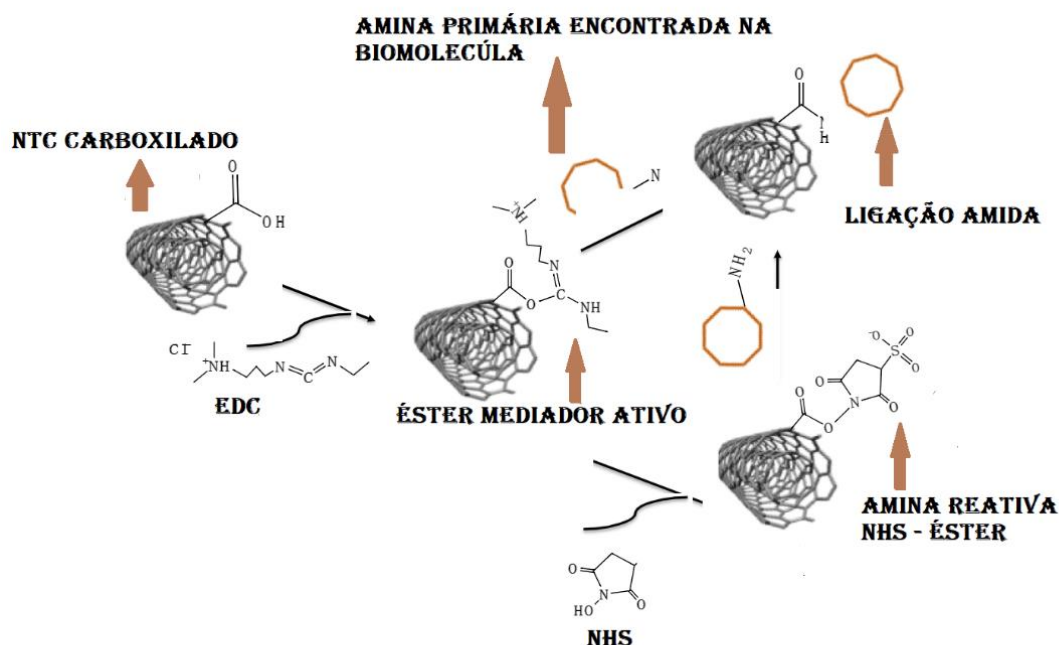
Fonte: Adaptado de (FUJIGAYA; NAKASHIMA, 2015).

A ligação covalente é a mais comumente usada no processo de imobilização de elementos, dentre estes elementos, temos o NTC. A funcionalização covalente dos NTC tem como principal vantagem a sua eficiência no alto grau de modificação química (GUPTA, N.; GUPTA, S. M.; SHARMA, S. K., 2019), acontecendo pela adição de grupos funcionais químicos nas paredes laterais do NTC, resultando em NTC carboxilados, NTC funcionalizados com amina e NTC funcionalizados com sulfidril (AN ZHOU, 2019).

Os grupos funcionais dos NTC podem reagir com grupos funcionais complementares que estão presentes, por exemplo, nos anticorpos e, assim, formar uma ligação covalente que auxilia na imobilização da biomolécula na superfície do CNT (AN ZHOU, 2019). Neste caso, os NTC carboxilados tendem a interagir com anticorpos ou outra biomolécula quando usam um composto a base de carbodiimida e assim ativar os grupos carboxil nos NTC diretamente com as aminas primárias dos anticorpos. A carbodiimida, que frequentemente é o cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDC - age como agente de reticulação), e o N-hidroxisuccinimida (NHS) acilitam a reação de acoplamento. O EDC reage com os grupos carboxila, formando um éster mediador ativo, podendo deslocar-se com facilidade por meio da amina

primária encontrada na biomolécula. O NHS é usado como um mediador secundário antes da aminação e a funcionalização dos NTC com estes compostos têm modificado as aplicações nas plataformas sensoras, melhorando assim a imobilização das biomoléculas utilizadas no processo de desenvolvimento de imunossensores (WICKRAMATHILAKA; TAO, 2019).

Figura 13: Esquema da reação do EDC e EDC/NHS pela funcionalização covalente no nanotubo de carbono



Fonte: Adaptado de (AN ZHOU, 2019).

Com base nas inúmeras possibilidades dos NTCs eles são atrativos para o desenvolvimento de plataformas sensoras, pois aumentam a área eletroativa superficial dos eletrodos. Uma maneira de melhorar o desempenho deste nanomaterial é a combinação deste com polímeros, que são macromoléculas resultantes da formação de monômeros. Os polímeros facilitam o transporte de carga, são de fácil síntese e quando incorporados ou revestidos com NTC

permitem que a disposição do NTC possa ser perfilada na superfície sensora, ampliando sua área e potencializando as interações entre os nanomateriais e analitos, proporcionando condutividade, transferência de elétrons e interações eletrostáticas entre o NTC, demonstrando boa estabilidade e biocompatibilidade (AN ZHOU, 2019; YELLAMPALLI, 2012).

3.8 POLÍMEROS CONDUTORES

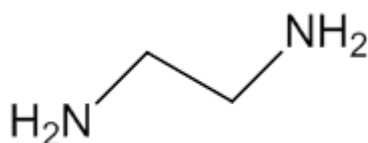
Os polímeros condutores apresentam propriedades eletroquímicas atrativas, pois possuem baixo potencial de ionização, altas afinidades eletrônicas e propriedades ópticas, com condutividade eletrônica intrínseca, podendo apresentar variações na condutividade. Polímeros condutores também são conhecidos por sua capacidade de serem compatíveis com moléculas biológicas em soluções aquosas neutras e, muitas vezes, eles podem ser modificados para ligar biomoléculas. Outra vantagem dos polímeros condutores é que a síntese eletroquímica permite a deposição direta de um filme de polímero no substrato do eletrodo, que pode ser seguida pela imobilização da biomolécula (KUMARA SWAMY, SANDEEP, et al., 2017).

Os polímeros condutores têm vantagens em relação ao metal ou materiais inorgânicos, como: fácil síntese, na modificação da superfície do eletrodo, podendo promover afinidade e estabilidade do bicomponente, diversidade química e estrutural, baixo peso e flexibilidade. Quando são associados aos NTC, a área da superfície sensora é ampliada, potencializando as interações entre os materiais e analitos, o que leva à alta sensibilidade. Por outro lado, espera-se que nanocompósitos à base de NTC-polímero tenham várias propriedades como: mudança significativa na mecânica, propriedades elétricas e térmicas de matrizes poliméricas, tornando-os candidatos promissores para aplicação em plataformas sensoras (PARK, KWON, et al., 2014). Para obtenção de um eletrodo modificado por filme polimérico, podem ser utilizadas as técnicas de *dip-coating*, *spin-coating*, eletrodeposição, polimerização por plasma, eletropolimerização, dentre outras (TAO et al., 2007).

Em biossensores eletroquímicos, filmes poliméricos obtidos pela oxidação do pirrol, tiofeno e fenileno têm sido os mais estudados, devido às

suas características de rápida transferência de carga poliméricos ricos em grupos amino, carboxílicos, tiolados podem também facilitar a imobilização de biomoléculas. Uma das possibilidades é a utilização de monômeros contendo estas funcionalidades. A etilenodiamina (EDA) é um composto diamino de cadeia curta que facilmente pode ser polimerizado produzindo filmes delgados (**Figura 12**).

Figura 12: Estrutura química da etilenodiamina.



Fonte: A autora

A síntese de filme de de poli-EDA pode resultar em uma superfície sensora com alta densidade de grupos amino reativos, além de alta área superficial e facilidade de imobilização covalente de biomoléculas por ligação amida (FREITAS, 2014). A eletropolimerização do EDA no eletrodo de trabalho resulta em um filme polimérico de estrutura semelhante ao polietilenoimina (PEI). A funcionalização de superfícies com NTC utilizando o poli-etilenodiamina (poli-EDA) é facilitada pela capacidade das nanoestruturas formarem complexos com polieletrólitos catiônicos e íons metálicos. Neste caso, o polímero atua como agente controlador de tamanho e confere grande estabilidade. Outra vantagem da utilização do poli-EDA é a obtenção de grupos funcionais na superfície das nanopartículas por meio da síntese em uma única etapa (RIVA, FIORATI, *et al.*, 2021). A eletropolimerização ocorre com a primeira etapa envolvendo a eletro-oxidação do monômero utilizado com a formação de um cátion-radical (INZELT *et al.*, 2000). A dimerização é o início da segunda etapa, chamada etapa química. O crescimento da cadeia e, conseqüentemente, formação do polímero, procede via reação do dímero resultante com outra molécula neutra e assim por diante. Por último, ocorre a eletrodeposição do polímero formado na superfície do eletrodo (KUMAR & CHEN, 2008).

Esses filmes eletropolimerizados geralmente contêm grupos funcionais que após ativação podem imobilizar biomoléculas via um grupo funcional específico, podendo ser hidroxilas (-OH), carbonilas (C=O), carboxilas (COOH) e aminas primárias (NH₂) (FREITAS, 2014). Assim sendo, um filme formado pelo poli-EDA combinado com NTC foi formado, sendo possível observar pelas micrografias eletrônicas de varredura, proporcionando uma espessura controlada e boa estabilidade da plataforma para a imobilização dos anticorpos monoclonais anti-NS1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados em forma de artigo referente ao artigo produzido e publicado, conforme mostra a **Tabela 3**.

O artigo tem fator de impacto 4.142 (2020), classificado Qualis Capes 2020 no estrato A2, atendendo os critérios para obtenção do título de Doutor no Programa de Rede em Biotecnologia do Nordeste.

Tabela 3 – Organização dos Resultados obtidos na Tese.

Capítulo/Artigo	Título	Periódico	Apêndice
ARTIGO 1	NS1 glycoprotein detecting in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for Dengue and Zika virus	Analytical and Bioanalytical Chemistry (2021) 413:4873–4885 https://doi.org/10.1007/s00216-021-03449-7	Página 64

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi desenvolvido um imunossensor baseado em nanocompósito, buscando o desenvolvimento de um sensor eletroquímico capaz de detectar a proteína NS1. Para a caracterização da plataforma, o método usado foi a eletropolimerização que sintetizou o filme em um polímero (poli-EDA) usando a voltametria cíclica. A eletrossíntese permite o crescimento de filmes mais controlados e sua estabilidade eletroquímica resulta em uma condutividade melhor quando se comparado a *dropcasting*. Neste estudo foi desenvolvido um método *label free* por meio do filme poli-EDA e obtido em nanoescala, sendo confirmado pela microbalança de cristal de quartzo. A microscopia eletrônica de varredura mostrou um polímero com uma condutividade efetiva, gerando sinergismo entre o NTC-COOH e o poli-EDA por meio das ligações amidas e promoveu alta taxa de transferência de elétrons e estabilidade eletroquímica viável. O imunossensor foi capaz de detectar a proteína NS1, pela técnica de voltametria de pulso diferencial, apresentando boa sensibilidade para rastreamento de NS1 por meio de amostra reais de soro e urina em meio complexo. Comparado aos métodos convencionais, é econômico e prático a partir de um ponto de vista, a imobilização de anticorpos pode ser facilmente analisada, visto que imunossensor demonstra uma sensibilidade dentro dos limites de detecção quando se comparado aos outros métodos de diagnósticos que é relatado na literatura, apresentando boa facilidade de operação, utilização de amostra mínima com potencial adicional para análises clínicas.

REFERÊNCIAS

- AKEY, D. L. *et al.* Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. **Science**, 2014. v. 343, n. 6173, p. 881–885.
- ALCALÁ, A. C.; PALOMARES, L. A.; LUDERT, J. E. Secretion of Nonstructural Protein 1 of Dengue Virus from Infected Mosquito Cells: Facts and Speculations. **Journal of Virology**, maio. 2018. v. 92, n. 14.
- ALCON, S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002. v. 40, n. 2, p. 376–381.
- AN ZHOU, Y. F. And R. P. R. Non-Covalent Functionalization of CarbonNanotubes for ElectrochemicalBiosensor Developmen. **Sensors**, 2019. ANALYSIS, C. The Role of Electrochemical Immunosensors in. 2019. p. 1–19.
- ARORA, H. S. A to Z of Zika Virus: A Comprehensive Review for Clinicians. **Global Pediatric Health**, 2020. v. 7.
- BARRETT, A. D.T.; WEAVER, S. C. **Arboviruses: Alphaviruses, flaviviruses and bunyaviruses: Encephalitis; yellow fever; dengue; haemorrhagic fever; miscellaneous tropical fevers; undifferentiated fever**. Eighteenth ed. [S.I.]: Elsevier Ltd, 2012.
- BHATT, P. *et al.* **Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. Current Microbiology**.
- BRITO, C. L.; FERREIRA, E. I.; LA-SCALEA, M. A. Multi-walled carbon nanotube functionalization and the dispersing agents study applied for the glassy carbon electrode modification and voltammetric reduction of nitrofurazone. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 2020. v. 24, n. 8, p. 1969–1980.
- BRITO, Carlos Alexandre Antunes DE; CORDEIRO, Marli Tenorio. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: From hypotheses to evidence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2016. v. 49, n. 5, p. 537–543.
- BURDMANN, E. A. Flaviviruses and Kidney Diseases. **Advances in Chronic Kidney Disease**, 2019. v. 26, n. 3, p. 198–206.
- CARPIO, K. L.; BARRETT, Alan D.T. Flavivirus ns1 and its potential in vaccine development. **Vaccines**, 2021. v. 9, n. 6, p. 1–21.
- CDC/WHO. Qrcode_dengue-and-severe-dengue. **Cdc**, 2021. Disponível em: <80.%09www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=gene&acc=4524.>.

CECCHETTO, J. *et al.* An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators B: Chemical**. [S.l.]: [s.n.], 2015.

_____ *et al.* The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, 2017. v. 87, n. August 2016, p. 949–956.

CHO, I. H.; KIM, D. H.; PARK, S. Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. **Biomaterials Research**, 2020. v. 24, n. 1, p. 1–12.

CHONG, H. Y. *et al.* Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus Research**, 2019a. v. 274, p. 197770.

_____ *et al.* Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus Research**, 2019b. v. 274, p. 197770.

CONCEIÇÃO, S.; DINIZ, M. Exames laboratoriais específicos para o diagnóstico de Dengue. para o diagnóstico de Dengue. 2010.

CORDEIRO, Marli 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**, 2016. v. 214, n. 12, p. 1897–1904.

CYNTHIA G. ZOSKI; KEYES, T. E.; FORSTER, R. J. **Handbook of Electrochemistry**. [S.l.]: [s.n.], 2007.

DARWISH, N. T. *et al.* Electrochemical Immunosensor Based on Antibody-Nanoparticle Hybrid for Specific Detection of the Dengue Virus NS1 Biomarker. **Journal of The Electrochemical Society**, jan. 2016. v. 163, n. 3, p. B19–B25.

DIAS, Ana Carolina M.S. *et al.* A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, 2013. v. 44, n. 1, p. 216–221.

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

ELGRISHI, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, 2018. v. 95, n. 2, p. 197–206.

ELTOM, K. *et al.* Dengue Virus Infection in Sub-Saharan Africa Between 2010 and 2020: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 25 maio. 2021. v. 11.

ESPINOZA, E. M. *et al.* Practical Aspects of Cyclic Voltammetry: How to Estimate Reduction Potentials When Irreversibility Prevails. **Journal of The Electrochemical Society**, 2019. v. 166, n. 5, p. H3175–H3187.

FUJIGAYA, T.; NAKASHIMA, N. **Non-covalent polymer wrapping of carbon nanotubes and the role of wrapped polymers as functional dispersants. Science and Technology of Advanced Materials.**

GARCÍA, G. *et al.* Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. **International Journal of Infectious Diseases**, 2011. v. 15, n. 1, p. 38–43.

GOURINAT, A. C. *et al.* Detection of zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, 2015. v. 21, n. 1, p. 84–86.

GUPTA, N.; GUPTA, S. M.; SHARMA, S. K. Carbon nanotubes: synthesis, properties and engineering applications. **Carbon Letters**, 2019. v. 29, n. 5, p. 419–447.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, 2016. v. 2, p. 1–26.

HARAPAN, H. *et al.* Dengue: A minireview. **Viruses**, 2020. v. 12, n. 8, p. 1–35.

HARDEEP, K.; REEMA, S. A review on major aspects of dengue. **International Journal of pharma and Bio Sciences**, 2019. v. 10, n. 3.

HARSHAVARDHAN, S. *et al.* Electrical immunosensors. **Bioelectrochemical Interface Engineering** , 2019. v. 1, p. 343–369.

HARVEY, D. Analytical Chemistry. 2019.

HOSSEIN, F. An overview of the current medical literature on Zika virus. **Biophysical Reviews**, 2020. v. 12, n. 5, p. 1133–1138.

KABIR, M. A. *et al.* Dengue detection: Advances in diagnostic tools from conventional technology to point of care. **Biosensors**, 2021. v. 11, n. 7, p. 1–28.

KAUSHIK, A. *et al.* Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics. **Trends in Biotechnology**, 2017. v. 35, n. 4, p. 308–317.

KHAN, E. *et al.* The Clinical Features of Co-circulating Dengue Viruses and the Absence of Dengue Hemorrhagic Fever in Pakistan. **Frontiers in Public Health**, 2020. v. 8, n. June, p. 1–10.

KUMAR, R. P.; , R. SUNITH, A. K.; KUMAR, And V. P. Dengue Fever: A Review Article. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2020. v. 9, n. 1, p. 1502–1510.

LAI, Y. C. *et al.* Antibodies Against Modified NS1 Wing Domain Peptide Protect Against Dengue Virus Infection. **Scientific Reports**, 2017. v. 7, n. 1, p. 1–15.

LAMB, L. E. *et al.* Advantage of urine based molecular diagnosis of Zika virus. **International Urology and Nephrology**, 2016. v. 48, n. 12, p. 1961–1966.

LUSTIG, Y. *et al.* Screening and exclusion of Zika virus infection in travellers by an NS1-based ELISA and qRT-PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, dez. 2020. v. 26, n. 12, p. 1687.e7-1687.e11.

MENDONÇA, P. D. *et al.* NS1 glycoprotein detection in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for dengue and Zika virus. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2021a. v. 413, n. 19, p. 4873–4885.

_____. *et al.* NS1 glycoprotein detection in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for dengue and Zika virus. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 21 jun. 2021b. p. 13.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia De Vigilância Em Saúde Ministério Da Saúde**. [S.l.]: [s.n.], 2019.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. **The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker**. **Antiviral Research**. Elsevier B.V.

MURUGESAN, A.; MANOHARAN, M. **Dengue virus**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019.

MUSSO, D.; DESPRÈS, P. Serological diagnosis of flavivirus-associated human infections. **Diagnostics**, 2020. v. 10, n. 5, p. 1–13.

NASAR, S.; RASHID, N.; IFTIKHAR, S. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. **Journal of Medical Virology**, 2020. v. 92, n. 8, p. 941–955.

NUNES, P. C. G. *et al.* 30 years of fatal dengue cases in Brazil: A review. **BMC Public Health**, 2019. v. 19, n. 1, p. 1–11.

PACHECO, W. F. *et al.* Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Química**, 2013. v. 5, n. 4, p. 516–537.

POSSAS, C. *et al.* Zika puzzle in Brazil: Peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2017. v. 112, n. 5, p. 319–327.

PUERTA-GUARDO, H. *et al.* Zika Virus Nonstructural Protein 1 Disrupts Glycosaminoglycans and Causes Permeability in Developing Human Placentas. **The Journal of infectious diseases**, 2020. v. 221, n. 2, p. 313–324.

RAAFAT, N.; BLACKSELL, S. D.; MAUDE, R. J. A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2019. v. 113, n. 11, p. 653–660.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. **Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein**. **Virology Journal**. BioMed Central Ltd.
REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. **Electrochemical detection techniques in biosensor applications**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019.

RODRIGUEZ, B. A. G. *et al.* Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor. **Biosensors - Micro and Nanoscale Applications**, 2015.

SALLES, T. S. *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review. **Parasites and Vectors**, 2018. v. 11, n. 1, p. 1–12.

SILVA, M.M.S. *et al.* A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. **Talanta**, 2014. v. 128, p. 505–510.

_____ *et al.* Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2015. v. 90, n. 1.

SINAWANG, P. D. *et al.* Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, 2016. v. 77, p. 400–408.

SRIKIATKHACHORN, A. *et al.* Dengue-how best to classify it. **Clinical Infectious Diseases**, 2011. v. 53, n. 6, p. 563–567.

THEODORIDIS, I.; LAMBROU, G. I. Voltammetry and monoamines determination: An old acquaintance revisited. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, 2019. v. 24, n. 2, p. 231–244.

UGO, P.; MORETTO, L. M. **Electrochemical Immunosensors and Aptasensors**. **Chemosensors**.

WALIA, S. S.; ARIF, M. A.; LIAQAT, J. **Clinical manifestations and laboratory diagnosis**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019.

WANG, C. *et al.* **Endocytosis of flavivirus NS1 is required for NS1-mediated endothelial hyperpermeability and is abolished by a single N-glycosylation site mutation**. [S.l.]: [s.n.], 2019. V. 15.

WANG, W. *et al.* ScienceDirect Dengue hemorrhagic fever e A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis , prevention and control. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2020. n. xxxx.

WICKRAMATHILAKA, M. P.; TAO, B. Y. Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates. **Journal of Biological Engineering**, 2019. v. 13, n. 1, p. 8–17.

WILDER-SMITH, A. *et al.* Dengue. **The Lancet**, 2019. v. 393, n. 10169, p. 350–363.

YELLAMPALLI, S. **Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites**. [S.l.]: [s.n.], 2012.

APÊNDICE A

NS1 glycoprotein detection in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for dengue and Zika virus

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2021) 413:4873–4885
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03449-7>

RESEARCH PAPER



NS1 glycoprotein detection in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for dengue and Zika virus

Priscila D. Mendonça¹ · Lorena K. B. Santos¹ · Marcos V. Foguel¹ · Marco A. B. Rodrigues² · Marli T. Cordeiro³ · Luís M. Gonçalves⁴ · Ernesto T. A. Marques⁵ · Rosa F. Dutra¹

Received: 25 March 2021 / Revised: 21 May 2021 / Accepted: 31 May 2021 / Published online: 21 June 2021
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

The incidence of infection by the dengue virus (DENV) has grown dramatically, reaching 128 countries in tropical and subtropical regions worldwide, with a pattern of hyper-endemicity. DENV is a mosquito-borne disease having four serotypes, one or two circulating in epidemic outbreaks. The diagnosis of DENV is challenging mainly due to the circulation of new viruses with remarkable similarities, such as Zika (ZIKV) that may cause fetal microcephaly. DENV affects 390 million people per year, but these numbers may be higher due to the underreported and misclassified cases. Recently, the NS1 nonstructural protein has been described in serum and urine of DENV and ZIKV patients, suggesting its use as a biomarker for screening since a negative NS1 sample confirms the absence of these infections. Herein, a label-free immunosensor comprising an assembled nanostructured thin film of carbon nanotube-ethylenediamine is described. The advantage of in situ electrosynthesis of polymer film is to allow major control of thickness and conductivity, in addition to designing the reactive groups for functionalization. A quartz crystal microbalance system was used to estimate the thickness of the polymeric film obtained. The anti-NS1 monoclonal antibodies were immobilized to carbon nanotubes by covalent linkage, permitting a high stability during measurements. Analytical responses to NS1 were obtained by differential pulse voltammetry (DPV), showing a linear range from 20 to 800 ng mL⁻¹ and reproducibility of 3.0%, with a limit of detection (LOD) of 6.8 ng mL⁻¹. This immunosensor was capable of detecting ZIKV and DENV NS1 in spiked urine and real serum in a clinical range.

Keywords Immunosensor · Label-free · NS1 · Dengue virus · Zika virus

Introduction

Dengue is one of the oldest arboviruses globally, endemic in tropical and subtropical regions, transmitted mainly by the *Aedes aegypti* mosquitoes and affects more than 125 countries [1]. Severe forms can lead to hemorrhagic fever or dengue shock resulting in death [2]. It is estimated 390 million individuals are infected per year; however, the number of cases fluctuates according to the seasonality of the disease [3]. There is no specific vaccine or therapy, and prevention by massive testing of mosquitoes and infected individuals is one of the strategies for controlling the disease. The gold-standard diagnostic test for DENV is the polymerase chain reaction (PCR) that detects the viral RNA. However, it is prohibitively expensive, mainly in epidemic outbreaks, besides requiring complicated procedures in amplification to avoid contamination and care in sample collection. Cost-

✉ Rosa F. Dutra
rosa.dutra@ufpe.br

¹ Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

² Electronic Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50740-550, Brazil

³ Department of Virology and Experimental Therapy, Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ, Aggeu Magalhães Institute, Recife, PE 50670-420, Brazil

⁴ Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP 5508-000, Brazil

⁵ Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, Center for Vaccine Research, Pittsburgh, PA 15261, USA

effective tests based on immunoassay are urgently needed to detect DENV more quickly and efficiently. The NS1 non-structural secretory protein has been considered a powerful marker of DENV, and several immunochromatographic rapid tests have been developed in the last decade [4]. In the acute phase of viral replications, there is a significant increase in NS1 concentrations in the bloodstream [5, 6].

Although some studies have found the NS1 protein only in individuals infected with DENV, this description is not a consensus. ZIKV is closely related to DENV, and during the acute phase of disease, the Zika virus might release NS1 protein into the bloodstream [7, 8]. Besides, ZIKV infection has apparent symptoms very similar to DENV; it is most severe in pregnant being associated with severe congenital microcephaly and malformations in infants [9, 10]. The same mosquitoes of DENV transmit ZIKV; however, given the ZIKV ability to infect the reproductive tract [11], it may also be transmitted via sexual intercourse [12, 13]. There is no controversy regarding the presence of Zika virus RNA in urine [7]. ZIKV RNA can be identified in urine and in whole blood for a longer period; however, a negative result does not rule out infection even early after symptom onset. In many countries endemic for DENV, co-infection with DENV and ZIKV occurs, meaning that the NS1 serological tests for differential diagnosis are not exhaustive, requiring the molecular PCR test. However, there is a consensus that the absence of NS1 protein precludes a positive diagnosis for DENV and ZIKV. DENV-NS1 in urine has been reported and also in saliva [8]. Urine offers obvious advantages for sample collection in groups as newborns and patients.

Given the great importance of NS1, many immunosensors for NS1 protein detection have been proposed using different transducers, including optical detection based on localized surface plasmon resonance [14], fluorescence [15], impedimetric [16], amperometric [17] and others. Nevertheless, among them, label-free electrochemical transducers are a more attractive alternative, due to the possibility of easy portability, which can result in a quick point-of-care diagnosis such as with the use of glucometers [18].

In electrochemical biosensors, the use of conductive polymer associated with carbon nanomaterials has been shown as an attractive strategy to obtain nanocomposites with high chemical stability and conductivity [19, 20]. Polymers derived from pyrrol and thiophene have been used alone as well in combination with carbon nanotubes [21, 22]. The way that nanocomposites are synthesized on the electrode surface is crucial, because it can affect the electrochemical properties and conductivity by effects on the electron transfer and charge net. Conventional methods for synthesis such as drop-casting and dip-coating have produced films with uncontrolled thickness, irregularities on the surface and several pinholes [23]. When polymer films are obtained by electrosynthesis, it

is possible to control the thickness in nanoscale, based on the electrochemical technique, number of cycles of cyclic voltammetry (CV), pH and other factors. Amine-rich conducting polymers seem more advantageous for biosensors than simply conducting polymers, because they are readily functionalized for linking to biomolecules by carboxylic groups, or to the carbon nanostructures [24].

In this study, we designed the development of an immunosensor for NS1 glycoprotein combining a carboxylated multi-walled carbon nanotube (CNT-COOH) and thin and short-branched poly-ethylenediamine (poly-EDA) forming a high-conductivity film to detect NS1 in serum and urine samples in a range of clinical levels.

Materials and methods

Reagents and materials

Ethylenediamine (EDA, 98%), ethyldimethylamine-propyl carbodiimide (EDC), hydroxysuccinimide (NHS), glycine, potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$) and potassium ferri-cyanide [$K_3Fe(CN)_6$] were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Multi-walled carbon nanotubes functionalized with carboxylic acid (CNT-COOH, > 8% functionalized) were purchased from Dropsens (Oviedo, Spain). Anti-NS1 antibodies and NS1 protein were acquired from Abcam (Cambridge, UK). Phosphate-buffered saline (PBS) (0.01 mol L^{-1} , pH 7.4) was used in all experiments for dilution of the samples. Ultrapure water obtained from a Millipore water purification system (18 M Ω , Milli-Q, Millipore) was used in all experiments. All other chemicals used were of analytical grade.

Pools of spiked sera used in the study were prepared from a mixture of five sera from healthy individuals collected by venipuncture. The blood was collected in a dry tube and centrifuged at 15,000 RPM for 10 min. Lipemic serum was discarded to prepare pools spiked with NS1 at the desired concentration for analysis. The urine samples used in this study were collected in a clean dry tube, free of preservatives, from two healthy volunteers and were also spiked with NS1 in the desired concentration for the test.

In addition to the spiked samples, samples from ZIKV-infected individuals confirmed by molecular diagnosis via RT-PCR and IgM ELISA with assay protocol according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) from the USA were also used in this study. Sera with a positive diagnosis of DENV was confirmed by protocols already described, in addition to the cultivation of the virus. For this study, sera from positive ZIKV individuals who had also been previously co-infected with DENV were discarded, which was very common in the study, because the ZIKV sample collection zone was endemic for DENV. The positive ZIKV

individuals were admitted to the Hospital das Clínicas Universitário in Recife, Pernambuco, the Brazilian state most affected during the ZIKV outbreak in 2016. All samples used in this study were from volunteers who signed informed consent forms, and the required protocols were approved by the Ethics Committee of the CPqAM/FIOCRUZ (protocol number 28309414.9.0000.5190).

Electrochemical and piezoelectric measurements

Electrochemical measurements were carried out by the Ivium CompactStat potentiostat (Eindhoven, Netherlands) interfaced with a computer, and software controlled by IviumSoft. It was used a conventional three-electrode system, comprising a gold electrode (EAu) as the working electrode (area of 0.985 mm²), Ag/AgCl in saturated KCl (Ag/AgCl, KCl_{sat}) as the reference electrode and platinum wire (Pt) as the counter electrode. The electrodes were immersed in a 5 mL electrochemical cell with 5 mmol L⁻¹ K₄ [Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃ [Fe(CN)₆]³⁻ in KCl solution at 0.1 mol L⁻¹ measured at room temperature (approximately 23 °C).

Modifications that occurred on the electrode surface were characterized by cyclic voltammetry (CV) with a potential window from -0.2 to 0.6 V at 50 mV s⁻¹ and pretreatment of 10 s for stabilization of the residual current. Analytical measurements were performed using differential pulse voltammetry (DPV), applying a modulation amplitude of 25 mV, modulation time of 50 ms and interval time of 500 ms, with a step potential of 5 mV s⁻¹. The analytical responses of NS1 were obtained from the differential currents of the anodic peaks discounting the blank (ΔI), the ready electrode before the NS1 incubations.

Changes in the sensor surface were also characterized by a piezoelectric quartz crystal microbalance (QCM) system. The QCM system consisted of a 10 MHz quartz crystal electrode (Universal Sensors, USA) coupled to a home-made oscillator circuit that was developed by our group [25]. The oscillating circuit was designed to operate with two crystal electrodes, one reference whose oscillating frequency was adjusted to zero to match the difference between them. These initial calibrations are essential for restoring the equilibrium and make possible the comparisons among QCM electrodes since their resonance frequency can be slightly discrepant. Here, only one crystal electrode was modified. The QCM system was programmed to operate in a continuous flow mode at a rate of 100 μ L/min supplied by a peristaltic pump (Watson-Marlow SCI Q 400 model, UK). During each step of the crystal electrode modifications, measurements were recorded by a frequency counter (Agilent - model 011, USA). During measurements, the flow was turned off, avoiding fluctuation on the baseline.

Chemical and morphological characterization

FTIR in attenuated total reflectance (ATR) spectra provided information on functional groups near the surface (~1 μ m) of internal reflection elements. To obtain spectra in ATR mode, a compact Bruker ALPHA IFS 66e⁻ spectrometer (Germany) was used in the range of 500 to 4000 cm⁻¹ with 20 scans.

For morphological characterizations, micrographs were obtained by scanning electron microscopy (SEM) using a TESCAN VEGA3 microscope with LM-type compartment and tungsten filament with secondary electron and backscattered electron detectors. To obtain the images, the gold discs were metalized over a period of 180 s using a Quorum Technologies Ltd. Q15OR modular coating system (Ashford, UK).

Growth of nanostructured polymer film on the sensor surface

The polymer film was obtained from EDA monomers using the CV electrochemical technique. For electropolymerization, the three electrodes were immersed in an electrochemical cell with an internal volume of 5 mL containing a mixture of 0.1 mol L⁻¹ EDA and 0.1 mol L⁻¹ of lithium perchlorate prepared in acetonitrile. Polymerization was carried out at a scan rate of 50 mV s⁻¹ in a potential window between -1.8 and 1.9 V with a step potential of 10 mV during 25 cycles.

Afterward, the CNT-COOH was covalently linked to the poly-EDA film. Prior to use, 1 mg of CNT-COOH was dispersed in 1 mL of dimethylformamide (DMF) and subjected to an ultrasound bath at 40 kHz for 1 h. After dispersion, CNT-COOH was pre-activated by incubating with EDC (40 mol L⁻¹) and NHS (100 mol L⁻¹) prepared in 0.1 mol L⁻¹ of acetate buffer (pH 5.5) and left to stand for 1 h at room temperature (~24 °C). Then, an aliquot (5 μ L) of the pre-activated CNT-COOH was pipetted on the electrode surface and left to react for 1 h, followed by two washes with PBS.

To perform the piezoelectric measurements, instead of using the gold electrode as described, the crystal electrode (Universal Sensors, USA) was employed as the working electrode with both terminals short-circuited, using the mentioned reference and counter electrodes immersed in a 5-mL cell, with the same electrochemical parameters for electropolymerization.

Immobilization of the anti-NS1 antibodies and immunoassay

Immobilization of the anti-NS1 antibody was performed by pipetting an aliquot (2 μ L) of anti-NS1 (10 μ g mL⁻¹) on the electrode surface [26]. The electrode was incubated in a moist chamber for 1 h at room temperature (~24 °C). The remaining

non-covalently bound antibodies were removed with five washes with PBS for 2 min each, followed by rinsing with ultrapure water. The remaining free reactive carboxylic groups were blocked with 50 mmol L⁻¹ glycine prepared in 0.1 mol L⁻¹ of citrate phosphate buffer (pH 5.5).

Analytical responses were obtained by incubating the electrode surface with 2 μ L of samples for 30 min followed by placement in a moist chamber at 37 °C. Samples of serum and urine were diluted with 10 mM PBS (pH 7.4) for further analyses.

Results and discussion

Electrosynthesis of the poly-EDA/CNT-COOH film

Figure 1 exhibits a typical cyclic voltammogram of the electrochemical growth of polymer film on the electrode surface. EDA monomers were electrochemically oxidized to a peak of approximately 0.88 V. The first oxidation peak can be attributed to oxidation of an amino group that corresponds to the radical NH₂⁺ cation. The reduction currents in oxidation peaks are due to the binding of the EDA monomers on the electrode surface. Also observed was an increase in the reduction current, showing that radical cations were consumed during the electropolymerization of the poly-EDA, as well as different amine polymers [24, 27, 28].

The current density supplied for electropolymerization affects the thickness and conductivity of the film. Figure S1a (see Supplementary Information, ESM) shows the profile of

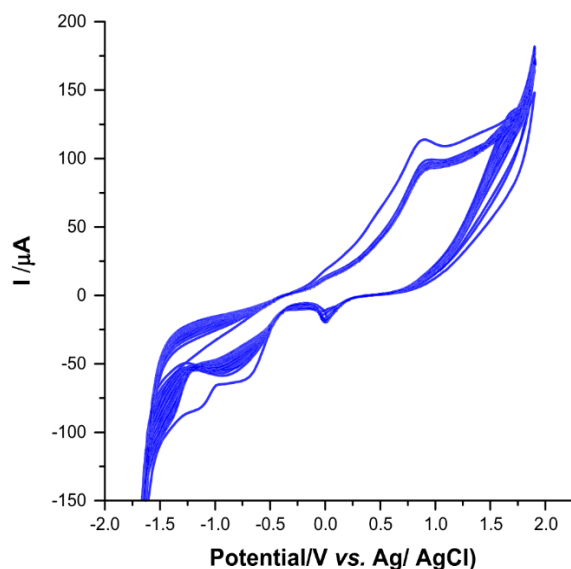


Fig. 1 Typical cyclic voltammogram of the electrosynthesis of the poly-EDA by 25 cycles. Polymerization was carried out at a scan rate of 50 mV s⁻¹ in a potential window between -1.8 and 1.9 V with a step potential of 10 mV

the cyclic voltammogram obtained after the electropolymerization of the poly-EDA film, under different scan rates from 10 to 50 mV s⁻¹ in the presence of 5 mmol L⁻¹ K₄ [Fe(CN)₆]⁴⁻ / K₃ [Fe(CN)₆]³⁻ in 0.1 mol L⁻¹ KCl. An increase in redox current peaks was observed with the increase of scan rates, indicating that polymerized monomers on the electrode surface increased with the current density, reaching a plateau at 30 mV s⁻¹ (ESM Fig. S1b). A scan rate of 50 mV s⁻¹ was adopted for all subsequent experiments, due to it requiring less time to obtain film.

Electrochemical characterization of poly-EDA/CNT-COOH nanostructured film

The stability of the poly-EDA film was evaluated by subjecting the electrode to 25 consecutive cycles of CV in a potential ranging from -0.2 V to 0.6 V at a 50 mV s⁻¹ scan rate in the presence of 5 mmol L⁻¹ K₄ [Fe(CN)₆]⁴⁻ / K₃ [Fe(CN)₆]³⁻ in 0.1 mol L⁻¹ KCl. The coefficients of variation of the anodic and cathodic peaks were 0.01% to 0.1%, respectively, demonstrating that the poly-EDA film achieved excellent electrochemical stability, implying a further high reproducibility in analytical measurements [29]. Electrochemical diffusion processes on the poly-EDA film were also analyzed by CV in the presence of ferri/ferrocyanide as a redox probe (Fig. 2a). According to the amplitude of redox peaks, a linear increase of anodic and cathodic current peaks was observed, as a function of the square root of the scan rate with high correlation coefficients, found at 0.999 and 0.997, respectively, indicating a process controlled by diffusion (Fig. 2b). This behavior was also confirmed by the slope (*m*) of the logarithm of anodic and cathodic peaks of current versus the logarithm of scan rate (Fig. 2c). The *m* values were approximately 0.51 and 0.58, respectively, which means the system was mostly driven by diffusion, as opposed to a value close to 1.0 that would describe adsorptive behavior [30–32].

It is well-established that the binding of CNT-COOH to the sensor surface in an adsorptive way results in low reproducibility due to the leaching of nanomaterial during the analyses [33]. A covalent bond to the poly-EDA film can be achieved through an amide bond with the amino groups since the CNT used here was carboxyl-functionalized. Herein, the EDC/NHS chemistry was used for this purpose with the pre-activation of the CNT-COOH for subsequent bonding to the amino poly-EDA film. The CNT-COOH binding was confirmed by changes in the electrochemical profile with an increase in the electroactive area at the expense of capacitive and faradaic current. Previous studies using only the CNTs on electrode surfaces have shown CV results with a typical double-layer behavior [34, 35]. However, in this study, synergism between CNT-COOH and poly-EDA due to the strong linkage between two structures improved the conductivity with an increase of electron transfer rate, probably attributed to the non-

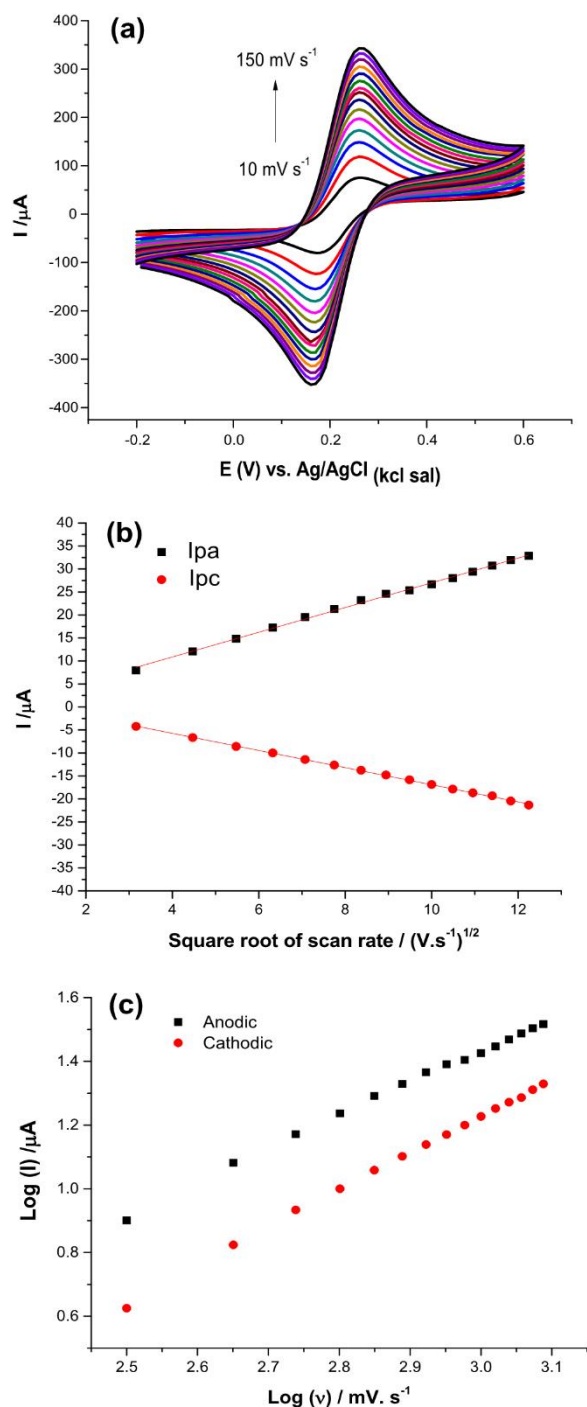


Fig. 2 (a) Cyclic voltammograms of poly-EDA film under different scanning rates of 10 → 150 mV s⁻¹ (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 and 150 mV s⁻¹) in 5 mmol L⁻¹ of the K₄[Fe(CN)₆]⁴⁻/K₃[Fe(CN)₆]³⁻ in 0.1 M KCl. (b) Effect of the square root of the scan rate on the anodic and cathodic current peaks. (c) Curves of the logarithm of the anodic and cathodic current peaks (I_{pa}, I_{pc}) versus the logarithm of the square root of scan rates

COOH promoting a high capacity to store charge [36, 37]. Based on the Randles–Sevcik equation [38], it is possible to quantify the contribution of nanomaterial by the increase of electroactive area after CNT-COOH linkage:

$$i_p = 0.4463nFAC\sqrt{\frac{nFD\nu}{RT}}$$

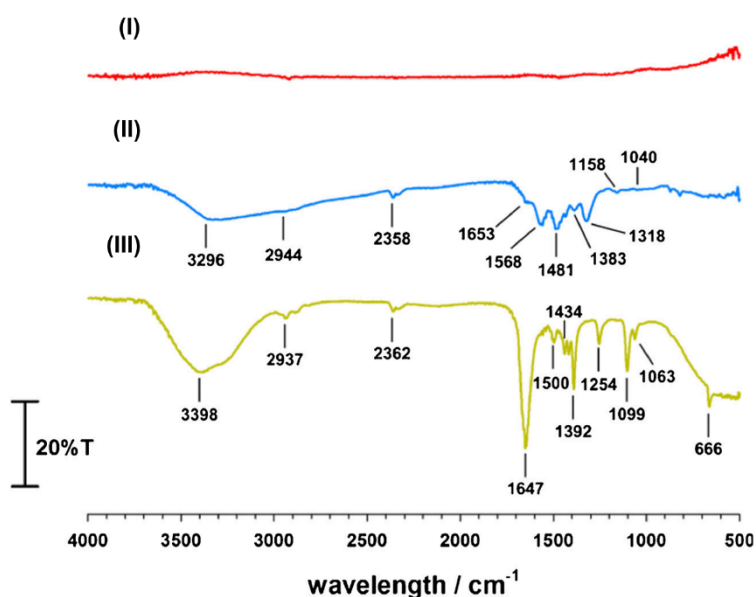
where n is the number of electrons, F is the Faraday constant, A is the area of the electrode, C is the concentration, R is the ideal gas constant, T is the temperature and D is the diffusion constant. An increase of approximately 1.8 times in the electroactive area was observed as compared to the poly-EDA, confirming that the electrosynthesized film behaved like the conducting polymer, simultaneously accelerating the transfer of electrons and increasing the charge storage, as confirmed by the increase of area approximately 4.5 times the bare electrode (ESM Fig. S1a). Here, the results show that the electrosynthesis of the poly-EDA film showed better electroactive conductivity compared to the polyethylenimine film obtained by drop-casting in previous studies [39]. It is believed that this can be attributed to the structure of the polymer formed, which appears to be linear and short-branched, which can promote greater electron transfer due to the structure of ionic bonds.

Given that the CNT-COOH amount bound to poly-EDA can affect the electroanalytical response by changing the electron transfer rate, studies were performed in different electrodes of poly-EDA modified by varying the concentration from 1 to 5 mg mL⁻¹ of previously dispersed CNT-COOH (ESM Fig. S2a). According to redox peaks of the cyclic voltammograms, the amount of CNT-COOH was limited to 4 mg mL⁻¹ when a plateau was reached (ESM Fig. S2b). This amount was limited by the availability of amine groups of the poly-EDA.

FTIR in the ATR mode is a very useful technique to analyze chemical surface modifications at nanoscale [40]. As can be observed in Fig. 3, there were evident differences between the bare gold electrode after deposition of the poly-EDA and after linking the CNT-COOH. As expected, the bare Au electrode showed no characteristic bands or peaks. The peaks around 2362 and 2358 cm⁻¹ can be explained by the CO₂ interference in the FTIR measurements [41]. There are some peaks that appear in both poly-EDA and poly-EDA/CNT-COOH that, obviously, are explained by the structure of the polymer: peaks around 2944 and 2937 cm⁻¹ can be attributed

branched structure of poly-EDA. Conductive polymers and CNT-COOH have shown excellent performance in the electron transfer, in addition to the high surface area of CNT-

Fig. 3 FTIR-ATR spectra in each step of the poly-EDA nanostructured film preparation: (I) bare EAU, (II) poly-EDA/EAU, (III) CNT-COOH/poly-EDA/EAU



to the axial deformation of C–H; the peaks around 1481 and 1500 cm^{-1} can be attributed to the angular deformation of C–H [27]; the peaks around 1383 and 1392 cm^{-1} can be attributed to the angular symmetric deformation of C–H; and the peaks in the region between 1200 and 1000 cm^{-1} (where the peaks 1158, 1040, 1099 and 1063 cm^{-1} can be found) can be attributed to the axial vibration of C–C [41]; however, it was specified that the 1063 cm^{-1} peak can also be attributed to the C–N stretching [27]. Then, there can be found a few changes from one spectrum to the other that can be explained by the reaction between the poly-EDA's amines and the carboxylic groups in the CNT-COOH forming amides (as schematized in Fig. 3): it seems that the band around 3296 cm^{-1} (in poly-EDA) can be attributed to the axial deformation of N–H. This band is large because it is a mixture between primary and secondary amines; then, after reaction (poly-EDA/CNT-COOH), the peak discretely shifted to the left (3398 cm^{-1}), and the band became narrower because there were more amides present and less primary amines. In the poly-EDA spectrum, there is a small peak (1653 cm^{-1}) that can be attributed to the axial deformation of N–H, another peak (1568 cm^{-1}) that can be attributed to the symmetric angular deformation of N–H, and the 1318 cm^{-1} peak that can be attributed to the amine's axial deformation of C–N [42]. Then, the poly-EDA/CNT-COOH spectrum showed a sharp peak at 1647 cm^{-1} that corresponded to the superimposition of the axial deformation of N–H along with the more intense axial deformation of the amide's C=O [43]. It is described that the C=O of the carboxylic acid is evident in the 1730–1700 cm^{-1} region, and the amide can appear in

the 1680–1630 cm^{-1} region; moreover, the small 1434 cm^{-1} peak can be attributed to the amide's axial deformation of C–N [41]. Finally, a few peaks were observed that can be attributed to the CNT-COOH, thus only appearing in the poly-EDA/CNT-COOH spectrum, namely, the 1254 cm^{-1} peak attributed to the scissoring vibration of the aromatic C–H and the 666 cm^{-1} attributed to a mono-substituted aromatic ring [44]. These results confirm the successful activation of the CNT-COOH anchoring to the amines in the poly-EDA film forming an amide linkage.

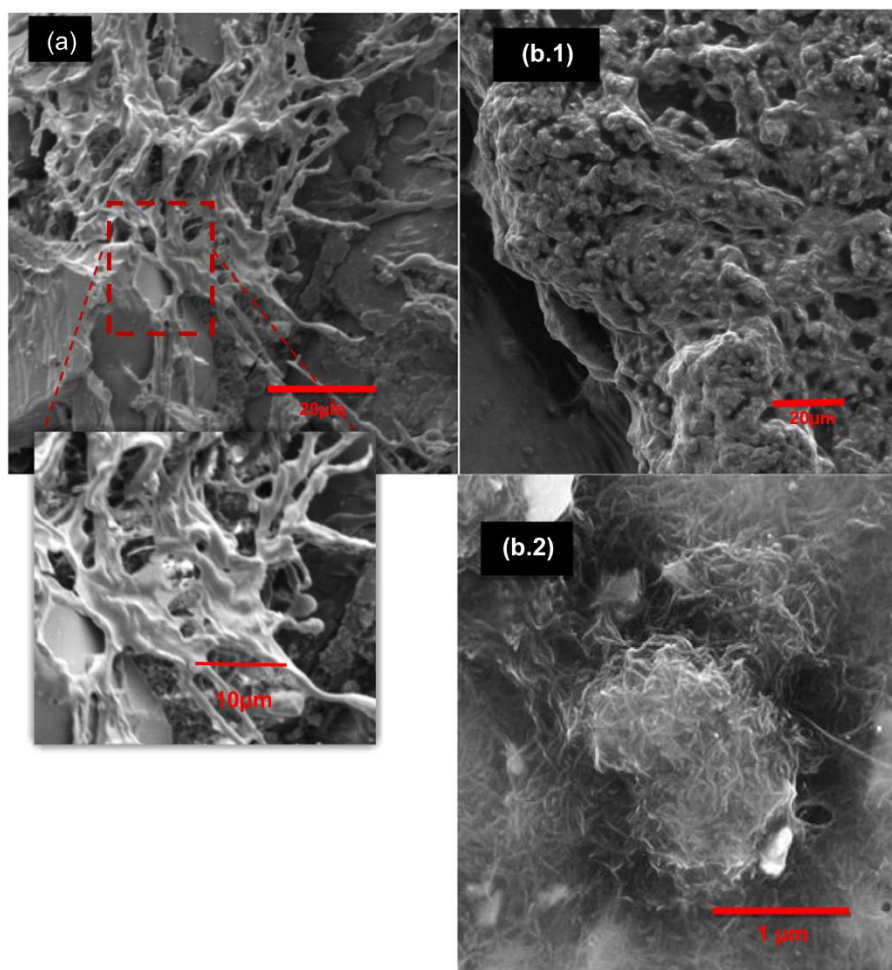
Morphological characterization

Scanning electron micrographs were obtained to study the conformational structures of poly-EDA and CNT-COOH. It is observed that the Au modified with poly-EDA polymer formed a polymer with a linear structure exhibiting a short-branched characteristic (Fig. 4a). The interaction of poly-EDA with CNT-COOH occurred in a really homogeneous way, with a homogeneous film covering all the CNT-COOH (Fig. 4b1 and b2). According to the CV, a significant improvement in the conductivity of the composite films was also observed as previously described in a polyethylenimine/CNT film [45].

Piezoelectric characterization

The QCM system is an excellent tool for studying rigid thin films [46], and was used to evaluate the stability and thickness of the poly-EDA film. Poly-EDA film was electropolymerized on the gold electrode of the quartz crystal,

Fig. 4 Scanning electron micrographs of the (a) poly-EDA and (b1 and b2) CNT-COOH/poly-EDA in different magnitudes



and frequency was taken in PBS buffer with pump flow stopped and compared to the initial time and after 24 h of sample monitoring. After 24 h of monitoring with a sampling frequency of 30 Hz, the frequency values were, respectively, 49.651 ± 5 Hz and 49.692 ± 6 Hz, showing no significant difference (paired *t* test, $p > 0.05$). This stability can be attributed to the formation of short and healthy chains, probably with more linear characteristics.

Taking into account that the thickness of the film can affect the analytical sensitivity due to modifying the electron transfer, thicknesses were studied using five electrodes in the QCM system described. Based on the frequency changes and density of the polymer, the thickness of the poly-EDA film ($t_{\text{poly-EDA}}$) could be calculated from the Δm , then using the poly-EDA density ($\rho_{\text{poly-EDA}}$) of 1.08 g mL^{-1} :

$$t_{\text{poly-EDA}} = \Delta m / \rho_{\text{poly-EDA}}$$

Thus, it was found that the average film thickness obtained was $104 \pm 23 \text{ nm}$ ($n = 5$), indicating a nanoscale film, as

expected. It was observed that the thickness of the poly-EDA films obtained by electropolymerization of triethanolamine increased proportionally to the electropolymerization time, obtaining an optimal at 13 min (0.1 M EDA) [47]; here, the film reached an average thickness of 100 nm in a shorter time, being also very homogeneous, as confirmed by symmetrical and regular peaks of the cyclic voltammograms. On the other hand, the EDA film was more quickly electropolymerized compared to triethanolamine, probably attributed to a shorter chain. Another advantage of electropolymerization compared to chemical synthesis and further drop-casting deposition is related to the reduction in the thickness, resulting in improved electron transfer.

Immobilization of anti-NS1 and blocking of the non-specific bindings

The immobilization of anti-NS1 antibodies was confirmed by the reduction of redox peaks and electroactive area due to the

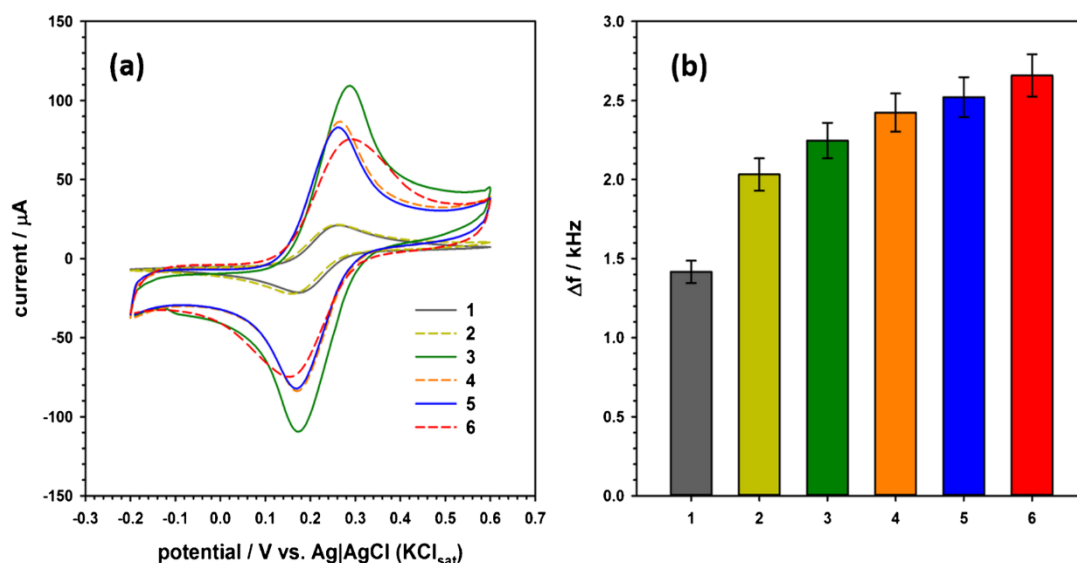


Fig. 5 Stepwise modifications in the immunosensor: (1) bare Eau, (2) poly-EDA/Eau, (3) CNT-COOH/poly-EDA/Eau, (4) anti-NS1/CNT-COOH/poly-EDA/Eau, (5) glycine/anti-NS1/CNT-COOH/poly-EDA/Eau and (6) NS1/anti-NS1/CNT-COOH/poly-EDA/Eau. In (a): cyclic

voltammograms obtained in the presence of $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in 0.1 M KCl ; and (b) Barr plot of the frequency changes in the QCM system measured in PBS

insulating nature of proteins, as seen in Fig. 5a, curve 4. In order to block nonspecific bindings, one aliquot ($2 \mu\text{L}$) of 50 mmol L^{-1} glycine solution was pipetted on the sensor surface. The decrease in redox peaks (curve 5) confirmed the blockage due to its similar insulating nature. Glycine is a very suitable block for biosensors since it has a low molecular weight with only one amino acid, not resulting in a change in the background current when compared to blocking with BSA or casein, commonly used in immunoassays.

Frequency changes in each step were also characterized by a piezoelectric system. Using the EDC/NHS chemistry, the effective anchoring of the CNT-COOH to the poly-EDA was verified by an increase in the shift frequency of the QCM system. Likewise, an increase in frequency shift was observed with successive steps, per the anti-NS1 antibody immobilization, as well as glycine blocking, and after NS1 antigen (100 ng mL^{-1}) response. In all these steps after the film, it is necessary to consider that the mass variation model does not correspond to a linear variation of mass on the electrode surface. It is mainly observed that when the sensor surface is covered by carbon nanotubes and followed by structured 3D proteins, deformations and changes in viscoelasticity occurring in the center of the electrode due to the movement of molecules on the sensor surface can affect the electric dipole of the quartz crystal [46]. Thus, although the model does not obey the Sauerbrey equation (1958) [48], changes in frequency by mass adsorption cannot be compared to the

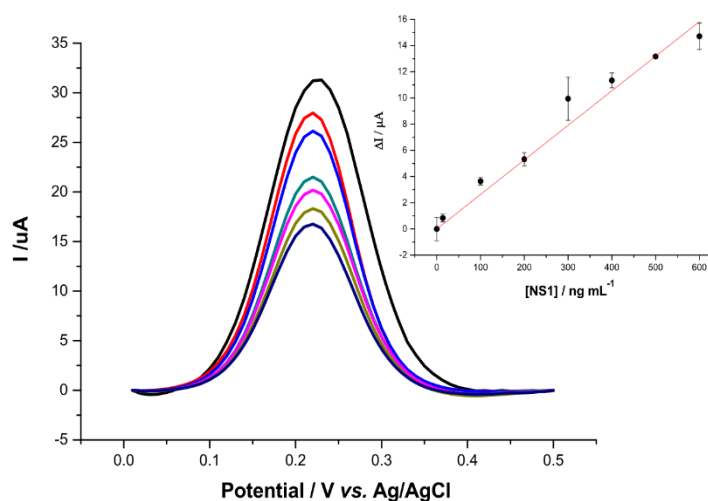
electrochemical technique, even though a gradual increase at each successive step is observed (Fig. 5b).

Analytical curve and interference study

Under optimal conditions, the immunosensor was evaluated in response to the NS1 in PBS, applying DPV as the electrochemical method. The current response was obtained by the difference of amplitude of the DPV cathodic peaks before and after incubation with NS1 prepared in the PBS. The calibration curve of the DPV current peaks was $\Delta i_p (\mu\text{A}) = (1.13 \pm 0.08) [\text{NS1}] (\mu\text{g mL}^{-1}) + (0.23 \pm 0.03)$ for three NS1 standard curves (values of the slope and intercept expressed as the adjusted data for the linear equation showed a coefficient of determination (R^2) of 0.9975, $p < 0.01$, $n = 7$) with a low relative error ($< 1\%$) (Fig. 6a and inset).

Analytical responses were also obtained with the recombinant NS1 spiked serum diluted 1:10 in PBS after successive incubations by DPV (ESM Fig. S3a). The curve obtained resulted in an R^2 of 0.9725 with a linear range between 20 and 800 ng mL^{-1} (ESM Fig. S3b). Based on the relative standard deviation (RSD) of the blank sample and slope of the analytical curve, the limit of detection according to the IUPAC was found at 6.2 ng mL^{-1} , comparable to that reported previously for labeled immunosensors [33, 49], however here with the advantage of practicality and fewer steps required,

Fig. 6 Immunosensor as response to NS1 diluted in PBS. Electrochemical DPV measurements obtained in the presence of $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ in 0.1 M KCl . Inset: analytical curve of the anodic peaks



due to the label-free detection. Impedimetric immunosensors for NS1 were also developed, showing a superior limit of detection [16, 50, 51] and a combination of impedimetric and lateral flow in an electrochemical immunosensor [17]; these works are presented in Table S1 (see ESM). Likewise, here, detection of the NS1 was demonstrated using a simpler effective electrochemical method. It has been reported that NS1 protein is found in circulation in serum at levels up to $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, higher than that found in this study [52]. Thus, the designed immunosensor was able to detect the NS1 at the clinical level in serum, showing ability to distinguish NS1.

Further interference studies encompass typical agents that cause cross-reaction results, such as ascorbic acid present in the human blood, bovine serum albumin used as blocking agent, and human immunoglobulin G. According to the recovery factor (%), the average error found was less than 8% (ESM Table S2). It is noteworthy that the concentrations of studied interferences were higher than or similar to those found in human samples. These satisfactory results can be attributed to the effective glycine blockage that was carried out at a slightly acidic pH (5.5), below the isoelectric point of the glycine, making its amino groups available to block the CNT-COOH free remaining carboxyl moieties.

Real sample analysis

Regarding the selectivity to the NS1, this immunosensor was further investigated by subjecting it to real conditions with human serum samples of ZIKV and DENV from mono-infected patients and using a negative serum against both arboviruses as control. All the samples were previously checked according to the CDC's protocols, and

hemolyzed and hypercholesteremic samples were discarded since they can interfere with the analytical signal. DPV response curves of different electrodes after incubating with the ZIKV, DENV and control diluted in PBS are shown in Fig. 7a, b and c, respectively. According to Fig. 7d, serum samples diluted with PBS up to 1:50 showed significant differences between control and both infected individuals; however, NS1 was detected in ZIKV and DENV sera, as expected. Due to the high structural similarities between the viruses belonging to the *Flaviviridae* family, cross-reactivity is a key concern, primarily in the endemic regions where DENV and ZIKV are present, and the symptoms are also similar [53]. Additionally, there are many asymptomatic individuals. On the other hand, DENV/ZIKV co-infections may also occur [10].

Although RNA of the flavivirus is observed only in the urine of ZIKV-infected patients [10], recent studies have reported that the NS1 nonstructural protein occurs in ZIKV and DENV urine samples [8]. One advantage of urine for a rapid test is the noninvasive sample collection and higher sample volume. Here, a proof of concept was performed measuring NS1 in a spiked urine sample (Fig. 8a). The analytical performance of the immunosensor according to the DPV curves showed significant discrimination between control and NS1-spiked urine for NS1 concentrations up to 20 ng mL^{-1} , which was established as the cutoff (Fig. 8b). These results confirm the possibility of developing an immunosensor for ZIKV and DENV trials by detection of NS1, although more samples need to be tested.

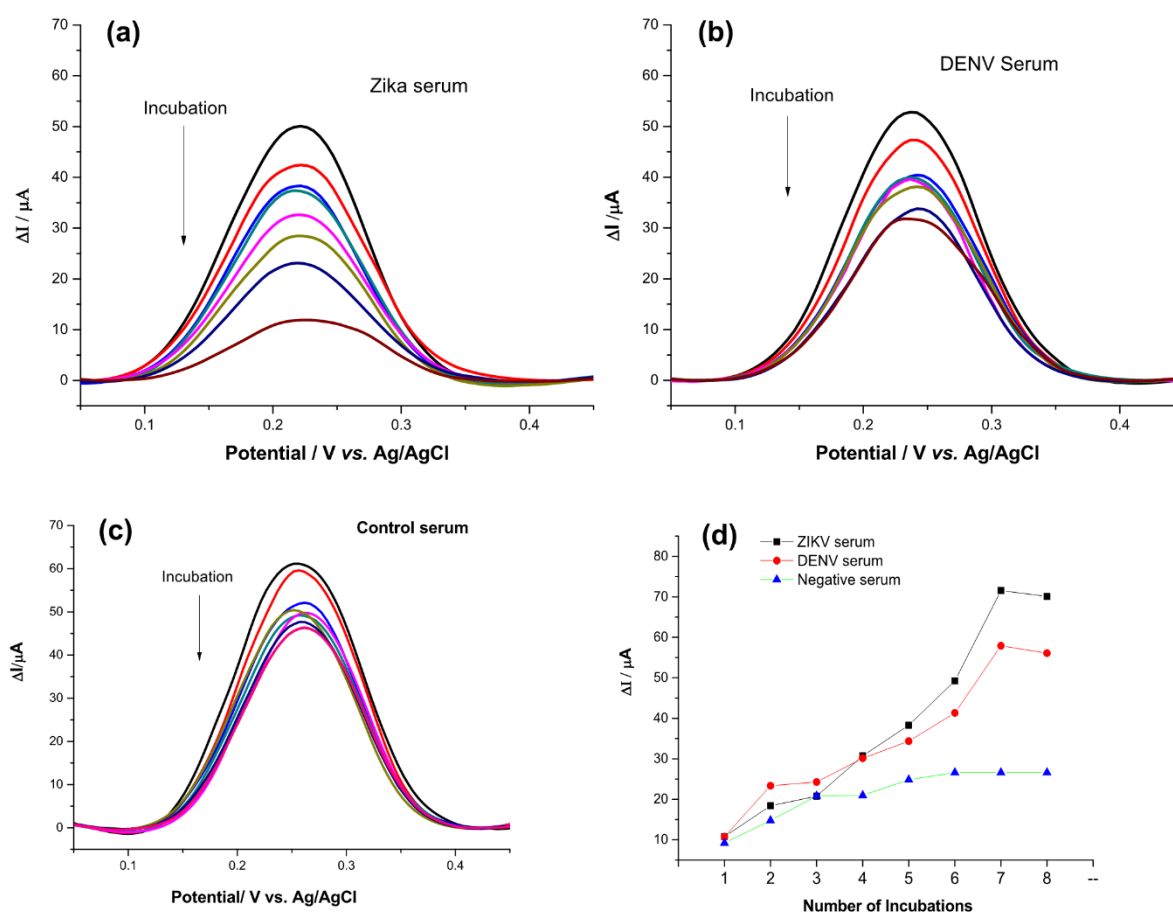


Fig. 7 DPV responses to real serum samples of (a) ZIKV-infected individuals, (b) DENV-infected individuals and (c) healthy individuals. (d) Calibration curves of anodic peaks of the ZIKV-infected, DENV-infected and healthy individuals

Repeatability and reproducibility

Repeatability and reproducibility are important analytical parameters in immunosensor performance. Herein, repeatability was obtained by analyzing ten successive measurements after incubating the electrode with sample serum spiked with 50 ng mL^{-1} of NS1, running an interval of 10 min for each one. The coefficient of variation for measurements of DPV, anodic and cathodic peaks of cyclic voltammograms and square-wave voltammograms are shown in bar plots in ESM Fig. S4a. The RSD values for I_{pa} and I_{pc} were highly similar, with good performance ($\text{RSD} < 5\%$). Reproducibility was assessed using the same techniques as repeatability on eight different electrodes (ESM Fig. S4b). For all the techniques, the RSD was about 5%, indicating the good selectivity of the designed immunosensor.

Conclusions

An immunosensor for NS1 protein detection was successfully developed for analyses in real samples of serum and showed possible used for urine samples. The electropolymerization method was used to synthesize a polymer film using cyclic voltammetry. Electrosynthesis compared with drop-casting enables the growth of films with more controlled thickness, chain lengths and electrochemical stability to result in better conductivity. In this study, poly-EDA film was obtained with nanoscale thickness, as confirmed by the QCM system. SEM images showed a short-branched polymer, implying an effective conductivity, and amine-rich moieties yielded profitable synergism between the CNT-COOH and poly-EDA by amide bonds, promoting a high electron transfer rate and good electrochemical stability. In

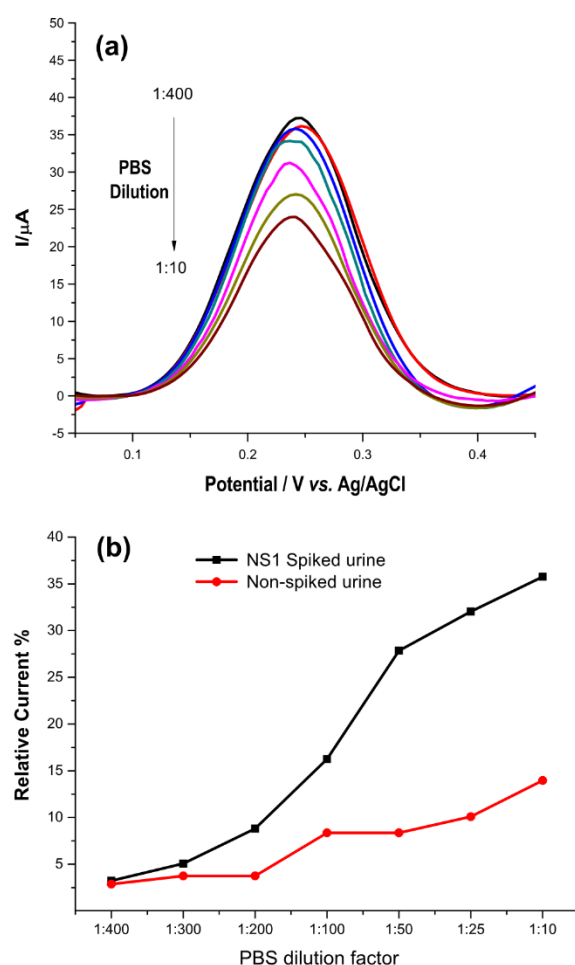


Fig. 8 (a) DPV curves in response to the NS1-spiked urine in different PBS dilutions, and (b) calibration curves of anodic peaks of the NS1-spiked and non-spiked urine samples

optimized conditions, this immunosensor was able to detect the NS1 with discrimination in serum and urine in complex medium, showing this proposed immunosensor has further potential for clinical analysis.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03449-7>.

Acknowledgments This work was supported by Research Brazilian Agency CNPq grant number 440605/2016-4 and CAPES from Brazil, Public Call to Prevent and Combat Zika Virus. Priscila Dias and Lorena Santos had scholarships from CAPES and FACEPE agencies, respectively, of Brazil.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical approval This study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2013. The serum samples used in this study are leftover samples from volunteers that signed the informed consent and authorized the use for research purposes. The study protocol was reviewed and approved by the local Ethics Committee on Human Research at the Instituto Aggeu Magalhães-Fundação Oswaldo Cruz (IAM-FIOCRUZ/Recife/Brazil) (approval ID 28309414.9.0000.5190).

References

1. WHO. Dengue: causas, sintomas, tratamento e prevenção. 2019.
2. Lim SP. Dengue drug discovery: Progress, challenges and outlook. *Antivir Res.* 2019;163:156–78.
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504–7.
4. Alcalá AC, Palomares LA, Ludert JE. Secretion of Nonstructural Protein 1 of Dengue Virus from Infected Mosquito Cells: Facts and Speculations. *J Virol [Internet].* 2018; 92(14): e00275–18.
5. Ahmed NH, Broor S. Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase. *J Vector Borne Dis.* 2014;51(3): 194–9.
6. Lim JK, Lee Y-S, Wilder-Smith A, Thiry G, Mahoney R, Yoon I-K. Points for consideration for dengue vaccine introduction – recommendations by the dengue vaccine initiative. *Expert Rev Vaccines.* 2016;15(4):529–38.
7. Lustig Y, Koren R, Biber A, Zuckerman N, Mendelson E, Schwartz E. Screening and exclusion of Zika virus infection in travellers by an NS1-based ELISA and qRT-PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(12):1687.e7–1687.e11.
8. Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala AMK, Kantele A, Vapalahti O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. *J Clin Virol.* 2014;61(3):353–8.
9. Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. *Can J Microbiol.* 2020;66(2):87–98.
10. Bosch I, De Puig H, Hiley M, Carré-Camps M, Perdomo-Celis F, Narváez CF, et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. *Sci Transl Med [Internet].* 2017 Sep 27 [cited 2021 Jan 25];9(409). Available from: /pmc/articles/PMC6612058/?report=abstract.
11. Musso D, Ko AI, Baud D. Zika virus infection — after the pandemic. *N Engl J Med.* 2019;381(15):1444–57.
12. Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan L, et al. Diagnosis of Zika virus infection by peptide array and ELISA. *MBio.* 2018;9(2):1–16.
13. Borges ED, Vireque AA, Berteli TS, Ferreira CR, Silva AS, Navarro PA. An update on the aspects of Zika virus infection on male reproductive system. Vol. 36, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* Springer New York LLC; 2019. p. 1339–49.
14. Camara AR, Gouvêa PMP, Dias ACMS, Braga AMB, Dutra RF, De Araujo RE, et al. Dengue immunoassay with an LSPR fiber optic sensor. *Opt Express.* 2013;21(22).
15. Darwish NT, Sekaran SD, Alias Y, Khor SM. Immunofluorescence-based biosensor for the determination of dengue virus NS1 in clinical samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;149:591–602.

16. Cecchetto J, Carvalho FC, Santos A, Fernandes FCB, Bueno PR. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. Vol. 213, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015.
17. Sinawang PD, Rai V, Ionescu RE, Marks RS. Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NSI protein. *Biosens Bioelectron*. 2016;77:400–8.
18. Dhal A, Kalyani T, Ghorai S, Sahu NK, Jana SK. Recent development of electrochemical immunosensor for the diagnosis of dengue virus NSI protein: A review. *Sensors Int*. 2020;1:100030.
19. Bajpai OP, Kumar S, Bhandari S, Dhar A, Khastgir D, Chattopadhyay S. Electrolyte and current density determines the fate of electrodeposited polythiophene from waveguide to photovoltaics. *Sol Energy Mater Sol Cells*. 2018;183:107–19.
20. Watanabe T, Ohira M, Koizumi Y, Nishiyama H, Tomita I, Inagi S. In-plane growth of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films on a substrate surface by bipolar Electropolymerization. *ACS Macro Lett* 2018;7(5):551–5.
21. Ferreira PAB, Araujo MCM, Prado CM, de Lima RA, Rodríguez BAG, Dutra RF. An ultrasensitive cystatin C renal failure immunosensor based on a PPY/CNT electrochemical capacitor grafted on interdigitated electrode. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2020;189.
22. Salavagione HJ, Díez-Pascual AM, Lázaro E, Vera S, Gómez-Fatou MA. Chemical sensors based on polymer composites with carbon nanotubes and graphene: the role of the polymer. *J Mater Chem A*. 2014;2(35):14289–328.
23. Mangione MI, Spanevello RA, Minudri D, Cavallo P, Otero L, Fungo F. Electrochemical films deposition and electro-optical properties of bis-carbazol-triphenylamine end-capped dendrimeric polymers. *Electrochim Acta*. 2018;263:585–95.
24. Duan S, Yue R, Huang Y. Polyethylenimine-carbon nanotubes composite as an electrochemical sensing platform for silver nanoparticles. *Talanta*. 2016;160:607–13.
25. Mattos AB, Freitas TA, Kubota LT, Dutra RF. An α -aminobenzoic acid film-based immunoelectrode for detection of the cardiac troponin T in human serum. *Biochem Eng J*. 2013;71.
26. Dias ACMS, Gomes-Filho SLR, Silva MMS, Dutra RF. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NSI protein. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2013 15 [cited 2017 Dec 11];44:216–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566312008895>
27. Lakard S, Herlem G, Lakard B, Fahys B. Theoretical study of the vibrational spectra of polyethylenimine and polypropylenimine. *J Mol Struct {THEOCHEM}*. 2004;685(1–3):83–7.
28. Patois T, Lakard B, Martin N, Fievet P. Effect of various parameters on the conductivity of free standing electrosynthesized polypyrrole films. *Synth Met*. 2010;160(19–20):2180–5.
29. da Fonseca AR, Franco DL, Cordeiro MT, de Oliveira EM, Fireman Dutra RA, Del Pilar Taboada Sotomayor M. Novel electrochemical genosensor for Zika virus based on a poly-(3-amino-4-hydroxybenzoic acid)-modified pencil carbon graphite electrode. *Sensors Actuators, B Chem*. 2019;296.
30. Batchelor-McAuley C, Gonçalves LM, Xiong L, Barros AA, Compton RG. Controlling voltammetric responses by electrode modification; using adsorbed acetone to switch graphite surfaces between adsorptive and diffusive modes. *Chem Commun*. 2010;46(47):9037–9.
31. Gonçalves LM, Batchelor-McAuley C, Barros AA, Compton RG. Electrochemical oxidation of adenine: A mixed adsorption and diffusion response on an edge-plane pyrolytic graphite electrode. *J Phys Chem C*. 2010;114(33):14213–9.
32. Trindade EKG, Silva BVM, Dutra RF. A probeless and label-free electrochemical immunosensor for cystatin C detection based on ferrocene functionalized-graphene platform. *Biosens Bioelectron* 2019;138.
33. Silva MMS, Dias ACMS, Cordeiro MT, Marques E, Goulart MOF, Dutra RF. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NSI protein. *Talanta*. 2014;128:505–10.
34. Chen JH, Li WZ, Wang DZ, Yang SX, Wen JG, Ren ZF. Electrochemical characterization of carbon nanotubes as electrode in electrochemical double-layer capacitors. *Carbon N Y*. 2002;40(8):1193–7.
35. Hoefler M, Bandaru PR. Determination and enhancement of the capacitance contributions in carbon nanotube based electrode systems. 2009 [cited 2018 Dec 12]; Available from: http://maecourses.ucsd.edu/groups/bandaru/Publications_files/APL_paper_capacitancecontributions.pdf
36. Barbosa S, Gozde AB, Lima NF, Batista CL, da Bastos MS, Nicolette VC, et al. Epidemiology of Disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. Rodrigues MM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 28 [cited 2019 Oct 9];8(8):e3109. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003109>
37. Song H, Li T, Han Y, Wang Y, Zhang C, Wang Q. Optimizing the polymerization conditions of conductive polypyrrole. *J Photopolym Sci Technol*. 2016;29(6):803–8.
38. Mundinamani SP, Rabinal MK. Cyclic Voltammetric Studies on the Role of Electrode, Electrode Surface Modification and Electrolyte Solution of an Electrochemical Cell [Internet]. Vol. 7, *IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC)*. 2014 [cited 2019 Jun 2]. Available from: www.iosrjournals.org/www.iosrjournals.org
39. Gomes-Filho SLR, Dias ACMS, Silva MMS, Silva BVM, Dutra RF. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T. *Microchem J* [Internet]. 2013 Jul [cited 2018 May 16];109:10–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X12001518>
40. Trindade EKG, Dutra RF. A label-free and reagentless immunoelectrode for antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) detection. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2019 mar 21];172:272–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30173094>
41. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ, Bryce DL. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Wiley; 2014.
42. Rodríguez MC, Rubianes MD, Rivas GA. Highly selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin at glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine. *J Nanosci Nanotechnol*. 2008;8(11):6003–9.
43. Murugan E, RC Akshata, Stephy A. Electrochemical sensing of anti-cancer drug (capecitabine) by GC-MWCNT-PAMAM (G3)-AuNps electrode. *Adv Mater Proc* 2017;2(3):176–183.
44. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introdução à Espectroscopia*. Cengage; 2015.
45. Zou G, Jain M, Yang H, Zhang Y, Williams D, Jia Q. Recyclable and electrically conducting carbon nanotube composite films. *Nanoscale*. 2010;2(3):418–22.
46. Chen Q, Xu S, Liu Q, Masliyah J, Xu Z. QCM-D study of nanoparticle interactions. Vol. 233, *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V.; 2016. p. 94–114.
47. Rivera-Nieblas JO, Alvarado-Rivera J, Acosta-Enríquez MC, Ochoa-Landin R, Espinoza-Beltrán FJ, Apolinar-Irribé A, et al. resistance and resistivities of pbs thin films using polyethylenimine by chemical bath deposition. Vol. 10, *Chalcogenide Letters*. 2013.
48. Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur W{ä}gung d{ü}nner Schichten und zur Mikrow{ä}gung. *Zeitschrift f{ü}r Phys*. 1959;155(2):206–22.
49. Parkash O, Yean C, Shueb R. Screen Printed Carbon Electrode Based Electrochemical Immunosensor for the Detection of Dengue NSI Antigen. *Diagnostics* [Internet]. 2014 Nov 20 [cited 2021 Feb 2];4(4):165–80. Available from: <http://www.mdpi.com/2075-4418/4/4/165>

50. Nawaz MH, Hayat A, Catanante G, Latif U, Marty JL. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2018 Oct 5 [cited 2021 Feb 4];1026:1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.032>
51. Guzman MG, Harris E. Dengue *Lancet*. 2015;385(9966):453–65.
52. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. [Internet]. Vol. 98, *Antiviral Research*. Elsevier B.V.; 2013 [cited 2021 Jan 24]. p. 192–208. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23523765/>
53. Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ*. 2016;352(February):i657.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary information for

NS1 glycoprotein detecting in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for Dengue and Zika virus

Priscila D. Mendonça^a, Loreнна K.B. Santos^a, Marcos V. Foguel^a, Marco A. B. Rodrigues^b, Marli T. Cordeiro^c, Luís M. Gonçalves^d, Ernesto T. A. Marques^e, Rosa F. Dutra^{a*}

^a*Biomedical Engineering Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

^b*Electronic Department, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

^c*Department of Virology and Experimental Therapy, Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Aggeu Magalhães Institute, Recife, Brazil*

^d*Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo (USP),*

São Paulo, Brazil

^e*University of Pittsburgh, Departments of Infectious Diseases, Graduate School of Public Health,*

Pittsburgh, United States of America.

Corresponding author

Rosa Fireman Dutra

Email: rosa.dutra@ufpe.br

Fig. S1: (a) Effect of poly-EDA polymerization at different scan rates (10mV, 20mV, 30mV, 40mV and 50mV); CV in presence of 5 mmol L⁻¹ K₄ [Fe (CN)₆]⁴⁻ / K₃ [Fe (CN)₆]³⁻ in KCl solution at 0.1mol L⁻¹ (b) Redox peaks of CVs as function of the scan rate (Error bars represent the standard deviation of three replicate data).

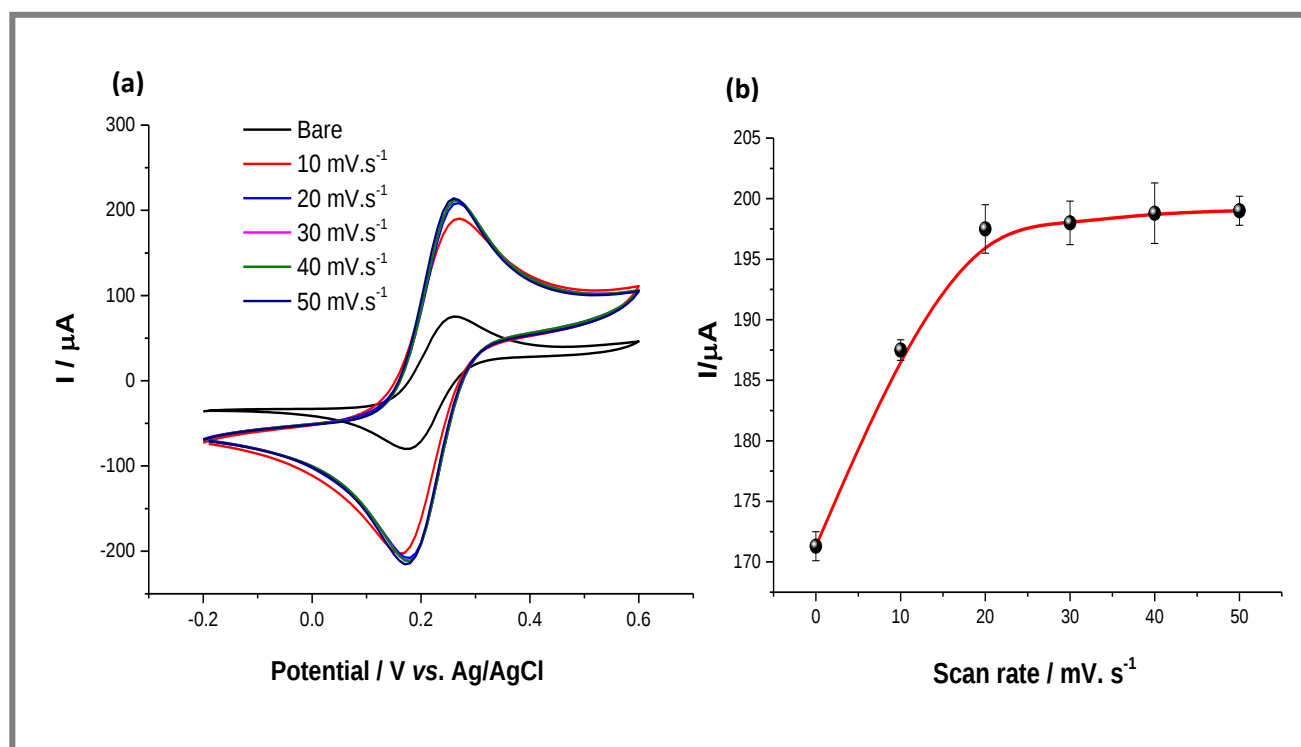


Fig.S2. (a) Cyclic voltammetry of the modified electrode with different concentrations of NTC-COOH. (b) Effect of the NTC-COOH concentrations on the anodic redox peaks of the CVs (Error bars represent the standard deviation of three replicate data).

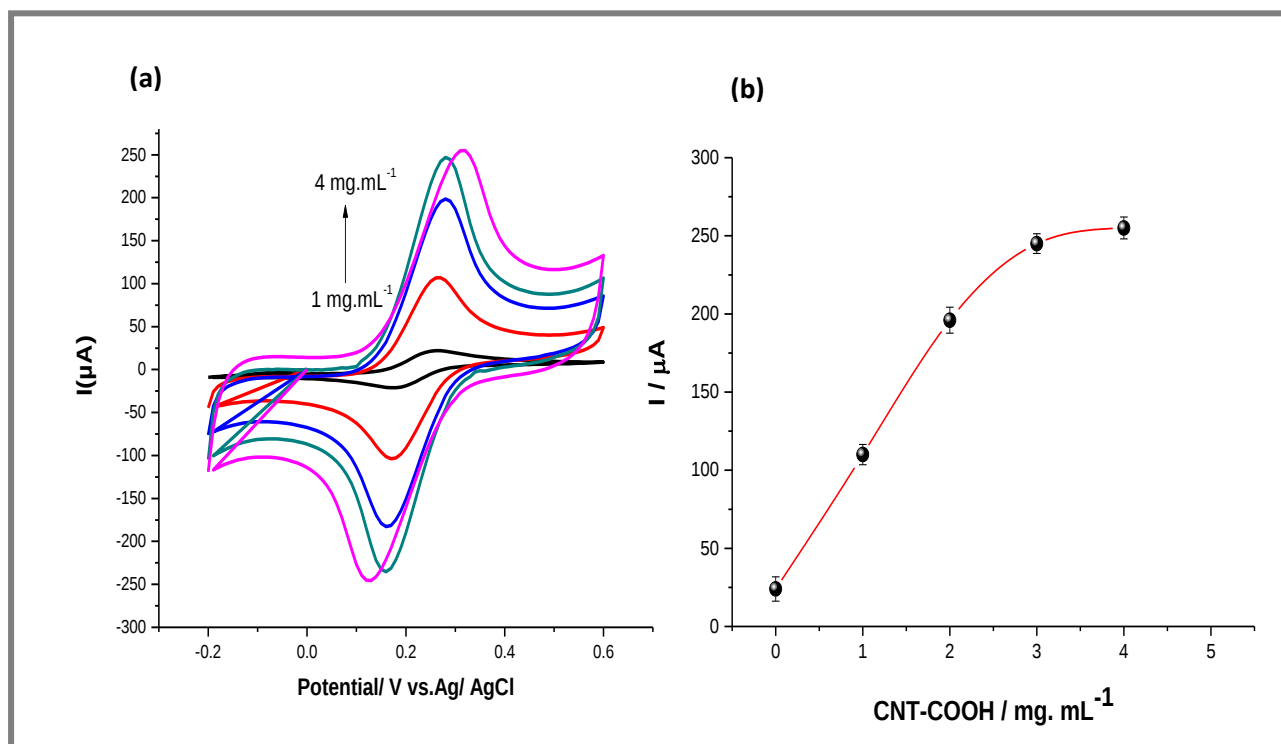


Fig S3 (a) DPV analytical curve of immunosensor in response to different concentrations of the NS1 in PBS diluted. Inset: Linear fit of the current vs. NS1 concentrations. (b) DPV analytical curve of immunosensor in the spiked NS1 serum responses, and (c) Analytical curve of immunosensor in response to spiked and non-spiked NS1 serum. All the DPV measurements were obtained in 5mmolL1 de K3 [Fe(CN)₆]/K₄Fe(CN)₆

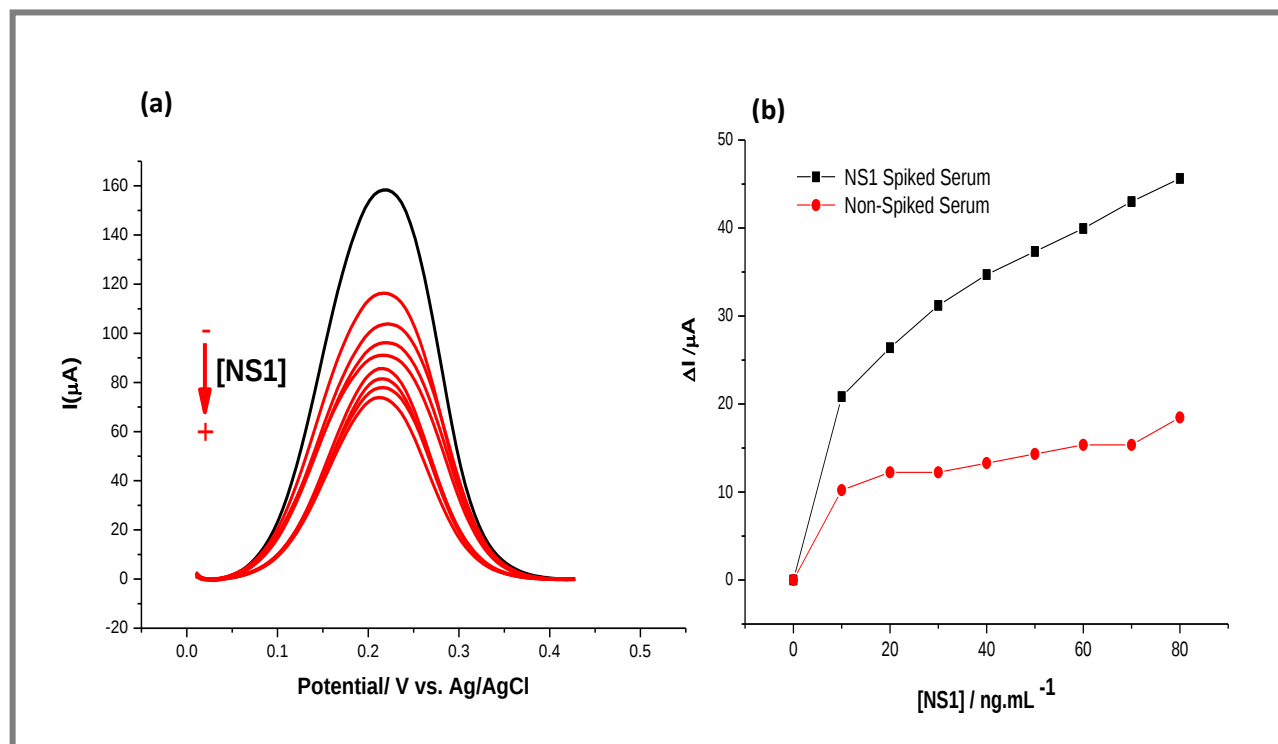


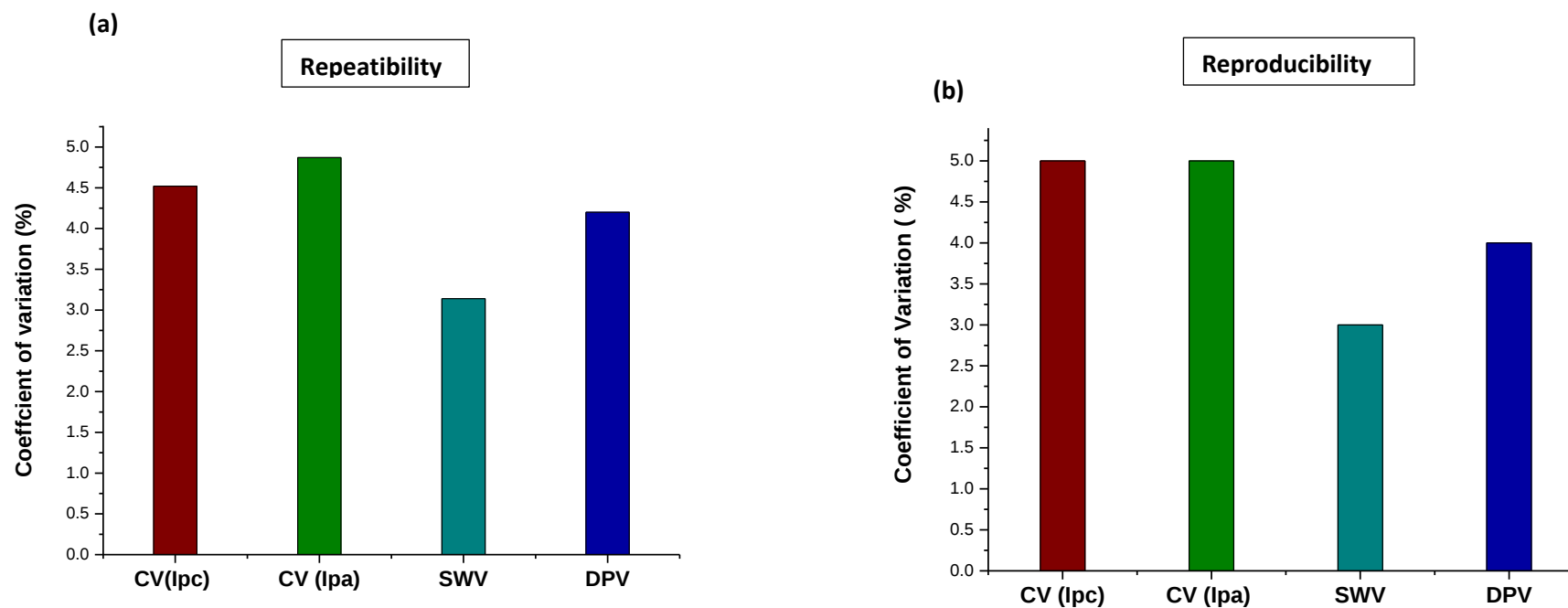
Table S1: Comparison of immunosensor performance of NS1 detection with this immunosensor.

Reference	Transducer Surface	Limit of Detection (ng/mL)	Linear Range (ng/mL)
(Prima Dewi Sinawang et al., 2016)(SINAWANG <i>et al.</i> , 2016)	Impedimetric lateral flow immunoassay	0.5	10-25
(Silva et al., 2015) (SILVA, M.M.S. <i>et al.</i> , 2015)	Poly (allylamine) (PAH) sandwiched NTCs	35	100–2500
(Dias et al., 2013)(DIAS, Ana Carolina M.S. <i>et al.</i> , 2013)	carbon nanotube-ink printed electrode	12	0 - 2000
(Silva et al., 2014)(SILVA, M.M.S. <i>et al.</i> , 2014)	Thiophene-SPE/gold NPs/Protein A	15	40–600
(Darwish et al., 2016)(DARWISH <i>et al.</i> , 2016)	Electrochemical Immunosensor Based on Antibody-Nanoparticle Hybrid	35	5–4000
(Cecchetto et al., 2015)(CECCHETTO <i>et al.</i> , 2015)	Electrochemical impedimetric immunosensor	30	10-1000
	This work	6.2	20-800

Table S2. Recovery (%) obtained in interference contaminants with designed electrochemical immunosensor for NS1 in three replicate measurements.

Interference	Recovery %	Error %
NS1	100.0%	0
5 mM Ascorbic Acid	105.9	5.9
1% BSA	92.4	7.6
0.5 mg/mL IgG	99.4	0.6

Figure S4. Repeatability and reproducibility study of the immunosensor in response to NS1 spiked serum. Coefficient of variation for Repeatability obtained from same electrode at 10 replicates (a); and Reproducibility from 8 different electrodes (B) in measurements of DPV, SWV, CV electrochemical techniques.



References

- AKEY, D. L. *et al.* Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. **Science**, 2014. v. 343, n. 6173, p. 881–885.
- ALCALÁ, A. C.; PALOMARES, L. A.; LUDERT, J. E. Secretion of Nonstructural Protein 1 of Dengue Virus from Infected Mosquito Cells: Facts and Speculations. **Journal of Virology**, maio. 2018. v. 92, n. 14.
- ALCON, S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 2002. v. 40, n. 2, p. 376–381.
- AN ZHOU, Y. F. And R. P. R. Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. **Sensors**, 2019.
- ANALYSIS, C. The Role of Electrochemical Immunosensors in. 2019. p. 1–19.
- ARORA, H. S. A to Z of Zika Virus: A Comprehensive Review for Clinicians. **Global Pediatric Health**, 2020. v. 7.
- BARRETT, A. D.T.; WEAVER, S. C. **Arboviruses: Alphaviruses, flaviviruses and bunyaviruses: Encephalitis; yellow fever; dengue; haemorrhagic fever; miscellaneous tropical fevers; undifferentiated fever**. Eighteenth ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2012.
- BHATT, P. *et al.* **Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. Current Microbiology**.
- BRITO, C. L.; FERREIRA, E. I.; LA-SCALEA, M. A. Multi-walled carbon nanotube functionalization and the dispersing agents study applied for the glassy carbon electrode modification and voltammetric reduction of nitrofurazone. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 2020. v. 24, n. 8, p. 1969–1980.
- BRITO, Carlos Alexandre Antunes DE; CORDEIRO, Marli Tenorio. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: From hypotheses to evidence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2016. v. 49, n. 5, p. 537–543.
- BURDMANN, E. A. Flaviviruses and Kidney Diseases. **Advances in Chronic Kidney Disease**, 2019. v. 26, n. 3, p. 198–206.
- CARPIO, K. L.; BARRETT, Alan D.T. Flavivirus ns1 and its potential in vaccine development. **Vaccines**, 2021. v. 9, n. 6, p. 1–21.
- CDC/WHO. Qrcode_dengue-and-severe-dengue. **Cdc**, 2021. Disponível em: <80.%09www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=gene&acc=4524.>.
- CECCHETTO, J. *et al.* **An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. Sensors and Actuators B: Chemical**. [S.l.]: [s.n.], 2015.
- _____. *et al.* The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, 2017. v. 87, n. August 2016, p. 949–956.
- CHO, I. H.; KIM, D. H.; PARK, S. Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. **Biomaterials Research**, 2020. v. 24, n. 1, p. 1–12.

CHONG, H. Y. *et al.* Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus Research**, 2019a. v. 274, p. 197770.

_____*et al.* Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus Research**, 2019b. v. 274, p. 197770.

CONCEIÇÃO, S.; DINIZ, M. Exames laboratoriais específicos para o diagnóstico de Dengue. para o diagnóstico de Dengue. 2010.

CORDEIRO, Marli 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**, 2016. v. 214, n. 12, p. 1897–1904.

CYNTHIA G. ZOSKI; KEYES, T. E.; FORSTER, R. J. **Handbook of Electrochemistry**. [S.l.]: [s.n.], 2007.

DARWISH, N. T. *et al.* Electrochemical Immunosensor Based on Antibody-Nanoparticle Hybrid for Specific Detection of the Dengue Virus NS1 Biomarker. **Journal of The Electrochemical Society**, jan. 2016. v. 163, n. 3, p. B19–B25.

DIAS, Ana Carolina M.S. *et al.* A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, 2013. v. 44, n. 1, p. 216–221.

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

ELGRISHI, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, 2018. v. 95, n. 2, p. 197–206.

ELTOM, K. *et al.* Dengue Virus Infection in Sub-Saharan Africa Between 2010 and 2020: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 25 maio. 2021. v. 11.

ESPINOZA, E. M. *et al.* Practical Aspects of Cyclic Voltammetry: How to Estimate Reduction Potentials When Irreversibility Prevails. **Journal of The Electrochemical Society**, 2019. v. 166, n. 5, p. H3175–H3187.

FUJIGAYA, T.; NAKASHIMA, N. **Non-covalent polymer wrapping of carbon nanotubes and the role of wrapped polymers as functional dispersants**. *Science and Technology of Advanced Materials*.

GARCÍA, G. *et al.* Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. **International Journal of Infectious Diseases**, 2011. v. 15, n. 1, p. 38–43.

GOURINAT, A. C. *et al.* Detection of zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, 2015. v. 21, n. 1, p. 84–86.

GUPTA, N.; GUPTA, S. M.; SHARMA, S. K. Carbon nanotubes: synthesis, properties and engineering applications. **Carbon Letters**, 2019. v. 29, n. 5, p. 419–447.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, 2016. v. 2, p. 1–26.

- HARAPAN, H. *et al.* Dengue: A minireview. **Viruses**, 2020. v. 12, n. 8, p. 1–35.
- HARDEEP, K.; REEMA, S. A review on major aspects of dengue. **International Journal of pharma and Bio Sciences**, 2019. v. 10, n. 3.
- HARSHAVARDHAN, S. *et al.* Electrical immunosensors. **Bioelectrochemical Interface Engineering**, 2019. v. 1, p. 343–369.
- HARVEY, D. Analytical Chemistry. 2019.
- HOSSEIN, F. An overview of the current medical literature on Zika virus. **Biophysical Reviews**, 2020. v. 12, n. 5, p. 1133–1138.
- KABIR, M. A. *et al.* Dengue detection: Advances in diagnostic tools from conventional technology to point of care. **Biosensors**, 2021. v. 11, n. 7, p. 1–28.
- KAUSHIK, A. *et al.* Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics. **Trends in Biotechnology**, 2017. v. 35, n. 4, p. 308–317.
- KHAN, E. *et al.* The Clinical Features of Co-circulating Dengue Viruses and the Absence of Dengue Hemorrhagic Fever in Pakistan. **Frontiers in Public Health**, 2020. v. 8, n. June, p. 1–10.
- KUMAR, R. P.; , R. SUNITH, A. K.; KUMAR, And V. P. Dengue Fever: A Review Article. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2020. v. 9, n. 1, p. 1502–1510.
- LAI, Y. C. *et al.* Antibodies Against Modified NS1 Wing Domain Peptide Protect Against Dengue Virus Infection. **Scientific Reports**, 2017. v. 7, n. 1, p. 1–15.
- LAMB, L. E. *et al.* Advantage of urine based molecular diagnosis of Zika virus. **International Urology and Nephrology**, 2016. v. 48, n. 12, p. 1961–1966.
- LUSTIG, Y. *et al.* Screening and exclusion of Zika virus infection in travellers by an NS1-based ELISA and qRT-PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, dez. 2020. v. 26, n. 12, p. 1687.e7-1687.e11.
- MENDONÇA, P. D. *et al.* NS1 glycoprotein detection in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for dengue and Zika virus. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2021a. v. 413, n. 19, p. 4873–4885.
- _____. *et al.* NS1 glycoprotein detection in serum and urine as an electrochemical screening immunosensor for dengue and Zika virus. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 21 jun. 2021b. p. 13.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia De Vigilância Em Saúde Ministério Da Saúde**. [S.l.]: [s.n.], 2019.
- MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. **The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker**. **Antiviral Research**. Elsevier B.V.
- MURUGESAN, A.; MANOHARAN, M. **Dengue virus**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019.
- MUSSO, D.; DESPRÈS, P. Serological diagnosis of flavivirus-associated human infections. **Diagnostics**, 2020. v. 10, n. 5, p. 1–13.

NASAR, S.; RASHID, N.; IFTIKHAR, S. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. **Journal of Medical Virology**, 2020. v. 92, n. 8, p. 941–955.

NUNES, P. C. G. *et al.* 30 years of fatal dengue cases in Brazil: A review. **BMC Public Health**, 2019. v. 19, n. 1, p. 1–11.

PACHECO, W. F. *et al.* Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Quimica**, 2013. v. 5, n. 4, p. 516–537.

POSSAS, C. *et al.* Zika puzzle in Brazil: Peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2017. v. 112, n. 5, p. 319–327.

PUERTA-GUARDO, H. *et al.* Zika Virus Nonstructural Protein 1 Disrupts Glycosaminoglycans and Causes Permeability in Developing Human Placentas. **The Journal of infectious diseases**, 2020. v. 221, n. 2, p. 313–324.

RAAFAT, N.; BLACKSELL, S. D.; MAUDE, R. J. A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2019. v. 113, n. 11, p. 653–660.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. **Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein**. **Virology Journal**. BioMed Central Ltd.

REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. **Electrochemical detection techniques in biosensor applications**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019.

RODRIGUEZ, B. A. G. *et al.* Nanomaterials for Advancing the Health Immunosensor. **Biosensors - Micro and Nanoscale Applications**, 2015.

SALLES, T. S. *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review. **Parasites and Vectors**, 2018. v. 11, n. 1, p. 1–12.

SILVA, M.M.S. *et al.* A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. **Talanta**, 2014. v. 128, p. 505–510.

_____*et al.* Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbon nanotube layered immunoelectrode. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2015. v. 90, n. 1.

SINAWANG, P. D. *et al.* Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, 2016. v. 77, p. 400–408.

SRIKIATKHACHORN, A. *et al.* Dengue-how best to classify it. **Clinical Infectious Diseases**, 2011. v. 53, n. 6, p. 563–567.

THEODORIDIS, I.; LAMBROU, G. I. Voltammetry and monoamines determination: An old acquaintance revisited. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, 2019. v. 24, n. 2, p. 231–244.

UGO, P.; MORETTO, L. M. **Electrochemical Immunosensors and Aptasensors. Chemosensors**.

WALIA, S. S.; ARIF, M. A.; LIAQAT, J. **Clinical manifestations and laboratory diagnosis**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019.

WANG, C. *et al.* **Endocytosis of flavivirus NS1 is required for NS1-mediated endothelial hyperpermeability and is abolished by a single N-glycosylation site mutation**. [S.l.]: [s.n.], 2019. V. 15.

WANG, W. *et al.* ScienceDirect Dengue hemorrhagic fever e A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis , prevention and control. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2020. n. xxxx.

WICKRAMATHILAKA, M. P.; TAO, B. Y. Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates. **Journal of Biological Engineering**, 2019. v. 13, n. 1, p. 8–17.

WILDER-SMITH, A. *et al.* Dengue. **The Lancet**, 2019. v. 393, n. 10169, p. 350–363.
YELLAMPALLI, S. **Carbon Nanotubes - Polymer Nanocomposites**. [S.l.]: [s.n.], 2012.

ANEXO A (Outro trabalho desenvolvido durante o doutorado)



Article

A Redox-Probe-Free Immunosensor Based on Electrocatalytic Prussian Blue Nanostructured Film One-Step-Prepared for Zika Virus Diagnosis

Lorena K. B. Santos ¹, Priscila D. Mendonça ¹, LiLian K. S. Assis ¹ , Carlos R. Prudêncio ² ,
Maria Izabel F. Guedes ³, Ernesto T. A. Marques ⁴ and Rosa Fireman Dutra ^{1,*}

¹ Biomedical Engineering Laboratory, Department of Biomedical Engineering, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, Recife 50670-90, Brazil

² Immunology Center, Institute Adolfo Lutz, São Paulo 01246-902, Brazil

³ Human Biochemistry Laboratory, University of Ceará, Fortaleza 60714-903, Brazil

⁴ Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15261, USA

* Correspondence: rosa.dutra@ufpe.br; Tel.: +55-81-2126-8205



Citation: Santos, L.K.B.; Mendonça, P.D.; Assis, L.K.S.; Prudêncio, C.R.; Guedes, M.I.F.; Marques, E.T.A.; Dutra, R.F. A Redox-Probe-Free Immunosensor Based on Electrocatalytic Prussian Blue Nanostructured Film One-Step-Prepared for Zika Virus Diagnosis. *Biosensors* **2022**, *12*, 623. <https://doi.org/10.3390/bios12080623>

Received: 10 June 2022

Accepted: 29 July 2022

Published: 10 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The Zika virus (ZIKV) is a great concern for global health due to its high transmission, including disseminating through blood, saliva, urine, semen and vertical transmission. In some cases, ZIKV has been associated with microcephaly, neurological disorders, and Guillain-Barré syndrome. There is no vaccine, and controlling the disease is a challenge, especially with the co-circulation of the Dengue virus, which causes a severe cross-reaction due to the similarity between the two arboviruses. Considering that electrochemical immunosensors are well-established, sensitive, and practical tools for diagnosis, in this study we developed a sensor platform with intrinsic redox activity that facilitates measurement readouts. Prussian blue (PB) has a great ability to form electrocatalytic surfaces, dispensing redox probe solutions in voltammetric measurements. Herein, PB was incorporated into a chitosan-carbon nanotube hybrid, forming a nanocomposite that was drop-casted on a screen-printed electrode (SPE). The immunosensor detected the envelope protein of ZIKV in a linear range of 0.25 to 1.75 µg/mL ($n = 8$, $p < 0.01$), with a 0.20 µg/mL limit of detection. The developed immunosensor represents a new method for electrochemical measurements without additional redox probe solutions, and it is feasible for application in point-of-care diagnosis.

Keywords: Zika virus; immunosensor; Prussian blue; envelope protein; point-of-care diagnosis

1. Introduction

The Zika virus (ZIKV) is considered endemic and an emerging disease of great concern for health services, due to its high transmission rates in the tropical regions of Africa, America, and Asia [1]. In addition to vector transmission by mosquitoes of the *Aedes* genus and other arthropods, ZIKV can be transmitted by sexual intercourse, blood transfusion, saliva, urine, and vertical transmission, which makes controlling its spread more difficult [2]. ZIKV infection is a self-limiting disease; although in most cases it ranges from being asymptomatic to presenting mild symptoms such as fever, joint pain, headache, malaise, and rashes, it can also develop into a severe form [3]. In 2016, during a large outbreak in America, especially in northeastern Brazil, the correlation between the potential mechanism of severe congenital microcephaly and malformations in infants was confirmed [4,5]. Additionally, records of spontaneous abortions and decreased male fertility have also been associated with ZIKV infection [6,7].

Currently, the gold standard for ZIKV diagnosis is the molecular method, whereby the viral RNA is detected using the reverse transcription technique (PCR) [8]. However, molecular tests have seen limited use in several endemic countries due to the high cost of analysis and require skilled laboratory staff for sample preparation and result managements [9].

Furthermore, molecular tests are suitable only in the acute stage, when the replication phase of the virion is still highly active [1]. After the viremic period, serological assays to detect antibodies or virion proteins of ZIKV are more appropriate. ZIKV is a member of the *Flaviviridae* family, with a positive-sense RNA genome codifying seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) and three structural proteins, which are cleaved into the capsid (C), envelope (E), and precursor membrane (prM) [10]. The serological detection of ZIKV can identify any of these proteins or antibodies from the humoral response. However, in many countries, multiple viruses are in co-circulation, including Dengue, Zika, Yellow Fever, and West Nile. It is challenging to eliminate the cross-reactivity among these viruses due to their similarities, especially to distinguish Dengue and Zika [11,12]. Recently, the ZIKV E protein has been identified as a good biomarker for ZIKV since it is the largest of the virion and is involved in many aspects of the viral cycle, including membrane fusion and binding mediation, which makes it an optimal choice for serological diagnosis [1]. The ZIKV E protein stands out among the structural proteins, as it offers greater power to differentiate between ZIKV and other flaviviruses [13].

Immunochromatographic tests (ICTs) have been identified as an attractive tool for rapid diagnosis, especially during outbreaks, as was evidenced recently in the Coronavirus pandemic beginning in March 2020 [14]. ICTs have the advantage of producing results quickly (within approximately 15–30 min), and most can be used as a point-of care test with greater usability. ICTs have become popular and are distributed in many countries, facilitating rapid disease management and intervention and helping countries with limited or poor resources [15,16]. Nowadays, several ZIKV tests using chromatography technology are commercially available, such as the Chembio DPP Zika IgM system (DPP Zika ICA; Chembio, Medford, NY, USA) and others that detect antigens or antibodies in blood and saliva [17]. Although ICTs have many advantages, they are limited in terms of sensitivity compared to laboratory immunoassays that perform detection using enzymatic reactions (ELISA) or electrochemiluminescence (ECLIA); in addition, these analyzers can provide quantitative results, and their sensitivity and specificity are higher than those of ICT-based devices. However, they also have several disadvantages, such as high infrastructure costs, additional steps for sample processing, the longer time required to obtain results, and the need for sophisticated equipment that substantially increases the cost per test, restricting their use in ZIKV-endemic areas and their distribution in places with limited resources. In contrast, immunosensors based on nanomaterials can mitigate all these drawbacks [18] while achieving the same sensitivity as ELISA immunoanalyzers, and they have the advantage of being a portable technology, thus facilitating therapeutic management.

In recent years, several immunosensors for ZIKV have been developed with optical [19,20] and acoustic mechanisms, using multimode interference waveguides [21] and electrochemical transduction [17,22]. Although notable advances in immunosensor technologies have been observed, certain challenges and drawbacks still need to be overcome for their application in clinical practice, such as the many steps required and their unsuitability for practical use. In this study, we designed a redox-free electrochemical sensor by exploring Prussian blue (PB) as a stable electroactive species intrinsically immobilized on the sensor surface. Species derived from the oxidation of PB are capable of generating a faradaic current response, creating a diffusional charge flow at the sensor surface. Based on our previous studies and those of other authors using active redox surfaces [22–24], this new design provides faster responses, a simpler readout system, and fewer steps to avoid passivation on the sensor surface and minimize false responses. PB is a chemically recognized compound that promotes redox reactions in a reversible way [25]. It has been denoted as an “artificial peroxidase”, since it is a chemical with high catalytic activity. However, if PB is simply adsorbed onto the sensor surface, a loss of reversibility can easily occur, as this chemical is sensitive to cyclic potential variations or even simple changes in pH [26]. One strategy is its incorporation into compatible polymers that allow anchoring and stability.

Chitosan (CHI) is a cationic polysaccharide rich in amine groups that allow the stable immobilization of proteins by amide bonds [27,28]. Herein, CHI was used to disperse

carboxylated carbon nanotubes (CNT) to form a nanocomposite, CHI–CNTs@PB. The nanostructured film on the SPE was obtained by drop-casting in a single step, facilitating scale-up. Different concentrations of PB were evaluated to obtain a thin film with good conductivity. The ZIKV E protein was detected by the reduction of the faradaic current without an additional redox probe solution in the electrochemical procedure, such as the well-known potassium ferri/ferrocyanide.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Materials

Iron (III)-ferrocyanide-Fe₄ (Fe (CN)₆)₃ (PB), chitosan (CHI), glycine, potassium ferricyanide (K₃ (Fe (CN)₆)), and potassium ferrocyanide (K₄ (Fe (CN)₆)) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Recombinant ZIKV E protein and anti-ZIKV E protein antibodies were acquired from EastCoast Bio (North Berwick, UK). The ZIKV Vero E6 tissue culture antigen was acquired from Bei Resources (Manassas, VA, USA). Multi-walled carbon nanotubes (CNTs) and screen-printed electrodes (SPEs) were obtained from Dropsens (Oviedo, Spain). Tris Hydrochloride buffer (Tris-HCl) (100 mmol·L^{−1}, pH 6.5) was used in the blocking solution containing glycine (100 mmol·L^{−1}). Phosphate buffer saline (PBS) (100 mmol·L^{−1}, pH 7.4) was used in all experiments to dilute the samples. All other chemicals used were of analytical grade, and solutions were prepared in ultra-pure water acquired from a MilliQ station (USA) and had resistivity below 18 MΩ cm^{−1}.

2.2. Native and Recombinant ZIKV Antigen Spiked Serum Samples

A serum pool was prepared by mixing seven serum samples obtained from volunteers collected by venipuncture. Blood samples (4 mL) were collected in a dry tube (vacutainer) and subjected to centrifugation at 2000 × *g* for 20 min to obtain the serum. All serum samples were freshly processed within 2 h of collection. Lipemic and hemolyzed sera were discarded to avoid false responses. Serum samples were previously confirmed to be negative for ZIKV by molecular diagnostics RT-PCR and IgM ELISA following the assay protocol of the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC). All participating volunteers were duly informed, and the protocols were approved by the CPqAM/FIOCRUZ Ethics Committee (protocol number 63441516.6.0000.5190).

To evaluate the analytical responses, the electrode was subjected to the ZIKV E recombinant protein as well as the native antigen extracted from the viral culture. First, antigens were diluted in PBS (100 mmol·L^{−1}, pH 7.4), and afterward, the pools of serum were 1:4 diluted in PBS that had previously been spiked with the respective analytes. Control samples (unspiked pool of serum) were obtained under the same conditions, except Vero-E6 cells without the virus were used.

2.3. Electrochemical Measurements

Electrochemical measurements were performed in the Autolab potentiostat/galvanostat model PGSTAT204 from Eco Chemie (Utrecht, The Netherlands), interfaced to the PC system and controlled by Nova 2.1.1 software. Carbon ink SPEs (DRP-C110) were purchased from Dropsens (Spain). The diameter of the working electrode was 4 mm, allowing micro-volume samples. The measurements were performed at room temperature (~24 °C) by pipetting 25 µL of the sample volume on the screen-printed electrode, which was interfaced to the potentiostat by a DSC cable connector (Dropsens, Spain).

Electrochemical characterizations of the surface electrode modifications were performed by cyclic voltammetry (CV) in a window potential between −0.4 and 0.6 V with a scan rate of 50 mV·s^{−1}, applying a pre-treatment of 5 s at −0.3 V potential to stabilize the residual current. Analytical responses were also evaluated by CV under the same conditions and measured by the anodic current peaks with blank subtraction (before sample incubations). Characterizations and analytical responses, unless stated otherwise, were measured in the presence of KCl (100 mmol·L^{−1}) as the supporting electrolyte. All statisti-

cal analyses and graphs were processed using OriginPro version 9.0 software (OriginLab Co., Northampton, MA, USA).

Before chemical modifications for antibody immobilization, screen-printed electrodes (SPE) were cleaned in ethanol and ultra-pure water. After cleaning, they were electrochemically pre-treated using a cyclic voltammetry procedure, in which the SPEs were subjected to a potential window between -1.8 and 1.8 V at a scan rate of $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ in the presence of $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl solution.

2.4. Structural and Morphological Analyses

For morphological characterizations, micrographs were obtained by scanning electron microscopy (SEM) using an AURIGA model with crossbeam scanning (Zeiss, Jena, Germany). The microscope contained a field emission gun (FEG) electron column and a focused ion column (FIB) that provided better image quality compared to the traditional filament sources. MEV was operated at a potential of $0.1\text{--}30$ kV and a resolution of 1 nm at 15 kV . Samples were deposited onto stubs and secured with glassy carbon tape. Before obtaining the images, the stubs containing the samples were metallized for a period of 90 s using a sputtering coater (model Q15OR PLUS, Quorum Technologies LTD, Lewes, UK). The resolutions of 200 nm and $1 \mu\text{m}$ were chosen to obtain the images.

2.5. Synthesis of the CHI-CNT@PB Nanocomposite

The preparation of the CHI-CNT@PB nanocomposite solution was carried out through the mixture of solutions A and B. Solution A was prepared by adding 3 mg CHI to 3 mg CNTs, dissolved in 2 mL acetic acid ($2.5\% \text{ w/v}$), and homogenizing in an ultrasound bath for 1 h at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$). Solution B was obtained by dispersing 12 mg PB in 1 mL of $2.5\% \text{ (v/v)}$ acetic acid and subjecting the mixture to an ultrasound bath for 1 h at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$). The final mixture was obtained by adding solution A to solution B, resulting in a total volume of 3 mL . This mixture was subjected to an ultrasound bath for 1 h at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$), thus forming the CHI-CNT@PB nanocomposite with final concentrations of $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CHI, $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CNTs, and $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ PB.

2.6. Assembly of the CHI-CNT@PB Nanoelectrode SPE

Before assembling the CHI-CNT@PB nanocomposite film, SPEs were cleaned using a cyclic voltammetry procedure, in which the SPEs were subjected to a potential window between -2.0 and 2.0 V at an $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ scan rate in the presence of the $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl solution; this was followed by rinsing with ultra-pure water and air-drying at room temperature ($\sim 24^\circ\text{C}$). Then, $7.5 \mu\text{L}$ of the prepared CHI-CNT@PB nanocomposite solution was pipetted onto the SPE working surface, and the modified SPE was subjected to oven-drying at 50°C for 10 min . Four layers were drop-casted using a total volume of $10 \mu\text{L}$ nanocomposite per electrode (Figure 1a).

2.7. Immobilization of Anti-ZIKV E and Immunoassay

First, an aliquot of $5 \mu\text{L}$ of anti-ZIKV E protein solution at $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration prepared in PBS ($\text{pH } 7.4$) was deposited on the working SPE surface and incubated in a moist chamber for 1 h at 60°C . Afterward, a blocking solution, formed from glycine ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) prepared in Tris-HCl ($\text{pH } 6.5$), was pipetted onto the working SPE surface and incubated for 2 h . Finally, the immunosensor was washed in PBS at $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and stored in a refrigerator ($\sim 8^\circ\text{C}$) until use.

Analytical responses were obtained by incubating the Env ZIKV ($0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the surface of the SPE for 20 min for each measurement. Before measurements, the electrodes were immersed for 10 s in a beaker containing 10 mL of PBS with medium agitation. The immunosensor preparation step is illustrated in detail in Figure 1b.

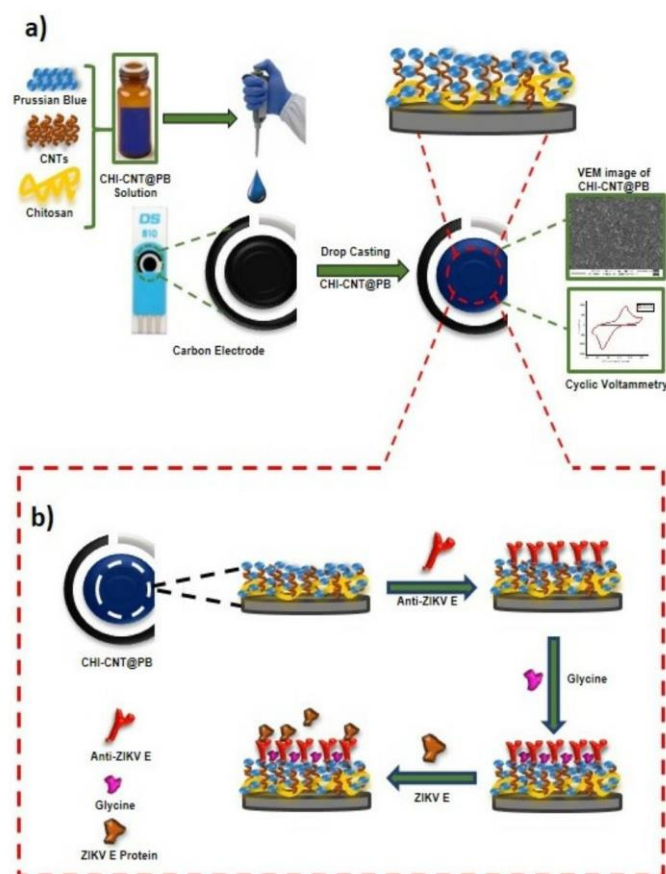


Figure 1. Diagram of the ZIKV immunosensor: (a) steps performed in the synthesis of the nanostructured electrode and (b) process of immobilization of the anti-ZIKV E protein and immunoassay.

3. Results and Discussion

3.1. CHI-CNT@PB Nanocomposite

3.1.1. Synthesis and Optimization of Experimental Conditions

PB has been widely used in the development of electrochemical biosensors due to its catalytic activity. However, in most cases, PB and its derivatives are unstable when subjected to cyclic voltammetry, potential variations, and pH changes—parameters that compromise the diagnostic sensitivity and specificity of biosensors. The search for alternatives to improve PB stability without damaging its electrocatalytic properties has been previously described [24,29]. In this study, a CHI polymer was used due to its well-known biocompatibility and ability to immobilize biomolecules with amine groups. Additionally, CHI can confer increased stability to films aggregating on anionic surfaces and thus can easily bind to PB [30]. Although CHI is considered a non-conductive polymer, it can improve electron transfer when incorporated into materials with good electrical conductivity;

however, its use in the construction of nanocomposites must be considered carefully so that it provides stability without a significant decrease in the electrical signal [31–33].

Cyclic voltammetry (CV) is an electrochemical method widely applied in studies for understanding electron transfer processes. In this study, the electrocatalytic activity of the CHI–CNT@PB film component was verified by the presence of redox peaks in measurements with 100 mmol·L^{−1} KCl as an electrolyte support (Figure 2). The electrocatalytic activity of PB in the CHI–CNT@PB film was evaluated by comparing it with the following control experiments: (a) CHI + CNT, (b) CHI + PB, (c) CNT + PB, and (d) CHI–CNT@PB. The redox activity of PB was confirmed in curves (c) and (d) of Figure 2 by the presence of redox peaks. Although PB was present in curve (b), redox peaks were not observed. This was attributed to the CHI + PB being synthesized in a gel with insulating properties, since it was not evidenced in the PB current peaks [34]. The formation of anodic and cathodic peaks was observed in curve (c) at the potentials of 0.36 V and −0.15 V, respectively, which was attributed to the redox processes resulting from the CNT–PB interactions with a remarkable electrocatalytic effect [35]. There was also a great increase in the electroactive area; however, the composite drop-casted on the electrode surface showed instability when subjected to successive CVs, suggesting that the polymers promoted greater stability in the nanocomposite.

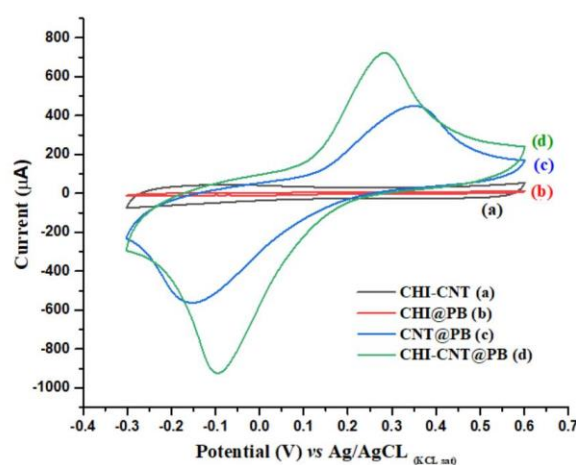


Figure 2. Cyclic voltammograms at 0.1 V·s^{−1} scan rate with different film compositions: (a) CHI–CNT, (b) CHI–PB, (c) CNT–PB, and (d) CHI–CNT@PB. Measurements were performed in the presence of KCl (100 mmol·L^{−1}) at a 0.05 V·s^{−1} scan rate.

Films containing CNTs produced by polymers have shown good stability in the construction of biosensor platforms [36]. Here, CNT was incorporated with CHI, by using a CNT–CHI/PB film, which demonstrated anodic and cathodic peaks at the 0.3 V and −0.1 V potentials, respectively (curve d), representing an increase of approximately 53 % in the electroactive surface area (cm²) compared to CNT–PB without CHI. This increase in the electroactive area of the CNT–CHI/PB was determined by CVs according to the Randles–Sevcik equation:

$$I_p = (2.687 \times 10^5) n^{(3/2)} A C_0 (D \cdot \nu)^{(1/2)} \quad (1)$$

where I_p is the current peak, n is the number of electrons transferred, A is the electrode area (cm²), C_0 is the molar concentration of the redox species (mol·cm^{−3}), D is the diffusion

coefficient of PB, and v is the scan rate ($V \cdot s^{-1}$). According to Equation (1), the current peak is directly proportional to the concentration, and its increase is related to the scan rate [37,38]. Conversely, the CNT–PB film without the presence of CHI did not produce peaks. It is believed that this significant increase in the electroactive area was due to the CHI–CNT@PB synthesis process, in which the PB catalytic sites were more exposed to the nanocomposite surface compared to the mixture of all components simultaneously. In this case, the CNTs were first dispersed in the CHI solution, and afterward, the PB was added. This conductivity increase was also attributed to the strong interaction between the cationic groups of the CHI and the PB, which present opposite charges, resulting in a synergistic effect. The cationic groups of the CHI, when undergoing oxidation–reduction at their respective potentials, transfer ionic species that help restore the redox processes of the BP, guaranteeing its good reversibility. This was confirmed by the redox peaks in the CVs of the CHI–CNT@PB film at -0.1 and 0.27 V for the cathodic and anodic potentials, respectively (Figure S1). The stability of the electrocatalytic nanocomposite on the electrode surface was evaluated by subjecting the modified electrode to 30 successive CVs. The coefficient of variation of the anodic and cathodic current peak amplitudes were 2% and 3%, respectively, indicating a good performance ($CV < 5\%$).

A study of the optimal concentration of PB for generating faradaic currents was conducted (Figure 3). Significant growth was observed in the redox peak pairs with an increase in the concentration of PB, reaching the maximum value at the concentration of $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (inset Figure 4). This increase was attributed to the synergistic effect between the CHI–CNT–PB components, since the carboxylic groups present in CNTs are electrostatically attracted by the amine groups present in CHI that are bound to the PB. The investigation of the optimal PB concentration in the nanocomposite showed that at a concentration above $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the peak currents were reduced; this suggested that higher concentrations exceeded the number of available binding sites, causing excess PB to detach from the film, thus reducing the electrocatalytic activity and stability. These materials were dispersed in an acidic medium, since PB contains ions that are more easily hydrolyzed in a neutral medium, to stabilize the chemical bonds between the compounds [39].

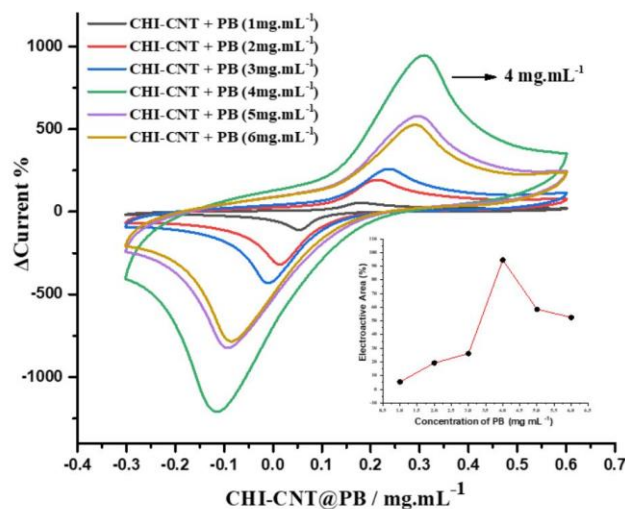


Figure 3. CV profiles according to the PB concentration (inset: electroactive area as function of different PB concentrations). Measurements performed in $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl at $0.05 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ scan rate.

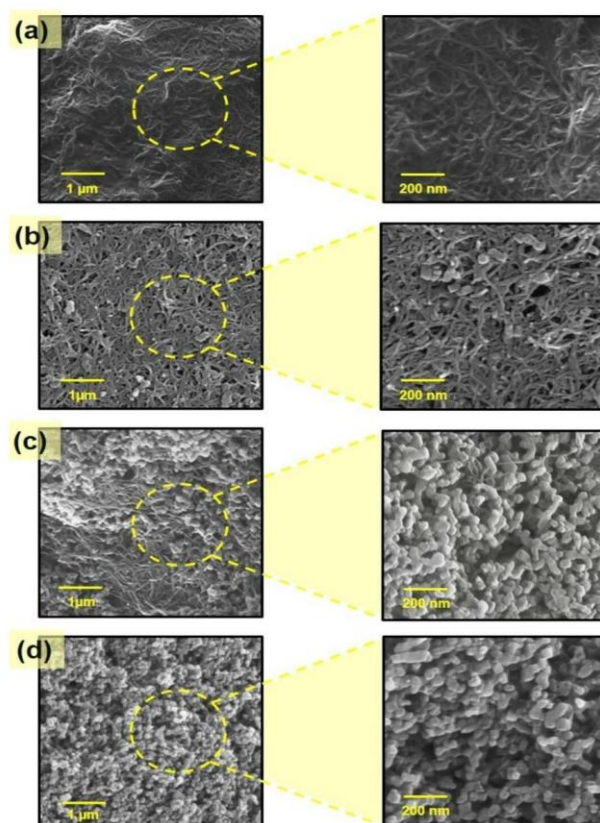


Figure 4. SEM micrographs of the following: (a) CHI-CNT, (b) CHI-CNT@PB, (c) CNT-PB, (d) CHI-PB.

3.1.2. Morphological Characterization

Scanning electron microscopy was performed to study the conformational structures of the CNT-PB, CHI-CNT, CHI-PB, and CHI-CNT@PB films (Figure 4). PB is a porous and inorganic material formed by iron and hexacyanoferrate bridges. It demonstrates high redox activity, reversible electron transfer behavior, and excellent electrocatalytic activity. These characteristics make its use convenient and promising for the development of sensor platforms [29]. Figure 4a shows the morphology of the CHI-CNT film, formed of tubular structures compatible with the CNTs covered by the CHI polymer, which appeared on a cohesive and dense base. Yu et al. (2020) reported that the binding of CNTs to CHI occurs through adsorption by the carboxyl groups of the CNTs to the amine groups of the CHI. Although a uniform nanocomposite was observed, forming a homogeneous film with a greater surface area at the expense of the nanomaterial, the insulating nature of the CHI was predominant and therefore reduced the electrocatalytic activity [40]. To promote electrocatalytic activity by the adsorption of a redox species to the film, PB was added to the CHI-CNT film, and the synthesis was carried out in two ways, either by mixing the three

compounds simultaneously or by adding the PB after the dispersion of the compounds. CNTs were added to the CHI, and the mixture was subjected to an ultrasound bath. In the latter synthesis method, a greater increase in redox peaks was observed in the CVs, probably due to the greater exposure of the PB, which was bound to the cationic polymer of the CHI by the anions of hexacyanoferrate (II). Figure 4b shows the CHI-CNT@PB film, demonstrating that the PB was more superficially and clearly immobilized on the CHI-CNT film than on the other structures. BP is characterized by cluster structures of a cubic nature, as shown in detail in Figure 5b. As illustrated in Figure 4c, when CHI was not present, PB seemed to dissociate from the CNTs, presenting heterogeneous complexes of isolated structures. Such dissociation corroborates the findings of the CVs, which showed the electrocatalytic activity with prominent redox peaks [41]; however, this film did not demonstrate electrochemical stability when subjected to the same conditions and number of cycles as the CHI-CNT@PB films. According to Figure 4d, when analyzing the CHI-PB composite, the film morphology showed an aggregated appearance with small particles. This porosity was due to the interaction between the cationic chains of the chitosan and the Fe anionic ions of the PB.

3.1.3. Study of Electrochemical Kinetic Properties

Figure 5a presents the CV profiles corresponding to the modified SPE with the CHI-CNT@PB nanocomposite submitted to different scan rates, ranging from $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ to $120 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ at a potential window between -0.3 V and 0.6 V . These measurements were performed in $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCl}$, and the observed redox current peaks indicated the reversible activity of the PB (Figure 5a). It was noted that the anodic (I_{pa}) and cathodic current peaks (I_{pc}) increased according to the scan rate, forming a linear curve until approximately $120 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Correlation coefficients were calculated for I_{pa} ($r = 0.988$, $n = 11$) and I_{pc} ($r = 0.996$, $n = 11$), confirming that the electroactive PB was successfully surface-confined at the electrode (Figure 5b).

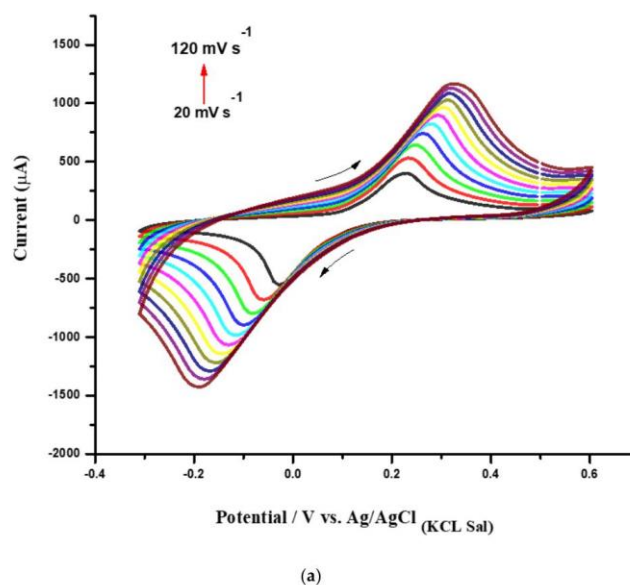
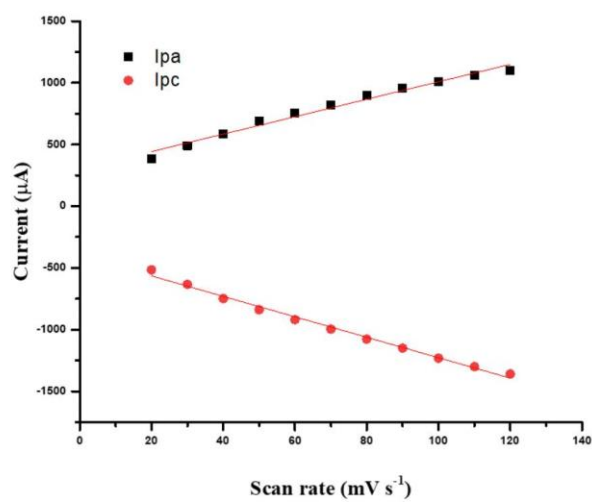
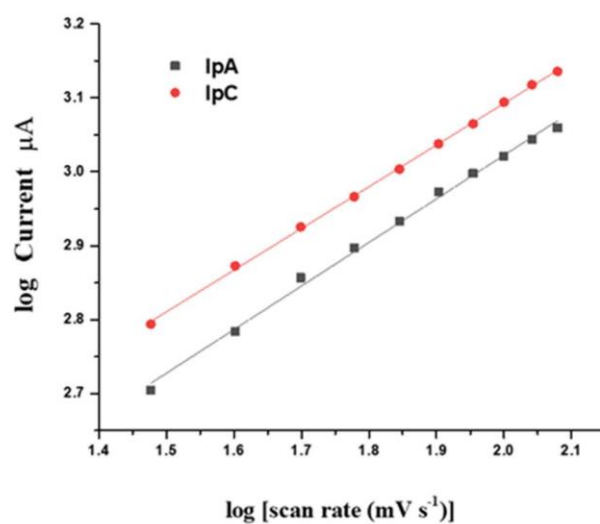


Figure 5. Cont.



(b)



(c)

Figure 5. (a) CVs obtained from the CHI-CNT@PB film at 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, and 120 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ scan rates (inner to outer); (b) plot of anodic and cathodic peak currents from CVs vs. square root of scan rate; (c) plot of $\log I_{pa}$ and I_{pc} vs. $\log$ scan rate. All measurements were performed in KCl ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) as the supporting electrolyte.

As shown in Figure 5a, a slight displacement in the redox peak potentials was observed as the scan rate increased, indicating that PB species were adsorbed into the film. Through a more accurate analysis, after plotting the logarithm of the scan rate versus the logarithm of the cathodic and anodic peak currents, it was observed that the slopes of the regression linear curves were 0.56 and 0.54, respectively (Figure 5c). This meant that the confined species generated on the electrode interface by redox reactions with the catalytic PB resulted in a diffusion-controlled process, since the obtained values were very close to the theoretical value of 0.5, which represents an ideal reaction of the diffusion-controlled electrode process [23].

3.2. Assembly of the Anti-ZIKV E Immunosensor Platform

The assembly of the biosensor platform was followed by the measurement of the voltammetric profiles without a redox solution in the presence of the supporting electrolyte of $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, including an analysis of the anodic peak currents and electroactive area (Figure 6). The electrode modified with the CHI-CNT@PB film showed an electrocatalytic profile with dramatic increases in the current redox peaks (curve b), especially compared to the cleaned electrode, in which the currents were practically zero (curve a). The immobilization of anti-Env ZIKV antibodies was confirmed by the reduction in the anodic peaks due to the insulating nature of the proteins (curve c) [42]. Given the cationic characteristics of CHI, anti-Env ZIKV antibodies were probably immobilized in an oriented mode, e.g., by their FC portion [38]. To block the nonspecific bindings, one aliquot ($2 \mu\text{L}^{-1}$) of $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glycine solution was prepared in $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl buffer (pH 6.5), pipetted onto the sensor surface, and left to react for 2 h. This step was important to avoid nonspecific bindings, which were confirmed by a decrease in the current redox peaks (curve d).

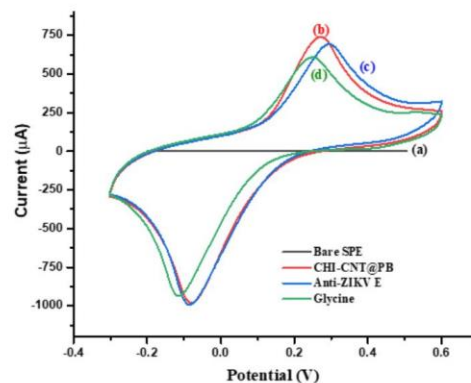


Figure 6. CVs of the stepwise preparation of the immunosensor: (a) bare SPE, (b) CHI-CNT@PB, (c) Anti-ZIKV E, (d) glycine ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Measurements were performed in the presence of KCl ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) for a $0.05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ scan rate.

3.3. Analytical Responses to the ZIKV E Protein and ZIKV Isolated Culture

Various electrochemical immunosensors for ZIKV have been described, relying on the detection of the NS1 protein [43], NS2B protein [22], and membrane protein [44]. To the best of our knowledge, this work is the first to focus on the detection of the ZIKV envelope protein. Some immunosensors have a lower limit of detection, with the disadvantage of requiring a solution containing a redox probe for voltammetric measurements. Additionally, the E protein is more specific for ZIKV diagnosis than the NS1 protein, since NS1 has 50%

homology with DENV [13]. NS2B is a redox-probe-free immunosensor developed by our group with attractive advantages in the acute stage of the disease [22].

To evaluate the specificity of the immunosensor response, a control experiment was performed by incubating the electrode with both spiked and unspiked human serum samples. The pool was obtained from serum samples from seven healthy individuals, all free of lipemia and hemolysis, which can interfere with the immunosensor response. Under optimal conditions, the ZIKV immunosensor was subjected to successive incubations with spiked pool serum containing PBS-diluted ZIKV E protein, and CVs were registered (Figure S2). Current responses were measured according to the difference in the amplitude of the anodic peaks before and after incubation with ZIKV E protein in the pool serum. The analytical curve of the anodic current peaks was extracted from three ZIKV E protein standard curves (Figure 7); the values of the slope and intercept, expressed as the adjusted data for the linear equation, showed a Pearson correlation coefficient of approximately 0.98 ($p < 0.01$, $n = 7$, t test) with a low relative error ($<1\%$). A linear range between 0.25 and $1.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was obtained. The limit of detection was based on the least squares method, determined as three times the standard deviation of the current response intercept divided by the slope of the regression curve according to the IUPAC; the value obtained was $0.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ZIKV E protein. This value falls in the clinical range for ZIKV diagnosis [19]. Unspiked ZIKV E serum was used as a control and tested under the same conditions, which resulted in a current response that was practically constant, indicating discrimination by anti-ZIKV protein E antibodies. The cutoff (limit of reaction) was obtained according to the average of the unspiked responses plus two standard deviations, resulting in a value of approximately $0.23 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ZIKV E protein. This experiment assessed the impact of interferences on the sensor response since the serum and pool samples contained different proteins, antibodies, and other components.

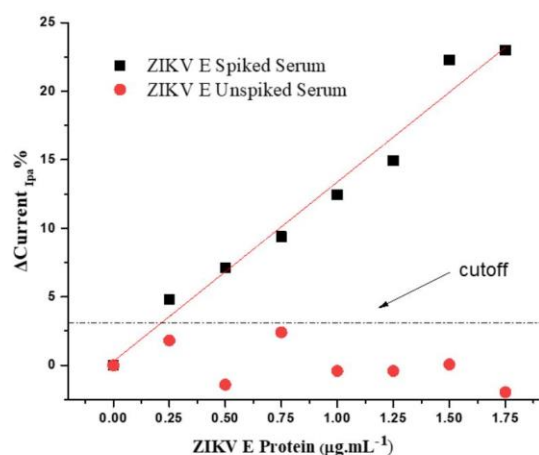


Figure 7. Analytical curve of the CV anodic peaks for immunosensor response to the serum pool spiked with ZIKV E protein diluted in PBS $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 7.4) and the unspiked serum pool diluted under the same conditions. Measurements were performed in the presence of KCl ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) for a $0.05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ scan rate.

The evaluation response of the immunosensor to the virus culture, i.e., native ZIKV protein, was measured by subjecting the immunosensor to incubations with serum samples (pool) spiked with ZIKV cell culture supernatant (ZIKV Vero E6 Tissue Culture, Bioresource, Cotati, CA, USA). The pool was diluted 1:4 in PBS spiked with 0.55×10^6 PFU. For analytical

responses, the pool was successively incubated for 20 min on the electrode surface at room temperature ($\sim 24^\circ\text{C}$). Before measurements, the electrodes were washed for 1 min in a PBS solution with stirring. Analytical responses were measured after successive incubations with spiked and unspiked samples and were compared (Figure 8). The linear range was from 0.55 to 2.75×10^6 PFU, with a limit of detection of 0.18 PFU ZIKV. The analyses of the current responses showed statistically significant differences ($p < 0.05$) between spiked and unspiked samples after the application of the paired t -test, demonstrating that the immunosensor was specific and distinguished the ZIKV cell culture. Additionally, the analytical response of the immunosensor to the spiked sample was linear (coefficient correlation 0.979 , $p < 0.05$), and the immunosensor showed a capacity to discriminate samples infected with the virus. The limit of the reaction (cutoff) for the native protein of ZIKV was less discriminative than that for the recombinant antigen. However, this was expected, since the antibody used was a monoclonal produced by the protein E recombinant antigen, and epitopes of the whole virus could be less exposed to the Fab portions of the anti-ZIKV E antibody. Thus, it is a promising immunosensor for application in real samples of infected patients.

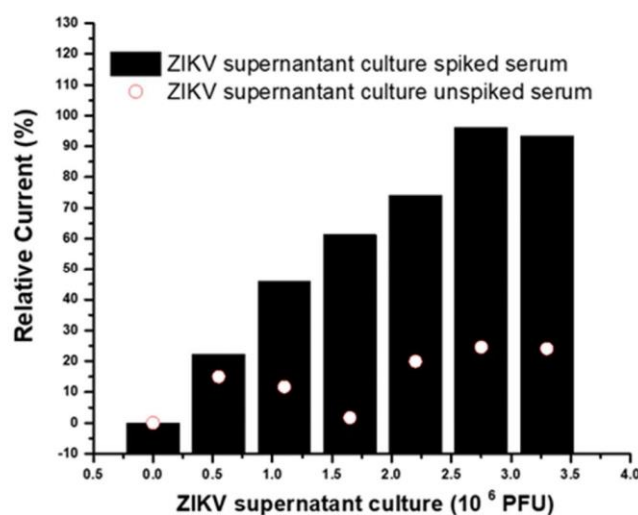


Figure 8. Immunosensor response to successive incubations with serum samples spiked and unspiked with ZIKV supernatant culture.

3.4. Long-Term Stability

Immunosensors, over time, may undergo aging and the consequent loss of catalytic activity and decrease in sensitivity and specificity. Service life and stability studies are important to ensure the proper functioning and market success of these devices [3]. The long-term immunosensor stability was evaluated over a period of 20 days using four readings from each electrode. Three electrodes were produced at the same time and stored in a moist chamber in a refrigerator at approximately 4 – 8°C . For this study, four readings were taken on different days from each electrode (1st, 5th, 10th, and 20th days). For analytical responses, electrodes were subjected to incubations with a concentration of $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ZIKV-E-protein-spiked serum. The average relative standard deviations of the three electrodes were found to be 2.97% , which was considered promising for the immunosensor's long-term stability.

4. Conclusions

An electrochemical immunosensor for detecting the Zika virus E protein was developed. The platform represents a new and effective method for detecting analytes without a redox probe, conferring the advantages of fewer steps and quicker analytical responses for immunosensors based on the analysis of faradaic currents. The redox-probe-free immunosensor was applied to the analysis of real samples of ZIKV-protein-E-spiked serum, demonstrating its ability to distinguish between positive and negative controls.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/bios12080623/s1>, Figure S1: Cyclic voltammograms of the CHI-CNT@PB nanocomposite film. The 30 cyclic voltammograms were performed in the presence of KCl (10 mmol·L⁻¹) at a 0.05 V·s⁻¹ scan rate; Figure S2: Anodic peaks of the CV by immunosensor response to the (a) Spiked pool of serum sample with ZIKV E protein and, (b) Unspiked pool of serum sample with ZIKV E protein.

Author Contributions: Conceptualization, L.K.B.S. and R.F.D.; Data curation, L.K.B.S.; Formal analysis, L.K.S.A., C.R.P. and E.T.A.M.; Funding acquisition, R.F.D.; Investigation, P.D.M., M.I.F.G. and E.T.A.M.; Methodology, L.K.B.S., L.K.S.A. and C.R.P.; Project administration, P.D.M. and R.F.D.; Supervision, C.R.P. and E.T.A.M.; Writing—original draft, L.K.B.S.; Writing—review & editing, M.I.F.G., E.T.A.M. and R.F.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Brazilian Research Agency CNPq, grant number 440605/2016-4, and the Brazilian CAPES foundation, Public Call to Prevent and Combat Zika Virus.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted under the Helsinki Declaration as revised in 2013. All protocols were approved by the Research Ethics Committee of Fiocruz/Aggeu Magalhães Research Center, Recife, Brazil according to protocol number 63441516.6.0000.5190.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Lorena K. B. Santos thanks the FACEPE (the agencies of the Pernambuco State of Brazil) for her scholarship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kazmi, S.S.; Ali, W.; Bibi, N.; Nouroz, F. A Review on Zika Virus Outbreak, Epidemiology, Transmission and Infection Dynamics. *J. Biol. Res.* **2020**, *27*, 5. [CrossRef]
2. Borges, E.D.; Vireque, A.A.; Berteli, T.S.; Ferreira, C.R.; Silva, A.S.; Navarro, P.A. An Update on the Aspects of Zika Virus Infection on Male Reproductive System. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2019**, *36*, 1339–1349. [CrossRef] [PubMed]
3. Song, B.H.; Yun, S.J.; Woolley, M.; Lee, Y.M. Zika Virus: History, Epidemiology, Transmission, and Clinical Presentation. *J. Neuroimmunol.* **2017**, *308*, 50–64. [CrossRef] [PubMed]
4. Gulland, A. Zika Virus Is a Global Public Health Emergency, Declares WHO. *BMJ* **2016**, *352*, i657. [CrossRef]
5. Merfeld, E.; Ben-Avi, L.; Kennon, M.; Cervený, K.L. Potential Mechanisms of Zika-Linked Microcephaly. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2017**, *6*, e273. [CrossRef] [PubMed]
6. Silva, V.I.; Alvarenga, C.; Abreu, C.; Tozetto-Mendoza, T.R.; Do Canto, C.L.M.; Manuli, E.R.; Mendes-Correa, M.C.; Sabino, E.C.; Figueiredo, W.M.; Segurado, A.C.; et al. Potential Effect of Zika Virus Infection on Human Male Fertility? *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **2018**, *60*, 2–5. [CrossRef]
7. Elfiky, A.A. Novel Guanosine Derivatives against Zika Virus Polymerase in Silico. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 11–16. [CrossRef]
8. Myhrvold, C.; Freije, C.A.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Metsky, H.C.; Durbin, A.F.; Kellner, M.J.; Tan, A.L.; Paul, L.M.; Parham, L.A.; et al. Field-Deployable Viral Diagnostics Using CRISPR-Cas13. *Science* **2018**, *360*, 444–448. [CrossRef]
9. Gourinat, A.C.; O'Connor, O.; Calvez, E.; Goarant, C.; Dupont-Rouzeyrol, M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 84–86. [CrossRef]
10. Rastogi, M.; Sharma, N.; Singh, S.K. Flavivirus NS1: A Multifaceted Enigmatic Viral Protein. *Virol. J.* **2016**, *13*, 131. [CrossRef]
11. Mendonça, P.D.; Santos, L.K.B.; Foguel, M.V.; Rodrigues, M.A.B.; Cordeiro, M.T.; Gonçalves, L.M.; Marques, E.T.A.; Dutra, R.F. NS1 Glycoprotein Detection in Serum and Urine as an Electrochemical Screening Immunosensor for Dengue and Zika Virus. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413*, 4873–4885. [CrossRef] [PubMed]
12. Peters, R.; Stevenson, M. Zika Virus Diagnosis: Challenges and Solutions. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 142–146. [CrossRef] [PubMed]

13. Elfiky, A.A.; Ibrahim, I.M. Zika Virus Envelope–Heat Shock Protein A5 (GRP78) Binding Site Prediction. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, *39*, 5248–5260. [CrossRef] [PubMed]
14. Laureano, A.F.S.; Riboldi, M. The Different Tests for the Diagnosis of COVID-19—A Review in Brazil so Far. *JBRA Assist. Reprod.* **2020**, *24*, 340–346. [CrossRef] [PubMed]
15. Zhou, G.; Mao, X.; Juncker, D. Immunochromatographic Assay on Thread. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7736–7743. [CrossRef]
16. Koczula, K.M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 111–120. [CrossRef]
17. Cecchetto, J.; Fernandes, F.C.B.; Lopes, R.; Bueno, P.R. The Capacitive Sensing of NS1 Flavivirus Biomarker. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 949–956. [CrossRef]
18. Lee, S.H.; Chung, J.; Park, H.; Lee, G. A Simple and Facile Glucose Biosensor Based on Prussian Blue Modified Graphite String. *J. Sens.* **2016**, *2016*, 1859292. [CrossRef]
19. Jiang, Q.; Chandar, Y.J.; Cao, S.; Kharasch, E.D.; Singamaneni, S.; Morrissey, J.J. Rapid, Point-of-Care, Paper-Based Plasmonic Biosensor for Zika Virus Diagnosis. *Adv. Biosyst.* **2017**, *1*, 1700096. [CrossRef]
20. Darwish, N.T.; Sekaran, S.D.; Alias, Y.; Khor, S.M. Immunofluorescence–Based Biosensor for the Determination of Dengue Virus NS1 in Clinical Samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *149*, 591–602. [CrossRef]
21. Stambaugh, A.; Parks, J.W.; Stott, M.A.; Meena, G.G.; Hawkins, A.R.; Schmidt, H.; Kuno, G.; Chang, G.J.; Tsuchiya, K.R.; Karabatsos, N.; et al. Optofluidic Detection of Zika Nucleic Acid and Protein Biomarkers Using Multimode Interference Multiplexing. *Biomed. Opt. Express* **2018**, *9*, 3725–3730. [CrossRef] [PubMed]
22. Silva, B.V.M.; Cordeiro, M.T.; Rodrigues, M.A.B.; Marques, E.T.A.; Dutra, R.F. A Label and Probe-Free Zika Virus Immunosensor Prussian Blue@carbon Nanotube-Based for Amperometric Detection of the Ns2b Protein. *Biosensors* **2021**, *11*, 157. [CrossRef] [PubMed]
23. Landim, V.P.A.; Silva, B.V.M.; Sobral Filho, D.C.; Dutra, R.F. A Novel Redox-Free Immunosensor Concept Based on Cobalt Phthalocyanine@carbon Nanotubes Pseudocapacitor for Cardiac B-Type Natriuretic Peptide Detection. *Electroanalysis* **2021**, *33*, 2302–2309. [CrossRef]
24. Trindade, E.K.G.; Silva, B.V.M.; Dutra, R.F. A Probeless and Label-Free Electrochemical Immunosensor for Cystatin C Detection Based on Ferrocene Functionalized-Graphene Platform. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *138*, 111311. [CrossRef] [PubMed]
25. Sun, X.; Hui, N.; Luo, X. Reagentless and Label-Free Voltammetric Immunosensor for Carcinoembryonic Antigen Based on Polyaniline Nanowires Grown on Porous Conducting Polymer Composite. *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 889–896. [CrossRef]
26. Cinti, S.; Arduini, F.; Vellucci, G.; Cacciotti, I.; Nanni, F.; Moscone, D. Carbon black assisted tailoring of Prussian Blue nanoparticles to tune sensitivity and detection limit towards H2O2 by using screen-printed electrode. *Electrochem. Commun.* **2014**, *47*, 63–66. [CrossRef]
27. Chakraborty, N.; Jha, D.; Gautam, H.K.; Roy, I. Peroxidase-like Behavior and Photothermal Effect of Chitosan-Coated Prussian Blue Nanoparticles: Dual-Modality Antibacterial Action with Enhanced Bioaffinity. *Mater. Adv.* **2020**, *1*, 774–782. [CrossRef]
28. Che, X.; Yuan, R.; Chai, Y.; Li, J.; Song, Z.; Li, W.; Zhong, X. A Glucose Biosensor Based on Chitosan-Prussian Blue-Multiwall Carbon Nanotubes-Hollow PtCo Nanochains Formed by One-Step Electrodeposition. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *84*, 454–461. [CrossRef]
29. Yang, L.; Wang, J.; Lü, H.; Hui, N. Electrochemical Sensor Based on Prussian Blue/Multi-Walled Carbon Nanotubes Functionalized Polypyrrole Nanowire Arrays for Hydrogen Peroxide and MicroRNA Detection. *Microchim. Acta* **2021**, *188*, 25. [CrossRef]
30. Ahmad, A.; Siddique, J.A.; Setapar, S.H.M.; Lokhat, D.; Gollandaj, A.; Ramjugernath, D. Recent Advances in Chitosan-Based Films for Novel Biosensor. In *Electrically Conductive Polymer and Polymer Composites*; 2018; pp. 137–161. Available online: <https://doi.org/10.1002/9783527807918.ch7> (accessed on 9 June 2022).
31. Marroquin, J.B.; Rhee, K.Y.; Park, S.J. Chitosan Nanocomposite Films: Enhanced Electrical Conductivity, Thermal Stability, and Mechanical Properties. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1783–1791. [CrossRef]
32. Kaushik, A.; Khan, R.; Solanki, P.R.; Pandey, P.; Alam, J.; Ahmad, S.; Malhotra, B.D. Iron Oxide Nanoparticles-Chitosan Composite Based Glucose Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 676–683. [CrossRef] [PubMed]
33. Bo, Z.; Shuai, X.; Mao, S.; Yang, H.; Qian, J.; Chen, J.; Yan, J.; Cen, K. Green Preparation of Reduced Graphene Oxide for Sensing and Energy Storage Applications. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6684. [CrossRef] [PubMed]
34. Jirakunakorn, R.; Khumngern, S.; Choosang, J.; Thavarungkul, P.; Kanatharana, P.; Numnuam, A. Uric Acid Enzyme Biosensor Based on a Screen-Printed Electrode Coated with Prussian Blue and Modified with Chitosan-Graphene Composite Cryogel. *Microchem. J.* **2020**, *154*, 104624. [CrossRef]
35. Duangthaisuksak, S.; Kanel, S.; Haushalter, E.F.; Ruetz, J.E.; Kim, D.S. Detection of Hydroxyl Radicals Using Cerium Oxide/Graphene Oxide Composite on Prussian Blue. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1136. [CrossRef]
36. Gomes-Filho, S.L.R.; Dias, A.C.M.S.; Silva, M.M.S.; Silva, B.V.M.; Dutra, R.F. A Carbon Nanotube-Based Electrochemical Immunosensor for Cardiac Troponin T. *Microchem. J.* **2013**, *109*, 10–15. [CrossRef]
37. Mundinamani, S.P.; Rabinal, M.K. Cyclic Voltammetric Studies on the Role of Electrode, Electrode Surface Modification and Electrolyte Solution of an Electrochemical Cell. *J. Appl. Chem.* **2014**, *7*, 45–52. [CrossRef]
38. Santana, G.M.; Silva, A.K.S.; Foguel, M.V.; Dutra, R.F. An Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Hepatitis C Antibodies Based on One-Step-Electrosynthesized Polypyrrole–Graphene Nanocomposite. *J. Mater. Sci.* **2022**, *57*, 5586–5595. [CrossRef] [PubMed]

39. Cheng, M.; Peng, W.; Hua, P.; Chen, Z.; Sheng, J.; Yang, J.; Wu, Y. In Situ Formation of PH-Responsive Prussian Blue for Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy of Cancer. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 18270–18276. [[CrossRef](#)]
40. Yu, W.; Sang, Y.; Wang, T.; Liu, W.; Wang, X. Electrochemical Immunosensor Based on Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotube-Chitosan Functional Layer for the Detection of Cephalexin. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 1001–1011. [[CrossRef](#)]
41. Cho, G.; Azzouzi, S.; Zucchi, G.; Lebental, B. Electrical and Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes for the Monitoring of Chemicals in Water—A Review. *Sensors* **2022**, *22*, 218. [[CrossRef](#)]
42. Trindade, E.K.G.; Dutra, R.F. A Label-Free and Reagentless Immuno-electrode for Antibodies against Hepatitis B Core Antigen (Anti-HBc) Detection. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *172*, 272–279. [[CrossRef](#)]
43. Cabral-Miranda, G.; Cardoso, A.R.; Ferreira, L.C.S.; Sales, M.G.F.; Bachmann, M.F. Biosensor-Based Selective Detection of Zika Virus Specific Antibodies in Infected Individuals. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *113*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Faria, A.M.; Mazon, T. Early Diagnosis of Zika Infection Using a ZnO Nanostructures-Based Rapid Electrochemical Biosensor. *Talanta* **2019**, *203*, 153–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]