



UNIFAL - MG
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas/MG – CEP
37130-000



MATHEUS SIQUEIRA SILVA

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA PROTEÍNA NS1 DE *Zika virus* E *Dengue virus* ATRAVÉS DO RECONHECIMENTO *LABEL-FREE* COM POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE

ALFENAS / MG

2021

MATHEUS SIQUEIRA SILVA

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA PROTEÍNA NS1 DE *Zika virus* E *Dengue virus*
ATRAVÉS DO RECONHECIMENTO *LABEL-FREE* COM POLÍMEROS
IMPRESSOS MOLECULARMENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal Alfnas, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor.

Áreas de concentração: Farmácia.

Linhas temáticas: Toxicologia e Análises toxicológicas.

Orientador: Dr. Eduardo Costa de Figueiredo.

Co-orientador: Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

ALFENAS / MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Silva, Matheus Siqueira
S586d Diagnóstico diferencial da proteína ns1 de *Zika vírus* E *Dengue vírus* através
do reconhecimento *label-free* com polímeros impressos molecularmente /
Matheus Siqueira Silva – Alfenas, MG, 2021.
125 f.: il. –

Orientador: Eduardo Costa de Figueiredo.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de
Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Dengue vírus. 2. Zika vírus. 3. Impressão molecular. 4. Epitopo. 5. Sensor.
6. label-free. I. Figueiredo, Eduardo Costa de. II. Título.

CDD- 615

Ficha Catalográfica elaborada por Marlon Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

MATHEUS SIQUEIRA SILVA

"DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA PROTEÍNA NS1 DE *Zika virus* E *Dengue virus* ATRAVÉS DO RECONHECIMENTO COM POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE"

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovado em: 26 de março de 2021

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley
Instituição: Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Ana Cristina Honorato de Castro
Instituição: Universidade Federal do ABC

Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **CÉSAR RICARDO TEIXEIRA TARLEY, Usuário Externo**, em 26/03/2021, às 19:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Costa de Figueiredo, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2021, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Honorato de Castro, Usuário Externo**, em 29/03/2021, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariane Gonçalves Santos, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2021, às 10:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Cosme Cotta Malaquias, Professor do Magistério**

AGRADECIMENTOS

À professora Ana Lúcia Bárbara Cruvinel que, mesmo na educação básica, evidenciara e estimulava a minha curiosidade pelo “porquês” e a minha afinidade com métodos. Aquele gesto de crença me motiva até hoje.

Aos Drs. Aline Pereira Castro, Mascos José Marques e Fábio Antônio Colombo, pela construção de meu profissionalismo, em termos de desempenho e caráter.

Aos meus mentores, Drs. Eduardo Costa de Figueiredo e Luiz Felipe Leomil Coelho, por me impulsionar a níveis de qualificação profissional que a tampouco me soavam inimagináveis.

Às Dras. Maria Goreti Ferreira Sales, Ana Patrícia Moreira Tavares e Felismina Moreira, pelo enriquecimento técnico do trabalho e pelo meu desenvolvimento profissional e cultural.

À Universidade Federal de Alfenas e ao corpo docente de Ciências Farmacêuticas, por edificar todas as etapas do meu aperfeiçoamento profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG, bem como pelo edital N° 19 do do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE - bolsista da Capes/PDSE/ Processo nº{88881.133746/2016-01}).

Se você considera a educação cara, experimente a ignorância.

(DEREK BOK, 1978)

RESUMO

A semelhança dos sintomas desenvolvidos após as infecções pelo *Zika virus* e *Dengue virus* dificulta o diagnóstico clínico. Além disso, a similaridade estrutural entre esses vírus dificulta a elaboração de um método de diagnóstico diferencial e preciso. A proteína não estrutural 1 (NS1) é uma glicoproteína comum a todos os flavivírus, secretada no soro de pacientes infectados com o *Dengue virus* em concentrações de 1×10^{-2} a 50 mg L^{-1} . O reconhecimento artificial de proteínas por sensores eletropolimerizados ganhou espaço recentemente no diagnóstico clínico por fornecer quimiosensores rápidos, sensíveis, seletivos, robustos, não destrutivos, com baixo custo atribuído, sendo ainda portáteis e de fácil manuseio. O presente trabalho propôs a elaboração de quimiosensores capazes de detectar e diferenciar as proteínas NS1 de *Zika virus* (ZIKV) e *Dengue virus* tipo I (DENV-1). À partir de informações estruturais de linearidade, flexibilidade, acessibilidade e imunogenicidade seis epítomos foram selecionados para serem utilizados como molécula modelo para a produção de polímeros impressos molecularmente, dois para DENV-1 e quatro para ZIKV. Foram testados filmes de fenol, ácido aminofenil borônico e 3- e 4-aminofenol e realizou-se estudos para determinar condições ideais de polimerização. Um filme impresso molecularmente foi polimerizado na superfície de eletrodos de quadro impresso de carbono comerciais através da técnica de voltametria cíclica. A remoção da molécula modelo foi realizada por clivagem com proteinase K e voltametria cíclica. Foram testados três modelos de sensores, dois para NS1 de DENV-1 e um para NS1 de ZIKV. Ademais, foi avaliada a influência de uma etapa prévia de desnaturação por temperatura para converter a NS1 à sua forma monomérica antes do reconhecimento. A performance dos dispositivos foi avaliada em termos de precisão, sensibilidade, seletividade e especificidade. Os sensores sintetizados a partir do 3-aminofenol foram capazes de detectar a NS1 em amostras de soro humano diluído (1:1000) em concentrações de 50 a $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Um dos modelos testados foi capaz de distinguir as NS1 de *Dengue virus* e *Zika virus*. Este mesmo protótipo foi capaz de detectar a proteína desnaturada na faixa de 50 a $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ com DPR abaixo de 5.04%. Os valores de LOD e LOQ calculados foram de 29.3 e $88.7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: Dengue virus; Zika virus; NS1; Impressão molecular; epítomo; sensor; label-free.

ABSTRACT

The similarity of symptoms developed after Zika virus and Dengue virus infections makes clinical diagnosis difficult. Furthermore, the structural similarity between these viruses makes it difficult to develop a differential and accurate diagnostic method. Nonstructural protein 1 (NS1) is a glycoprotein common to all flaviviruses, secreted in the serum of patients infected with Dengue virus at concentrations from 1×10^{-2} to 50 mg L^{-1} . The artificial recognition of proteins by electropolymerized sensors has recently gained space in clinical diagnosis for providing fast, sensitive, selective, robust, non-destructive chemosensors, with a low attributed cost, while being portable and easy to handle. The present work proposed the development of chemosensors capable of detecting and differentiating the NS1 proteins of Zika virus (ZIKV) and Dengue virus type I (DENV-1). Based on structural information of linearity, flexibility, accessibility and immunogenicity, six epitopes were selected to be used as a template molecule for the production of molecularly printed polymers, two for DENV-1 and four for ZIKV. Films of phenol, aminophenyl boronic acid and 3- and 4-aminophenol were tested and studies were carried out to determine ideal conditions for polymerization. A molecularly printed film was polymerized on the surface of commercial carbon printed board electrodes using the cyclic voltammetry technique. Removal of the template molecule was performed by cleavage with proteinase K and cyclic voltammetry. Three sensor models were tested, two for NS1 from DENV-1 and one for NS1 from ZIKV. Furthermore, the influence of a previous temperature denaturation step to convert NS1 to its monomeric form before recognition was evaluated. Device performance was evaluated in terms of precision, sensitivity, selectivity and specificity. Sensors synthesized from 3-aminophenol were able to detect NS1 in diluted human serum samples (1:1000) at concentrations from 50 to $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. One of the tested models was able to distinguish NS1 from Dengue virus and Zika virus. This same prototype was able to detect the denatured protein in the range of 50 to $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ with a DPR below 5.04%. The calculated LOD and LOQ values were 29.3 and $88.7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

Keywords: *Dengue virus*; *Zika virus*; NS1; molecular imprinting; epitope; sensor; label-free.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema representativo da impressão molecular.	20
Figura 2 –	Esquema comparativo entre um sensor com um polímero impresso (esquerda) e um imunosensor (direita) na superfície de uma balança de microcristais de quartzo.	22
Figura 3 –	Processo de eletrooxidação do fenol.	23
Figura 4 –	Equilíbrio ácido/base do 3-aminofenol (espécies protonada/neutra).	24
Figura 5 –	Esquema proposto para a eletrooxidação e formação de filme com o 4-aminofenol. .	25
Figura 6 –	Eletrodo de quadro impresso C-110 (DropSens) com eletrodos auxiliar e trabalho de tinta de carbono e referência de Ag/AgCl.	26
Figura 7 –	Canais que promovem o “Gate effect” em polímeros impressos na superfície de eletrodos de quadro impresso.	27
Figura 8 –	Diagrama de experimentos com potencial controlado.	28
Figura 9 –	Voltametria Cíclica.	30
Figura 10 –	Sistemas reversível, quasi-reversível e irreversível.	31
Figura 11 –	Voltametria de onda quadrada.	33
Figura 12 –	Diagrama de fases mostrando vetores de corrente e voltagem separados pelo ângulo de fase ϕ	35
Figura 13 –	Figura de <i>Lissajous</i> para uma medida de impedância.	36
Figura 14 –	<i>Circuito equivalente de Randles</i> , representando um sistema eletroquímico de processo de transferência de carga simples. R_{Ω} é a resistência apresentada pelos materiais dos eletrodos e pela solução que comunica os mesmos, C_d é a capacidade da dupla camada e Z_f é a impedância do processo fadático.	37
Figura 15 –	Plotagem progressiva (<i>Nyquist</i>) dos elementos de um circuito equivalente de <i>Randles</i> . $R_u=R_{\Omega}$	38
Figura 16 –	Plotagem <i>Nyquist</i> de um circuito completo de <i>Randles</i>	39
Figura 17 –	Organização genômica da família <i>Flaviviridae</i>	41
Figura 18 –	Ciclo de replicação de um Flavivirus.	42
Figura 19 –	Incidência do vírus da Dengue no Brasil de 2010 a 2016.	43
Figura 20 –	Cinética dos marcadores sorológicos durante as infecções primária e secundária por DENV.	45
Figura 21 –	Evolução da transmissão do Zika vírus mediada por mosquito-vetor.	48
Figura 22 –	Diagrama de topologia para um monômero de NS1.	51
Figura 23 –	Acessibilidade de Superfície.	63
Figura 24 –	Predição de flexibilidade.	64
Figura 25 –	Predição de Linearidade.	65

Figura 26 –	Predição de ligação com MHC classe I (a) e II (b) para os protótipos propostos.	66
Figura 27 –	EPT-I na estrutura da NS1 de DENV-2 (4O6B).	67
Figura 28 –	Ilustrando a alça distal na estrutura da NS1 de DENV-2 (4O6B).	68
Figura 29 –	EPT-III na estrutura da NS1 de ZIKV (5GS6).	70
Figura 30 –	EPT-IV na estrutura da NS1 de ZIKV (5GS6).	71
Figura 31 –	EPT-V na estrutura da NS1 de ZIKV (5GS6).	72
Figura 32 –	EPT-VI na estrutura da NS1 de ZIKV (5GS6).	73
Figura 33 –	Avaliação de diferentes métodos de ativação do eletrodo de trabalho.	74
Figura 34 –	Eletroatividade dos monômeros avaliada em um potencial de 0 a +1,0 V.	76
Figura 35 –	Leituras subsequentes durante a estabilização dos filmes poliméricos formados na superfície do eletrodo de trabalho.	77
Figura 36 –	Avaliação da eletroatividade do tampão fosfato salino (pontilhado), do EPT-I (tracejado) e do 3-AF (sólido).	78
Figura 37 –	Influência do número de ciclos sobre a formação do polímero de 3-AF.	79
Figura 38 –	Influência da concentração de monômero na formação de polímero de 3-AF.	80
Figura 39 –	Voltamograma de polimerização do 3-AF para polímeros impresso na presença do EPT-I e não impresso. Fonte: Do autor. Legenda: Voltamogramas cíclicos da Eletropolimerização do 3-AF não impresso (esquerda) e do impresso com o EPT-I (direita). Representação de potencial aplicado (x em volts) por corrente (y em amperes).	
81		
Figura 40 –	Construção do elemento de reconhecimento do modelo 3AFE1 na superfície do eletrodo de trabalho.	82
Figura 41 –	Reconhecimento do EPT-I em tampão fosfato salino pelo sensor 3AFE1.	83
Figura 42 –	Reconhecimento do EPT-I em tampão fosfato salino pelo sensor 3AFE1.	84
Figura 43 –	Reconhecimento da NS1 desnaturada em tampão fosfato salino pelo sensor 3AFE1.	86
Figura 44 –	Reconhecimento da NS1 desnaturada em x pelo sensor 3AFE1.	87
Figura 45 –	Influência da etapa prévia de desnaturação no reconhecimento da NS1 pelo modelo 3AFE1.	88
Figura 46 –	Influência do tempo de incubação na adsorção da NS1 na superfície do modelo 3AFE1.	89
Figura 47 –	Caracterização estrutural por Raman do polímero não impresso de 3-AF.	91
Figura 48 –	Caracterização estrutural por Raman do polímero impresso de 3-AF.	92
Figura 49 –	Avaliação de seletividade e especificidade do modelo 3AFE1.	93
Figura 50 –	Reconhecimento da Proteína não estrutural 1 desnaturada na presença de soro diluído (1:1000).	94
Figura 51 –	Avaliação da eletroatividade do tampão fosfato salino (pontilhado), do EPT-I	

	(tracejado) e do 4-AF (sólido).	96
Figura 52 –	Voltamograma de polimerização do 4-AF para polímeros impresso na presença do EPT-I e não impresso.....	96
Figura 53 –	Construção do elemento de reconhecimento do modelo 4AFE1 na superfície do eletrodo de trabalho.	97
Figura 54 –	Reconhecimento da NS1 desnaturada em tampão fosfato salino pelo sensor 4AFE1.	99
Figura 55 –	Reconhecimento da NS1 desnaturada em tampão fosfato salino pelo sensor 4AFE1.	100
Figura 56 –	Influência do tempo de incubação na adsorção da NS1 na superfície do modelo 4AFE1.	101
Figura 57 –	Reconhecimento da Proteína não estrutural 1 desnaturada pelo modelo 4AFE1.	102
Figura 58 –	Caracterização estrutural por Raman do polímero não impresso de 4-AF.....	103
Figura 59 –	Caracterização estrutural por Raman do polímero impresso de 4-AF.....	104
Figura 60 –	Avaliação da seletividade do modelo 4AFE1.....	105
Figura 61 –	Avaliação da eletroatividade do tampão fosfato salino (pontilhado), do EPT-I (tracejado) e do EPT-III (sólido).	106
Figura 62 –	Voltamograma de polimerização do 3-AF para polímeros impresso na presença do EPT-III e não impresso.	107
Figura 63 –	Construção do elemento de reconhecimento do modelo 3AFE3 na superfície do eletrodo de trabalho.	108
Figura 64 –	Reconhecimento da NS1 de ZIKV em tampão fosfato salino pelo modelo 3AFE3..	109
Figura 65 –	Avaliação de seletividade e especificidade do modelo 3AFE3.	110
Figura 66 –	Reconhecimento da Proteína não estrutural 1 de ZIKV desnaturada na presença de soro humano diluído (1:1000).	111

LISTA DE ABREVIACOES

3-AF	- 3-Aminofenol
4-AF	- 4-Aminofenol
VC	- Voltametria Cíclica
DENV-1	- <i>Dengue virus</i> sorotipo 1
DENV-2	- <i>Dengue virus</i> sorotipo 2
EIE	- Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
IEDB	- Immune Epitope Database and Analysis Resource
JEV	- Vírus da Encefalite Japonesa
LOD	- Limite de Detecção
LOQ	- Limite de Quantificação
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
NS1	- Proteína Não Estrutural 1
PIM	- Polímero Impresso Molecularmente
PNI	- Polímero Não Impresso
R_{ct}	- Resistência  transferência de carga
R_Ω	- Resistência Ôhmica
VOQ	- Voltametria de Onda Quadrada
ZIKV	- <i>Zika virus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO LITERÁRIA	18
2.1	DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA BIOMOLÉCULAS	18
2.1.1	Polímeros de Reconhecimento Molecular com Alta Seletividade Aplicados ao Reconhecimento de Biomacromoléculas	19
2.1.1.1	Impressão de Superfície por Eletropolimerização.....	20
2.1.1.2	Impressão de Epítomos.....	21
2.1.1.3	A escolha do monômero funcional.....	22
2.1.2	Eletrodos de Quadro Impresso	25
2.1.3	Transdução Eletroquímica	27
2.1.3.1	Voltametria Cíclica.....	28
2.1.3.1	Cronoamperometria (CA).....	32
2.1.3.2	Voltametria de onda quadrada (VOQ)	33
2.1.3.3	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE).....	33
2.2	A FAMÍLIA <i>FLAVIVIRIDAE</i> E O GÊNERO <i>FLAVIVIRUS</i>	39
2.2.1	Dengue	42
2.2.1.1	Sintomas e Patologia	44
2.2.1.2	Diagnóstico Laboratorial.....	45
2.2.2	Zika virus	47
2.2.2.1	Sintomas e Patologia	49
2.2.2.2	Diagnóstico Laboratorial	50
2.2.3	A NS1	50
3	JUSTIFICATIVA	53
4	OBJETIVOS	54
4.1	OBJETIVOS GERAIS	54
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
5	METODOLOGIA	55
5.1	PLANEJAMENTO RACIONAL DOS EPÍTOMOS	55
5.1.1	Análise conservacional	55
5.1.2	Predições conformacionais	55
5.1.3	Imunogenicidade	56

5.2	INSTRUMENTAÇÃO E SOLUÇÕES.....	57
5.3	PREPARO DOS POLÍMEROS IMPRESSO E NÃO IMPRESSOS	57
5.3.1	Ativação do Eletrodo.....	58
5.3.2	Seleção do monômero funcional e determinação do potencial de polimerização	58
5.3.3	Otimização das condições de polimerização	58
5.3.4	Construção do sensor	58
5.3.5	Caracterização dos filmes formados.....	59
5.3.6	Avaliação da resposta aos analitos.....	59
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1	PLANEJAMENTO RACIONAL DE EPÍTOPOS	61
6.1.1	Seleção dos epítomos	61
6.1.2	Propostas para DENV-1	67
6.1.3	Propostas para ZIKV	69
6.2	CONSTRUÇÃO DOS SENSORES.....	73
6.2.1	Ativação do eletrodo.....	73
6.2.2	Seleção do monômero funcional e determinação do potencial de polimerização	75
6.2.3	Sensores para <i>Dengue virus</i>	78
6.2.3.1	Sensor com 3-aminofenol/EPT-I (3AFE1)	78
6.2.3.1.1	<i>Otimização das condições de polimerização</i>	<i>78</i>
6.2.3.1.2	<i>Readsorção do EPT-I após a remoção.....</i>	<i>82</i>
6.2.3.1.3	<i>Detecção da NS1 de DENV-1 pelo sensor de 3AFE1.....</i>	<i>85</i>
6.2.3.1.4	<i>Tempo de incubação</i>	<i>89</i>
6.2.3.1.5	<i>Caracterização estrutural do filme 3AFE1.....</i>	<i>90</i>
6.2.3.1.6	<i>Seletividade e especificidade</i>	<i>92</i>
6.2.3.2	Sensor com 4-aminofenol/EPT-I (4AFE1).....	95
6.2.3.2.1	<i>Eletroatividade do 4-aminofenol</i>	<i>95</i>
6.2.3.2.2	<i>Construção do sensor 4AFE1</i>	<i>97</i>
6.2.3.2.3	<i>Detecção da NS1 de DENV-1 pelo sensor de 4AFE1.....</i>	<i>98</i>
6.2.3.2.4	<i>Tempo de incubação</i>	<i>101</i>
6.2.3.2.5	<i>Caracterização estrutural do filme 4AFE1.....</i>	<i>102</i>
6.2.3.2.6	<i>Seletividade</i>	<i>105</i>

6.2.4	Sensor para Zika virus.....	106
6.2.4.1	Sensor com 3-aminofenol/EPT-III (3AFE3).....	106
6.2.1.1.1	<i>Eletroatividade do EPT-III</i>	106
6.2.1.1.2	<i>Construção do sensor 3AFE3</i>	107
6.2.1.1.3	<i>Detecção da NS1 de ZIKV pelo sensor de 3AFE3</i>.....	108
6.2.1.1.4	<i>Seletividade e especificidade</i>.....	109
7	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

Algumas arboviroses causadas por membros da família *Flaviviridae*, como as transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* – zika, dengue e febre amarela –, são motivo de grande preocupação epidemiológica e vêm se difundindo cada vez mais no território brasileiro com um recente aumento no número de casos. Em 2014 foram reportados aproximadamente 600 mil casos de dengue, sendo que mais da metade na região sudeste. Em fevereiro de 2015, um surto de uma “doença exantemática” acometeu a região nordeste do país, tendo confirmação três meses depois de que o soro de um dos pacientes era positivo para *Zika virus* (ZIKV). Ao final de 2015, já havia notificações de casos de ZIKV em todas as regiões do território nacional, com uma suspeita de casos na faixa de 440.000 a 1.300.000 (FARES *et al.*, 2015; MARCONDES; XIMENES, 2016; MUSSO; J.GUBLER, 2016). Até a presente data, não existe vacina ou tratamento antiviral eficaz contra o *Dengue virus* (DENV) e o ZIKV. As providências consistem em diagnóstico prematuro e cuidados apropriados, incluído hospitalizações, reduzindo assim a morbidade. A similaridade estrutural existente entre os flavivírus dificulta a elaboração de um diagnóstico diferencial entre espécies e sorotipos, tendo em vista uma sintomatologia análoga, a qual torna o diagnóstico clínico duvidoso. Além disso a existência de reatividade cruzada em metodologias sorológicas e moleculares é um fator que dificulta o diagnóstico destes dois vírus (CASTELLANOS, 2015; PETERS; STEVENSON, 2019).

Nos últimos anos foi possível observar um grande desenvolvimento no mercado de diagnósticos, que em meados de 2011 valia cerca de US\$46 bilhões e estima-se que em 2018 o mesmo atingiu aproximadamente US\$74 bilhões. O repertório analítico atual no diagnóstico de algumas doenças conta com reconhecimento sorológico específico como única opção no reconhecimento de biomoléculas, acoplando nestas metodologias as limitações de uso apresentadas por anticorpos, como baixa estabilidade a variações de pH e temperatura, curto tempo de armazenamento, alto custo e produção complexa (SCHIRHAGL, 2014; XU *et al.*, 2016a). Sensores eletroquímicos tornam possíveis monitoramentos locais por conta de sua portabilidade. Eletrodos de quadro impresso são sistemas elétricos de baixo custo frequentemente empregados como suporte para a formação de filmes poliméricos. Os eletrodos de quadro impresso podem ser acoplados à uma unidade de bioreconhecimento, onde os materiais biomiméticos têm sido utilizados como alternativa ao uso de anticorpos e enzimas, apresentando maior estabilidade e fácil preparo (CARNEIRO *et al.*, 2018; REBELO *et al.*, 2016). A impressão molecular é uma técnica de polimerização na presença de um molde, onde

o polímero formado consolida uma cavidade com alta afinidade adsortiva para a conformação estrutural impressa. Os polímeros impressos molecularmente (PIMs) estão cada vez mais competitivos para com os anticorpos e enzimas na cromatografia e análises biológicas, sobrepujando suas limitações de uso. A impressão de epítomos é uma modalidade de polimerização que foca o reconhecimento de proteínas através do reconhecimento de fragmentos de sua estrutura, mimetizando o comportamento de um anticorpo (SCHIRHAGL, 2014; WHITCOMBE *et al.*, 2011).

Desta forma, a hipótese principal deste trabalho é que as diferenças entre as sequências das NS1 de DENV e ZIKV viabilizem a diferenciação dos patógenos por meio de sensores eletroquímicos com filmes impressos molecularmente e seletivos a peptídeos exclusivos de cada NS1 e expostos por meio da desnaturação das proteínas. Foram avaliados polímeros de diferentes composições, porosidades, espessuras e condutividade. As moléculas modelo selecionadas foram epítomos de diferentes regiões da proteína, buscando explorar epítomos externos e internos, imunogênicos ou não. Testes de seletividade foram realizados contra interferentes presentes no soro, e a especificidade dos sensores foi investigada dentre as NS1 dos sorotipos 1 e 2 do DENV e a NS1 do ZIKV. Por fim, a aplicabilidade dos dispositivos foi avaliada em testes de reconhecimento em amostras de soro humano dopadas com a NS1.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 DESENVOLVIMENTO DE SENSORES PARA BIOMOLÉCULAS

A monitorização de compostos químicos *in situ* nas áreas da saúde, ambiental e alimentar vem ganhando espaço nos últimos 10 anos, colocando à frente os sensores de biomoléculas como uma de suas ferramentas principais. Tais biomoléculas podem servir como marcadores para diagnóstico clínico e serem identificadas em fluidos corporais, como plasma, urina e sangue. Os sensores oferecem uma série de vantagens, como baixo custo, versatilidade, boa sensibilidade, seletividade e confiabilidade (MOREIRA *et al.*, 2013; REBELO *et al.*, 2016).

A elaboração de sensores bioquímicos envolve uma abordagem multidisciplinar, que busca aprimorar a detecção e quantificação de marcadores de um diagnóstico clínico, reduzindo tempo, custo e limitações das análises, além de aumentar a especificidade e sensibilidade das detecções (ISKIERKO *et al.*, 2016; PARKASH; SHUEB, 2015).

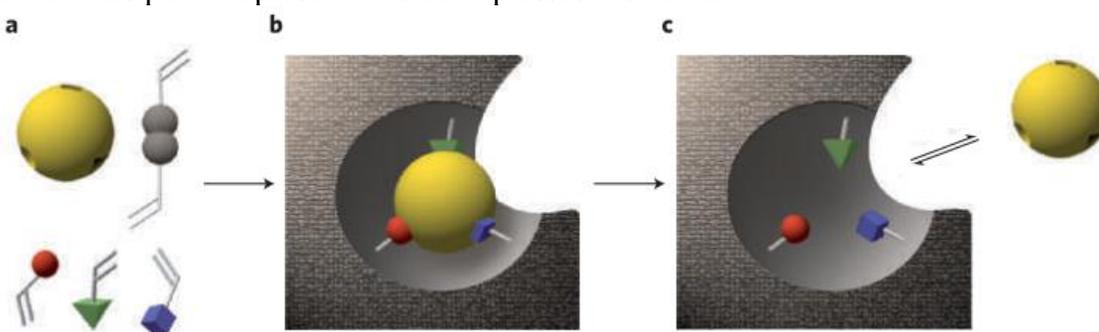
Os sensores consistem na associação de elementos de reconhecimento e transdução, onde a primeira determina a sensibilidade e especificidade na determinação de um analito através de interações químicas, que são posteriormente convertidas em sinais analíticos correspondentes (ISKIERKO *et al.*, 2016; PARKASH; SHUEB, 2015). O termo biossensor qualifica um sensor que utiliza como unidade de reconhecimento uma molécula biológica, como anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos, histonas ou até mesmo tecidos inteiros. Apesar da seletividade considerável obtida com essa metodologia, estes sensores apresentam muitas limitações de uso, armazenamento e tendem a se degradar quando reutilizados. Para sobrepujar essas limitações, unidades de reconhecimento artificiais acabam por substituir a unidade orgânicas, dando origem aos quimiossensores (ISKIERKO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016).

A nanotecnologia consiste em um campo da ciência destinado ao desenvolvimento de partículas em nano escala para diversas aplicações. As propriedades singulares dos nanomateriais e suas potenciais aplicações nas áreas de diagnóstico, terapia e profilaxia proporcionaram muitos avanços na medicina atual. A aplicação de polímeros em biodiagnósticos vem ampliando o repertório analítico clínico, tanto com o surgimento de novas metodologias, quanto com o aprimoramento das já existentes (GARCÍA; MARRADI; PENADÉS, 2010; SARAVANAN; DOMB, 2013; YANG *et al.*, 2013).

2.1.1 Polímeros de Reconhecimento Molecular com Alta Seletividade Aplicados ao Reconhecimento de Biomacromoléculas

Biomoléculas com alta seletividade, como anticorpos ou enzimas, apresentam um papel fundamental no reconhecimento molecular específico de um diagnóstico. Contudo, esses compostos são, em sua maioria, caros, de difícil produção e armazenamento, e apresentam aplicação limitada pelas suas condições ideais de uso (temperatura e pHs ótimos, ausência de proteases, inviabilidade do uso de solventes orgânicos) (GURYANOV; FIORUCCI; TENNIKOVA, 2016; SCHIRHAGL, 2014; WEN *et al.*, 2016). Os PIMs estão cada vez mais competitivos para com os anticorpos e enzimas na cromatografia e análises biológicas, apresentando alta seletividade e superando as limitações presentes em diagnósticos baseados em anticorpos e enzimas (YARMAN *et al.*, 2015). A impressão se baseia em uma reação de polimerização na presença de um molde, onde o polímero consolida uma cavidade com alta afinidade adsortiva para a conformação estrutural impressa. Quando os monômeros entram em contato com a molécula a ser impressa, seus grupos funcionais se orientam em direção aos grupos correspondentes do molde. Em seguida os monômeros são acoplados em forma de rede por uma reação de polimerização, tendo assim a sua conformação “congelada” e mantida após a retirada do molde (Figura 1)(ISKIERKO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; SCHIRHAGL, 2014). As cavidades formadas são capazes de reproduzir o tamanho, formato e as propriedades químicas da superfície da molécula molde, apresentando assim afinidade molecular proporcional à homologia estrutural entre o analito e a molécula molde (LIU *et al.*, 2016; SCHIRHAGL, 2014; XU *et al.*, 2016a).

Figura 1 – Esquema representativo da impressão molecular.



Fonte: (HAUPT, 2010)(p. 613).

Legenda: (a) interação entre os monômeros (azul, verde e vermelho), agente de ligação cruzada (cinza) e a molécula modelo (amarelo); (b) os monômeros complexados com a molécula modelo copolimerizam com o agente de ligação cruzada, formando uma rede polimérica intercruzada ao redor da molécula modelo; (c) a remoção da molécula modelo revela sítios de ligação complementares à sua estrutura.

2.1.1.1 Impressão de Superfície por Eletropolimerização

A impressão molecular tradicional, ou *bulk synthesis*, é muito eficiente para analitos de baixo peso molecular, mas é menos aplicada a alvos macromoleculares. A impressão de superfície é uma estratégia que possibilita a elaboração de filmes poliméricos finos, com cavidades homogêneas e que reconheça desde uma sequência peptídica (ou epítipo) a microrganismos inteiros (ANSELL, 2015; ERDŐSSY *et al.*, 2016; GE; TURNER, 2008; ISKIERKO *et al.*, 2016; YARMAN *et al.*, 2015). A espessura do polímero formado precisa ser rigorosamente controlada, uma vez que a proteína se encontra direcionada de forma aleatória em meio à massa monomérica e corre o risco de ficar recoberta pelo polímero, dificultando a etapa de remoção. Um filme espesso implica também na redução do contato do molde com a superfície do transdutor, reduzindo a sensibilidade. A eletropolimerização fornece à partir de uma superfície condutora uma reação rápida, controlada e simples, tipicamente compreendendo o molde e o monômero em uma solução a qual é submetida às condições elétricas necessárias para a formação do filme (REBELO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016; WHITCOMBE; LAKSHMI, 2010). Vários trabalhos recentes obtiveram sucesso empregando a impressão de superfície no preparo de filmes capazes de mimetizar o reconhecimento tanto de metabólitos de baixo peso molecular, quanto proteínas e microrganismos inteiros (CHEN; LUO, 2015; CHEN *et al.*, 2012; DECHTRIRAT *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2016; REBELO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

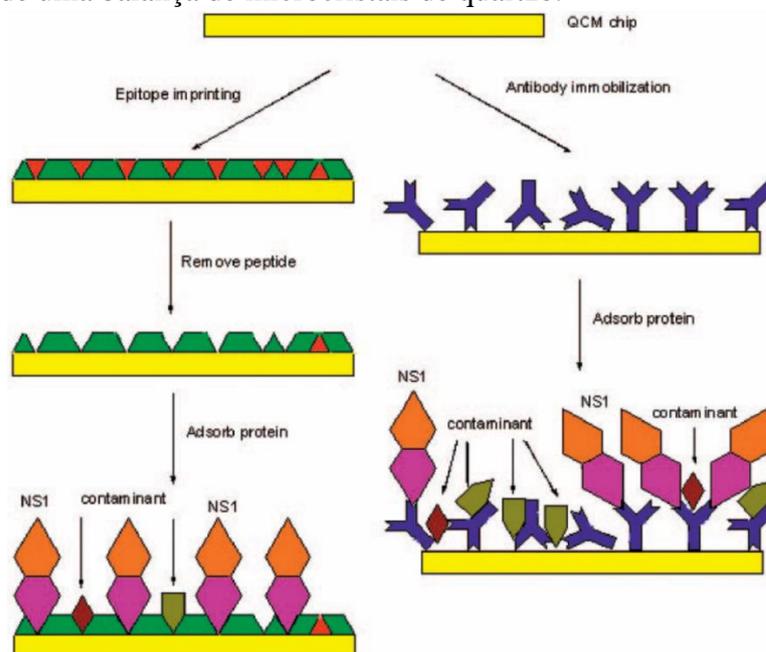
2.1.1.2 Impressão de Epítomos

Enquanto PIMs de alta afinidade são elaborados amplamente para moléculas pequenas, a impressão para macromoléculas vem se mostrando uma técnica mais complexa e de difícil reprodução (ISKIERKO *et al.*, 2016; SCHIRHAGL, 2014; XU *et al.*, 2016a). Tanto o volume da molécula molde quanto a rigidez do PIM (coordenada pela proporção de ligações cruzadas entre os monômeros) implicam em um tempo de difusão prejudicialmente longo (ISKIERKO *et al.*, 2016).

Proteínas em condições não fisiológicas podem apresentar modificações em suas estruturas tridimensionais, tornando-se impróprias para a impressão tradicional. Uma estratégia para evitar esta restrição é a impressão de epítomos (fragmentos peptídicos que possibilitam um reconhecimento seletivo), permitindo ao polímero mimetizar uma interação antígeno-anticorpo (ISKIERKO *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2016). As sequências peptídicas utilizadas como moldes apresentam uma maior estabilidade conformacional, favorecendo a impressão de uma cavidade mais correspondente à conformação do epítomo em seu meio fisiológico (ISKIERKO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015). O planejamento racional de epítomos orienta a seleção dos peptídeos estabelecendo condições básicas como: ponto isoelétrico similar ao da proteína mãe (evitando repulsões); uma área pouco susceptível às modificações pós-translacionais; um tamanho que permita alta seletividade (evitando reatividade cruzada), porém não muito grande (7 a 15 aminoácidos) para favorecer a impressão e o reconhecimento e reduzir a velocidade de difusão. As sequências presentes nos N e C-terminais de uma subunidade são as porções mais utilizadas (TAI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015).

A impressão de epítomos já foi utilizada em trabalhos com balanças de microcristais de quartzo, na detecção de biomarcadores de infarto agudo do miocárdio (TAI *et al.*, 2011) e insuficiência cardíaca (BOSSI *et al.*, 2012), e de antígenos de Anthrax (Figura 2)(TAI *et al.*, 2010) e DENV (TAI, 2006; TAI *et al.*, 2005).

Figura 2 – Esquema comparativo entre um sensor com um polímero impresso (esquerda) e um imunossensor (direita) na superfície de uma balança de microcristais de quartzo.



Fonte: (TAI, 2006, p. 1487).

2.1.1.3 A escolha do monômero funcional

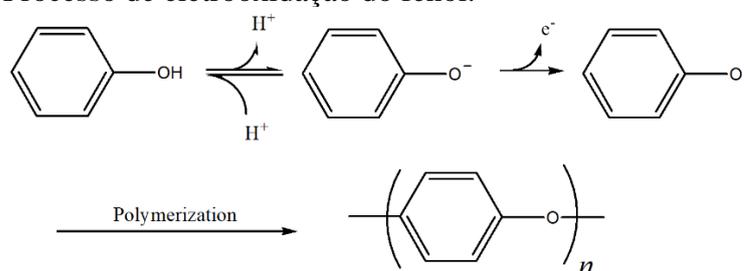
Os monômeros utilizados na impressão possuem diversas formas de interação para com o molde, dentre elas: interações iônicas, dipolos, interações de van der Waals e/ou interações π - π . Os monômeros devem se polimerizar de forma que a cavidade se mantenha consistente mesmo após a retirada do molde. A flexibilidade de um polímero limita a afinidade de seu sítio ativo. A rigidez estrutural e baixa solubilidade oferecidas por poliheterociclos – como polifenol, polipirrol, politiofeno, polianilina e derivados – favorece a estabilidade e integridade dos sítios impressos após a retirada da molécula molde. Polímeros produzidos por eletropolimerização possibilitam a produção de filmes finos, fixação de moléculas e dificilmente são removidos do local da síntese (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007; PAL *et al.*, 2016; SCHIRHAGL, 2014; WHITCOMBE; LAKSHMI, 2010).

Dentre estes, os polímeros *isolantes* (como o polifenol e seus derivados amino, metil, nitro e outros) são muito utilizados como matrizes na impressão molecular pois oferecem vantagens como alta reprodutibilidade e permiseletividade (permeação seletiva de espécies iônicas). A formação deste tipo de polímeros promove uma redução na condutividade do sistema e se autolimita, formando filmes mais finos que os condutores típicos. Esta aplicação

do termo “*isolantes*”, contudo, não representa uma definição rigorosa. Como a condutividade do sistema pode estar relacionada à dopagem do material, a definição se torna flexível (FRANCO *et al.*, 2008; YUQING; JIANRONG; XIAOHUA, 2004). Para fins de consenso, trataremos como polímeros isolantes aqueles que apresentam elevada resistência à transferência de carga, quando preparados via eletropolimerização.

A eletropolimerização de filmes de fenol ocorre por acoplamentos orto- e para- entre radicais fenolato, formados pela oxidação do ânion fenolato (Figura 3). Se mantida, a reação tende a formar oligômeros e estes oligômeros ligam-se entre si, se depositando na superfície do eletrodo (YUQING; JIANRONG; XIAOHUA, 2004).

Figura 3 – Processo de eletrooxidação do fenol.



Fonte: (NAKABAYASHI, 2000)(p.610).

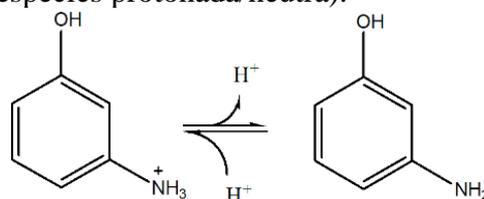
Legenda: A saída do próton promove a formação do íon fenilato. Oligômeros de poli (óxido de fenilato) são formados por acoplamentos orto- e para- e reações subsequentes ocasionam a formação do filme.

A Anilina e derivados como o aminofenol e a fenilenodiamina apresentam grupos funcionais capazes de interagir com o molde por ligação de hidrogênio, π - π e outros tipos de interações, dependendo da natureza do substituinte (ERDŐSSY *et al.*, 2016). Os aminofenóis apresentam dois grupos diferentes que podem ser oxidados: uma amina secundária e uma carbonila. Estes grupos funcionais, quando distribuídos na malha polimérica, podem servir para a incorporação de metais e biomoléculas. No entanto, a presença destes dois grupos gera debates na literatura quanto aos mecanismos de polimerização dos aminofenóis (FRANCO *et al.*, 2008; YUQING; JIANRONG; XIAOHUA, 2004).

O 3-aminofenol (3-AF) possui os grupos carbonila e amina em posições não-interativas, tornando complexo o estabelecimento de um mecanismo de reação. A polimerização do 3-AF pode ocorrer através da amina, da carbonila ou de ambos, dependendo das condições de pH, velocidade de varredura, faixa de potencial e material do eletrodo de trabalho (FRANCO *et al.*, 2008; SANKARAPAPAVINASAM, 1993). Nakabayashi (2000) descreve a polimerização de um filme de 3-aminofenol em um eletrodo de pasta de carbono, em pH 7.0. A existência de dois

picos anódicos, um a 0.45 e o outro a 1.1 V vs. Ag/AgCl, fica correlacionada com a participação tanto do grupo hidroxil quanto do amino na eletropolimerização. A análise de permiseletividade mostra que apenas os íons Ti^+ , Br^- e I^- foram capazes de permear parcialmente no filme formado. Íons maiores, como o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, não são capazes de permear este filme. O estudo de Franco *et al.* (2008) salienta o efeito do pH na eletropolimerização do 3-aminofenol em um eletrodo de grafeno. O estudo nos pH 1 a 8 mostra que o estado do equilíbrio entre cátion anilínio/amina aromática ($\text{pK}_a = 4.37$) (Figura 4) desloca o potencial de oxidação durante a eletropolimerização. Este fenômeno ocorre por efeitos indutivos e mesoméricos do grupo amino sobre o anel aromático.

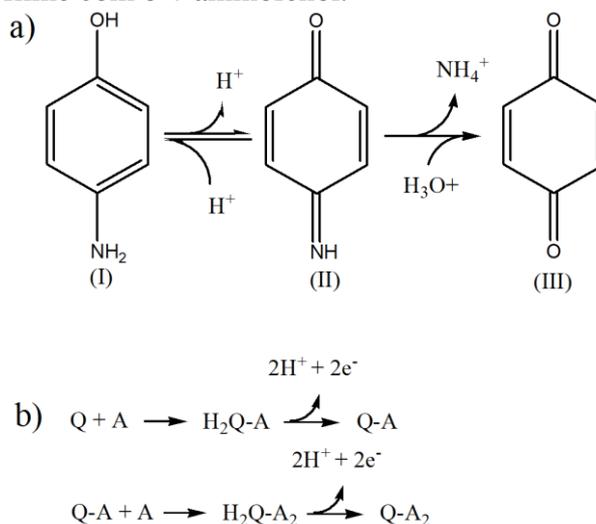
Figura 4 – Equilíbrio ácido/base do 3-aminofenol (espécies protonada/neutra).



Fonte: (FRANCO *et al.*, 2008)(p.405).

Hawley & Adams (1965) propuseram um mecanismo para a polimerização do 4-aminofenol (4-AF) em meio ácido, onde a eletrooxidação envolve a inserção de dois prótons e dois elétrons, produzindo uma quinoneimina. Na sequência, a quinoneimina formada é hidrolisada produzindo uma 4-benzoquinona (Figura 5a). Um aumento no pH eleva a contribuição de reações secundárias entre a 4-benzoquinona e o 4-AF com o acoplamento de aminas nas posições 2,5 da benzoquinona (Figura 5b) e a formação de filme na superfície do eletrodo.

Figura 5 – Esquema proposto para a eletrooxidação e formação de filme com o 4-aminofenol.



Fonte: (MENEZES; MAIA, 2006)(p.43).

Legenda: a) Eletrooxidação do 4-aminofenol (I) em quinoneimina (II) e hidrólise de II em 4-benzoquinona (III); b) Esquema de formação de quinonas amino-substituídas pelo acoplamento de aminas em 1,4-benzoquinonas nas posições 2,5, onde Q são compostos quinônicos e A são compostos aminados.

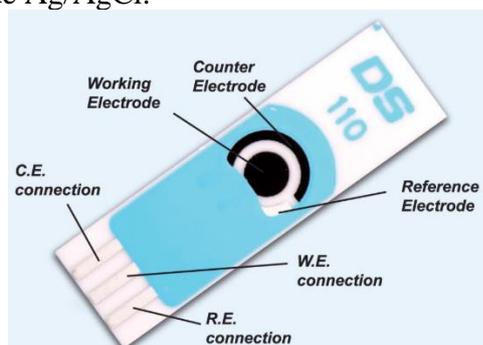
O trabalho de Menezes & Maia (2006) compara polímeros formados em pH 4, 6 e 8 e as contribuições das ligações N- e O-. Os polímeros produzidos em pH 4 apresentam um maior contingente de ligações fenil-N-fenil (sistema mais ressonante), com grande capacidade de retenção de carga. Os polímeros produzidos em pH 6 e 8 possuem uma distribuição mais homogênea entre as ligações fenil-N-fenil e fenil-O-fenil. Ambos apresentam uma capacidade reduzida de retenção de carga, a qual aparentemente está ligada à precipitação do complexo de transferência de carga e o aumento na formação do filme polimérico.

2.1.2 Eletrodos de Quadro Impresso

Sensores eletroquímicos fornecem a possibilidade de um monitoramento local do analito em questão, devido ao tamanho pequeno e à sua portabilidade. Os eletrodos de quadro impresso (Figura 6) são compostos por três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) e utilizam como transdução de sinal a eletroquímica. Assim, as reações químicas que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho são convertidas num sinal elétrico através do transdutor. Esse sinal elétrico é posteriormente processado num equipamento que permite analisar o resultado obtido. Este tipo de eletrodo é amplamente empregado na monitorização de glicose no sangue.

Uma série de suportes é compatível com a montagem de eletrodos de quadro impresso, sendo a cerâmica o modelo mais utilizado (MOREIRA *et al.*, 2016).

Figura 6 – Eletrodo de quadro impresso C-110 (DropSens) com eletrodos auxiliar e trabalho de tinta de carbono e referência de Ag/AgCl.



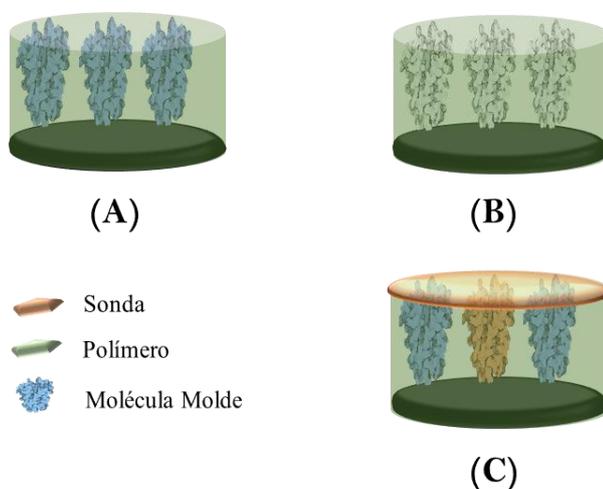
Fonte: (DROPSSENS, 2016)(p.15).

Carbono, prata, ouro e platina são frequentemente empregados como materiais condutores nos trilhos de eletrodos de quadro impresso. Eletrodos de carbono são relativamente inertes, muito mais baratos que ouro e platina. Ligantes poliméricos ou minerais podem ser adicionados às tinturas de carbono para aumentar a adesão da tintura na superfície dos suportes (em geral plásticos ou cerâmicas), e estes ligantes podem modificar a condutividade dos eletrodos e melhorar características eletroquímicas (CHURINSKY; GRGICAK, 2014; Pine Research, 2016).

Unidades de bioreconhecimento podem ser acopladas aos eletrodos de quadro impresso. Os materiais biomiméticos vem sendo utilizados como alternativa ao uso de anticorpos e enzimas, apresentando maior estabilidade e fácil preparo. Os eletrodos de quadro impresso são ainda de fácil fabricação e descartáveis, fatores esses que tornam a tecnologia atraente para aplicações clínicas (MOREIRA *et al.*, 2013, 2016; REBELO *et al.*, 2016).

Os eletrodos de quadro impresso atraem interesse como plataformas para sensores compatíveis com a impressão de superfície por produzir uma interface estreita, na qual o molde empregado gera “canais” no polímero. A permeabilidade da sonda no PIM pode então variar em função da interação específica do polímero com a molécula molde, por obstrução desses canais (*Gate Effect*)(Figura 7)(YÁÑEZ-SEDEÑO; CAMPUZANO; PINGARRÓN, 2017).

Figura 7 – Canais que promovem o “Gate effect” em polímeros impressos na superfície de eletrodos de quadro impresso.



Fonte: Do autor.
 Legenda: Polímero impresso antes (A) e após a remoção (B) da molécula molde. A adsorção do analito em (C) ocorre e a sonda é subsequencialmente acondicionada na superfície dos eletrodos. Os canais livres são preenchidos com a sonda, variando a permeabilidade da sonda de maneira inversamente proporcional à adsorção do analito.

2.1.3 Transdução Eletroquímica

Para estudos eletroquímicos são empregados métodos de controle galvanostático, por manipulação da corrente i , ou potenciostático, por manipulação do potencial E . Um potenciostato opera com a diferença de potencial obtida entre o eletrodo de trabalho e o referência (o qual apresenta um loop de impedância elevada), e a resposta experimental observada é a corrente i , conduzida entre o par trabalho/auxiliar, seguindo a lei de *Ohm*

$$R = \frac{E}{i} \quad (\text{Equação 1})$$

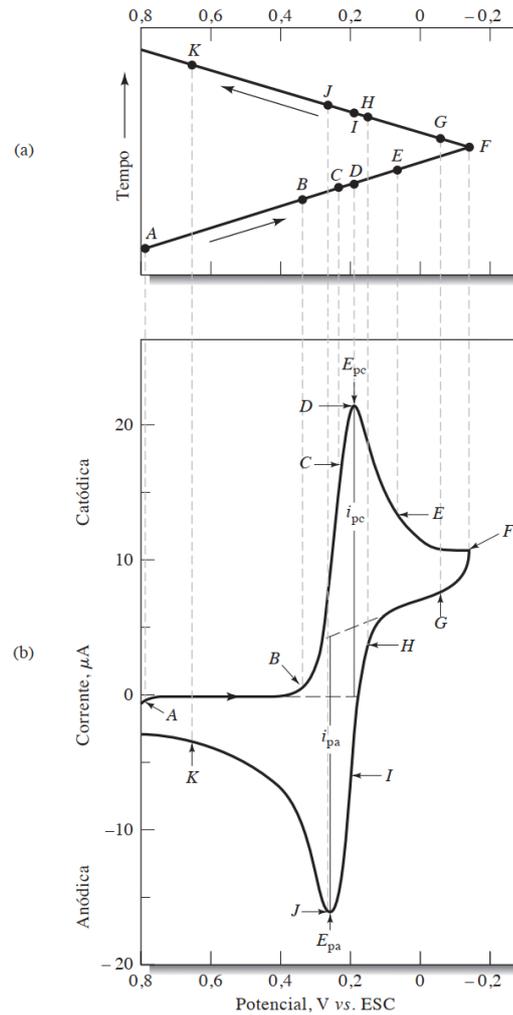
onde R é a resistência apresentada pelo circuito (Figura 8)(BARD; FAULKNER, 2000).

um potencial onde nenhuma oxidação ocorre. Determina-se uma faixa de potencial na qual será feita a leitura e a varredura anódica segue para os valores mais positivos. Após atingir o valor final da faixa pré-determinada, geralmente estabelecido antes do ponto de oxidação dos solventes ou dos eletrólitos de suporte, o sentido da varredura é invertido e o potencial segue até o menor valor da faixa de trabalho. Nesta varredura catódica ocorre a redução de parte das espécies oxidadas na varredura anódica (GIRAULT, 2004). O sinal consiste em uma corrente faradáica, I_f , sendo registrada em uma região relevante do potencial aplicado, revelando a região da faixa onde a reação ocorre (Figura 9b). Também existe uma contribuição capacitiva: durante a varredura a carga da dupla camada elétrica se modifica e esta contribuição é amplificada com um aumento da velocidade de varredura. A corrente total é definida como

$$I = I_c + I_f = C_d \frac{dE}{dt} + I_f = vC_d + I_f \quad (\text{Equação 2})$$

onde v corresponde à velocidade de varredura e C_d a capacitância do sistema. A capacitância é definida por $C = q/E$, onde q é a carga acumulada por esse capacitor (GIRAULT, 2004).

Figura 9 – Voltametria Cíclica.



Fonte: (SKOOG *et al.*, 2003)(p. 656).
 Legenda: (a) Variação de potencial em função do tempo e
 (b) voltamograma cíclico de uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Alguns parâmetros analíticos importantes em um voltamograma cíclico são as magnitudes dos picos de corrente, i_{pa} e i_{pc} , e os potenciais nos quais estes picos ocorrem, E_{pa} e E_{pc} (SKOOG *et al.*, 2003).

Pares redox onde ambas as espécies trocam elétrons com o eletrodo de trabalho de forma rápida e equivalente são denominados reversíveis. Nestes sistemas, o processo de transferência de elétrons permanece em equilíbrio, seguindo a equação de *Nernst*

$$E = E^\theta + 2,303 \frac{RT}{nF} \log \left(\frac{Ox}{Red} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

onde E^θ é o potencial padrão do eletrodo, medido contra o eletrodo normal de hidrogênio e relativo às atividades das espécies oxidadas (*Ox*) e reduzidas (*Red*) do sistema em equilíbrio. R

é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1}$), T é a temperatura, n é o número de elétrons e F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1})(BRETT; BRETT, 1993).

A equação de *Randles* e *Sevcik* fornece a corrente do pico I_p

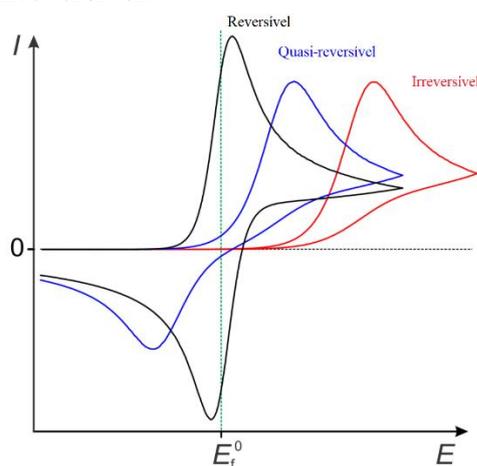
$$I_p = (2.69 \times 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2} \quad (\text{Equação 4})$$

onde A é a área do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão das espécies ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C é a concentração das espécies (mol dm^{-3}), v é a velocidade de varredura (V s^{-1}) e I_p é a corrente do pico. Em sistemas reversíveis, o total de espécies oxidadas no pico anódico será equivalente ao total reduzido no pico catódico. As informações do diagnóstico para reações reversíveis ficam sumarizadas como:

- Linearidade entre I_p e $v^{1/2}$;
- E_p independente de v ;
- $\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = 57,0 n^{-1} \text{ mV}^{-1}$;
- $|I_{pa}/I_{pc}| = 1$.

Se alguma das condições descritas não for seguida o sistema não pode ser considerado reversível, podendo ser denominado quasi-reversível ou irreversível (Figura 10), dependendo da extensão da irreversibilidade (BRETT; BRETT, 1993).

Figura 10 – Sistemas reversível, quasi-reversível e irreversível.



Fonte: Do autor.

A irreversibilidade eletroquímica é causada por uma troca lenta de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo de trabalho. Na ocorrência de reações irreversíveis do tipo $O + ne^- \rightarrow R$, por exemplo, não se observa a formação de um pico na varredura catódica. O pico

(anódico neste exemplo) passa a ser descrito como

$$I_p = -2,99 \times 10^5 n(\alpha n')^{1/2} ACD^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{Equação 5})$$

onde α é o coeficiente de transferência de carga (anódica neste caso), n' é o número de elétrons transferidos durante o passo determinante de velocidade (BARD; FAULKNER, 2000; BRETT; BRETT, 1993).

Um sistema, contudo, pode não ser rápido como um sistema reversível, e nem lento como um irreversível. Nestes casos quasi-reversíveis, o comportamento é determinado tanto por fenômenos de transferência de carga quanto transporte de massas. Em velocidades de varredura mais lentas o comportamento se aproxima ao de um sistema reversível. Proporcionalmente com o aumento desta velocidade de varredura, o sistema quasi-reversível passa a exibir cada vez mais características de sistemas irreversíveis. Com o aumento desta “irreversibilidade” é possível observar um decréscimo na altura do pico de corrente (quando comparado ao sistema reversível) e ocorre um distanciamento entre os picos catódico e anódico (BRETT; BRETT, 1993).

2.1.3.2 Cronoamperometria (CA)

Constituindo o mais simples método amperométrico transitório, a cronoamperometria monitora em função do tempo a corrente resposta proveniente de uma variação de potencial para um valor onde ocorra uma redução simples ou uma oxidação simples. Ao modificar o potencial, a dupla camada é carregada promovendo uma corrente capacitiva, I_C . Esta corrente decai a zero em menos de 50 μs e pode ser negligenciada em análises com tempos maiores. As contribuições restantes derivam da corrente faradáica, I_f , referente à transferência de elétrons. Para eletrodos planares, idealizando-se um sistema simples onde apenas uma das espécies está inicialmente presente (ex.: $R \rightarrow O + ne^-$), a corrente faradáica pode ser descrita pela *equação de Cottrell*

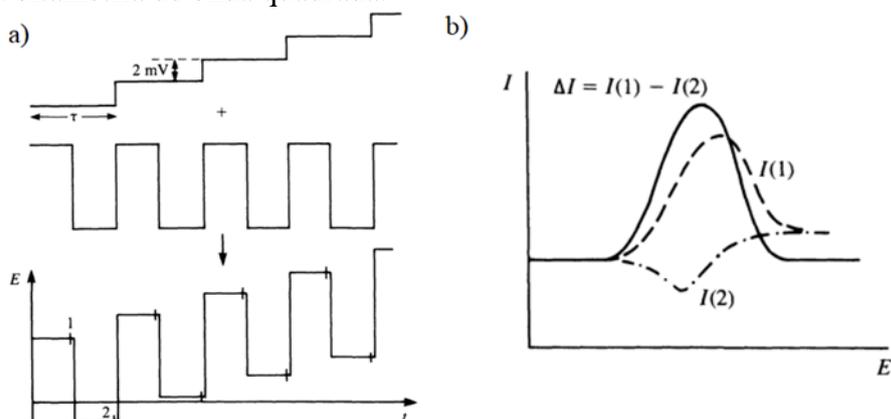
$$I_f(t) = nFAC \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (\text{Equação 6})$$

onde I_f , n , F , A , C , D e t correspondem à corrente faradáica (A), número de elétrons envolvidos na transferência de massa, constante de Faraday (C mol^{-1}), área do eletrodo (cm^2), concentração inicial da espécie (espécie reduzida neste caso) (mol cm^{-3}), coeficiente de difusão da espécie ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e tempo (s), respectivamente (BRETT; BRETT, 1993; GIRAULT, 2004).

2.1.3.3 Voltametria de onda quadrada (VOQ)

A voltametria de pulsos se baseia na aplicação de etapas de potenciais. Ao se aplicar um pulso de potencial, a contribuição capacitiva na corrente se dissipa muito mais rapidamente que a contribuição faradáica. Quando comparada a outras técnicas voltamétricas, a voltametria de onda quadrada promove um menor consumo de espécies eletroativas, com alta velocidade nas análises e reduz o problema de bloqueio da superfície do eletrodo. As etapas de potencial aplicadas na VOQ compõem uma onda quadrada sobreposta em uma escada (Figura 11a), onde as amostragens de corrente ocorrem ao final de pulsos de sentido positivo e negativo. O sinal registrado é a diferença entre as leituras de duas etapas consecutivas de tendência oposta, ou corrente δ , e o gráfico final forma um pico. Os picos correspondentes à oxidação e redução de espécies eletroativas podem ser obtidos no mesmo experimento ao se utilizar a resposta de pulsos de apenas um dos sentidos (Figura 11b). Por se tratar de uma técnica diferencial, a contribuição residual capacitiva é subtraída. Este fenômeno favorece a análise de compostos orgânicos em eletrodos sólidos, uma vez que frequentemente estes compostos adsorvem no eletrodo e técnicas diferenciais podem discriminar efeitos que permanecem mais ou menos constantes antes e depois da aplicação do pulso (BRETT; BRETT, 1993).

Figura 11 – Voltametria de onda quadrada.



Fonte: (BRETT; BRETT, 1993)(p. 220).

Legenda: (a) Sobreposição de etapas em escada e onda quadrada: 1 - pulsos de sentido positivo; e 2 - negativo. (b) Resposta típica, com a corrente δ representada por ΔI .

2.1.3.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

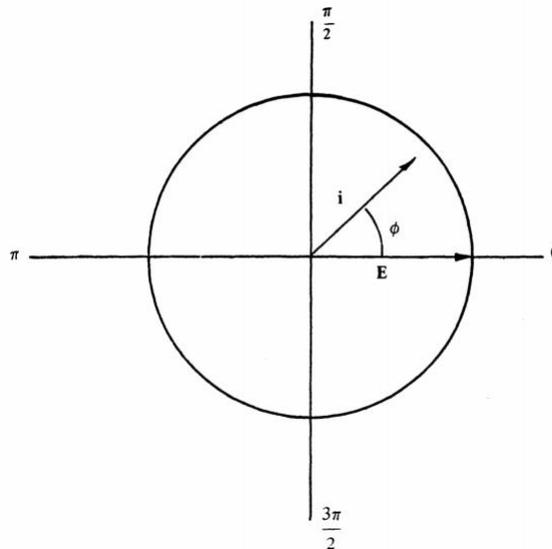
A determinação da impedância de um sistema eletroquímico envolve a aplicação de perturbações, as quais podem se basear em uma varredura linear ou etapas de potenciais que

forcem o sistema a sair do estado de equilíbrio. Estas perturbações podem ser promovidas com aplicação de um potencial ou corrente e, por se tratar de variações de baixa amplitude, estes métodos têm menos chance de proporcionar modificações durante a análise. A resposta a estas perturbações, que geralmente são sinusoidais, permite diferenciar o sinal em fase e amplitude. Medidas da diferença de fase e da amplitude (como a impedância) permitem avaliar durante um processo em um eletrodo, a contribuição da difusão, cinética, dupla camada e reações entre os eletrólitos. O elemento em fase determina o componente real do sistema (resistivo), enquanto o elemento fora de fase determina o componente imaginário (capacitivo)(BRETT; BRETT, 1993; SUNI, 2008).

Os dados do sistema eletroquímico coletados experimentalmente são comparados a um circuito equivalente que contenha combinações de resistências e capacitâncias (indutâncias são consideradas apenas em casos de frequências de grande perturbação, $> 10^6$ Hz). As combinações são utilizadas geralmente para reações faradáicas, apresentando-se um elemento representativo para o transporte por difusão, outro para a cinética (puramente resistivo) e um último para a capacitância da dupla camada (BRETT; BRETT, 1993).

Uma vez que se trata de um circuito de corrente alternada ($V = V_0 \text{ sen } \omega t$; no qual ω é a frequência [rad.s^{-1}]) (Figuras Figura 12 e Figura 13), a impedância se caracteriza como razão entre potencial e corrente ($Z = i/U$); considerando um sistema com diferentes fases. Podemos analisar a impedância em uma porção resistiva, R , onde a voltagem e a corrente estão em fase ($I = \frac{V_0}{R} \text{ sin } \omega t$); e uma porção reativa (sendo a reatância definida por $X_c = 1/\omega C$), com 90° de diferença de fase entre voltagem e corrente (BRETT; BRETT, 1993).

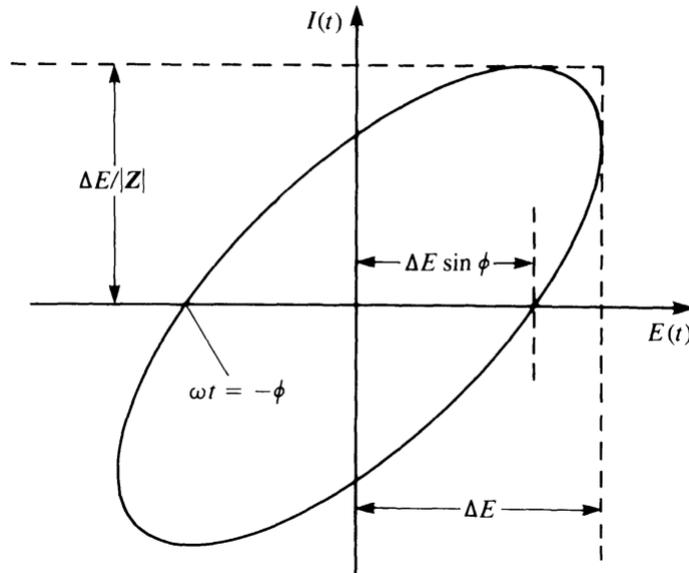
Figura 12 – Diagrama de fases mostrando vetores de corrente e voltagem separados pelo ângulo de fase ϕ .



Fonte: (PLETCHER *et al.*, 2001) (p. 253).

Os detectores sensíveis à fase, como o analisador de respostas de frequência, comparam a perturbação aplicada ao sistema com a resposta obtida, fornecendo a diferença de fase em relação às amplitudes da resposta. Quando o sinal aplicado é registrado contra o sinal resposta, o resultado é uma *figura de Lissajous* (Figura 13) e sua forma conduz à diferença de fases e, conseqüentemente, à impedância. Com uma perturbação de sinal na forma de $E(t) = \Delta E \sin \omega t$, obtém-se

Figura 13 – Figura de Lissajous para uma medida de impedância.



Fonte: (BRETT; BRETT, 1993) (p. 228).

e a resposta é

$$I(t) = \frac{\Delta E}{|Z|} \sin(\omega t + \phi) \quad (\text{Equação 7})$$

onde Z representa a impedância (Ω), $\omega = 2\pi f$ e ϕ é a mudança de fase ($^\circ$).

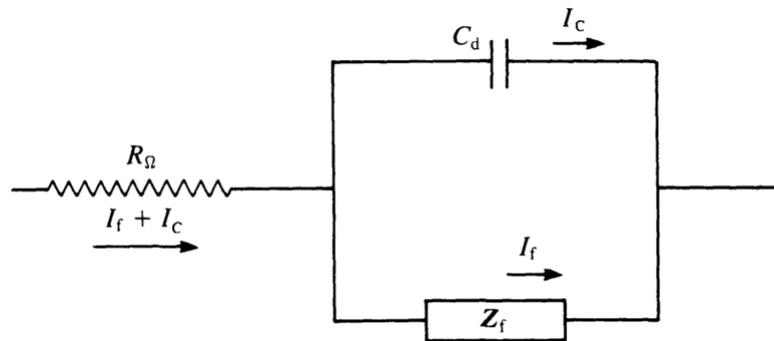
Como mostrado na Figura 13, valores de algumas variáveis importantes podem ser obtidos geometricamente da *figura de Lissajous* (BRETT; BRETT, 1993).

Todo sistema eletroquímico pode ser correspondido por um circuito que compreenda uma combinação de resistências e capacitâncias. Este circuito precisa conter componentes que representem:

- a resistência ôhmica não compensada, R_Ω , que representa, na maioria dos casos, a resistência entre os eletrodos de referência e trabalho;
- a dupla camada: um capacitor puro de capacitância C_d ;
- a impedância do processo faradáico Z_f .

O circuito de *Randles* (Figura 14) será utilizado como exemplo nas explicações seguintes.

Figura 14 – Circuito equivalente de Randles.



Fonte: (BRETT; BRETT, 1993) (p. 228).

Legenda: Circuito representando um sistema eletroquímico de processo de transferência de carga simples. R_{Ω} é a resistência apresentada pelos materiais dos eletrodos e pela solução que comunica os mesmos, C_d é a capacidade da dupla camada e Z_f é a impedância do processo fadático.

O circuito apresentado na Figura 14 possui uma combinação de Z_f e C_d em paralelo e pode ser subdividido em dois caminhos equivalentes:

1. uma resistência, R_s , em série com a pseudocapacitância, C_s



onde $I = I_R = I_C$. Para circuitos RC, seguindo as leis de *Kirchhoff* relaciona-se que

$$Z = R - iX_C \quad (\text{Equação 8})$$

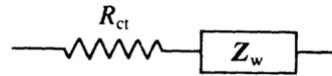
onde $X_C = (\omega C_s)^{-1}$, e representa a reactância, medida em ohms. A impedância dos componentes em fase é geralmente nomeada Z' , e a do componente fora de fase (ex.: $\pi/2$) como Z'' , e com isso. $Z = Z' + iZ''$. Para este caso,

$$Z' = R_s \quad (\text{Equação 9})$$

$$Z'' = (\omega C_s)^{-1} \quad (\text{Equação 10})$$

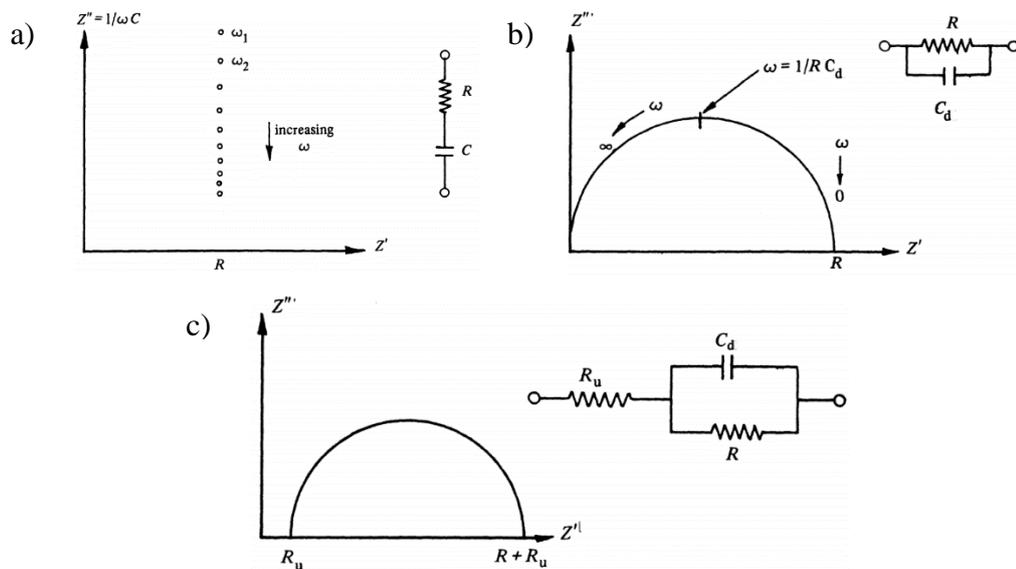
É possível representar este fenômeno em uma plotagem de *Nyquist* como uma linha vertical (Figura 15a), uma vez que Z' é constante e Z'' varia com a frequência (BRETT; BRETT, 1993; PLETCHER *et al.*, 2001).

2. uma resistência à transferência de carga, R_{ct} , e a impedância que ilustra a dificuldade das espécies eletroativas no transporte de massa, denominado *impedância de Warburg*, Z_w



O resultado é um círculo com o centro em $Z' = R_{\Omega} + R_{ct}/2$, com o raio $R_{ct}/2$ (Figura 15c).

Figura 15 – Plotagem progressiva (Nyquist) dos elementos de um circuito equivalente de Randles. $R_u = R_{\Omega}$.



Fonte: (PLETCHER *et al.*, 2001) (p. 266).

Para frequências elevadas, Z'' apresenta valores negligenciáveis, que tendem a aumentar proporcionalmente à redução da frequência. Em frequências baixas, uma vez que C_s proporciona uma elevada reatância, a corrente passa predominantemente pelo R_{ct} , ampliando Z' e reduzindo Z'' (BRETT; BRETT, 1993).

Em uma das situações limitantes na análise do modelo completo do *circuito de Randles*, onde ω tende a 0, as porções real e imaginária da impedância total podem ser determinadas por

$$Z' = R_{\Omega} + R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2} \quad (\text{Equação 11})$$

$$Z'' = \sigma\omega^{-1/2} + 2\sigma^2 C_d \quad (\text{Equação 12})$$

onde

$$Z = Z' - R_{\Omega} - R_{ct} + 2\sigma^2 C_d \quad (\text{Equação 13})$$

A equação 14 produz uma reta que intercepta o eixo Z' em $R_{\Omega} - R_{ct} + 2\sigma^2 C_d$.

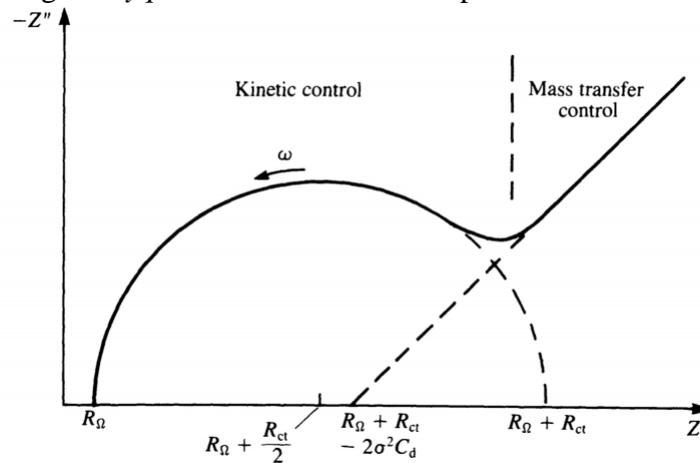
Seguindo o modelo completo de *Randles* (Figura 14), é possível determinar separadamente as impedâncias dos componentes em fase e fora de fase por

$$Z' = R_{\Omega} + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad (\text{Equação 14})$$

$$Z'' = \frac{C_d R_{ct}^2 \omega}{1 + \omega^2 C_d^2 R_{ct}^2} \quad (\text{Equação 15})$$

e estes componentes são representados através de uma plotagem Nyquist (Figura 16).

Figura 16 – Plotagem Nyquist de um circuito completo de *Randles*.



Fonte: (BRETT; BRETT, 1993) (p. 228).

Neste caso, o R_{ct} pode ser obtido experimentalmente por extrapolação dos pontos no semicírculo até o eixo Z' . Baseado na relação dos valores de R_{ct} , Z_w e C_d de cada sistema, podem ser observados somente a linha da difusão ou somente o semicírculo (BRETT; BRETT, 1993; PLETCHER *et al.*, 2001).

Quando um analito afeta alguma(s) das variáveis do circuito sem que esta variável seja afetada por espécies interferentes, a análise de impedância pode ser utilizada na detecção deste analito. A R_{ct} pode ser sensível à adsorção do analito, especialmente em casos de espécies grandes como proteínas ou células, que impedem significativamente a transferência de elétrons (SUNI, 2008).

2.2 A FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE E O GÊNERO FLAVIVIRUS

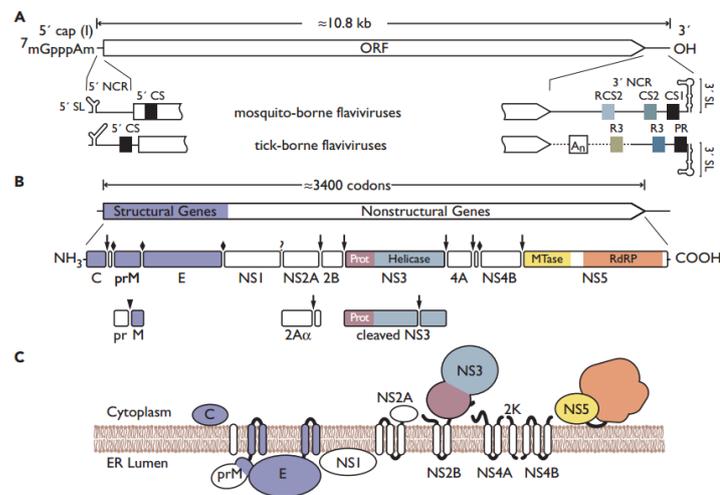
O gênero flavivírus é composto por mais de 50 espécies, com boa parte dos componentes sendo patógenos humanos transmitidos por artrópodes, os quais causam uma série de doenças

tais como febre, encefalite e febres hemorrágicas. Os *Vírus da Encefalite Japonesa (JEV)*, da *Febre Amarela (YFV)*, o *Vírus do Leste do Nilo (WNV)* e o da *DENV* preocupam os órgãos de vigilância epidemiológica em âmbito global (LINDENBACH *et al.*, 2013). A redução de esforços no controle dos mosquitos, o surgimento de ampla resistência à inseticidas (incluindo piretróides) e a densa urbanização são fatores que possibilitaram a disseminação dos flavivírus nas Américas (LINDENBACH *et al.*, 2013; SHAPSHAK; SINNOTT, 2015; YAKOB; WALKER, 2016).

Apesar de aspectos como a organização dos genomas e mecanismos de replicação da família *Flaviviridae* serem similares, os membros dessa família apresentam variações no espectro de hospedeiros susceptíveis e nas formas de transmissão (VILLORDO *et al.*, 2016). Os vírions desta família são envelopados e seu envelope é composto por uma bicamada lipídica onde estão inseridas as glicoproteínas do envelope (E) e de membrana (M). Este envelope envolve o nucleocapsídeo, que abriga um genoma de RNA senso-positivo de fita simples complexado com várias cópias de uma proteína do capsídeo (C). A adsorção e penetração das partículas virais à célula hospedeira é realizada por endocitose mediada por receptor e, após este processo, a acidificação do pH endossomal favorece a liberação do RNA viral no citoplasma. Este RNA serve tanto de mensageiro (RNAm) para a tradução das proteínas virais, quanto molde para sua própria replicação genômica (LINDENBACH *et al.*, 2013).

O processo de internalização consiste em uma endocitose mediada por receptor com envolvimento de clatrina onde, após a penetração, ocorre o desarranjo do nucleocapsídeo com a liberação do genoma viral no citoplasma. A tradução do RNA (Figura 17a) viral produz uma poliproteína (Figura 17b), a qual apresenta em sua região N-terminal as proteínas estruturais (C-prM-E), seguidas pelas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) (LINDENBACH *et al.*, 2013; SAXENA *et al.*, 2016).

Figura 17– Organização genômica da família Flaviviridae.



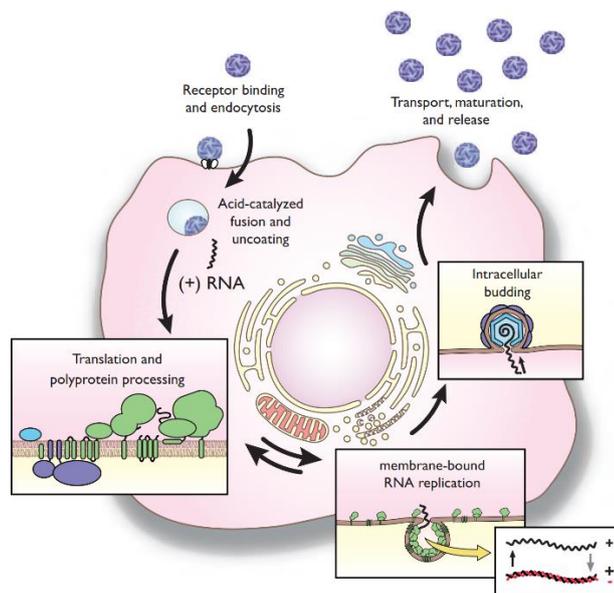
Fonte: KNIPE; HOWLEY (2013, v. I, p.717).

Legenda: Estrutura genômica e elementos do RNA. B: Processamento e produtos de clivagem da poliproteína. C: Topologia da poliproteína na membrana do retículo endoplasmático.

A enzima peptidase sinal do hospedeiro é responsável pelas clivagens C/prM, prM/E, E/NS1e 2K-NS4B. Uma serinoprotease viral, a NS2B-3, atua nas junções NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K e NS4B/NS5, e o mecanismo responsável pela separação da junção NS1-2A ainda não foi elucidado (EDELING; DIAMOND; FREMONT, 2014; LINDENBACH *et al.*, 2013; PARKASH; SHUEB, 2015).

As proteínas não estruturais iniciam o processo de replicação do genoma viral, com subsequente empacotamento do genoma viral sintetizado em múltiplas cópias da proteína C. A proteína E é glicosilada para garantir o enovelamento de forma apropriada, de maneira que sua estrutura terciária permita a formação de heterodímeros com a prM (prM/E). A prM/E se orienta no lúmen do retículo endoplasmático associando-se em trímeros e, acredita-se que o entrelaçamento dessas interações oligoméricas promova a formação de uma superfície curvada que dê origem ao início da construção do vírion. As partículas virais após montadas se pronunciam no retículo, destacando-se do mesmo e sendo secretadas da célula. A maturação do vírion ocorre em compartimentos ácidos do complexo de golgi (Figura 18)(PLETNEV *et al.*, 2003; SAXENA *et al.*, 2016).

Figura 18 – Ciclo de replicação de um Flavivirus.

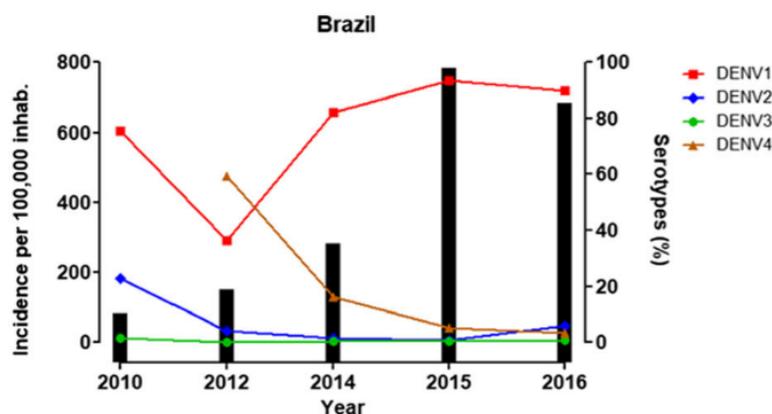


Fonte: KNIFE; HOWLEY (2013, v. I, p.714).

2.2.1 Dengue

O vocábulo “dengue”, que dá nome ao vírus, é proveniente da língua *Swahili* e significa doença causada por um espírito mau. O *DENV* pertence à família *Flaviviridae* e é transmitido ao homem pela picada de mosquitos *Aedes aegypti* ou *A. albopictus*. Trata-se da arbovirose mais frequente no mundo, com mais de 3 bilhões de pessoas vivendo nas áreas endêmicas da doença. A incidência anual de infecções ultrapassa os 400 milhões ao ano, com 500 mil hospitalizações por febre hemorrágica, priorizando crianças, e 21 mil mortes. Estudos sobre a disseminação da doença demonstram um aumento de 400% na incidência de casos entre 2000 e 2013. O aquecimento global, o aumento na frequência de vôos internacionais, a rápida urbanização, as condições precárias de saneamento e a falta de eficácia nos programas de controle de mosquitos são fatores que vem contribuindo para o aumento das áreas endêmicas, nos dias atuais bem estabelecidas em mais de 100 países (GUZMAN *et al.*, 2010; REINHOLD; LAZZARI; LAHONDÈRE, 2018; WILDER-SMITH *et al.*, 2019). O estudo de Salles *et al.* (2018), que correlaciona o número de casos registrados com a incidência dos sorotipos, mostra que até 2016 o sorotipo mais prevalente no Brasil era o DENV-1 (com mais de 80% dos casos), seguido pelos sorotipos 2, 4 e 3 (Figura 19).

Figura 19– Incidência do vírus da Dengue no Brasil de 2010 a 2016.



Fonte: SALLES *et al.* (2018, p.4).

Legenda: As barras representam no eixo Y esquerdo a incidência de casos por 100,000 habitantes. As linhas se relacionam ao eixo Y direito, mostrando a relação de sorotipos encontrada nos diagnósticos realizados.

O mosquito vetor se infecta normalmente ingerindo sangue de indivíduos virêmicos. Após a infecção ocorre um período de incubação extrínseca, ou seja, um período necessário para que o vetor se torne apto a infectar um hospedeiro vertebrado. Este período gira em torno de 10 dias, podendo diminuir com temperaturas ambientes mais elevadas. A partícula viral percorre então o trato intestinal do vetor até atingir as glândulas salivares, onde passa a ser inoculado juntamente às proteínas salivares do mosquito, as quais colaboram com a infecção de um novo hospedeiro. Em hospedeiros susceptíveis, as partículas virais infectam células dendríticas imaturas presentes no sítio da picada do mosquito, que migram pelo sistema linfático, onde a infecção se dissemina em células como monócitos e macrófagos, antecedendo a disseminação sistêmica (GUZMAN *et al.*, 2010; REINHOLD; LAZZARI; LAHONDÈRE, 2018).

Os vírus foram classificados em quatro sorotipos geneticamente distintos, apresentando alto grau de homologia e capazes de causar doenças semelhantes. Os sorotipos participam de um mesmo complexo antigênico apresentando, portanto, um elevado grau de reatividade cruzada. A infecção por um sorotipo fornece imunidade duradoura contra aquele mesmo sorotipo, mas não aos outros tipos. A distinção histórica foi feita baseada na capacidade limitada de neutralização cruzada apresentada pelos anticorpos de um sorotipo para com os seus heterólogos. Estudos de sequenciamento revelaram que um sorotipo pode diferir do outro a níveis de aminoácidos em até 40% de variação nas proteínas do envelope (LINDENBACH *et al.*, 2013; WILDER-SMITH *et al.*, 2019).

Os antígenos virais são capazes de estimular a resposta inata por aumento da atividade

do sistema complemento e dos títulos de interferon (IFN) do tipo I. Estes mesmos antígenos incitam ainda a resposta adaptativa como resultado da interação sorotipo específica de células TCD4+ e TCD8+ com a lise das células infectadas pelo vírus e a produção de IFN- γ , fator de necrose tumoral- α (TNF) e linfotoxinas. Os primeiros anticorpos produzidos têm como alvo as proteínas virais prM, E e NS1. Após uma infecção com qualquer sorotipo, a resposta adquirida fornece imunidade duradoura aos vírus homólogos, mas uma resposta de curta duração aos heterólogos. Esta proteção cruzada, em casos em que o anticorpo reconhece um sorotipo heterólogo sem neutralizar a infectividade do vírus, amplia o risco de desenvolvimento da forma clínica severa. O mecanismo por trás deste fenômeno é o aumento da infecção mediado por anticorpos (AMA). Neste modelo, anticorpos com atividade cruzada ou em concentração subneutralizante se ligam aos sorotipos de DENV. O imunocomplexo se liga posteriormente à receptores Fc γ , facilitando desta forma a entrada do vírus em monócitos, macrófagos e células dendríticas. Esta vem sendo uma das maiores barreiras no desenvolvimento de uma vacina eficaz. A AMA promove um aumento no número de células infectadas, gerando uma grande carga viral, a qual estimula uma resposta pró-inflamatória desbalanceada, que pode causar danos endoteliais capilares e extravasamento vascular. O quadro pode evoluir a um choque hipovolêmico, como o observado da síndrome de choque da dengue. (PIERSON; DIAMOND, 2013; WILDER-SMITH *et al.*, 2019).

2.2.1.1 Sintomas e Patologia

Após a inoculação do vírus, a maior parte dos pacientes ou apresentam manifestações assintomáticas ou sintomas mais leves. Cerca de 25 % apresentam quadro de dengue febril auto limitante com distúrbios sanguíneos e bioquímicos. As complicações de relevância clínica incluem a síndrome do extravasamento capilar sistêmico, distúrbios na coagulação associados com sangramentos e envolvimento de órgãos com danos teciduais, geralmente hepáticos ou neurológicos. Os casos são divididos em sintomáticos, quando o indivíduo não possui complicações, ou dengue severa, quando o paciente apresenta extravasamento plasmático severo o bastante para insuficiência respiratória ou síndrome de choque, sangramento grave ou envolvimento de órgãos (PIERSON; DIAMOND, 2013; WILDER-SMITH *et al.*, 2019).

A presença do vírus no sangue pode ser observada clinicamente em até 6 dias após a picada do mosquito. Os sintomas se iniciam passado um período de incubação de 2 a 7 dias após a picada do mosquito. Em casos sintomáticos clássicos observa-se um quadro próximo à

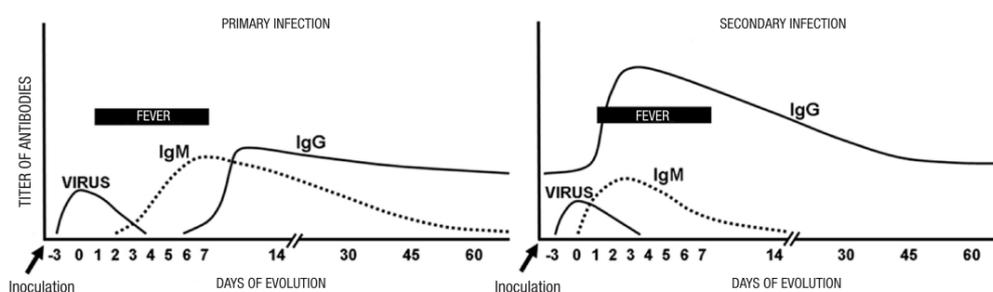
uma infecção pelo vírus da gripe, com experiências subclínicas que variam de febre branda acompanhada de dor de cabeça frontal, dor atrás dos olhos, mialgias generalizadas e artralrias, rubor na face, anorexia, dor abdominal e náuseas. Com os cuidados apropriados, a recuperação do quadro sintomático geralmente não ultrapassa 15 dias. As erupções cutâneas convalescentes podem persistir por algumas semanas. Efeitos residuais como cansaço, fraqueza, mialgia e depressão podem persistir em adultos por alguns meses (CASTELLANOS, 2015; PIERSON; DIAMOND, 2013; WILDER-SMITH *et al.*, 2019).

2.2.1.2 Diagnóstico Laboratorial

Testes laboratoriais de diagnóstico preciso são fundamentais em fases iniciais da infecção para que o paciente possa receber os cuidados adequados durante a manifestação clínica severa. Um caso de dengue pode ser confirmado por diagnóstico sorológico, detectando uma resposta imunológica específica, seja pela detecção de imunoglobulinas ou pela neutralização da hemaglutinação ou pela reação de neutralização da infecção. Outras estratégias envolvem a detecção de proteínas solúveis como a NS1, do RNA viral, ou por isolamento do vírus em cultura. Um método de diagnóstico ideal conta com custo acessível, alta sensibilidade (evitando falsos negativos), especificidade (evitando falsos positivos) e robustez. A performance deve ser rápida e simples, sem necessitar aparelhagem complexa e mão de obra altamente especializada (BLACKSELL, 2012; CASTELLANOS, 2015; PARKASH; SHUEB, 2015).

Nesta sessão são abordadas várias metodologias para o diagnóstico da dengue, e para fins didáticos, o início da fase febril representará o dia 1, conforme mostra a Figura 20.

Figura 20– Cinética dos marcadores sorológicos durante as infecções primária e secundária por DENV.



Fonte: CASTELLANOS (2015, p.619).

O vírus pode ser detectado por diagnóstico molecular durante a viremia (dias -3 a 3), sendo possível distinguir os quatro sorotipos e quantificar a carga viral. A região 3' codificadora da NS5 apresenta uma sequência altamente conservada, sendo utilizada para o diagnóstico não apenas dos quatro sorotipos de dengue, mas também de outros arbovírus como ZIKV, WNV, JEV e YFV. Por mais específico que seja o diagnóstico molecular, a metodologia requer equipamento sofisticado e sem portabilidade e pessoal qualificado, elevando o custo e impossibilitando a aplicação desse diagnóstico em campo (CASTELLANOS, 2015; PARKASH; SHUEB, 2015).

O isolamento do vírus é considerado um diagnóstico padrão ouro na confirmação de casos, sendo executado em mosquitos, culturas de células ou por inoculação intracerebral em camundongos. A presença do agente viral nas células infectadas é avaliada por imunofluorescência ou RT-PCR. Apesar de preciso, o método é demorado (7 a 12 dias), requer mão de obra especializada e estrutura apropriada, e é aplicável apenas durante a viremia, não sendo adequado para o diagnóstico laboratorial rotineiro (DARWISH; ALIAS; KHOR, 2015; PARKASH; SHUEB, 2015).

Durante a fase aguda de uma infecção primária, os níveis de IgM são indetectáveis em metade dos pacientes. Quando os sintomas começam a amenizar e a viremia desaparece, a concentração de IgM evolui de forma que no sexto dia seja detectável em 93% dos pacientes e em 100% no décimo dia. Os níveis de IgM se mantêm elevados por 3 meses e, após 1 a 2 semanas, a resposta por IgG é gerada, podendo ser detectada por ELISA. Em uma infecção secundária, as manifestações clínicas são similares, porém a cinética dos marcadores sorológicos se altera, afetando a estratégia de diagnóstico. A concentração de IgG eleva rapidamente, enquanto a de IgM não ascende tanto quanto observado na infecção primária (

). Outro problema no diagnóstico sorológico é que os anticorpos podem apresentar reatividade cruzada, tanto com sorotipos heterólogos quanto com outros flavivírus com alto nível de homologia nos epítopos em questão (CASTELLANOS, 2015).

As proteínas presentes na superfície da partícula viral possuem a capacidade de aglutinar eritrócitos de aves, sendo um teste utilizado para discriminar infecções primárias de secundárias. O teste consiste na adição de antígenos do vírus ao soro do paciente, onde a mistura é submetida ao contato com eritrócitos (geralmente de ganso) em diluições seriadas. Quando o soro do paciente apresenta anticorpos anti-DENV a formação do complexo antígeno-anticorpo impede a hemaglutinação, sendo visível a olho nu. Esta metodologia apresenta resultados quantitativos com alta sensibilidade, porém é cara, trabalhosa e demorada (requer tratamento

prévio da amostra e diversas diluições), e não pode ser comercializada na forma de teste rápido (CASTELLANOS, 2015; DARWISH; ALIAS; KHOR, 2015; SHAPSHAK; SINNOTT, 2015).

Outra versão de sorologia em placa é o teste de neutralização por redução do número de placas de lise. Neste teste diversas diluições do soro de um paciente são incubadas em meio de cultura com o vírus. Quando a complexação com o anticorpo é capaz de neutralizar a infectividade da partícula viral, a cultura de células apresenta uma diminuição do número de unidades formadoras de placa, quando comparada ao controle de vírus. Quando não ocorre neutralização, o vírus é capaz de infectar as células da cultura, produzindo placas na camada celular (áreas de lise visíveis a olho nu) que podem ser facilmente contadas. A redução do número de placas de lise é considerado padrão ouro na diferenciação sorológica de flavivírus (CASTELLANOS, 2015).

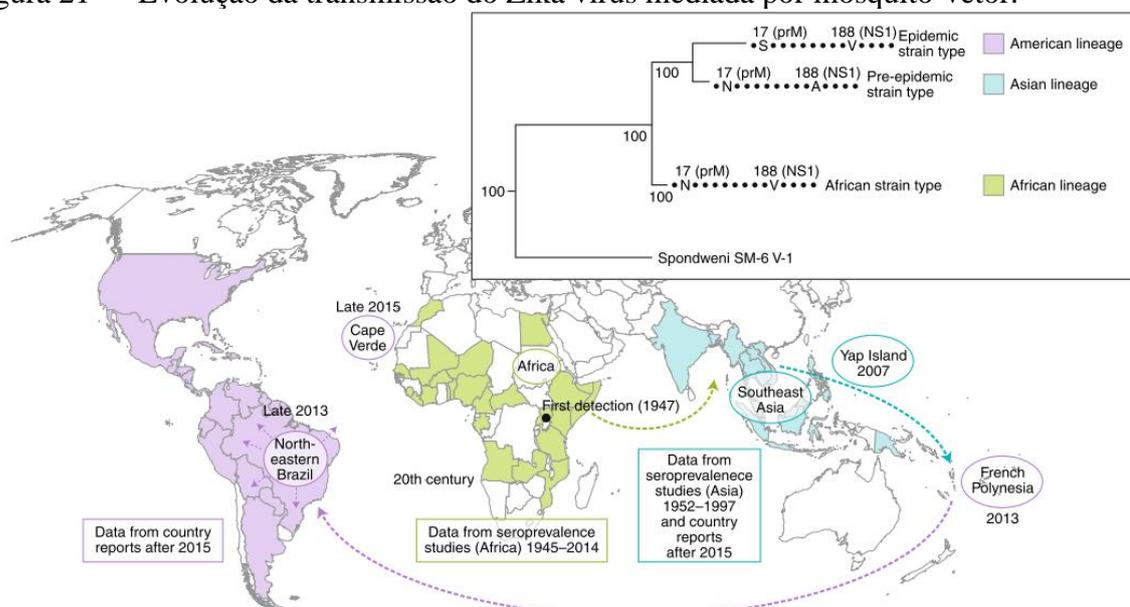
A NS1 é secretada no plasma e pode ser detectada por ELISA em até 4 dias após a viremia, tornando o diagnóstico possível mesmo quando a partícula viral não pode ser detectada. As formas secretadas são detectáveis no soro de pacientes infectados em concentrações de 10 µg a 50 mg L⁻¹. O antígeno solúvel pode ser encontrado em até 6 dias após o início dos sintomas em infecções primárias e em até 12 dias em infecções secundárias, ressaltando que neste último caso, a presença de anticorpos anti-NS1 podem impedir a detecção da proteína por obstrução dos epítomos pelos próprios anticorpos ou pela formação de complemento (CASTELLANOS, 2015; GELANEW; POOLE-SMITH; HUNSPERGER, 2015).

2.2.2 Zika virus

Primeiramente isolado em Uganda no ano de 1947, o ZIKV é um flavivírus transmitido ao homem por vetores pertencentes ao gênero *Aedes sp.*. Sua transmissão foi confirmada por muitas décadas em países como Senegal, Costa do Marfim, Burkina Faso, Nigéria, República da África Central, Uganda, Tailândia, Malásia, Indonésia e Filipinas. No início do século XXI, o vírus expandiu seu ciclo ao pacífico sul e às Américas. Registros de surtos no Gabão e Ilhas Yap em 2007 foram seguidos por um surto maior na Polinésia Francesa em 2013. Neste último, ocorreram mais de 100 mil indivíduos infectados, com o desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré sendo associado a quadros severos da infecção. A propagação do agente nas Américas provocou uma epidemia massiva, com diversas ocorrências de microcefalia congênita consequentes de infecções em gestantes. Esta expansão pode ser dividida territorialmente pela

prevalência de uma das três linhagens: Africana (nativa), Asiática (pré-epidêmica) e Americana (pós-epidêmica) (Figura 21) (GUTIÉRREZ-BUGALLO *et al.*, 2019; MUSSO; J.GUBLER, 2016).

Figura 21 – Evolução da transmissão do Zika vírus mediada por mosquito-vetor.



Fonte: GUTIÉRREZ-BUGALLO *et al.* (2019, p. 562).

Além da microcefalia, outras anomalias congênitas foram associadas à infecção congênita com ZIKV, como lissencefalia, ventriculomegalia e anormalidades oculares. O porque destas anormalidades congênitas terem sido observadas apenas nas américas leva Langerak *et al.* (2019) a discutirem sobre uma potencial ocorrência de aumento da infecção mediado por anticorpo em infecções com ZIKV intensificadas por anticorpos anti-DENV. Em modelos *in vitro*, o ZIKV foi capaz de infectar explantes placentários com maior eficiência na presença de anticorpos anti-DENV. O grupo propôs um mecanismo de transcitose do complexo IgG-vírião materno através do sincício trofoblasto mediado pelos receptores Fc neonatais, semelhante ao que ocorre com o Citomegalovírus e o Vírus da Imunodeficiência Humana. As células do sincício trofoblasto internalizam fluido contendo IgG materno. A região Fc do anticorpo se liga aos receptores Fc na superfície de endossomas ácidos, onde o IgG é liberado na superfície basolateral em pH neutro. Se ligado a um anticorpo cruzado não-neutralizante, este vírião poderá ser liberado no lado fetal das vilosidades coriônicas ainda em sua forma infectiva. Há uma observação clínica condizente com esta teoria de que os vírions presentes em placentas de mulheres infectadas foram encontrados exclusivamente em macrófagos do núcleo das vilosidades coriônicas (células de *Hofbauer*) (LANGERAK *et al.*, 2019).

Evidências recentes revelam outras rotas de transmissão que não a transplacentária ou via vetor. Já foi confirmada a presença de vírions infecciosos no leite materno, saliva e a transmissão sexual é a rota alternativa que mais tem ganhado atenção. Há relatos de que o RNA viral se mantém detectável em amostras de fluidos vaginais por até 3 meses e sêmen por até 6 meses após a infecção. Até mesmo pacientes homens assintomáticos podem transmitir o vírus à/ao parceira(o). Além disso, estudos *in vivo* mostraram inflamação crônica e danos severos em testículos de ratos imunossuprimidos (KOPPOLU; SHANTHA RAJU, 2018; LI *et al.*, 2018).

2.2.2.1 Sintomas e Patologia

Determinar um “dia zero” para o quadro clínico na febre do Zika é uma tarefa complexa, uma vez que não há estabelecimento abrupto de sintomas visíveis como ocorre na febre da Dengue. O período de incubação do vírus no paciente após a inoculação pode durar de 3 a 10 dias. Grande parte dos casos se manifesta de forma assintomática (cerca de 80%), enquanto os casos sintomáticos são semelhantes aos de outras arboviroses, baseados em acessos febris agudos similares aos da dengue, com cefaleia discreta, surgimento de exantema maculopapular pruriginoso acometendo a face, o tronco, os membros, as palmas das mãos e as plantas dos pés, além de outras manifestações, tais como conjuntivite, pirexia, dores musculares, artralgia e mialgia (MUSSO; J.GUBLER, 2016; SAXENA *et al.*, 2016; TU-XUAN NHAN, 2015).

Com os surtos da Polinésia Francesa e das Américas, algumas neuropatias passaram a ser associadas com quadros severos de infecção por Zika. A Microcefalia Congênita e a síndrome de Guillain-Barré ganharam destaque em levantamentos epidemiológicos. Na Microcefalia Congênita ocorre o desenvolvimento cerebral incompleto do feto. O recém-nascido apresentará uma cabeça menor quando comparado a outro de mesmo sexo e idade. O quadro apresenta como consequências deficiências intelectuais, atraso no desenvolvimento, convulsões e problemas de visão e audição em crianças. O Brasil apresentava uma média de 150 a 200 casos de microcefalia congênita por ano antes do surto. Entre outubro de 2015 e janeiro de 2016, durante a epidemia, foram reportados 3,983 casos de microcefalia afetando neonatos com RNA viral do Zika. Após uma retrospectiva, constatou-se que as autoridades da Polinésia Francesa relataram um aumento de casos de má formação fetal coincidindo com o período do surto. Já a Síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune que afeta adultos e causa fraqueza muscular progressiva com paralisia promovida por um distúrbio de desmielinização. Durante a epidemia na Polinésia Francesa houve uma incidência 20 vezes

maior de Síndrome de Guillain-Barré, onde em todos os casos foram observados sintomas compatíveis com uma infecção aguda por Zika vírus. Após a epidemia brasileira, foram observados nos estados do nordeste 121 casos de Síndrome de Guillain-Barré, dos quais 62% dos pacientes apresentaram previamente sintomas compatíveis com a Febre do Zika. As infecções oculares brandas observadas em adultos, com sintomas como conjuntivite e uveíte, podem ocorrer de forma muito mais severa em crianças, evoluindo até neurite ótica, atrofia coriorretinal, coloboma bilateral da íris, hemorragias intraretinais e mesmo cegueira (KOPPOLU; SHANTHA RAJU, 2018; MUSSO; J.GUBLER, 2016).

2.2.2.2 Diagnóstico Laboratorial

O mesmo modelo universal de PCR para flavivírus que tem como alvo a região 3'-codificadora da proteína NS5, já descrito no tópico 2.2.1.2, permite a distinção de várias espécies e sorotipos (ZIKV, WNV, JEV e DENV-1, 2, 3 e 4) durante a viremia. O diagnóstico molecular para ZIKV também foi bem sucedido com regiões codificadoras das proteínas E, NS1 e NS3 e em amostras de soro, sangue, fluido cerebrospinal, sêmen, urina e saliva (KARKHAH *et al.*, 2018; MUSSO; J.GUBLER, 2016; SHAPSHAK; SINNOTT, 2015).

A cultura viral do ZIKV pode ser conduzida em diversas linhas de células, como células epiteliais do rim de macaco *Rhesus* (LLC-MK2) ou macaco africano verde (Vero), e também células de *Aedes pseudoscutellaris* (MOS61 ou AP-61) e *Aedes albopictus* (C6/36) (WAGGONER; PINSKY, 2016).

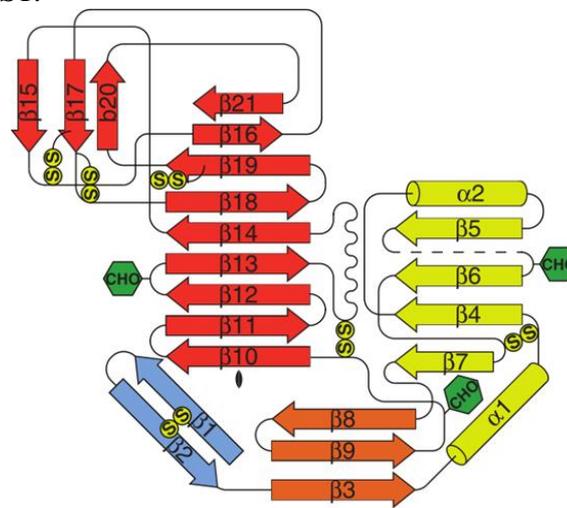
O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, USA) estabeleceu um protocolo de captura de anticorpos IgM com Ensaio Imunosorvente com Enzima Ligada, capaz de detectar a imunoglobulina antiviral em amostras de soro e fluido cerebrospinal. A metodologia é menos subjetiva do que técnicas de imunofluorescência, possibilitando a análise de várias amostras simultaneamente. O teste é liberado apenas em laboratórios aprovados pelo CDC, como forma de um algoritmo multi-teste na validação do método (CDC, 2016).

2.2.3 A NS1

A NS1 é uma glicoproteína (peso molecular ~48 kDa, pI ~5.7) cotranslocada na luz do retículo endoplasmático rugoso, onde a mesma já se dimeriza após a adição de carboidratos ricos em manose. Os dímeros são então destinados aos sítios de replicação, à membrana

plasmática e ao espaço extracelular. Na maioria dos casos, a NS1 é secretada como uma partícula proteolipídica formando uma capa hexamérica em forma de barril com um canal central ocupado por lipídeos. Estes hexâmeros são mantidos por interações hidrofóbicas fracas e a estrutura se dissocia em dímeros na presença de detergentes não iônicos (FIGUEIREDO *et al.*, 2015; SCATURRO *et al.*, 2015). O trabalho de Akey *et al.* (2014) classificou regiões da NS1 flaviviral, como demonstrado na Figura 22, baseado na importância destas áreas na interação da proteína com membranas celulares e com o sistema imune do hospedeiro.

Figura 22 – Diagrama de topologia para um monômero de NS1.



Fonte: AKEY *et al.* (2014, p. 882).

Legenda: O cilindro central (azul), a asa (amarelo) e seu subdomínio conector (laranja) e a escada (em vermelho). As letras α e β se referem a conformações de hélice e fita, respectivamente. Os círculos adjacentes (amarelo) ilustram as pontes de dissulfeto, os açúcares (verde) representam os sítios de glicosilação.

O centro de um dímero de NS1 é constituído por um cilindro β , sendo este composto pelo N-terminal de cada monômero (aminoácidos 1 a 29, em azul), constituído por duas fitas β . Do N-terminal de cada monômero se estende um domínio em forma de “asa” (aminoácidos 30 a 180, em amarelo), o qual apresenta dois sítios de glicosilação (asparaginas 130 e 175) e uma alça distal desordenada (aminoácidos 108 a 128, tracejado). Dois subdomínios da asa (aminoácidos 30 a 37 e 152 a 180, em laranja) se empacotam contra o cilindro β central, ligando a “asa” ao cilindro. O terceiro domínio (aminoácidos 181 a 352, em vermelho) apresenta um sítio de glicosilação (asparagina 207) e doze fitas β , das quais nove formam uma extensa folha similar a uma escada. Cada monômero apresenta doze cisteínas, responsáveis por 6 pontes de dissulfeto que estabilizam a estrutura tridimensional da proteína.

Falconar, Young & Miles (1994) realizaram uma varredura de epítomos na estrutura da NS1 de DENV-2 (PR159S1) com a técnica de ELISA empregando 174 peptídeos sintéticos de 9 aminoácidos, onde sequências adjacentes apresentavam 7 resíduos em comum, variando apenas os terminais (1[#] 1 – 9, 2[#] 3 – 11, etc.), obtendo as melhores leituras nos fragmentos ²⁵VHTWTEQYK³³, ⁶¹TRLENLMWK⁶⁹, ¹¹¹LRYSWKTWG¹¹⁹, ¹¹³YSWKTWGKA¹²¹, ²⁹⁹RTTTASGKL³⁰⁷ e ³⁰¹TTASGKLIT³⁰⁹.

Gelanew, Poole-Smith & Hunsperger (2015) produziram anticorpos monoclonais para formas desnaturadas da NS1 de DENV, mapeando seus epítomos por ELISA com 43 peptídeos sintéticos de 15 aminoácidos cada. Dentre os resultados, foram comparadas as sequências ¹⁰⁵GPQPMEHKYSWKS¹¹⁹ e ¹¹³YSWKS¹²⁷WGKAKIIGAD¹²⁷, observando-se uma reatividade menor ao segundo peptídeo. Gelanew e colaboradores salientam que os dois peptídeos apresentam uma região sobreposta de 7 aminoácidos e que o primeiro peptídeo pode conter todos os resíduos essenciais ao reconhecimento, enquanto o segundo pode conter apenas um fragmento da região reconhecida. Ainda é possível cogitar um impedimento estérico devido à proximidade ao sítio de glicosilação Asp130 sendo responsável pela redução da reatividade. Nesse mesmo trabalho, uma sequência presente na interface entre os domínios cilindro e asa (²⁵EVHTWTEQYKFQADSP³⁹) apresentou alta reatividade à proteína desnaturada e uma reatividade reduzida à forma hexamérica da proteína recombinante, mostrando que mesmo nas formas naturais o anticorpo consegue ter acesso a pelo menos parte de seu epítopo.

Chen *et al.* (1996) descrevem um anticorpo anti-JEV capaz de reconhecer uma sequência de 15 aminoácidos (¹⁰⁹TELRYSWKTWGKAKM¹²³) presente na alça distal do domínio asa. O anticorpo se mostrou-se apto a detectar mesmo formas desnaturadas da NS1, comprovando a linearidade do epítopo. Utilizando a mesma região do epítopo de Chen, Tai *et al.* (2005) elaboraram um microchip molecularmente impresso capaz de reconhecer a NS1 de DENV de forma a distinguir a espécie de outros flavivírus.

3 JUSTIFICATIVA

Dussart *et al.* (2006) mostram que, no diagnóstico da Dengue, o teste Platelia apresenta uma redução na sensibilidade com a evolução da infecção e que, a partir do 4º dia, o mesmo fornece um alto índice de falsos negativos. Já o MAC-ELISA passa a ter 100 % sensibilidade apenas no 6º em diante. As deficiências destas metodologias geram um intervalo onde ambas passam a ser utilizadas simultaneamente, ainda podendo apresentar falsos negativos e aumentando o custo do diagnóstico no período. O quadro clínico semelhante apresentado pelo ZIKV, somado à reatividade cruzada observada em testes sorológicos, dificulta a diferenciação dos agentes etiológicos.

A dissociação de imunocomplexos mediada por temperatura, quando realizada antes de uma análise de soro, pode aprimorar a sensibilidade de testes clínicos. A inserção de uma etapa de pré-desnaturação da proteína propicia a liberação de epítopos em infecções secundárias e pode expor epítopos internos, aumentando tanto a seletividade quanto a sensibilidade (GELANEW; POOLE-SMITH; HUNSPERGER, 2015). A determinação de epítopos lineares internos por polímeros impressos é uma abordagem pouco explorada até os dias atuais. Geralmente os trabalhos consistem na degradação enzimática da proteína e detecção dos fragmentos. A nossa abordagem propõe detectar a proteína íntegra, porém, desnaturada por temperatura.

Acoplar a sensibilidade de um eletrodo de quadro impresso à seletividade de um PIM pode possibilitar uma distinção do patógeno de forma rápida, robusta, não destrutiva, simples e portátil, sem necessidade de mão de obra qualificada.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver um sensor de transdução eletroquímica para a detecção da proteína NS1 desnaturada para diagnóstico diferencial entre os sorotipos do DENV e o ZIKV.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Escolha *in silico* de epítomos pouco imunogênicos de NS1 de DENV-1 e ZIKV, compatíveis com as características desejáveis de uma molécula molde para impressão molecular;
- II. Otimização da construção dos sensores usando o epítomo escolhido como molécula molde, em etapas de polimerização, remoção e reconhecimento;
- III. Caracterização estrutural, morfológica e eletroquímica dos sensores produzidos;
- IV. Testes de seletividade frente a componentes do soro, como a albumina sérica humana;
- V. Testes de especificidade dos sensores produzidos com as NS1 de DENV-1 e 2 e ZIKV;

5 METODOLOGIA

5.1 PLANEJAMENTO RACIONAL DOS EPÍTOPOS

5.1.1 Análise conservacional

Foram empregadas ferramentas de predição do Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB)(<https://www.iedb.org/>) para se estimar acessibilidade, flexibilidade, linearidade e imunogenicidade do epítipo. Para tal, foram obtidas sequências de DENV-1 e ZIKV no UNIProtKB (<https://www.uniprot.org/>), o qual conta tanto com sequências do Swiss-Prot (manualmente anotadas e revisadas por experts) quanto com sequências do TrEMBL (automaticamente anotadas e não revisadas). Para análises de conservação foram também empregadas sequências de DENV-2, 3 e 4. O levantamento de sequências foi feito em novembro de 2016 e foram utilizados filtros de espécie/sorotipo (Zika virus e Dengue virus Type 1, 2, 3 e 4) e de região (Brazil), considerando assim apenas isolados brasileiros. Foram encontradas no total 67 sequências de NS1 de DENV-1 e 20 de ZIKV e foram adotadas como referência as sequências do Swiss-Prot P27909 (DENV-1 – strain Brazil/97-11/1997) e Q32ZE1 (ZIKV – strain Mr 766). Também foram encontradas 137, 62 e 15 sequências de isolados brasileiros para o DENV-2, 3 e 4, respectivamente. As 301 sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW do software MEGA 10 (<https://www.megasoftware.net/>) e comparadas entre si para análises conservacionais.

Após alinhadas, as sequências referência P27909 e Q32ZE1 foram analisadas pelas ferramentas de predição de anticorpo do IEDB. As ferramentas *Emini Surface Accessibility*, a *Karplus & Schulz Flexibility* e a *Bepipred Linear Epitope Prediction* foram utilizadas nos 352 resíduos das sequências.

5.1.2 Predições conformacionais

É de suma importância que o fragmento impresso esteja acessível para que ocorra a adsorção da proteína no eletrodo. Um resíduo é considerado acessível quando este apresenta uma área acessível para água superior a 20 angstroms (2 nm^2). O modelo de Emini *et al.* (1985) realiza recortes na sequência de *input* formando hexapeptídeos por comparação empírica, estes hexapeptídeos recebem probabilidades fracionais de constituírem uma superfície acessível. Os valores obtidos pelo modelo são representados por

$$S_n = [\prod_{i=1}^{\sigma} \delta_{n+4-i}] * (0,37)^{-\sigma} \quad (\text{Equação 16})$$

, onde a probabilidade de um aminoácido na posição n se encontrar na superfície é representado por S , e δ_x é a probabilidade de superfície fracional de cada aminoácido do hexapeptídeo, com posição relativa x .

Estruturas muito flexíveis podem prejudicar a impressão e, se muito rígidas, o processo de adsorção específica. Karplus & Schulz (1985) propuseram um algoritmo capaz de determinar a flexibilidade de um aminoácido baseado em fatores de temperatura como o fator B de carbonos α de uma proteína.

$$B_{norm} = (B + D_p) / (_p + D_p) \quad (\text{Equação 17})$$

O fator B ilustra o deslocamento de posições atômicas em relação a um ponto mediano, e $_p$ equivale à média do fator B de todos os C_α da proteína p , sendo omitidos os 3 aminoácidos finais de cada terminal da proteína. A média dos valores de B_{norm} de uma proteína é sempre 1, e o D_p para essa proteína é escolhido de forma que o desvio quadrático médio, ou variância, dos valores de B_{norm} seja ≤ 0.3 .

Epítomos lineares são mais adequados para a estratégia de impressão de superfície. Para avaliar a probabilidade de linearidade foi utilizado o modelo de Larsen, Lund & Nielsen (2006), um modelo combinatorial chamado *Bepipred*. Valores acima do limiar padrão (0,35) evidenciam uma elevada probabilidade de linearidade no fragmento em questão.

5.1.3 Imunogenicidade

A imunogenicidade é uma propriedade indesejável para este estudo, uma vez que o reconhecimento do sítio desejado por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) pode impedir o reconhecimento do polímero por impedimento estérico. O *Stabilized Matrix Method* contém uma matriz de pontuação que classifica a seletividade de modelos de sequências (dados obtidos experimentalmente), podendo prever por análise comparativa se ocorrerá ligação de peptídeos à moléculas do MHC ou se o peptídeo será conduzido por transportadores associados à apresentação de antígenos (PETERS; SETTE, 2005). A imunogenicidade dos protótipos foi avaliada pelas ferramentas *MHC I Binding* e *MHC II Binding* do IEDB, classificando os protótipos pela concentração obtida no *Stabilized Matrix Method*. O limiar de afinidade de ligação (IC_{50}) do *Stabilized Matrix Method* faz uma predição dos peptídeos ligantes que possam ser reconhecidos por células T, baseado em uma matriz

empírica.

5.2 INSTRUMENTAÇÃO E SOLUÇÕES

Para todos os procedimentos eletroquímicos, foi utilizado um potenciostado/galvanostato AutoLab PGSTAT128N com módulo de análise de resposta à frequência FRA32M (Metrohm, Suíça), controlado pelo software Nova 2.1.3. Os eletrodos de carbono comerciais C-110 (DropSens, Espanha) foram conectados com o auxílio de um adaptador DRP-DSC (DropSens, Espanha). Os peptídeos sintéticos (Genscript, Holanda) foram fornecidos em sais de fosfato com pureza > 98%. A NS1 de *Dengue virus* tipo I (Native Antigen Company, Inglaterra) foi fornecida em sais de fosfato pH 7,4 com pureza > 95%, esterilizada em filtro de 0,2 μm .

Para lavagem e soluções foi utilizada água MiliQ de resistividade 18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$. O tampão fosfato salino empregado nas soluções se encontra a 10 mmol L^{-1} e pH 7,4.

As análises de Raman foram realizadas no Laboratório de Propriedades Ópticas e Elétricas – LPOE da Unifal-MG. Utilizamos um sistema Raman modular composto por um microscópio Olympus B-X41 e um mono cromador da Horiba iHR550 na geometria de detecção de fótons retroespalhados. Como fonte de excitação utilizamos um laser em estado sólido de 532 nm da B&W Tek.

5.3 PREPARO DOS POLÍMEROS IMPRESSO E NÃO IMPRESSOS

Para acompanhar possíveis modificações realizadas, antecedendo e sucedendo qualquer tratamento nos eletrodos, foram realizadas as seguintes leituras:

- VOQ de -0,3 a +0,7 V com 0,02 V de amplitude e frequência de 1 Hz.
- Determinação de voltagem de circuito aberto, aplicando o potencial determinado em uma leitura de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) com perturbação sinusoidal de 0,01 V de amplitude, captando 50 pontos de frequência distribuídos logaritmicamente entre 10^{-2} a 10^4 Hz.

As medidas foram feitas na presença de ferricianeto de potássio II/III 5 mM como par redox, em solução tampão fosfato salino 10 mmol L^{-1} pH 7,4 como eletrólito suporte. Precedendo cada processo eletroquímico, os eletrodos de quadro impresso foram lavados vigorosamente com água MiliQ e secos em fluxo de nitrogênio.

5.3.1 Ativação do Eletrodo

Foram testadas diferentes estratégias de limpeza:

- cronoamperometria em KCl 0,1 mol L⁻¹ a +1,70 V por 180 s;
- voltametria cíclica em solução tampão fosfato salino 10 mmol L⁻¹ e pH 7,4, de -0,30 a +1,50 V por 15 ciclos com varredura de 0,05 V s⁻¹;
- voltametria cíclica em H₂SO₄ 0,50 mol L⁻¹ de -0,30 a +1,50 V por 15 ciclos com varredura de 0,05 V s⁻¹.

5.3.2 Seleção do monômero funcional e determinação do potencial de polimerização

Foram avaliados inicialmente para o protótipo ²⁸WTEQYKFQA³⁶ (EPT-I) três monômeros: fenol, 3-aminofenol (3-AF) e ácido 3-aminofenilborônico, todos na concentração de 1 mmol L⁻¹. Para se determinar os potenciais eletroativos de cada um dos compostos, foram realizados processos de voltametria cíclica de 0 a +1,5 V a 0,05V s⁻¹ por 2 ciclos. O 3-AF foi posteriormente avaliado em conjunto com o EPT-I por voltametria cíclica de 0 a +1,50 V a 0,025 V s⁻¹ por 2 ciclos. A molécula molde foi utilizada a 250 µmol L⁻¹ (concentração máxima compatível com a solubilidade do peptídeo). Posteriormente, um estudo comparativo foi feito entre o 3-AF e o 4-aminofenol (4-AF). Os estudos com o 4-AF seguiram o mesmo delineamento proposto para o 3-AF.

5.3.3 Otimização das condições de polimerização

Com base nas informações obtidas no item anterior, o monômero mais adequado foi polimerizado com 5, 10 e 15 ciclos a 1 mmol L⁻¹ para avaliar a formação e estabilidade do polímero. Em seguida, foram testadas as concentrações de 0,10, 1,00, 2,50 e 9,00 mmol L⁻¹.

5.3.4 Construção do sensor

A eletropolimerização foi conduzida com o monômero a 2,50 mmol L⁻¹ e a molécula molde a 250 µmol L⁻¹, em tampão fosfato salino 10 mmol L⁻¹ pH 7,4. Foram realizados 10 ciclos a 25,00 mV s⁻¹ de 0 a +0,38 V. Os polímeros foram lavados com água e foram feitos mais 5 ciclos nas mesmas condições em tampão fosfato salino para estabilizar o filme formado. O

mesmo processo foi realizado sem a adição da molécula molde para a produção de polímeros não impressos (PNI).

Os polímeros sintetizados foram submetidos a duas estratégias de remoção da molécula modelo em sequência. Foi realizado um procedimento de digestão proteolítica seguido por eletrólise. Foram promovidas incubações com proteinase K a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão fosfato salino 10 mM e pH 7,4 por 12 h. Para a remoção da proteinase e de potenciais resíduos da digestão, foram realizados 25 ciclos de voltametria cíclica na faixa de 0 a 0,37 V a $25,00 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ em tampão fosfato salino 10 mmol L^{-1} e pH 7,4.

5.3.5 Caracterização dos filmes formados

A espessura dos filmes (d) impressos e não impressos foi calculada por análise coulométrica (RIBEIRO *et al.*, 2017) através da fórmula

$$d = \frac{M \times Q}{F \times A \times \rho} \quad (\text{Equação 18})$$

onde M corresponde à massa molar do monômero (para o 3-AF, $109,128 \text{ g mol}^{-1}$), Q ao total de carga transferida durante a polimerização, F à constante de Faraday ($9,6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$), A à área de superfície do eletrodo de trabalho ($0,1256 \text{ cm}^2$) e ρ à densidade do polímero.

O comportamento do sistema foi acompanhado por leituras de EIE a cada etapa da construção do elemento de reconhecimento na superfície dos eletrodos de quadro impresso.

Os espectros de Raman foram coletados nas regiões de interesse entre 900 e 1950 cm^{-1} e entre 2350 e 3250 cm^{-1} de Raman shift. Foi empregada uma potência de 5 mW com uma objetiva de $10\times$ e exoisulções de 600 segundos em sextuplicatas.

5.3.6 Avaliação da resposta aos analitos

Antes de efetuar o reconhecimento, todos os sensores foram estabilizados por incubações sucessivas em tampão fosfato salino 10 mmol L^{-1} e pH 7,4 por 30 min, até que apresentassem três leituras consecutivas sem variação (sobrepostas). Após a otimização das condições de polimerização, o sensor foi submetido a incubações sucessivas com a molécula modelo por 30 min em concentrações crescentes ($3,91 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). A média das leituras após as estabilizações foi utilizada como branco. O sinal resposta foi avaliado na VOQ como diferença entre os valores dos picos formados durante as leituras de corrente δ ($I_x -$

$I_{\text{stab}}(\mu\text{A})$. O sinal resposta para a EIE foi avaliado como a diferença entre as R_{ct} relativas $(R_x/R_{\text{stab}})(\%)$.

As concentrações testadas são plotadas em diagramas de dispersão e analisadas por regressão linear. A análise de regressão linear nos diagramas de dispersão fornece a equação

$$Y = ax + b \quad (\text{Equação 19})$$

onde a representa a inclinação e b o intercepto da reta no eixo Y. A inclinação reflete a sensibilidade para este modelo, uma vez que para cada unidade de variação o eixo X, o eixo Y irá variar em a unidades.

Outro valor fornecido é o coeficiente de correlação linear de Pearson, r , o qual descreve quanto os pontos no diagrama de dispersão se aproximam da reta estabelecida pela equação. Quanto mais o módulo do valor se aproxima de 1, maior é o ajuste do modelo proposto aos dados obtidos.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados a partir das respectivas curvas de calibração à partir das equações

$$LOD = 3.3 \times \frac{\sigma}{a} \quad (\text{Equação 20})$$

$$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{a} \quad (\text{Equação 21})$$

onde σ representa o desvio padrão do intercepto e a a inclinação da curva obtida na Equação 19.

Após exibir resposta para a molécula molde, novos testes de adsorção foram feitos com a proteína NS1 desnaturada (10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) em tampão fosfato salino. A desnaturação da NS1 foi feita por tratamento térmico a 70°C durante 10 min, seguido pela incubação no eletrodo trabalho por 30 min. Os sinais resposta foram avaliados da mesma forma que para a molécula modelo.

A fim de determinar a seletividade de cada dispositivo testado, foram realizadas incubações na presença de Albumina Sérica Humana e Imunoglobulina G. Para determinar a especificidade dos dispositivos testados, foram feitas incubações com variantes da proteína NS1 de *Dengue virus* sorotipos 1 e 2 e *Zika virus*. Por fim, foi avaliada ainda a capacidade de reconhecimento da proteína alvo na presença de soro humano diluído (1:1000).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PLANEJAMENTO RACIONAL DE EPÍTOPOS

6.1.1 Seleção dos epítomos

Como descrito na seção 2.1.1.2, estudos anteriores de impressão de epítomos estabeleceram alguns parâmetros desejáveis para a escolha de peptídeos a serem impressos, tais como um ponto isoelétrico similar ao da proteína e comprimento de 7 a 15 aminoácidos, de forma a se obter seletividade sem dificultar a adsorção da proteína.

Dentre as sequências prospectadas na sessão 5.1, foram consideradas sequências de DENV-1 e ZIKV para a elaboração dos peptídeos modelo e sequências dos sorotipos 2, 3 e 4 para análises de conservação. As 301 sequências foram alinhadas e comparadas entre si para análises conservacionais. As áreas conservadas entre os isolados foram grifadas na Tabela S1 (Material suplementar digital). Após alinhadas, as sequências referência P27909 e Q32ZE1 foram analisadas pelas ferramentas de predição de anticorpo do IEDB. As ferramentas *Emini Surface Accessibility*, a *Karplus & Schulz Flexibility* e a *Bepipred Linear Epitope Prediction* foram utilizadas nos 352 resíduos das sequências.

Os estudos de caracterização estrutural e mapeamento antigênico da NS1 (sessão 2.2.3), juntamente aos dados *in silico* de acessibilidade, flexibilidade e linearidade, orientaram a escolha de regiões para a seleção dos protótipos, descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Regiões de trabalho para o DENV-1.

sp P27909 Dengue virus type 1 (strain Brazil/97-11/1997)		
#	Nome da Região	Sequência
1	Interface Cilindro-Asa	²⁵ VHTWTEQYKFQADSP ³⁹
2	Alça flexível no Domínio Asa	¹⁰⁵ RPQPMHKYSWKSWSGKAKIIGADIQ ¹²⁹
3	Região linear no domínio escada	²⁰⁹ TWKLARASFIEVKTC ²²³
4	Face externa do domínio escada	²⁸⁰ CEGTTVVVDEHCGSR ²⁹⁴
5	C-terminus	³³⁷ PVKEKEENLVRSMVSA ³⁵²

Fonte: Do autor.

Legenda: As regiões #1 (aminoácidos 25 a 39), #2 (105 a 129), #3 (209 a 223), #4 (280 a 294) e #5 (337 a 352). As sequências representadas na tabela são um exemplo de região trabalho, obtidas da sequência referência para DENV-1 (P27909).

Com a somatória dos dados de conservação, imunogenicidade, linearidade,

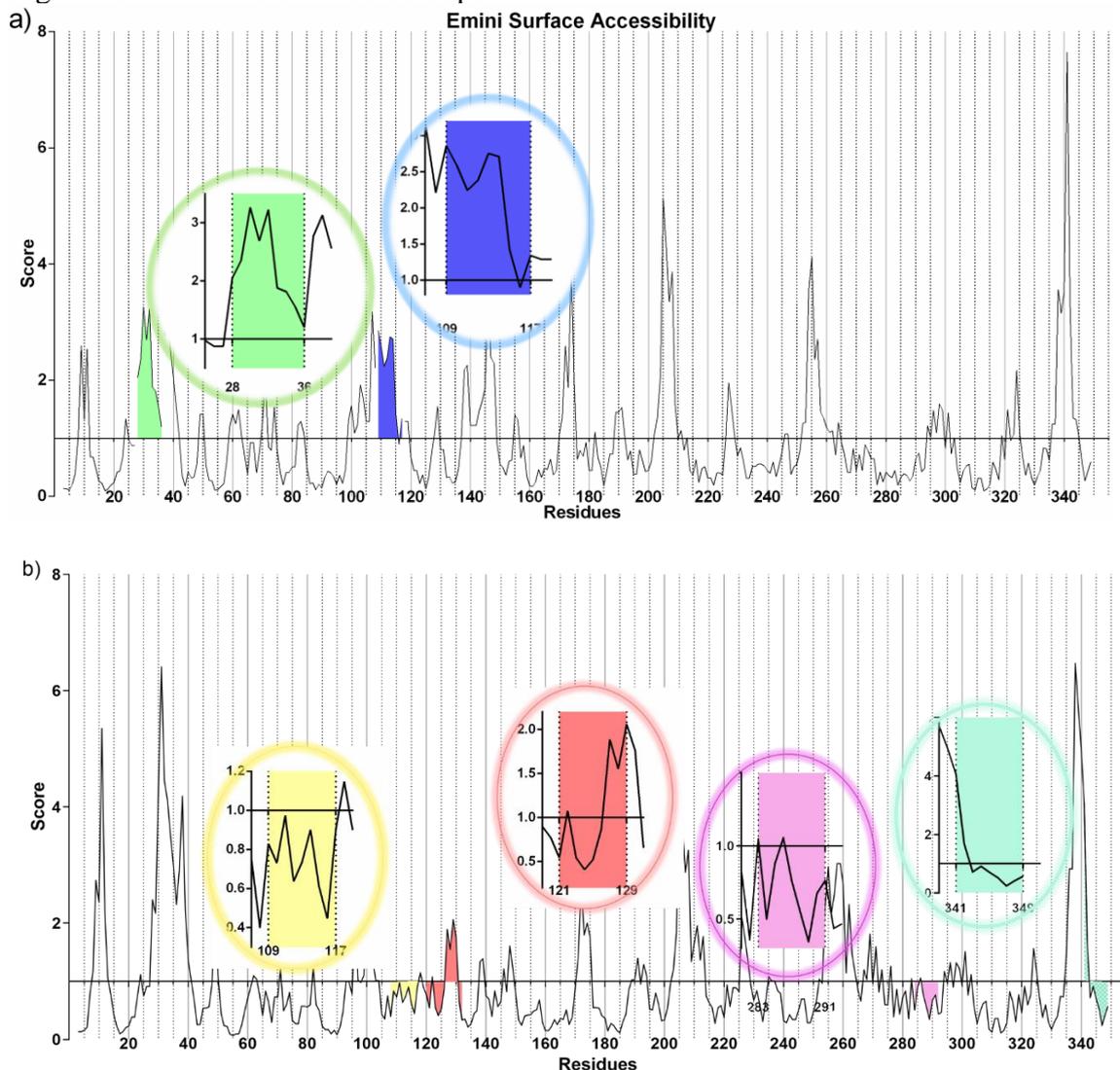
acessibilidade e flexibilidade foram propostos seis epítomos protótipos, buscando propor diferentes estratégias de reconhecimento para a NS1. Foram sugeridos dois protótipos de epítomos de nove aminoácidos para a NS1 de DENV-1 (EPTs-I e II) e quatro para ZIKV (EPTs-III, IV, V e VI). Os protótipos foram comparados aos 301 isolados pelo software Mega 10 (representação gráfica) e pela ferramenta *Conservation across antigens* do IEDB, com a finalidade de comprovar as respectivas seletividades para a espécie/sorotipo planejado (Material suplementar digital - Tabelas S2, S3 e S4).

As regiões da Tabela 1 buscaram representar diferentes estratégias de reconhecimento. As regiões trabalho #1, #2 e #3 (Tabela 1) foram selecionadas baseadas em epítomos explorados para o DENV anteriormente nos trabalhos de Falconar, Young & Miles (1994), Gelanew, Poole-Smith & Hunsperger (2015) e Tai (2006), descritos na sessão 2.2.3. A região #4 foi selecionada por demonstrar um baixo percentual de conservação na sequência entre todos os sorotipos e espécies testados na análise conservacional (Tabela S1). A região #5 foi selecionada por se tratar do C-terminal da proteína. Como descrito na sessão 2.1.1.2, os terminais N- e C- de uma proteína costumam ser utilizados como modelos para a impressão de epítomos.

As sequências referência da NS1 para DENV (P27909) e ZIKV (Q32ZE1) foram submetidas às ferramentas de predição do IEDB de acessibilidade, flexibilidade e linearidade. Como resultado, foram obtidos gráficos de predição da proteína inteira (Figuras Figura 23, Figura 24 e Figura 25). Nestas imagens, já estão realçados os epítomos protótipos descritos nas sessões 6.1.1 e 6.1.3.

Durante a impressão de epítomos, apenas um fragmento da proteína está presente. Se este mesmo fragmento não estiver devidamente acessível durante o reconhecimento, impedimentos estéricos podem reduzir ou até mesmo impedir a adsorção da região impressa na cavidade formada. Um resíduo é considerado acessível quando este apresenta uma área acessível para água superior a 20 angstroms (2 nm^2). Valores de S (Figura 23) superiores a 1 indicam uma maior probabilidade do resíduo se encontrar acessível.

Figura 23 – Acessibilidade de Superfície.



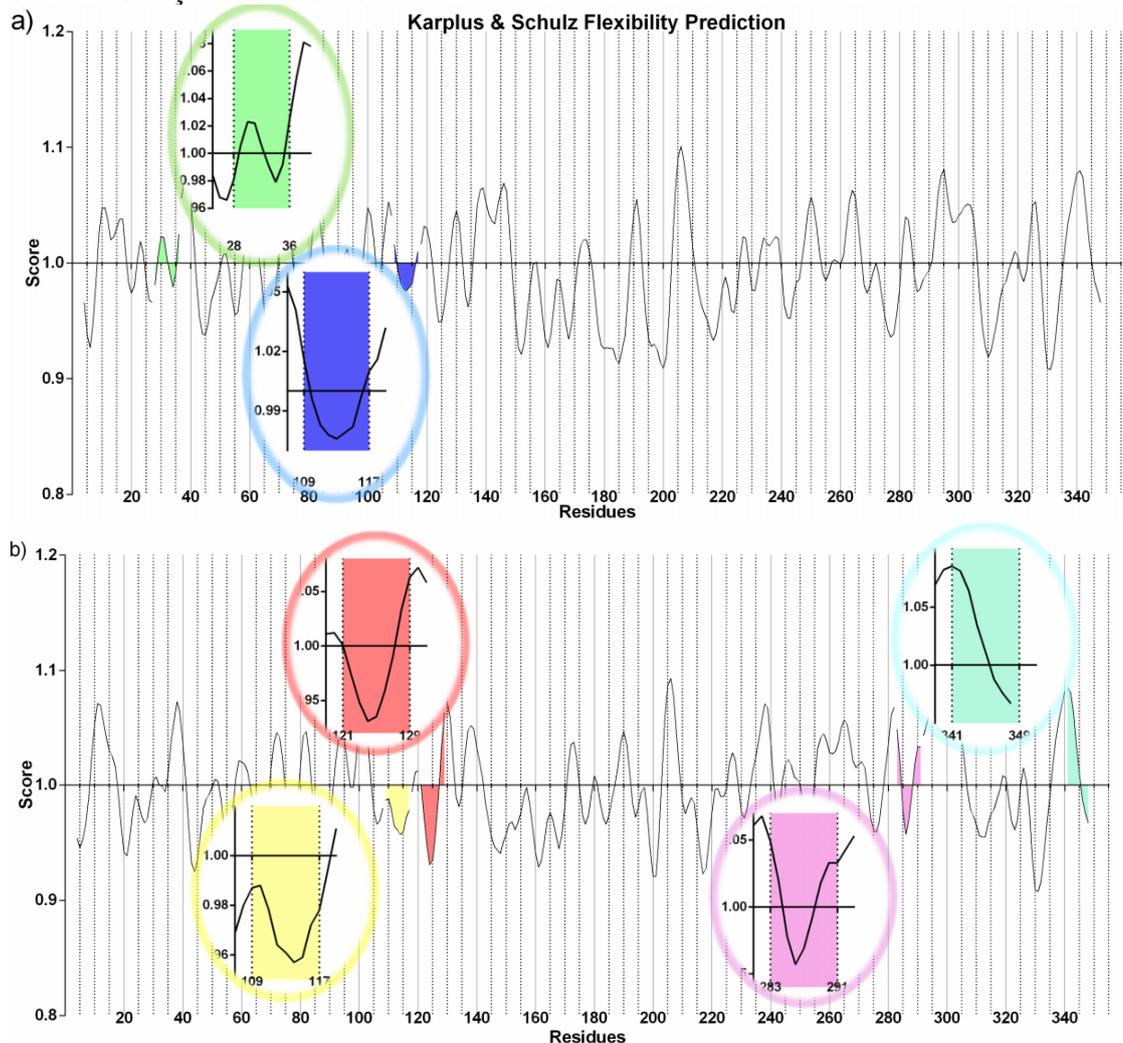
Fonte: Do autor.

Legenda: Método de Emini e Colaboradores. Sequências de a) DENV-1, com os protótipos I (EPT-I) em verde e II (EPT-II) em azul, e b) ZIKV, com os protótipos III (EPT-III) em amarelo, IV (EPT-IV) em vermelho, V (EPT-V) em lilás e VI (EPT-VI) em ciano. O eixo X representa cada aminoácido da NS1 e o eixo Y, a sua respectiva pontuação no algoritmo. Valores acima do limiar indicam uma elevada probabilidade da região ser encontrada na superfície.

Uma estrutura muito flexível irá responder aos menores estímulos de meio de forma muito abrupta. Com isso a configuração estrutural da molécula modelo fica mais susceptível a variações, gerando cavidades menos homogêneas. Em antemão, estruturas mais rígidas podem dificultar a remoção da molécula modelo após a impressão, além de dificultar a adsorção do fragmento modelo na cavidade impressa. O fator B ilustra o deslocamento de posições atômicas em relação a um ponto mediano, e $\langle B \rangle_p$ equivale à média do fator B de todos os C_α da proteína p , sendo omitidos os 3 aminoácidos finais de cada terminal da proteína. A média dos valores

de B_{norm} de uma proteína é sempre 1, e o D_p para essa proteína é escolhido de forma que o desvio quadrático médio, ou variância, dos valores de B_{norm} seja ≤ 0.3 . A Figura 24 ilustra os valores de B_{norm} obtidos para as NS1 de DENV-1 e ZIKV, onde os valores maiores que 1 representam regiões mais flexíveis.

Figura 24 – Predição de flexibilidade.



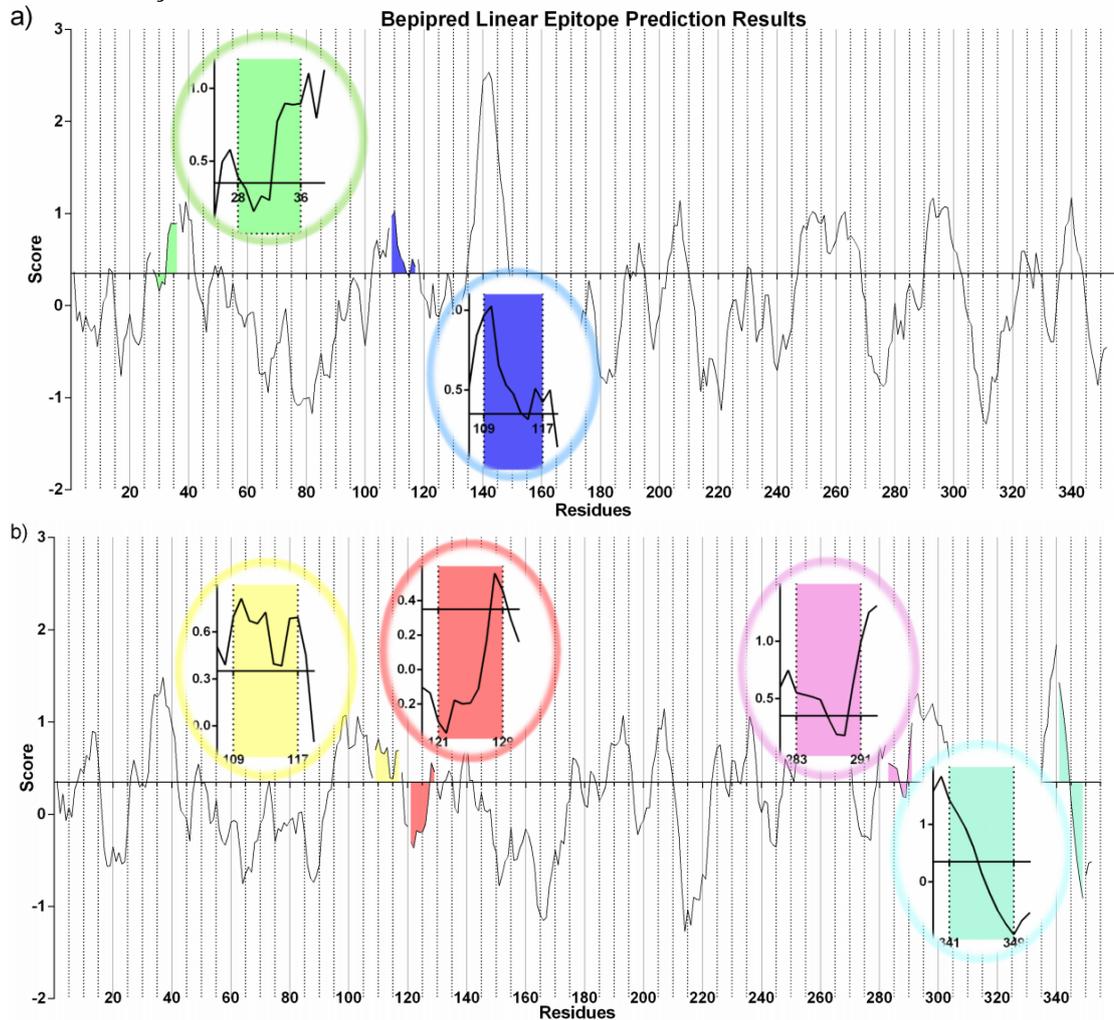
Fonte: Do autor.

Legenda: Método de Karplus& Schulz. Sequências de a) DENV-1, com os protótipos I (EPT-I) em verde e II (EPT-II) em azul, e b) ZIKV, com os protótipos III (EPT-III) em amarelo, IV (EPT-IV) em vermelho, V (EPT-V) em lilás e VI (EPT-VI) em ciano.

A disposição das moléculas modelo no polímero impresso é aleatória. Regiões lineares apresentam uma menor probabilidade de ficarem internalizadas na rede, tornando mais fácil tanto a remoção quanto o reconhecimento. Além disso, quando depositadas de forma longitudinal na superfície do filme, apresentam uma maior área de contato. Para avaliar a probabilidade de linearidade foi utilizado o modelo de Larsen, Lund & Nielsen (2006), um modelo combinatorial chamado *Bepipred*. Valores acima do limiar padrão (0,35) evidenciam

uma elevada probabilidade de linearidade no fragmento em questão (Figura 25).

Figura 25 – Predição de Linearidade.



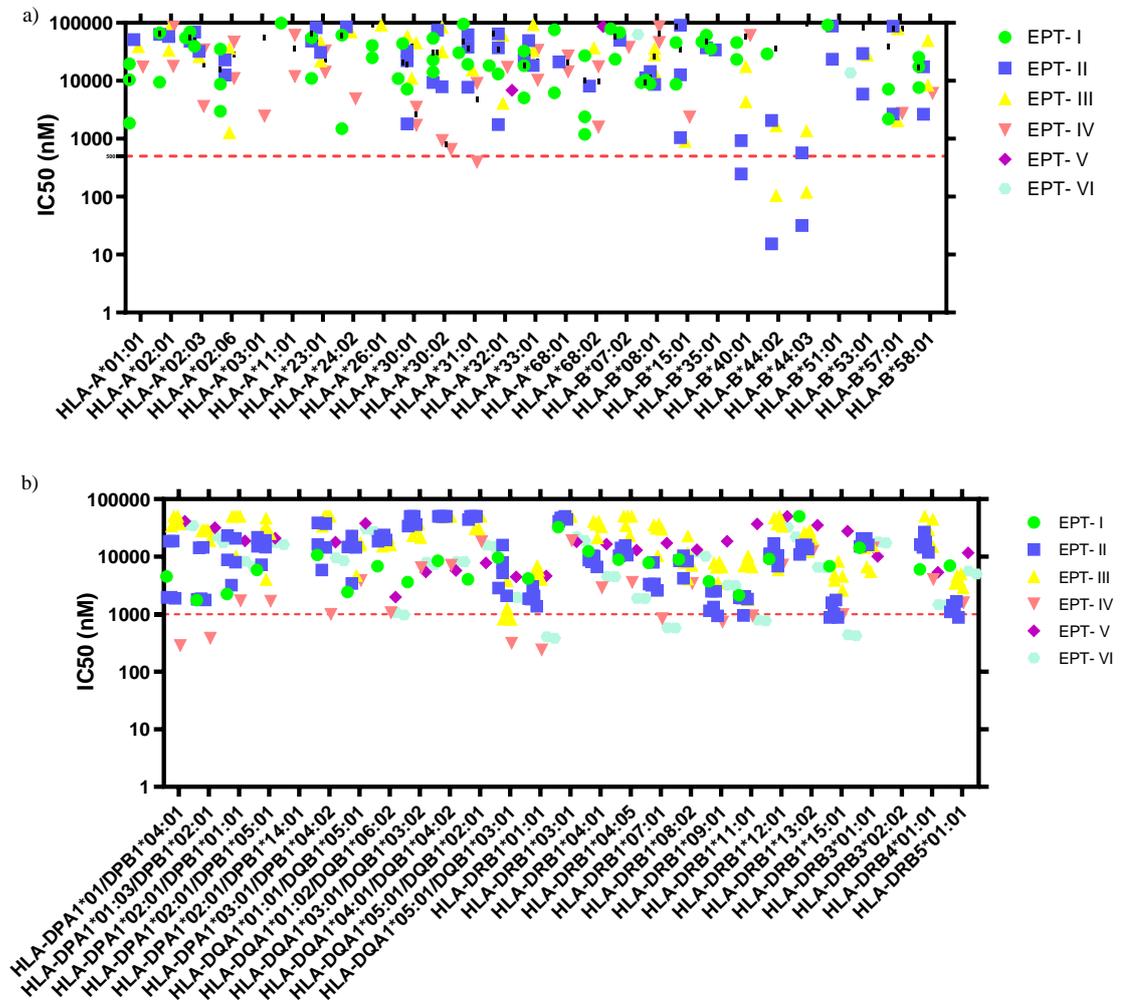
Fonte: Do autor.

Legenda: *Bepipred Linear Epitope Prediction*. Sequências de a) DENV-1, com os protótipos I (EPT-I) em verde e II (EPT-II) em azul, e b) ZIKV, com os protótipos III (EPT-III) em amarelo, IV (EPT-IV) em vermelho, V (EPT-V) em lilás e VI (EPT-VI) em ciano.

A reatividade cruzada de anticorpos é um fenômeno que compromete a exatidão de ensaios de determinação de antígenos. A formação do complexo antígeno anticorpo pode obstruir a região a ser reconhecida pelo método, gerando resultados falso-negativos. A imunogenicidade dos protótipos foi avaliada pelas ferramentas *MHC I Binding* e *MHC II Binding* do IEDB, classificando os protótipos pela concentração obtida no *Stabilized Matrix Method*. O limiar de afinidade de ligação (IC_{50}) do *Stabilized Matrix Method* faz uma predição dos peptídeos ligantes que possam ser reconhecidos por células T, baseado em uma matriz empírica. Os protótipos das sessões 6.1.1 e 6.1.3 foram submetidos a testes de *Stabilized Matrix Method* com os *sets* referência do IEDB para alelos de classe I (Figura 26a)(WEISKOPF *et al.*,

2013) e classe II (Figura 26b)(GREENBAUM, 2011), sendo utilizados como valores de *cut-off* de 500 nmol L⁻¹ (SETTE *et al.*, 1994 apud IEDB, 2016) para MHC I e 1000 nmol L⁻¹ para MHC II (SOUTHWOOD *et al.*, 1998).

Figura 26 – Predição de ligação com MHC classe I (a) e II (b) para os protótipos propostos.



Fonte: Do autor.

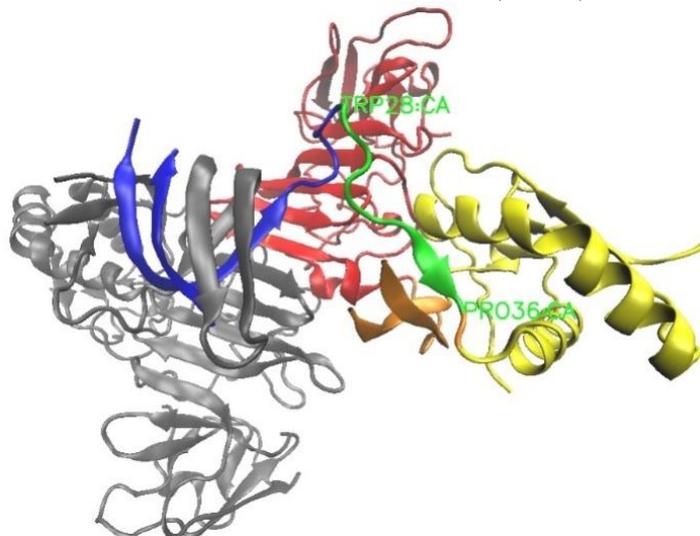
Legenda: Valores abaixo do cut-off sinalizam a possibilidade de reconhecimento do epítipo por células T, indicando uma potencial imunogenicidade. Os cut-offs padrão para screening são de 500 e 1000 nM, para classe I (a) e II (b) respectivamente.

Na planilha do arquivo Suplementar 1, as regiões selecionadas (Tabela 1) são comparadas às regiões equivalentes dos outros 300 isolados. As áreas conservadas em todas as espécies/sorotipos estão grifadas (Tabela S1). A fim de garantir a seletividade dos protótipos, as regiões selecionadas devem apresentar um elevado grau de homologia frente aos isolados de sua espécie/sorotipo e diferir o máximo possível dos isolados restantes.

6.1.2 Propostas para DENV-1

O primeiro protótipo, $^{28}\text{WTEQYKFQA}^{36}$ (EPT-I)(Figura 27), foi elaborado com o intuito de adsorver a NS1 após a dissociação de imunocomplexos mediada por temperatura. Diferentemente do epítipo $^{25}\text{EVHTWTEQYKFQADSP}^{39}$, o protótipo é compacto, facilitando a adsorção. O EPT-I não possui a alta flexibilidade encontrada nos resíduos 37, 38 e 39 (Figura 24a). Os resíduos 25, 26 e 27, que apresentam baixa acessibilidade (Figura 23a) não estão presentes no protótipo, fator que pode tornar a detecção possível mesmo na forma naturalmente enovelada da proteína. O peptídeo proposto apresenta certa flexibilidade nos resíduos 29, 30, 31 e 32 (Figura 24a), podendo ser a causa da ausência de linearidade observada no mesmo trecho (Figura 25a). Contudo, como os valores preditos para linearidade e flexibilidade se apresentam próximos aos limiares, o efeito de ambas as propriedades pode vir a ser benéfico ao reconhecimento da proteína desnaturada.

Figura 27 – EPT-I na estrutura da NS1 de DENV-2 (4O6B).

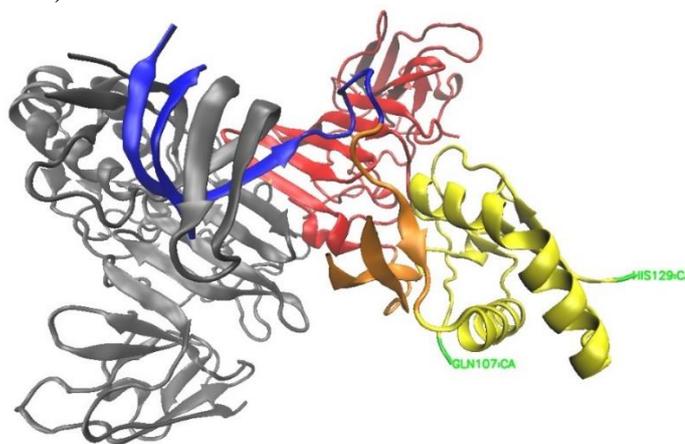


Fonte: Do autor.
 Legenda: Cilindro central em azul, domínio asa em amarelo, subdomínio conector em laranja, escada em vermelho e EPT-I em verde.

A proposta para o EPT-II ($^{109}\text{MEHKYSWKS}^{117}$) é reconhecer tanto a forma hexamérica quanto a dimérica, ou mesmo formas desnaturadas da proteína. O protótipo se encontra na alça distal do domínio asa, sítio relatado em investigações cristalográficas como exposto e acessível, tendo sido o primeiro domínio a ser utilizado em trabalhos de impressão molecular. O epítipo $^{109}\text{TELRYSWKTWGKAKM}^{123}$ (Figura 28) citado anteriormente foi utilizado na detecção tanto da NS1 de JEV quanto de DENV, por apresentar uma zona de consenso [$^{115}\text{WK(A/T)WGK}^{120}$]

conservada entre alguns flavivírus (CHEN *et al.*, 1996; TAI *et al.*, 2005). Assim, o EPT-II foi elaborado sem a metade final da zona de consenso ($^{118}\text{WGK}^{120}$)(Tabela S1), visando fornecer uma maior seletividade para o DENV. A região apresenta linearidade e boa acessibilidade (com exceção do resíduo 114, o único abaixo de ambos os limiares)(Figuras Figura 23a e Figura 25a) e consiste em uma das regiões mais rígidas da alça (Figura 24a). O sítio também se encontra distante do sítio de glicosilação 130, de forma a evitar o impedimento estérico causado pelo açúcar.

Figura 28 – Ilustrando a alça distal na estrutura da NS1 de DENV-2 (4O6B).



Fonte: Do autor.
 Legenda: Cilindro central em azul, domínio asa em amarelo, subdomínio conector em laranja, escada em vermelho e os terminais da alça em verde. A conformação da alça não foi determinada no cristal 4O6B.

As análises de conservação (Tabelas S2 e S3) mostraram que as propostas I e II são 100% consistentes nos isolados de DENV-1, comprovando que foram evitadas as mutações relacionadas neste sorotipo. O EPT-I se mostrou conservado dentre os sorotipos do DENV, com 100% de identidade com a região equivalente na NS1 do DENV-3 e 88.89% com DENV-2 e 4. Provavelmente o protótipo I será incapaz de distinguir os sorotipos do DENV, mas a sua identidade de 33.33% com o ZIKV pode promover uma boa seletividade entre as espécies.

Na análise de imunogenicidade por *Stabilized Matrix Method* (Figura 26), o protótipo I apresentou valores bem acima do *cut-off*, não exibindo potencial reatividade predita com nenhum dos alelos de classe I ou II. Para o epítipo II foram encontrados abaixo do *cut-off* para os alelos HLA-B*44:02 (15,34 nmol L⁻¹), HLA-B*44:03 (31,77 nmol L⁻¹) e HLA-B*40:01 (246,82 nmol L⁻¹) para o teste de MHC classe I, e os alelos HLA-DRB1*15:01 (873 nmol L⁻¹) e HLA-DRB1*15:01 (875 nmol L⁻¹) para o teste de MHC classe II, indicando uma elevada

probabilidade imunogênica para o protótipo II.

6.1.3 Propostas para ZIKV

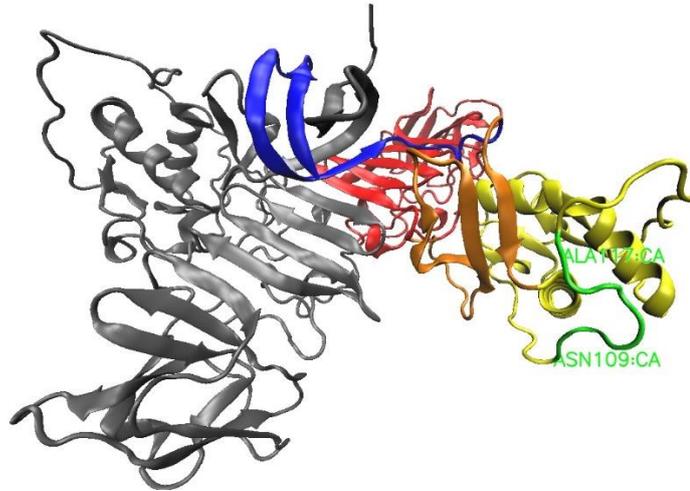
De acordo com Tai *et al.* (2011), os epítomos a serem utilizados em impressão devem ser selecionados pela análise da estrutura cristalina e de mapas de epítomos. Enquanto a literatura sobre a NS1 de DENV relata vários epítomos mapeados e até mesmo trabalhos de impressão molecular com fragmentos da proteína, as publicações sobre o vírus da Zika forneceram apenas informações sobre a estrutura cristalina da NS1 (BROWN *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016b).

A ausência desses mapas torna a seleção dos epítomos dependente exclusivamente da análise cristalográfica e das predições *in silico*.

A alça distal (108 a 129) apresentou linearidade até o resíduo 117 (Figura 25b), porém baixa pontuação na predição de acessibilidade (Figura 23b). Em contraste com esta predição, os trabalhos de Brown *et al.* (2016) e Xu *et al.* (2016) elucidaram a disposição espacial da estrutura, retratando a importância dos resíduos Trp₁₁₅, Trp₁₁₈ e Phe₁₂₃ como pontos de ancoragem da proteína com membranas celulares, ressaltando a acessibilidade desses resíduos mesmo com proteína na disposição hexamérica. A região ¹⁰⁹NELPHGWKA¹¹⁷ (ETP-III) (Figura 29) foi selecionada por apresentar os maiores escores de linearidade (Figura 25b) dentre aminoácidos pertencentes à alça distal. Além disso, as menores pontuações de flexibilidade foram observadas na região linear (Figura 24b). A análise de homologia aponta que a sequência proposta está presente em todos os isolados de ZIKV analisados, e difere das regiões equivalentes no DENV em pelo menos cinco dos nove aminoácidos, viabilizando uma distinção mais eficaz (Tabelas S2 e S4).

A predição do *Stabilized Matrix Method* indicou potencial de imunogenicidade para os alelos HLA-B*44:02 (104,22 n mol L⁻¹) e HLA-B*44:03 (119,14 n mol L⁻¹) do MHC I Classe I, e os alelos HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01 (815 nmol L⁻¹) e HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01 (808 n mol L⁻¹) do MHC Classe II.

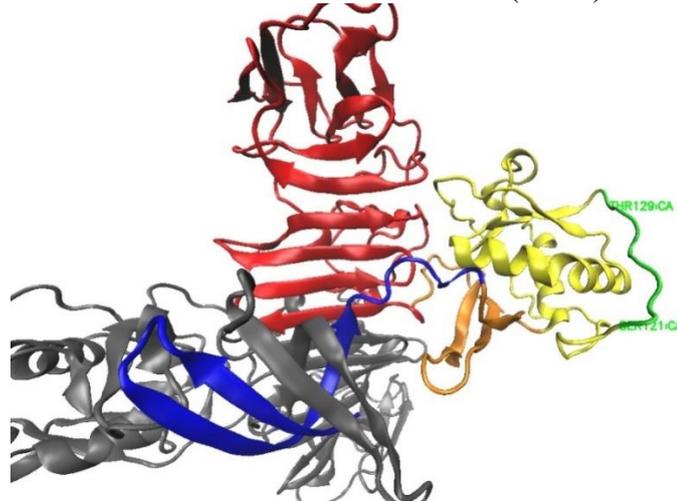
Figura 29 – EPT-III na estrutura da NS1 de ZIKV (5GS6).



Fonte: Do autor.
 Legenda: Cilindro central em azul, domínio asa em amarelo, subdomínio conector em laranja, escada em vermelho e EPT-III em verde.

O fragmento $^{121}\text{SYFVRAAKT}^{129}$ (EPT-IV) (Figura 30) apresenta boa pontuação de acessibilidade apenas nos resíduos 127 a 129. A proximidade com sítio de glicosilação Asn_{130} é indesejável para a impressão, sendo que a presença do glicosídeo pode promover impedimento estérico e reduzir a eficácia da impressão. Além disso, a análise de imunogenicidade mostrou valores de IC_{50} abaixo dos limiares para um alelo de MHC classe I e 9 de classe II. A investigação de homologia revelou uma mutação do resíduo $\text{Tyr}_{122} > \text{His}_{122}$ nos isolados A0A0U3FSM8 e A0A160JCU6, podendo propiciar falsos negativos, deteriorando a sensibilidade e especificidade da detecção. Entretanto, o fragmento difere dos trechos referentes nos isolados de DENV em pelo menos seis resíduos (Tabela S4).

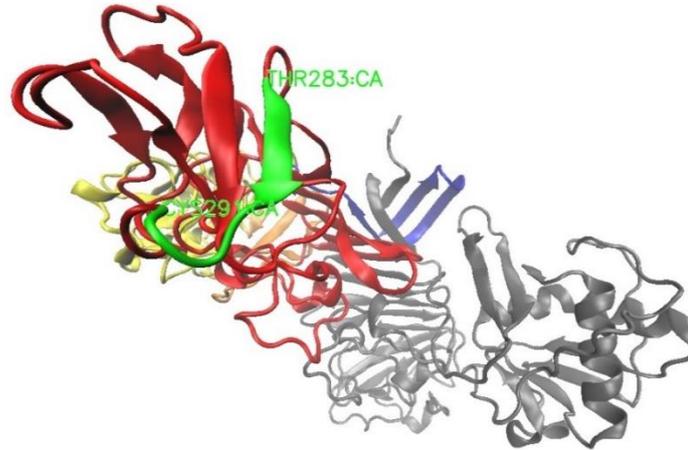
Figura 30 – EPT-IV na estrutura da NS1 de ZIKV (5GS6).



Fonte: Do autor.
 Legenda: Cilindro central em azul, domínio asa em amarelo, subdomínio conector em laranja, escada em vermelho e EPT-IV em verde.

A região $^{283}\text{TKVHVEETC}^{291}$ presente na face externa da escada foi selecionada como o quinto modelo (EPT-V) (Figura 31). O trecho encontra-se visualmente exposto mesmo na conformação hexamérica (SONG *et al.*, 2016). No entanto, a predição de acessibilidade (Figura 23b) exibiu escores baixos, indicando que este protótipo talvez só reconheça formas desnaturadas da NS1. As predições apontam um centro rígido com pontas flexíveis (Figura 24b) e linearidade consistente, com alguns valores ligeiramente abaixo do limiar na região central (Figura 25b). Essa proposta não apresentou potencial de imunogenicidade nos testes de MHC. A análise de homologia revelou divergências entre as sequências brasileiras de ZIKV e a sequência Q32ZE1, isolada em Uganda, sendo essa a única sequência disponível no Swiss-prot para a cepa Mr 766 de ZIKV. Contudo, os isolados brasileiros apresentaram a mutação pontual $\text{Tyr}_{286} > \text{His}_{286}$, fato que levou a adotar o segmento modificado como protótipo, o qual traz ao menos quatro resíduos discriminativos para com as sequências de DENV.

Figura 31 – EPT-V na estrutura da NS1 de ZIKV (5GS6).

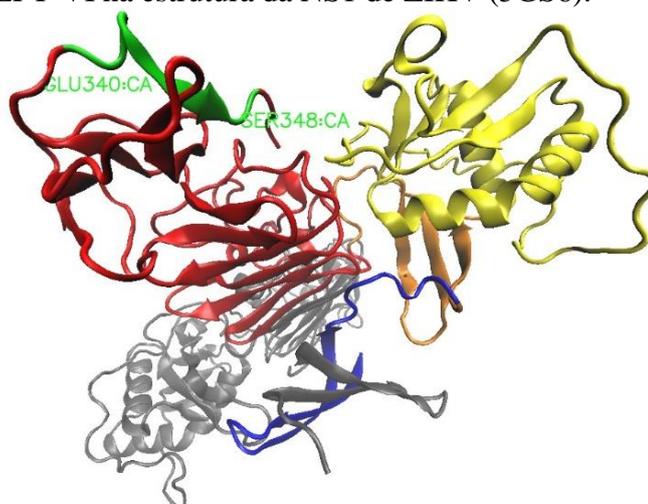


Fonte: Do autor.

Legenda: Cilindro central em azul, domínio asa em amarelo, subdomínio conector em laranja, escada em vermelho e EPT-V em verde.

O epítipo $^{340}\text{EPESNLVRS}^{348}$ (EPT-VI)(Figura 32) foi selecionado por estar presente na região C-terminal e, de maneira oposta às predições de acessibilidade e linearidade (Figura 23b e Figura 25b), apresenta-se linear e exposto na conformação dimérica, podendo conceder detectabilidade mesmo para formas enoveladas da proteína. O protótipo apresentou boa pontuação no teste de flexibilidade (Figura 24b). O teste de *Stabilized Matrix Method* forneceu valores de IC_{50} abaixo dos limiares para 9 alelos do MHC Classe II. O ensaio de homologia comprovou que o EPT-VI se mantém idêntico em todos os isolados de ZIKV testados, e apresenta ao menos dois resíduos em distintos para com os isolados de DENV.

Figura 32 – EPT-VI na estrutura da NS1 de ZIKV (5GS6).



Fonte: Do autor.
 Legenda: Cilindro central em azul, domínio asa em amarelo, subdomínio conector em laranja, escada em vermelho e EPT-VI em verde.

6.2 CONSTRUÇÃO DOS SENSORES

Na intenção de acompanhar possíveis modificações ao sensor, entre cada processo foram feitas leituras de VOQ e EIE.

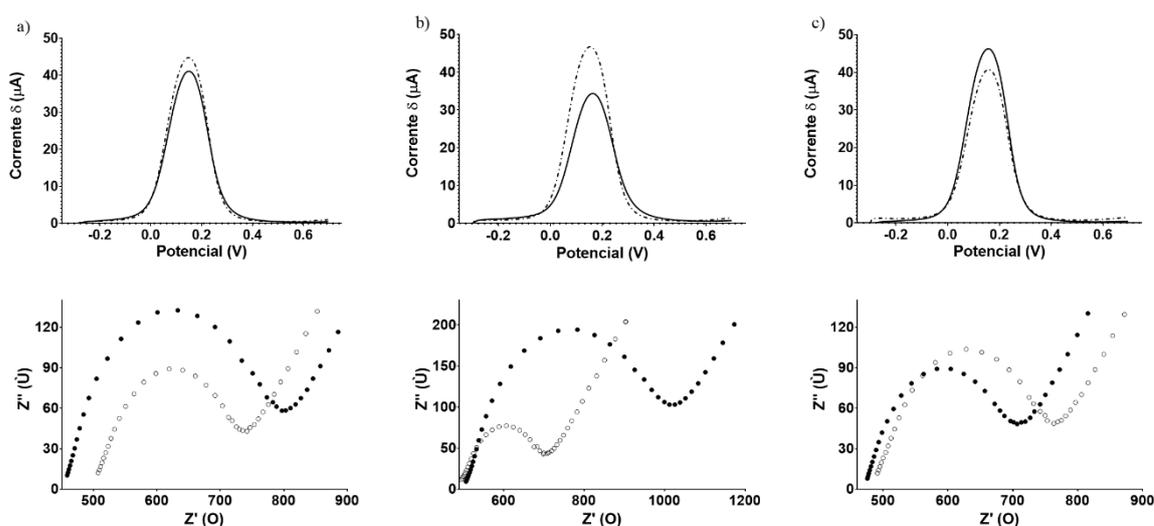
6.2.1 Ativação do eletrodo

Um eletrodo mais condutor é geralmente mais conveniente para a eletropolimerização, sendo que quanto maior a corrente durante o processo, maior a formação de polímero. As superfícies dos eletrodos de quadro impresso podem apresentar resíduos e interferentes que venham a prejudicar a construção do sensor. As tintas de carbono não podem ser limpas por abrasão, sendo aplicados procedimentos eletroquímicos que promovem a oxidação do eletrodo de trabalho. Esta limpeza, também conhecida como ativação, promove a remoção destes interferentes, adicionando grupos hidrofílicos e aprimorando a cinética de transferência de elétrons da superfície (CHURINSKY; GRGICAK, 2014; Pine Research, 2016). A adição de grupos funcionais na superfície do eletrodo também pode auxiliar em processos de bioconjugação, orientação da molécula molde e facilitar a adesão do polímero. Foram avaliadas estratégias de ativação com cronoamperometria em KCl e voltametria cíclica em solução tampão fosfato salino 10 mmol L⁻¹ e em H₂SO₄ 0.5 mol L⁻¹.

Na Figura 33 é possível notar que o tratamento com tampão fosfato salino foi o único

que promoveu um aumento da condutividade do sistema. Nas ativações com KCl e H₂SO₄, a oxidação do eletrodo de trabalho pode ser sustentada tanto pelo aumento de impedância (formas oxidadas do carbono são menos condutoras) quanto o de capacitância (hidroxilas terminais podem beneficiar o efeito capacitivo da dupla camada). A promoção destes grupos C-O pode provocar um aumento da adesão de polímero durante a polimerização. A cronoamperometria em KCl não só reduziu a condutividade como alterou a resistência da solução (R_{Ω}). Uma vez que parte da R_{Ω} é composta pela resistência do eletrólito entre o eletrodo trabalho e o referência, variações na mesma podem representar modificações no eletrodo referência. Carneiro *et al.* (2018) relatam que a estabilidade de pseudoeletrodos de Ag/AgCl pode ser afetada por espécies na solução que podem co-precipitar com as espécies metálicas catiônicas, como íons Cl. Estas modificações são indesejáveis, uma vez que podem prejudicar a reprodutibilidade durante a polimerização.

Figura 33 – Avaliação de diferentes métodos de ativação do eletrodo de trabalho.



Fonte: Do autor.

Legenda: Eletrodos de quadro impresso de carbono ativados com KCl (a), H₂SO₄ (b) e tampão fosfato salino (c). Leituras de VOQ (acima) e EIE (abaixo) em eletrodos comerciais (tracejado/oco) e limpos (sólido). Os gráficos de VOQ são uma representação de potencial aplicado (eixo x em Volts) pela corrente δ no eletrodo trabalho (eixo y em Amperes). Os resultados de EIE estão em plotagem de Nyquist (Z' e Z'' em x e y respectivamente).

O presente trabalho buscou a polimerização controlada de uma fina camada, a qual deve ser fixada firmemente no eletrodo de trabalho. O aumento da impedância do sistema antecedendo a polimerização pode proporcionar uma maior precisão na seleção de espessura do polímero, uma vez que a Eletropolimerização se conduzirá de forma mais lenta. Os testes posteriores foram conduzidos utilizando a ativação por voltametria cíclica em H₂SO₄, uma vez

que esta ativação reduziu a condutividade do sistema sem alterar a R_{Ω} .

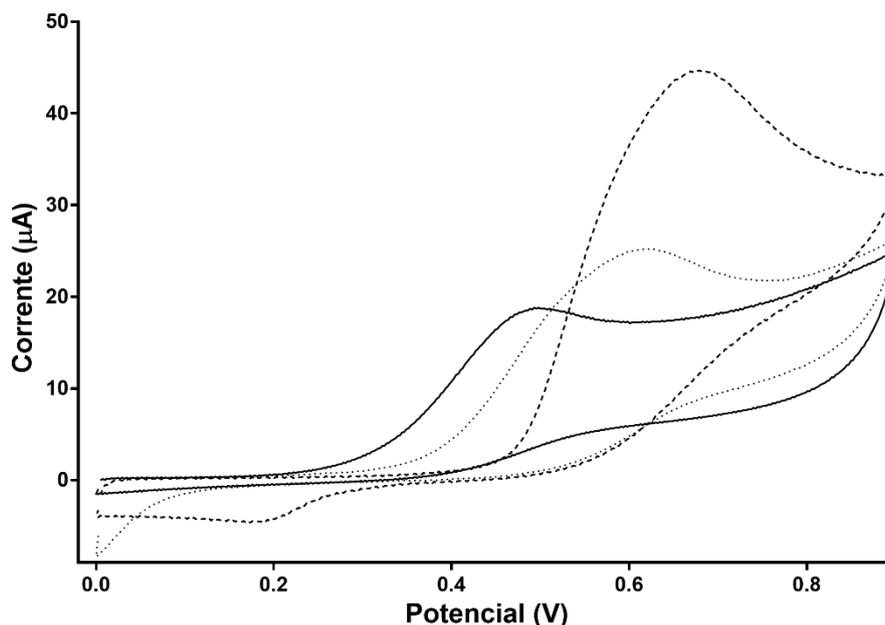
6.2.2 Seleção do monômero funcional e determinação do potencial de polimerização

A eletropolimerização auto limitante dos polímeros isolantes foi um recurso considerado na escolha do monômero, levando em conta que a impressão não deva recobrir a molécula molde. Foram selecionados:

- o fenol, que conta com interações com a molécula molde por ligações de hidrogênio, π - π e π -stacking;
- o 3-AF, que além do grupo hidroxil, apresenta ainda um grupo amino com cargas positivas para interação com a molécula molde;
- e o ácido 3-aminofenilborônico, que possui o grupo borônico, altamente negativo, e que possui a habilidade de se complexar com componentes glicosados de biomoléculas.

Nos voltamogramas de polimerização (Figura 34) foram observadas as maiores correntes no fenol, seguido pelo ácido 3-aminofenilborônico e pelo 3-AF consecutivamente. A corrente observada reflete processos faradâicos e, conseqüentemente, a quantidade de polímero formado. Contudo, a extensão da faixa de potencial na qual o composto exibe eletroatividade também influencia na formação do polímero. O início da zona eletroativa do 3-AF antecede o ácido 3-aminofenilborônico e o fenol, fato que leva a um maior tempo de polimerização favorecendo a formação do poliaminofenol.

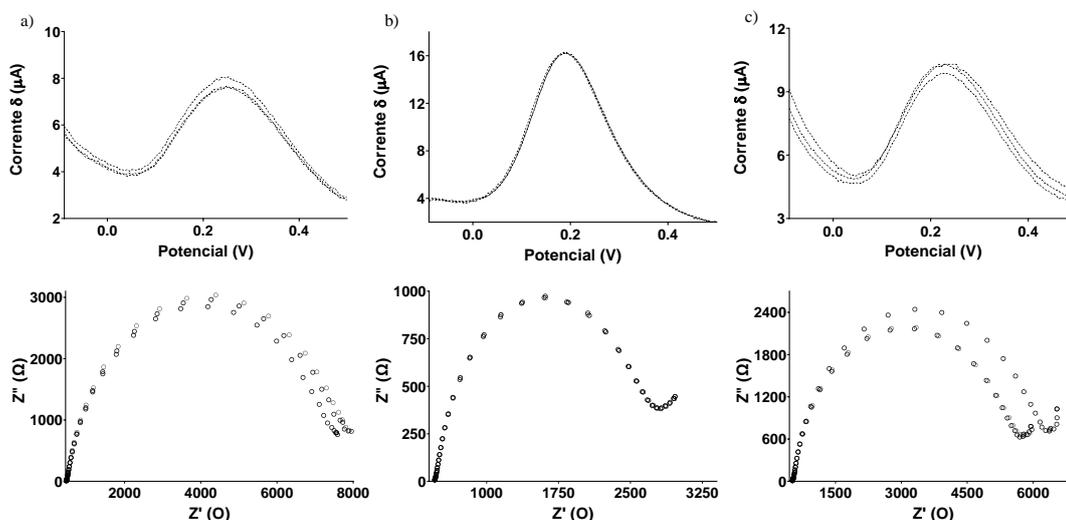
Figura 34 – Eletroatividade dos monômeros avaliada em um potencial de 0 a +1,0 V.



Fonte: Do autor.
 Legenda: Primeiro ciclo dos VCs durante a polimerização do fenol (tracejado), 3-AF (sólido) e ácido 3-aminofenilborônico (pontilhado). Varedura à 50 mV s^{-1} . Representação de potencial aplicado (x em volts) por corrente (y em amperes).

As leituras de VOQ e EIE após a polimerização (Figura 35) são condizentes com os resultados observados nos voltamogramas cíclicos. O fenol com sua elevada eletroatividade mesmo apresentando a menor faixa de potencial eletroativa exibiu o maior aumento de impedância, seguido pelo ácido 3-aminofenilborônico e pelo 3-AF, constituindo a mais condutora das três alternativas. Durante a estabilização, as lavagens com água ultrapura e incubações consecutivas com tampão fosfato salino auxiliam na remoção de resíduos de síntese e retirada de massas poliméricas pouco entrecruzadas. O 3-AF se mostrou o mais estável dos polímeros formados por sofrer menores variações após a estabilização. Outra propriedade de interesse exibida pelo 3-AF foi o início de sua faixa eletroativa em aproximadamente + 0.23 V. Em uma impressão molecular, é desejável que a molécula molde não reaja, evitando formação de ligações covalentes com o polímero, a fim de facilitar sua posterior remoção.

Figura 35 – Leituras subsequentes durante a estabilização dos filmes poliméricos formados na superfície do eletrodo de trabalho.

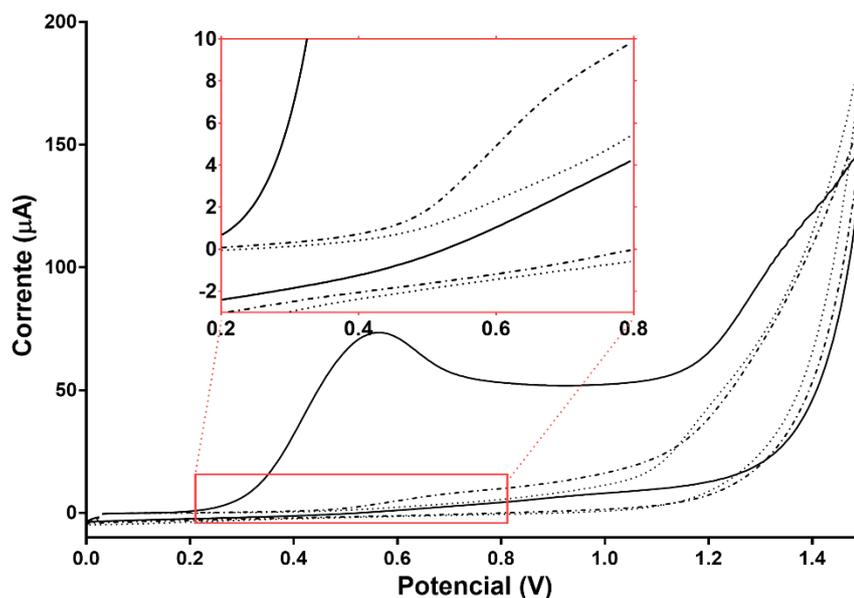


Fonte: Do autor.

Legenda: Sobreposição de leituras após três estabilizações consecutivas em tampão fosfato salino pH 7,4 a 10 mmol L^{-1} . VOQ (acima) e EIE (abaixo). Sistemas de polifenol (a), poliaminofenol (b) e poliaminofenilboronato. (c). Os gráficos de VOQ são uma representação de potencial aplicado (eixo x em Volts) pela corrente δ no eletrodo trabalho (eixo y em Amperes). Os resultados de EIE estão em plotagem de Nyquist (Z' e Z'' em x e y respectivamente).

Uma variável utilizada para nivelar a formação de polímero é a velocidade de varredura durante a polimerização. Velocidades mais baixas proporcionam um aumento no tempo de reação. Para se compensar a baixa reatividade do 3-AF, a velocidade de varredura foi reduzida para $25,00 \text{ mV s}^{-1}$. Na Figura 36 nota-se um aumento significativo do pico de oxidação por volta de $+0.5 \text{ V}$. Além disso, a imagem mostra voltamogramas do tampão e da molécula molde, permitindo distinguir zonas de eletroatividade da molécula modelo, as quais devem ser evitadas durante a polimerização. Tendo em vista que as leituras de oxidação do tampão e da molécula molde se separam após $+0.40 \text{ V}$, ficou determinado que o potencial de polimerização não deverá ultrapassar $+0.38 \text{ V}$.

Figura 36 – Avaliação da eletroatividade do tampão fosfato salino (pontilhado), do EPT-I (tracejado) e do 3-AF (sólido).



Fonte: Do autor.
 Legenda: Varredura à 25 mV s^{-1} . Representação de potencial aplicado (abscissas em volts) por corrente (ordenadas em amperes).

6.2.3 Sensores para *Dengue virus*

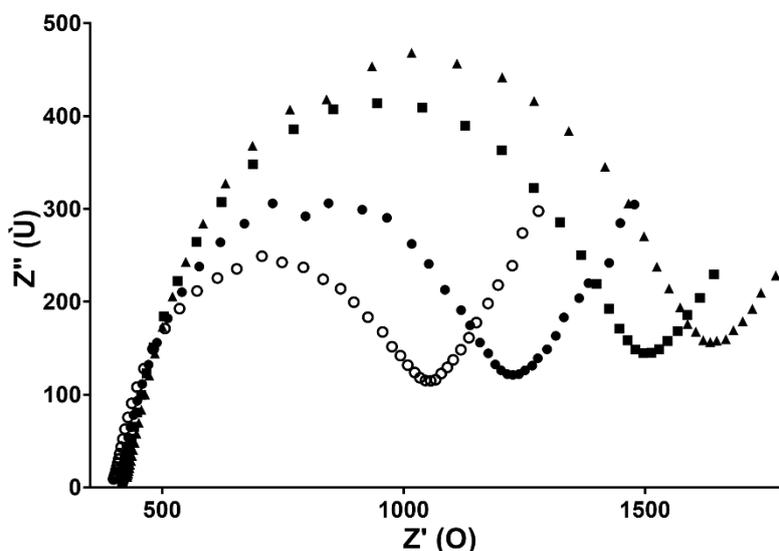
6.2.3.1 Sensor com 3-aminofenol/EPT-I (3AFE1)

6.2.3.1.1 Otimização das condições de polimerização

Trabalhos anteriores relataram que uma taxa de varredura elevada e poucos ciclos na voltametria cíclica produzem polímeros ásperos e com menos eficiência no reconhecimento. Em contrapartida, com um elevado número de ciclos e uma taxa de varredura muito baixa proporcionaram um polímero espesso e denso, que dificulta a retirada da molécula molde (CHEN *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016). A escolha desses parâmetros é importante na elaboração de um polímero eficaz.

A faixa de potencial selecionada abrange apenas a porção inicial da área eletroativa do 3-AF, colaborando para uma formação mais controlada do polímero. No entanto, a limitação de potencial faz com que pouco polímero seja formado a cada ciclo. A fim de compensar esta polimerização reduzida, foram avaliadas polimerizações com 5, 10 e 15 ciclos (Figura 37).

Figura 37 – Influência do número de ciclos sobre a formação do polímero de 3-AF.



Fonte: Do autor.

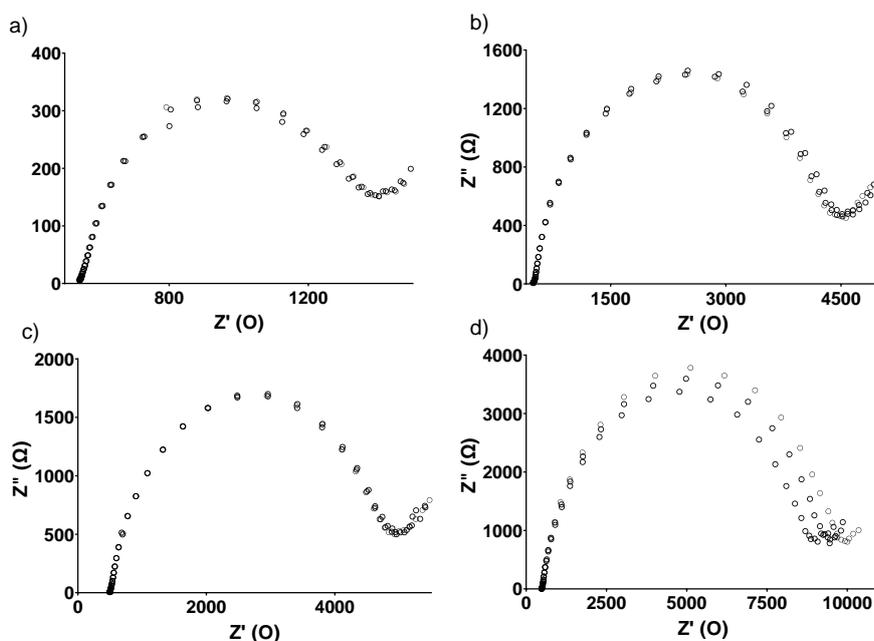
Legenda: Leituras após a ativação (○) e polimerização de 3-AF a 1 mM por 5 (●), 10 (■) e 15 ciclos (▲). Os resultados de EIE estão em plotagem de Nyquist (Z' e Z'' em x e y respectivamente).

Por se tratar de um polímero isolante, o aumento da formação do polímero tende a ser acompanhado por um aumento da resistência à transferência de carga (R_{ct}) do sistema. O maior aumento de R_{ct} foi observado entre as polimerizações de 5 e 10 ciclos. Apesar de com 15 ciclos ainda ser possível se obter mais polímero, vale ressaltar que o uso de muitos ciclos pode dificultar a remoção da molécula molde e comprometer a capacidade de reconhecimento do material impresso. Optamos, portanto, por continuar com 10 ciclos.

Outra variável a ser considerada é a concentração do monômero. Foram testadas as concentrações de 0,10, 1,00, 2,50 e 9,00 mmol L⁻¹ de 3-AF. Após a polimerização, os sistemas formados foram estabilizados por incubações sucessivas em tampão fosfato salino pH 7,4 10 mmol L⁻¹ por 30 min, com leituras de EIE intercalando as incubações (Figura 38). As impedâncias apresentadas pelos sistemas aumentaram proporcionalmente com a concentração de monômero. Foram considerados estáveis os sistemas que apresentassem as leituras mais sobrepostas após as incubações consecutivas em tampão. A concentração de 2,5 mmol L⁻¹ de 3-AF proporcionou o polímero mais estável dentre as concentrações testadas, com os menores desvios entre as leituras das estabilizações. Concentrações muito baixas podem formar polímeros flácidos e inconsistentes, os quais podem desprender fragmentos nas lavagens durante a análise. Concentrações muito elevadas podem formar camadas muito espessas de polímero, as quais pelo próprio efeito isolante impedem uma polimerização completa das

porções mais superficiais. A concentração de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ promoveu uma formação satisfatória de polímero, se apresentando altamente estável e sendo esta a concentração selecionada para os próximos estudos.

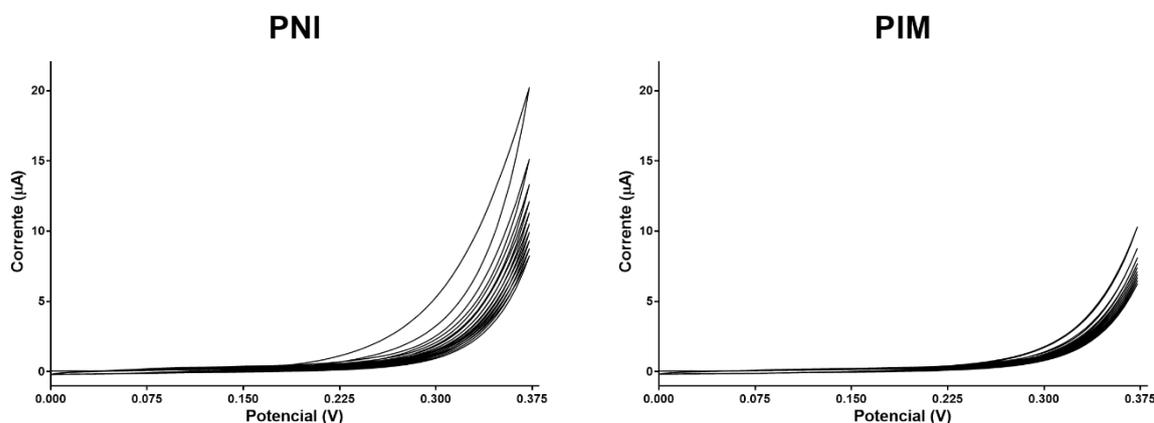
Figura 38 – Influência da concentração de monômero na formação de polímero de 3-AF.



Fonte: Do autor.
 Legenda: Leituras de EIE de três estabilizações consecutivas em tampão fosfato salino de PIMs eletropolimerizados nas concentrações de a) 0,1, b) 1, c) 2,5 e d) 9 mmol L^{-1} de 3-AF. Os resultados de EIE estão em plotagem de Nyquist (Z' e Z'' em x e y respectivamente).

Os dados da análise coulométrica são compatíveis com essa diferença de impedância. As cargas calculadas pelo software Nova para os voltamogramas de eletropolimerização (Figura 39) foram de $380,40$ e $232,43 \mu\text{C}$, para PNI e PIM respectivamente. Pela fórmula da análise coulométrica, considerando-se a densidade do poliaminofenol a mesma do 3-AF ($1,195 \text{ g cm}^{-3}$), foram encontradas espessuras de $24,54 \text{ nm}$ para o PNI e de $17,51 \text{ nm}$ para o PIM. Aparentemente a presença do epítipo reduz a eletroatividade do monômero durante a polimerização.

Figura 39 – Voltamograma de polimerização do 3-AF para polímeros impresso na presença do EPT-I e não impresso.



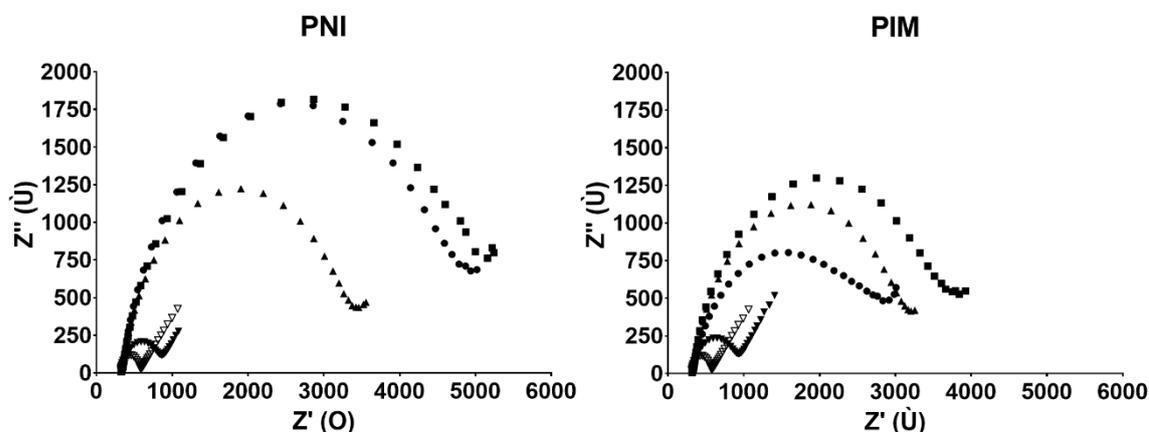
Fonte: Do autor.

Legenda: Voltamogramas cíclicos da Eletropolimerização do 3-AF não impresso (esquerda) e do impresso com o EPT-I (direita). Representação de potencial aplicado (x em volts) por corrente (y em amperes).

O fato de a molécula molde ser um peptídeo possibilita a aplicação de uma remoção menos agressiva ao polímero, através da digestão proteolítica por uso de uma enzima. A proteinase K vem sendo utilizada nesse âmbito por exibir alta atividade enzimática com baixa especificidade de corte (ERDŐSSY *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2016). A enzima, contudo, aparenta modificar a estrutura, ou mesmo, ficar adsorvida no polímero. Esta potencial adsorção gera a necessidade de etapas seguintes para a remoção da proteinase. Após a incubação com a enzima, foram conduzidos então 25 ciclos em tampão fosfato salino nas mesmas condições da polimerização, no intuito de remover resquícios da molécula molde por repulsão eletrostática. Antes de efetuar testes de reconhecimento, os sistemas foram estabilizados por incubações consecutivas em tampão fosfato salino.

O material impresso apresentou, desde a etapa da polimerização, menores valores de impedância quando comparado ao PNI (Figura 40). Geralmente a remoção de proteínas promove a redução da resistência de uma superfície. No entanto, a incubação com proteinase K promove um grande aumento do R_{ct} , tanto no PIM quanto no PNI. Este aumento de impedância pode ser reflexo tanto da adsorção da proteinase no polímero, quanto de eventuais modificações químicas do filme.

Figura 40 – Construção do elemento de reconhecimento do modelo 3AFE1 na superfície do eletrodo de trabalho.



Fonte: Do autor.

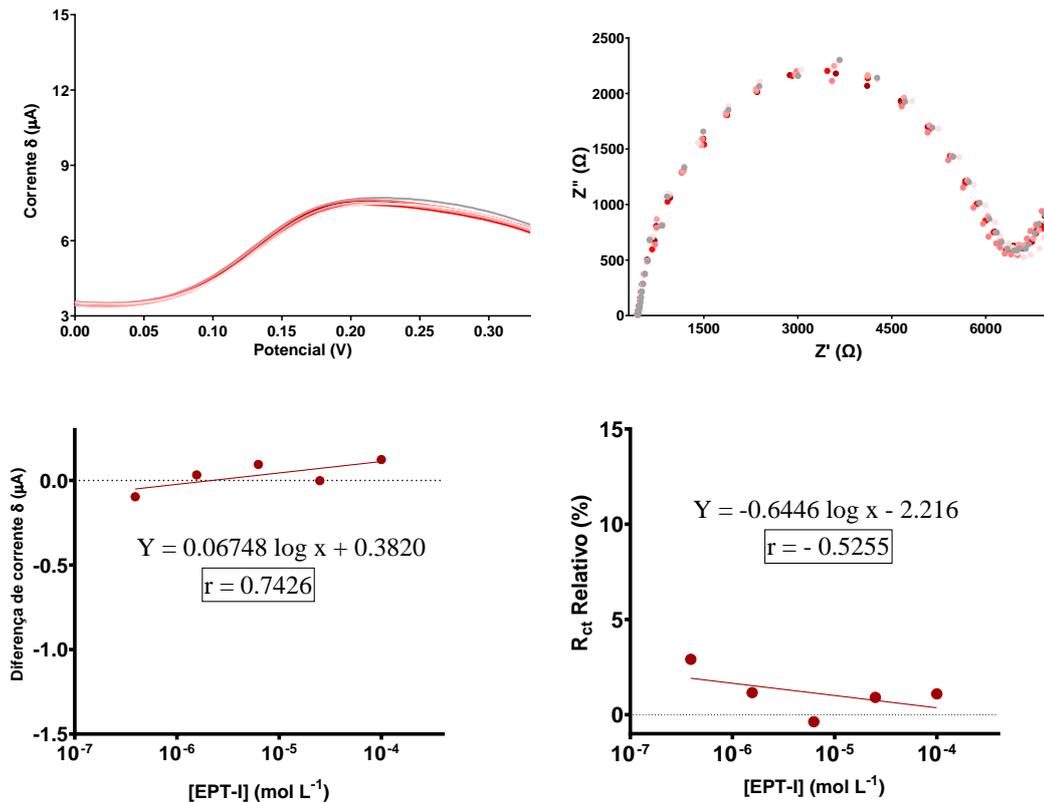
Legenda: Leituras de EIE de PNI (à esquerda) e PIM (à direita). Nas representações, leituras eletrodo comercial (∇), tratamento de ativação com H_2SO_4 (\blacktriangledown), polimerização (\blacktriangle), incubação com a proteinase K (\blacksquare), final da remoção (\bullet).

Khan *et al.* (2016) relata a possibilidade da proteinase ser capaz de realizar modificações em filmes de poliaminofenol. As ligações peptídicas próximas a aminoácidos aromáticos são alguns dos sítios de clivagem predominantes da enzima. Por conta da similaridade estrutural apresentada pelo filme de poliaminofenol, este pode sofrer uma digestão parcial. Ao final da construção, entretanto, o PIM apresenta um comportamento distinto ao do PNI. No PNI a leitura final de EIE se mantém próxima da leitura após a incubação com a proteinase. Para o PIM a leitura ao final da construção exibiu um R_{ct} menor que o da leitura após a polimerização. Este evento mostra que a remoção da molécula modelo foi bem sucedida, criando cavidades que podem ser preenchidas pela sonda de leitura, reduzindo assim a resistência à transferência de carga do sistema pela promoção de “*gate effect*” (Figura 7).

6.2.3.1.2 Readsorção do EPT-I após a remoção

Após a etapa da remoção, o sensor 3AFE1 foi submetido ao processo de bioreconhecimento com a própria molécula molde (Figuras Figura 41 e Figura 42, para PNI e PIM, respectivamente). Foram testadas as concentrações de $3,91 \times 10^{-7}$, $1,56 \times 10^{-6}$, $6,25 \times 10^{-6}$, $2,5 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 41 – Reconhecimento do EPT-I em tampão fosfato salino pelo sensor 3AFE1.



Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras do PNI de VOQ (à esquerda) e EIE (à direita), com as respectivas curvas abaixo. Nas representações, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de 3.91×10^{-7} a 10^{-4} mol L⁻¹, da cor mais clara para a mais escura. No diagrama de dispersão do gráfico de VOQ, as diferenças de corrente δ ($I_x - I_{\text{stab}}$)(μA) pela concentração (mol L⁻¹). No diagrama de dispersão do gráfico de EIS foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{\text{estabilização}}$, %) pela concentração (mol L⁻¹).

Como as concentrações do EPT-I seguem uma distribuição logarítmica no eixo das concentrações, foi utilizado o modelo de regressão semilogarítmico. A análise de regressão linear nos diagramas de dispersão fornece a equação

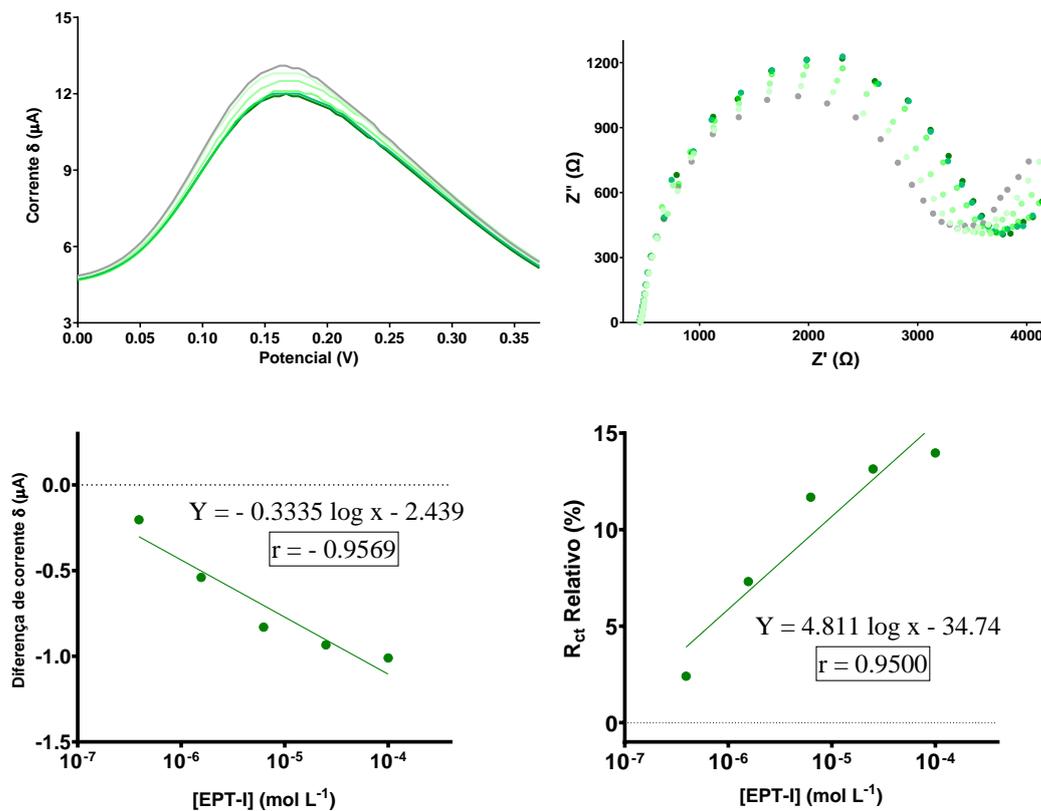
$$Y = a \log x + b \quad (\text{Equação 22})$$

onde a representa a inclinação e b o intercepto da reta no eixo Y. A inclinação reflete a sensibilidade para este modelo, uma vez que para cada unidade de variação do eixo X, o eixo Y irá variar em a unidades.

Outro valor fornecido é o coeficiente de correlação linear de Pearson, r , o qual descreve quanto os pontos no diagrama de dispersão se aproximam da reta estabelecida pela equação. Quanto mais o módulo do valor se aproxima de 1, maior é o ajuste do modelo proposto aos dados obtidos.

PNI exibiu $|r| \leq 0.9$ para VOQ e EIE (Figura 41), comprovando que não há tendência linear nas respostas obtidas. Apesar de na VOQ o quarto ponto parecer ser um *outlier* e o resultado aparentar demonstrar linearidade, vale ressaltar que os valores não se distanciaram significativamente do zero, podendo caracterizar uma resposta aleatória. Ressalta-se ainda que a sensibilidade foi muito baixa, sendo que concentrações distintas apresentaram sinais muito próximos.

Figura 42 – Reconhecimento do EPT-I em tampão fosfato salino pelo sensor 3AFE1.



Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras do PIM de VOQ (à esquerda) e EIE (à direita), com as respectivas curvas abaixo. Nas representações, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de 3.91×10^{-7} a 10^{-4} mol L⁻¹, da cor mais clara para a mais escura. No diagrama de dispersão do gráfico de VOQ, as diferenças de corrente δ ($I_x - I_{stab}$) (μA) pela concentração (mol L⁻¹). No diagrama de dispersão do gráfico de EIS foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{estabilização}$, %) pela concentração (mol L⁻¹).

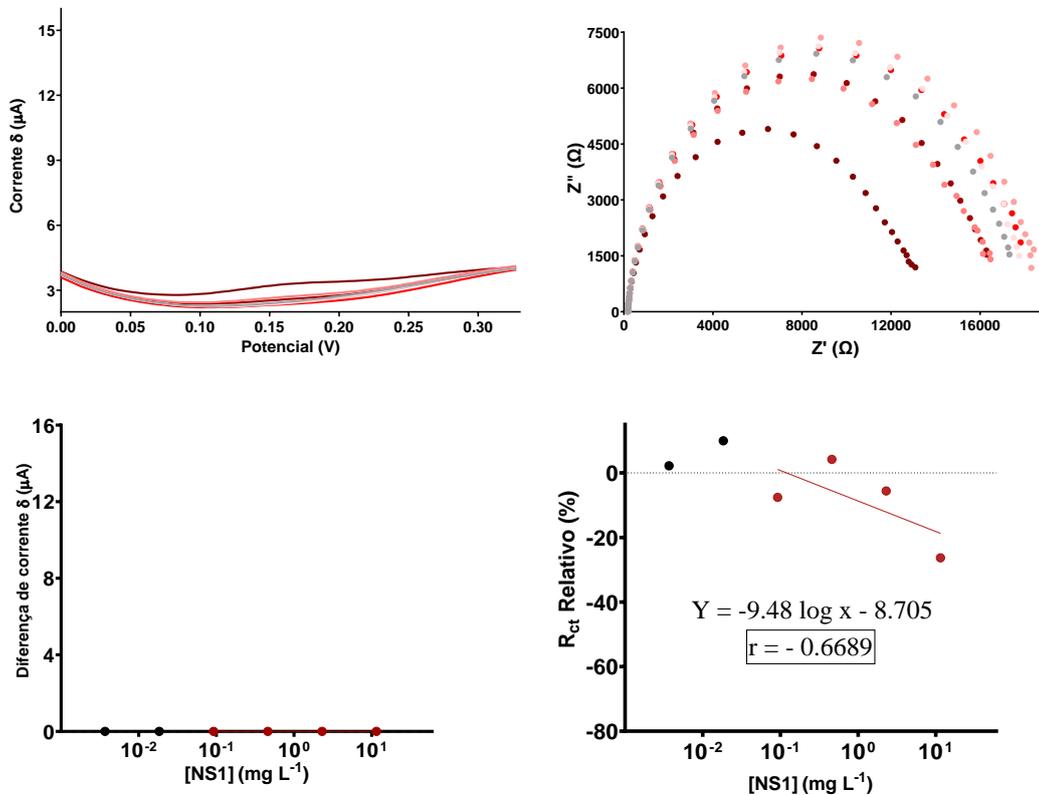
O PIM apresentou $|r| \geq 0.95$ para VOQ e EIE, mostrando que há uma relação de linearidade entre as respostas obtidas para cada concentração. As inclinações das retas obtidas no PIM foram de sentido oposto às observadas no PNI, e seus valores foram maiores. Como dito anteriormente, o valor da inclinação reflete a sensibilidade do modelo, e este achado demonstra uma maior afinidade do PIM, comprovando o aumento da eficácia no reconhecimento do analito pelo modelo impresso.

Nos testes de adsorção do EPT-I, o *gate-effect* (Figura 7) pode ter sido novamente o fator que mais influenciou na resposta observada: a remoção da molécula molde promove a formação de canais que são preenchidos pela sonda de ferricianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$), e a condutividade do sistema reduz com a adsorção do analito nestes sítios seletivos.

6.2.3.1.3 Detecção da NS1 de DENV-1 pelo sensor de 3AFE1

O EPT-I constitui uma região da proteína não estrutural 1 (NS1) de DENV-1 que se encontra parcialmente obstruída pelo enovelamento da proteína. Para realizar os testes de reconhecimento, a proteína foi submetida à desnaturação por temperatura antes da incubação no sensor. Concentrações de $3,68 \times 10^{-3}$, $1,84 \times 10^{-2}$, $9,2 \times 10^{-2}$, $4,6 \times 10^{-1}$, 2,3 e $11,5 \text{ mg L}^{-1}$ de NS1 desnaturada foram então incubadas por 30 min com PNI (Figura 43) e PIM (Figura 44). Esta ainda é uma etapa de refinamento do intervalo de resposta do sensor. Para PNI e PIM, as respostas obtidas nas duas primeiras concentrações testadas foram consideradas aleatórias, e a análise de regressão linear foi aplicada apenas nos 4 últimos pontos.

Figura 43 – Reconhecimento da NS1 desnaturada em tampão fosfato salino pelo sensor 3AFE1.

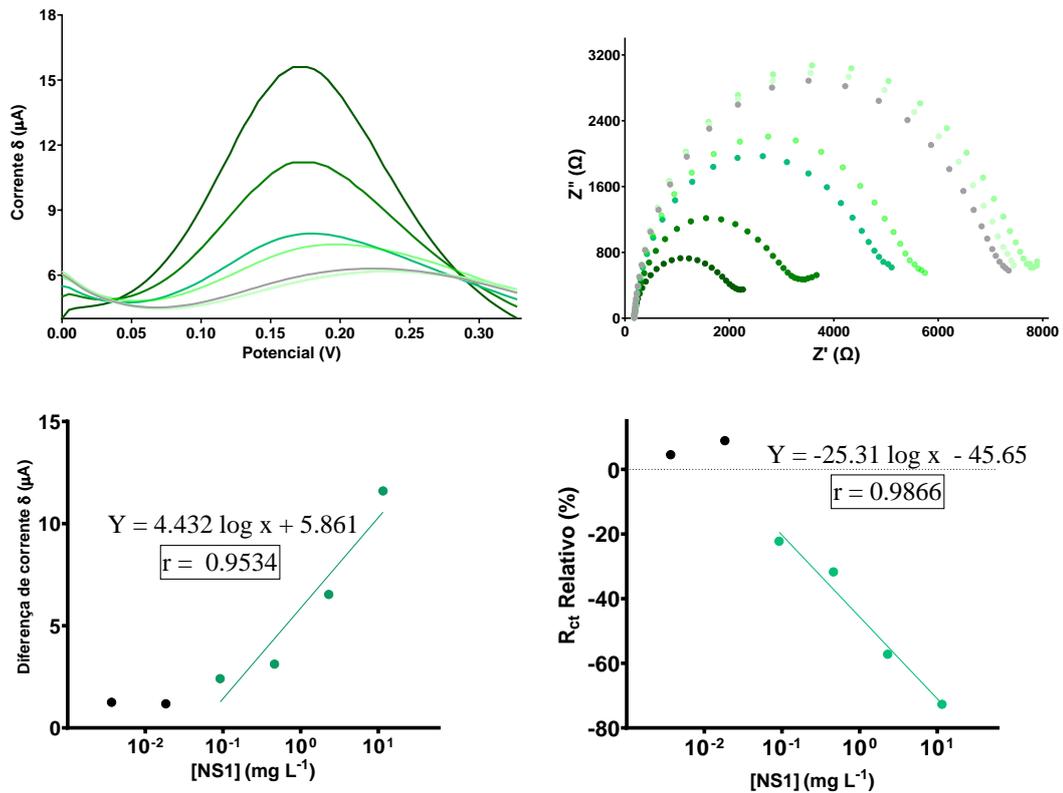


Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras do PNI de VOQ (à esquerda) e EIE (à direita), com as respectivas curvas abaixo. Nas representações, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de $3,68 \times 10^{-3}$ a $11,5 \text{ mg L}^{-1}$, da cor mais clara para a mais escura. No diagrama de dispersão do gráfico de VOQ, as diferenças de corrente δ ($I_x - I_{\text{stab}}$) (μA) pela concentração (mg L^{-1}). No diagrama de dispersão do gráfico de EIS foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / \text{Restabilização}$, %) pela concentração (mg L^{-1}).

A falta de condutividade do PNI da Figura 43 impossibilitou a análise por VOQ. A regressão dos dados de EIE mostra ausência de correlação linear entre os pontos analisados. O PNI aparenta mostrar resposta significativa apenas na última concentração testada. Optamos, a partir daqui, por realizar apenas análises de EIS.

Figura 44 – Reconhecimento da NS1 desnaturada em x pelo sensor 3AFE1.



Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras do PIM de VOQ (à esquerda) e EIE (à direita), com as respectivas curvas abaixo. Nas representações, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de $3,68 \times 10^{-3}$ a $11,5 \text{ mg L}^{-1}$, da cor mais clara para a mais escura. No diagrama de dispersão do gráfico de VOQ, as diferenças de corrente $\delta (I_x - I_{\text{stab}})$ (μA) pela concentração (mg L^{-1}). No diagrama de dispersão do gráfico de EIS foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{\text{estabilização}}$, %) pela concentração (mg L^{-1}).

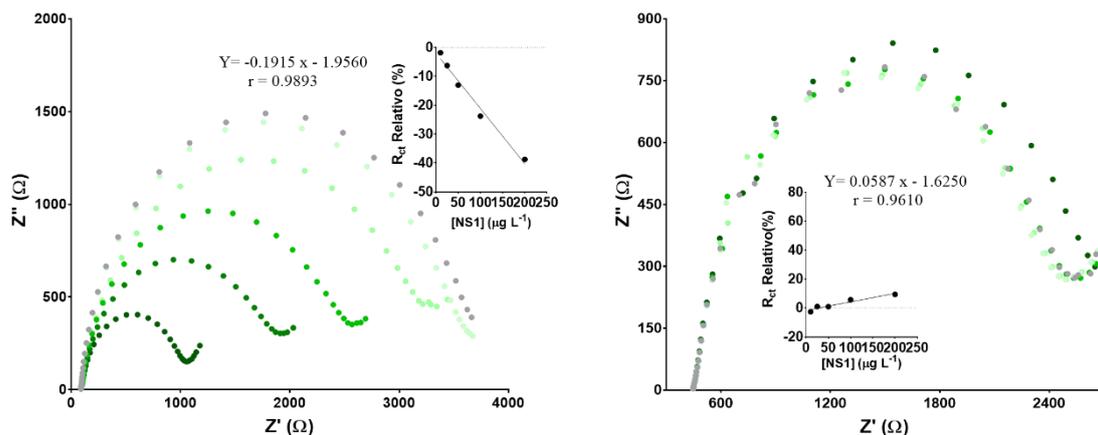
No PIM foi possível observar comportamento linear desde o terceiro ponto da curva, de $9,2 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$, até o último, de $11,5 \text{ mg L}^{-1}$, tanto na VOQ quanto na EIE.

Curiosamente, com a adsorção da NS1 o sentido das inclinações das retas foi oposto ao modelo equivalente para o EPT-I. Esta inversão pode ter ocorrido porque o *gate-effect* (Figura 7) deixa de ser o fator majoritário a contribuir para a resposta. A NS1 apresenta 352 aminoácidos, e apenas 9 destes se alojarão nas cavidades impressas. O restante do “corpo” da proteína permanece na superfície do polímero, podendo interagir com a sonda de ferricianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$). Não obstante, Gelanew, Poole-Smith & Hunsperger (2015) descrevem que anticorpos apresentam uma maior eficácia de reconhecimento para a forma monomérica desnaturada da NS1 frente às formas hexamérica e dimérica. Logo, o aumento de sensibilidade pode estar relacionado a (1) uma maior eficiência no reconhecimento, (2) um aumento do volume do analito e (3) das interações que este na forma desnaturada exerce sobre a sonda e a

superfície do filme.

O intervalo de concentrações foi refinado para o intervalo que sinalizou uma maior relação de linearidade na Figura 44. A fim de avaliar o impacto da desnaturação na exposição da região impressa, o modelo 3AFE1 foi submetido a incubações de concentração crescente de NS1 (Figura 45) na forma desnaturada e *in natura*.

Figura 45 – Influência da etapa prévia de desnaturação no reconhecimento da NS1 pelo modelo 3AFE1.



Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras EIE do PIM. Reconhecimento da NS1 em tampão fosfato salino com (direita) e sem (esquerda) a etapa de desnaturação por temperatura antecedendo as incubações. Na representação, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de 10 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, da cor mais clara para a mais escura ($n=2$). No diagrama de dispersão foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{\text{estabilização}}$, %) pela concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$).

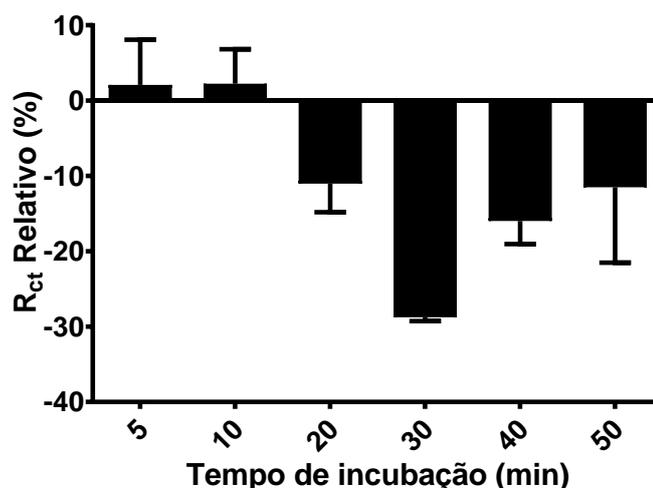
Para a proteína desnaturada, o sinal apresentou boa correlação linear ($r = 0.9893$) nas concentrações de 10 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, com desvio padrão relativo (DPR) abaixo de 5.58%. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) calculados foram de 13.9 e 42.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Para a proteína *in natura*, o sensor manifestou variações de sinal de baixa amplitude e com comportamento aparentemente aleatório nas concentrações mais baixas. Nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, houve um aumento do R_{ct} relativo do sistema. Estes apontamentos permitem estipular que o epítipo impresso se encontra internalizado na estrutura da proteína e que a adsorção observada neste experimento foi não específica.

6.2.3.1.4 Tempo de incubação

Na expectativa de melhorar a sensibilidade do modelo 3AFE1, foi analisada a influência do tempo de incubação com a NS1 desnaturada. Foram testadas incubações de 5 a 50 min (Figura 46).

Figura 46 – Influência do tempo de incubação na adsorção da NS1 na superfície do modelo 3AFE1.



Fonte: Do autor.
 Legenda: Variações de Rct do polímero impresso de 3-AF em função do tempo de incubação com a proteína desnaturada (n=3). Variações de Rct relativo após incubação com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de NS1 desnaturada.

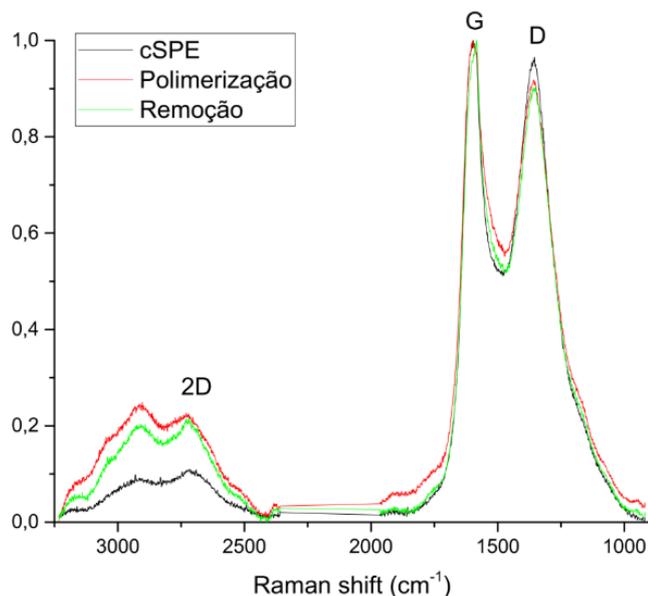
Os resultados obtidos nas leituras espectroscópicas de impedância foram analisados por *One-way analysis of variance*, com teste de Tukey *post hoc* ($p < 0,01$), sendo o tempo de 30 minutos o único com significância estatística dos outros grupos. As respostas nos tempos de 5 e 10 min foram similares ao observado na incubação da proteína *sem a* etapa de desnaturação (Figura 45) a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, podendo ser associadas a interações inespecíficas devido ao pouco tempo de incubação. O preenchimento de cavidades e a adsorção não específica na superfície do filme podem vir a contribuir de formas diferentes para a impedância final do sistema. Com 20 minutos, já é possível ver uma inversão do sinal, com metade do sinal apresentado pelo tempo de 30 minutos. Com 20 minutos, o sinal observado é proveniente de fenômenos mistos de adsorção específica e inespecífica. Quando sintetizada artificialmente, a NS1 forma homodímeros estáveis cerca de 30 min após o fim do processo. Estes dímeros são resistentes à redução, mas são termolábeis. Após o tempo decorrido na incubação a proteína pode voltar a estabelecer pontes de dissulfeto e se enovelar, reduzindo assim a acessibilidade ao sítio

$^{28}\text{WTEQYKFQA}^{36}$ (LINDENBACH; RICE, 2003; WALLIS *et al.*, 2004). Isso explica a redução de amplitude em tempos de incubação superiores a 30 min.

6.2.3.1.5 Caracterização estrutural do filme 3AFE1

Espectros de Raman do eletrodo de trabalho foram coletados em diferentes etapas da modificação do eletrodo com o 3-aminofenol, tanto na construção do PNI (Figura 47) quanto do PIM (Figura 48). Os espectros foram coletados nas regiões de interesse entre 900 e 1950 cm^{-1} e entre 2350 e 3250 cm^{-1} de Raman shift. O objetivo foi evidenciar as 3 bandas que ocorrem frequentemente em materiais de carbono, localizadas a 1370, 1580 e 2700 cm^{-1} de Raman shift. Estas bandas são conhecidas como D, G e 2D, respectivamente. A banda G representa as vibrações de estiramento da ligação de hibridização sp^2 dos átomos de carbono, expressando o estiramento das ligações C=C. O pico D se origina dos modos respiratórios (*breathing mode*) dos anéis hexagonais de carbono. A banda D representa vibrações de átomos de carbonos sp^3 hibridizados, indicando a presença de desordens e/ou defeitos na malha. A banda 2D representa uma segunda ordem da banda D relacionado com a dopagem da malha, envolvendo um processo vibracional em rede causado por fenômenos mistos. O pico de segunda ordem em torno de 2950 cm^{-1} pode ser atribuído a uma combinação de sobretom (*overtone*) das bandas D e G (D+G) (BULUSHEVA *et al.*, 2008; FERRARI *et al.*, 2006; KAWASHIMA; KATAGIRI, 1995; ROSCHER; HOFFMANN; AMBACHER, 2019).

Figura 47 – Caracterização estrutural por Raman do polímero não impresso de 3-AF.

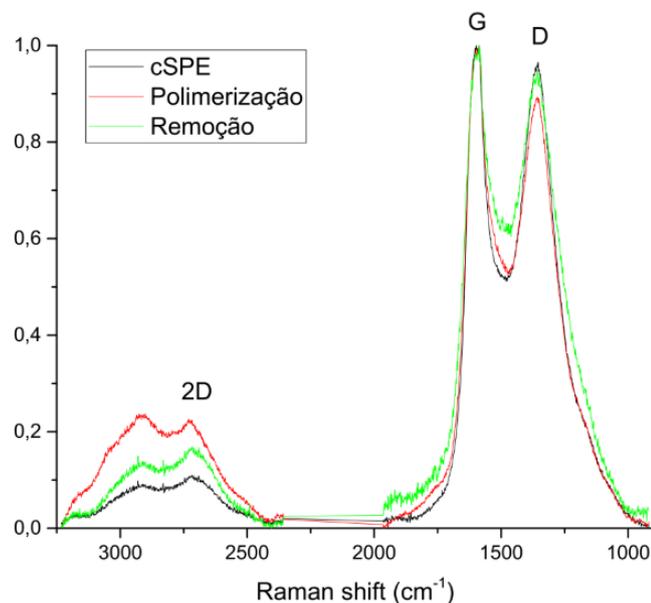


Fonte: Do autor.

Legenda: Espectro Raman de eletrodos trabalho em diferentes etapas da modificação durante a construção do PNI de 3-aminofenol. Gráfico de número de onda (cm⁻¹) do Raman shift pela intensidade normalizada dos picos.

A relação de intensidade I_D/I_G é utilizada frequentemente para quantificar a densidade de defeitos em materiais a base de carbono e foi empregada aqui para avaliar a ocorrência de modificações químicas nos materiais. A tinta de carbono do eletrodo trabalho foi o material de partida e apresentou uma relação I_D/I_G de 0,9723. Com a polimerização do filme de poliaminofenol na superfície, esta relação reduziu para 0,9154. Este resultado mostra que a superfície do filme ficou menos acidentada e com um maior contingente de C=C. Após o tratamento da remoção, o valor da relação caiu para 0,9064. Este achado ilustra uma superfície que se torna menos acidentada a cada etapa monitorada. Os ciclos aplicados na remoção podem promover o entrecruzamento de pontos da malha que não haviam reagido, aumentando assim o contingente de C=C. O aumento observado da banda 2D reflete a dopagem da malha com os grupos N- e O- do aminofenol após a polimerização.

Figura 48 – Caracterização estrutural por Raman do polímero impresso de 3-AF.



Fonte:
Legenda:

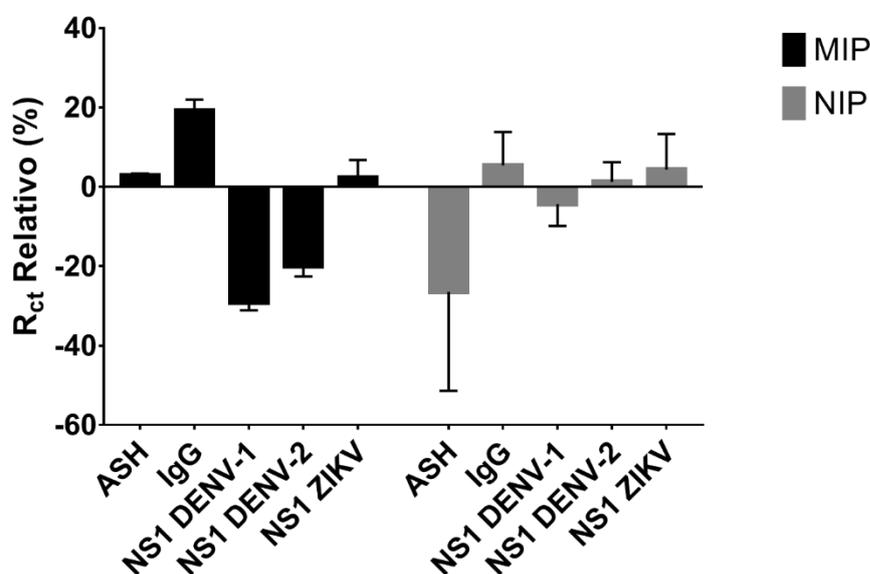
Do autor.
Espectro Raman de eletrodos trabalho em diferentes etapas da modificação durante a construção do PIM de 3-aminofenol. Gráfico de número de onda (cm^{-1}) do Raman shift pela intensidade normalizada dos picos.

No PIM a relação foi de 0,9723 para 0,9035 após a polimerização, se comportando de maneira similar ao PNI. Após a remoção, no entanto, a relação aumentou para 0,9549. Este aumento na relação pode estar relacionado com a retirada da molécula modelo, com a formação das cavidades impressas e consequente aumento na irregularidade da malha, aumentando assim a contribuição da banda D. A banda 2D apresenta comportamento semelhante ao do PNI após a polimerização, mas declina após a remoção, sinalizando uma redução na dopagem da malha que pode ser atribuída à remoção dos grupos funcionais dos resíduos da sequência peptídica impressa.

6.2.3.1.6 Seletividade e especificidade

A fim de determinar a seletividade do dispositivo 3AFE1, o mesmo foi submetido a incubações com Albumina Sérica Humana e imunoglobulina G (IgG) nas concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para determinar o grau de especificidade do dispositivo proposto, foram feitos experimentos de reconhecimento com as proteínas NS1 de DENV-2 e ZIKV a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Tanto os interferentes quanto as variantes da NS1 foram desnaturadas nas mesmas condições utilizadas nos testes anteriores (Figura 49).

Figura 49 – Avaliação de seletividade e especificidade do modelo 3AFE1.



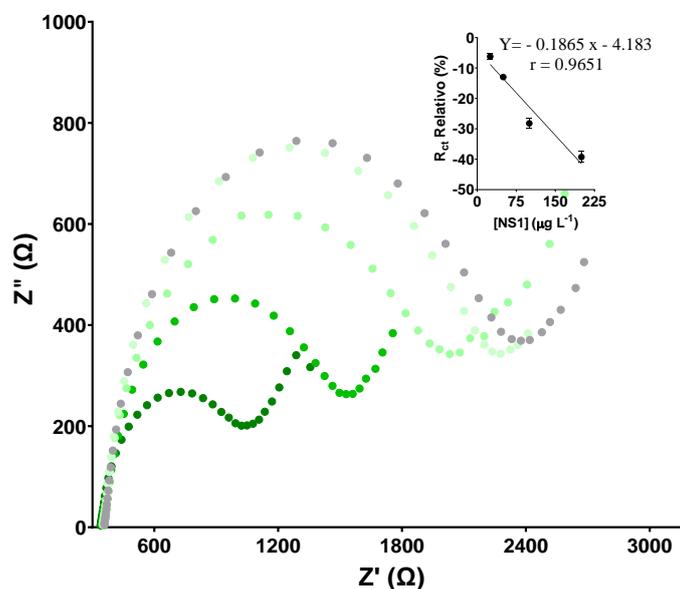
Fonte: Do autor.

Legenda: Comportamento de MIPs e NIPs do modelo 3AFE1 na presença de interferentes do soro (albumina e IgG), e das proteínas NS1 de *Dengue virus* sorotipos 1 e 2 e *Zika virus*. Variações (n=3) de R_{ct} relativo após incubação com 100 µg L⁻¹ da proteína/imunoglobulina desnaturada.

Em uma avaliação por *two-way analysis of variance* ($p < 0,01$) nenhum dos interferentes apresentou significância estatística entre PNI e PIM. O PNI exerce comportamento aleatório de elevado desvio padrão na presença da albumina, enquanto uma baixa amplitude de variação de sinal observada no PIM, mostrando que as cavidades impressas reduzem a influência da presença de albumina no sinal. Na presença de IgG, PNI e PIM tiveram comportamento estatisticamente similar, podendo a influência exercida sobre o sinal ser atribuída à adsorção do interferente na malha polimérica. Além disso, o PIM apresentou sinal resposta para a NS1 de DENV-2. Como apontado na Tabela S2 do Arquivo Suplementar 1, o EPT-I apresenta identidade máxima de 88.89% frente a NS1 de DENV-2. Este elevado grau de similaridade impossibilita a distinção entre estas proteínas através do epítipo proposto. No entanto, quando submetido a incubação com a NS1 de ZIKV, o polímero impresso 3AFE1 manifestou comportamento similar ao do polímero não impresso. A identidade máxima observada entre o EPT-I e as sequências de NS1 de ZIKV foi de 33.33%. Este grau de distinção forneceu às cavidades impressas a capacidade de distinguir as NS1 de ZIKV e DENV-1.

Para investigar o quanto esta influência dos interferentes pode prejudicar a capacidade analítica do sensor, foi realizado um teste de detecção da NS1 de DENV-1 empregando soro humano diluído (1:1000) como matriz (Figura 50).

Figura 50 - Reconhecimento da Proteína não estrutural 1 desnaturada na presença de soro diluído (1:1000).



Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras EIE do PIM. Na representação, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de 25 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, da cor mais clara para a mais escura ($n=2$). No diagrama de dispersão foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x/R_{\text{Restabilização}}$, %) pela concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$).

O sensor 3AFE1 foi capaz de detectar as concentrações crescentes de NS1 desnaturada mesmo na presença dos interferentes do soro humano, comprovando assim a eficácia das cavidades formadas na exclusão de potenciais interferentes da matriz. Contudo, a linearidade da correlação foi prejudicada. Isto pode atribuir uma redução na exatidão do resultado em um modelo quantitativo ou em um aumento da concentração do limite de detecção de um modelo qualitativo. Mesmo assim, o sensor foi capaz de detectar a proteína desnaturada na faixa de 50 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ com DPR abaixo de 5.04%. Os valores de LOD e LOQ calculados foram de 29.3 e 88.7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

O modelo não é compatível com análises em amostras de soro sem diluição, e os testes de reconhecimento mostram que os limites de detecção não são muito inferiores a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Apesar de não ser viável uma aplicação em condições reais, fica provado que o conceito de exposição de epítomos por desnaturação térmica é compatível com a impressão de epítomos. O somatório destas estratégias possibilitou a distinção entre as proteínas NS1 de Dengue e Zika. O sensor pode, portanto, ser empregado em usos laboratoriais, como na análise de sobrenadantes de meios de cultura infectados com os respectivos vírus.

6.2.3.2 Sensor com 4-aminofenol/EPT-I (4AFE1)

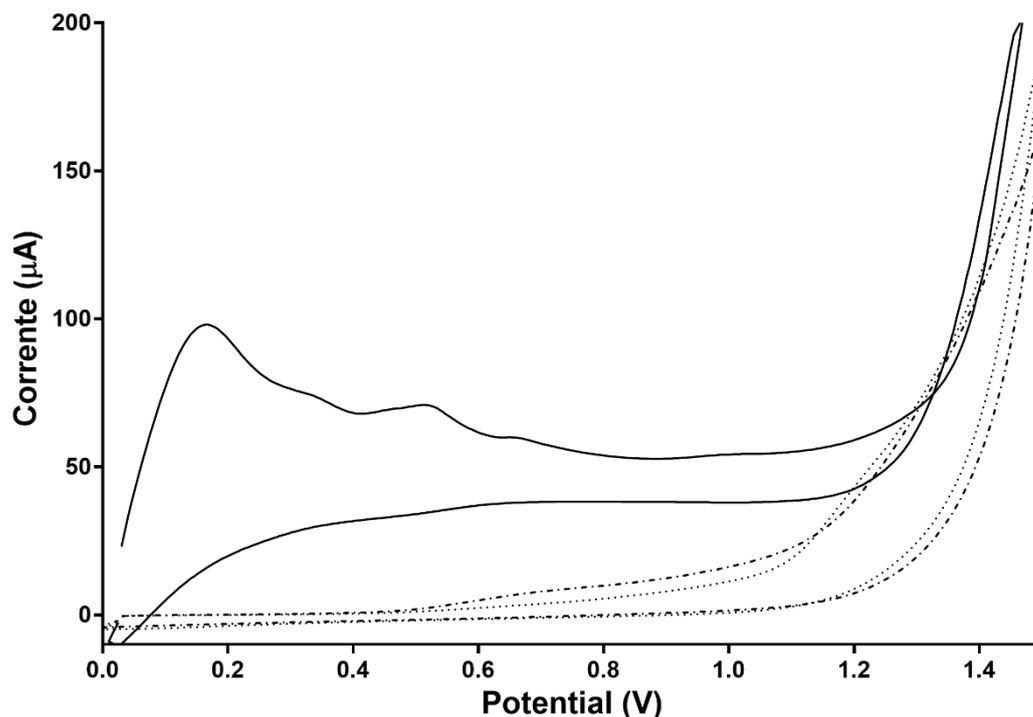
Decidimos aplicar as mesmas condições de polimerização otimizadas no 3-AF para o 4-aminofenol (4-AF), no sentido de investigar a influência das posições dos grupos substituintes na malha polimérica formada.

6.2.3.2.1 Eletroatividade do 4-aminofenol

Para fazer esta extrapolação, é necessário comprovar se o 4-AF apresenta eletroatividade para uma polimerização eficaz na faixa de potencial utilizada no sensor do item anterior.

O 4-AF apresentou eletroatividade (Figura 51) em potenciais de muito menos intensidade que o 3-AF e com maiores correntes, sinalizando uma maior ocorrência de processos faradáicos. As cargas calculadas pelo software Nova para os voltamogramas de eletropolimerização (Figura 52) foram de 5.384 e 4.507 μC , para PNI e PIM respectivamente. A análise coulométrica, considerando-se a densidade do poliaminofenol a mesma do 4-AF ($1,13 \text{ g cm}^{-3}$), foram encontradas espessuras de 428,9 nm para o PNI e de 359,04 nm para o PIM. As espessuras encontradas no modelo 4AFE1 foram cerca de 17 e 21 vezes maiores em relação aos valores do modelo 3AFE1, para PNI e PIM respectivamente. A presença do epítipo também reduz a eletroatividade do 4-AF durante a polimerização, o que justifica o PIM ter menor espessura do que o PNI.

Figura 51 – Avaliação da eletroatividade do tampão fosfato salino (pontilhado), do EPT-I (tracejado) e do 4-AF (sólido).

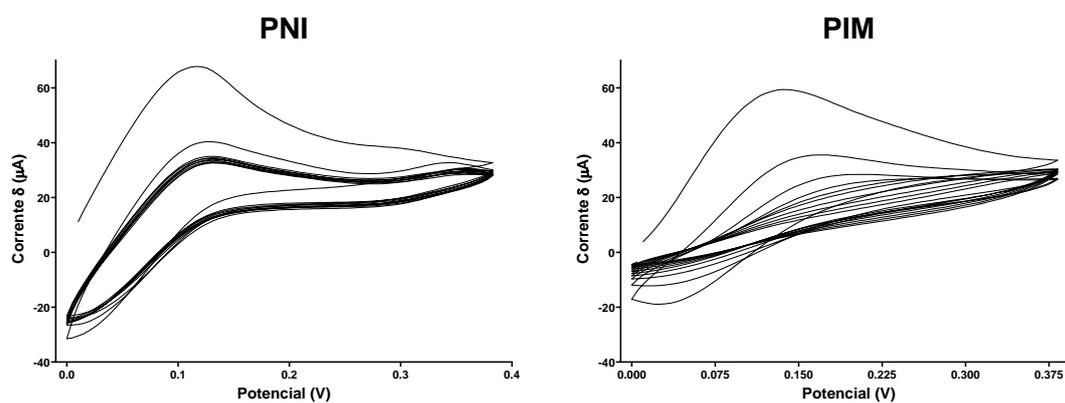


Fonte:

Do autor.

Legenda: Varredura à 25 mV s^{-1} . Representação de potencial aplicado (abscissas em volts) por corrente (ordenadas em amperes).

Figura 52 – Voltamograma de polimerização do 4-AF para polímeros impresso na presença do EPT-I e não impresso.



Fonte:

Do autor.

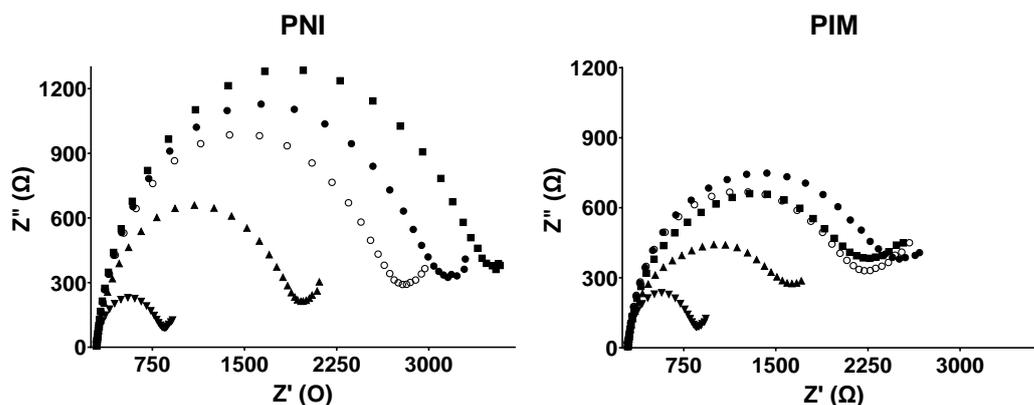
Legenda:

Voltamogramas cíclicos da Eletropolimerização do 4-AF não impresso (esquerda) e do impresso com o EPT-I (direita). Representação de potencial aplicado (x em volts) por corrente (y em amperes).

6.2.3.2.2 Construção do sensor 4AFE1

Polímeros de 4-AF apresentaram uma impedância menor que os equivalentes do 3-AF. Pela lógica, quanto maior a espessura dos filmes isolantes de poliaminofenol, maior será a impedância do sistema. Entretanto, os valores de impedância observados nos polímeros de 4-AF levam a crer que a malha formada possa ser mais porosa, criando uma maior interface para com a sonda de ferricianeto. Ao contrário do sensor 3AFE1, o R_{ct} observado entre polímeros impresso e não impresso foi similar. Na Figura 53, PNI e PIM apresentam valores próximos R_{ct} após a ativação (518,43 e 523,12 Ω , respectivamente) e polimerização (1569,5 e 1257,1 Ω , respectivamente).

Figura 53 – Construção do elemento de reconhecimento do modelo 4AFE1 na superfície do eletrodo de trabalho.



Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras de EIE de PNI (à esquerda) e PIM (à direita). Nas representações, leituras após a limpeza (▼), a polimerização (▲), a incubação com a proteinase (■), os ciclos de voltametria para a remoção (●) e após a estabilização com três incubações sucessivas em tampão fosfato salino (○).

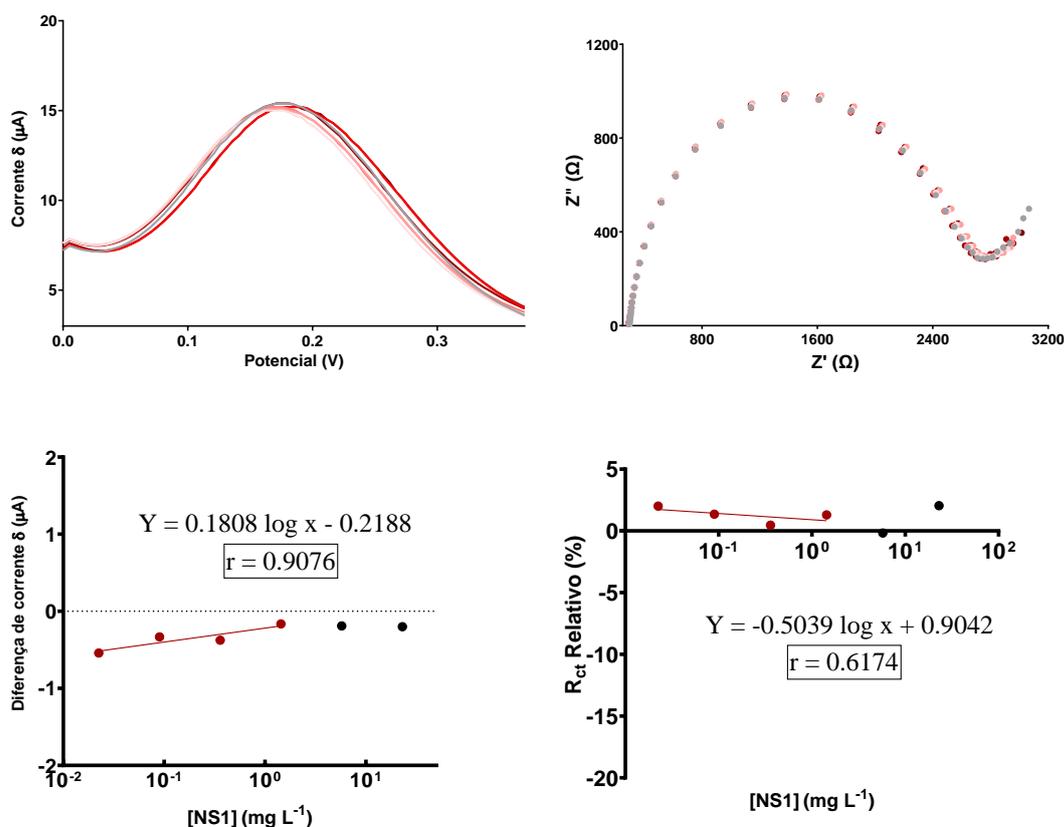
Durante a remoção foi possível notar que: (1) a contribuição da proteinase para o aumento da impedância no PNI foi muito maior que no PIM; (2) os ciclos de remoção promoveram a redução da impedância no PNI e aumento da mesma no PIM. Em 1, enquanto para o PIM a proteinase pode atuar tanto no filme quanto na molécula molde, no PNI as modificações causadas pela proteína são feitas exclusivamente no filme. O aumento da impedância observado nesta etapa pode ser atribuído parcialmente à modificação do filme e, como o PNI apresenta mais filme (em espessura e por não apresentar cavidades preenchidas pela molécula molde), este poderá ser proporcionalmente mais afetado. Em 2, enquanto no PNI as variações observadas são

provenientes da adsorção da proteinase e modificação do filme, no PIM ocorre ainda a contribuição da remoção do EPT-I do filme. A soma dos efeitos destes eventos no PIM pode ser o fator responsável pelo comportamento observado, inverso ao PNI. Apesar dos comportamentos distintos durante as etapas da remoção, o ponto final da estabilização não foi tão distante (R_{ct} de 2258,8 Ω para o PNI e 1888,6 Ω).

6.2.3.2.3 Detecção da NS1 de DENV-1 pelo sensor de 4AFE1

Uma vez que o filme de 4-AF supera o de 3-AF em espessura, a concentração de monômero e o número de ciclos foram mantidos para um teste piloto. Foram testadas as concentrações de $2,246 \times 10^{-2}$, $8,98 \times 10^{-2}$, $3,59 \times 10^{-1}$, 1,44, 5,75 e 23 mg L^{-1} de NS1 desnaturada para PNI (Figura 54) e PIM (Figura 55).

Figura 54 – Reconhecimento da NS1 desnaturada em tampão fosfato salino pelo sensor 4AFE1.

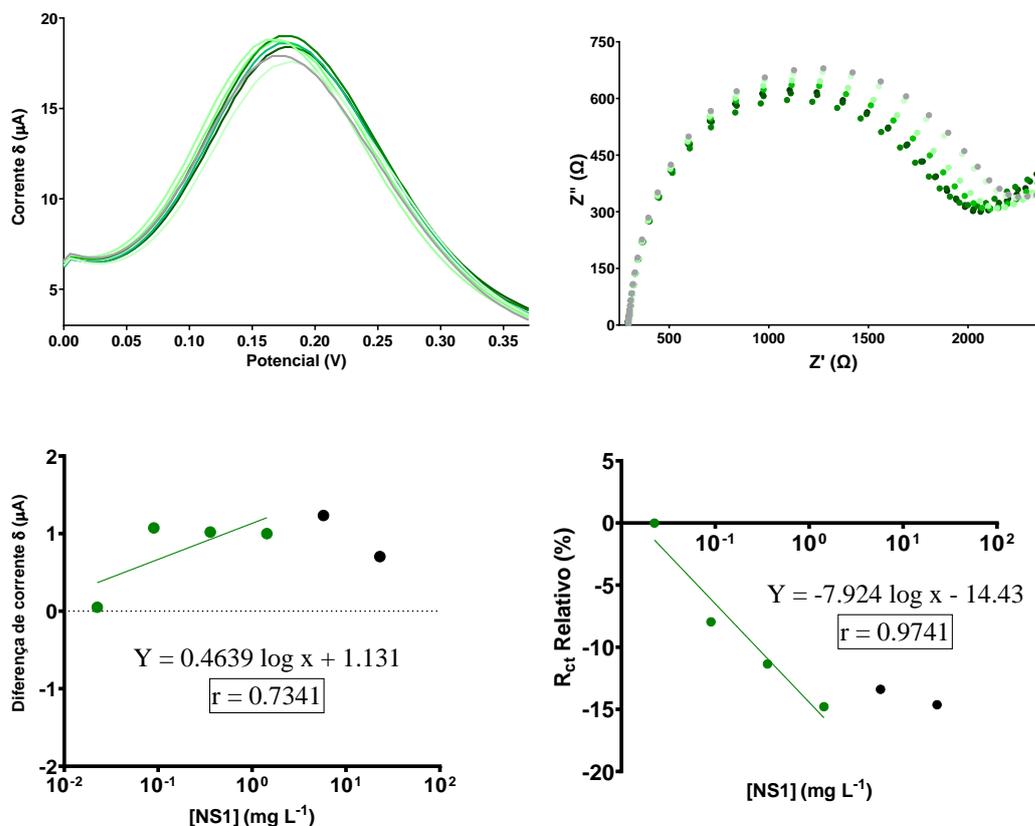


Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras do PNI de VOQ (à esquerda) e EIE (à direita), com as respectivas curvas abaixo. Nas representações, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de $2,246 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ a 23 mg L^{-1} , da cor mais clara para a mais escura. No diagrama de dispersão do gráfico de VOQ, as diferenças de corrente δ ($I_x - I_{\text{stab}}$) (μA) pela concentração (mg L^{-1}). No diagrama de dispersão do gráfico de EIS foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{\text{estabilização}}$, %) pela concentração (mg L^{-1}).

A regressão nos dados de VOQ mostra correlação linear entre os pontos analisados para o PNI. No entanto, as variações não são significativas e a sensibilidade da resposta é menos de um décimo ao PIM, levando a concluir que este é um comportamento aleatório. Na EIE, os pontos não apresentam variação significativa e nem correlação linear.

Figura 55 – Reconhecimento da NS1 desnaturada em tampão fosfato salino pelo sensor 4AFE1.



Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras do PIM de VOQ (à esquerda) e EIE (à direita), com as respectivas curvas abaixo. Nas representações, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de 22.46×10^{-3} a $23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, da cor mais clara para a mais escura. No diagrama de dispersão do gráfico de VOQ, as diferenças de corrente δ ($I_x - I_{\text{stab}}$) (μA) pela concentração ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). No diagrama de dispersão do gráfico de EIS foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{\text{estabilização}}$, %) pela concentração ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

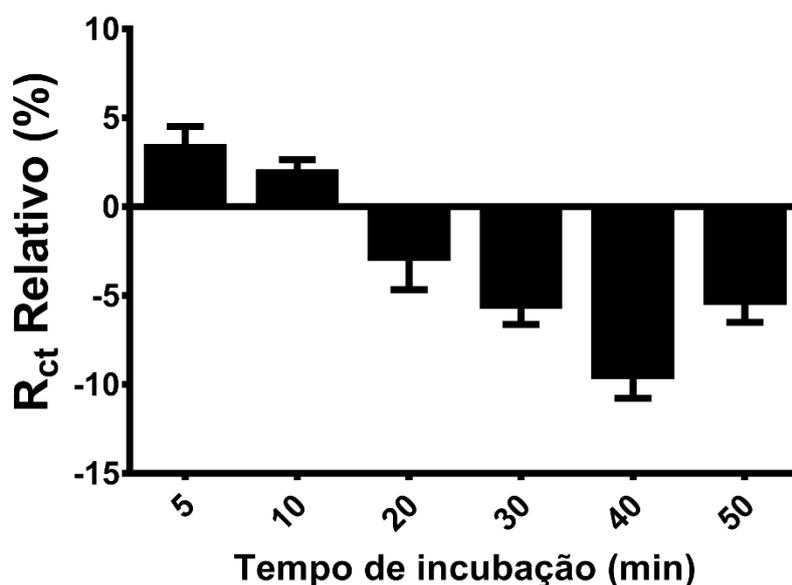
No PIM, os dados de VOQ apresentam baixa sensibilidade e ausência de linearidade. Na EIE, foi observado comportamento linear nas concentrações de 9×10^{-2} a $1,44 \text{ mg L}^{-1}$. A inclinação da reta na regressão do EIE foi aproximadamente três vezes menor para o 4AFE1 do que para o 3AFE1. Esta redução de sensibilidade pode ser relacionada com o aumento de 21 vezes na espessura do filme, o qual pode estar aprisionando a molécula molde e reduzindo a eficácia da remoção.

Além disso, não foi possível observar tendência nos testes de VOQ. Optamos, portanto, em utilizar apenas a EIE nas análises seguintes, a fim de aumentar a frequência analítica.

6.2.3.2.4 Tempo de incubação

Na expectativa de melhorar a sensibilidade do modelo 4AFE1, foi analisada a influência do tempo de incubação com a NS1 desnaturada. Foram testadas incubações de 5 a 50 min (Figura 56).

Figura 56 – Influência do tempo de incubação na adsorção da NS1 na superfície do modelo 4AFE1.



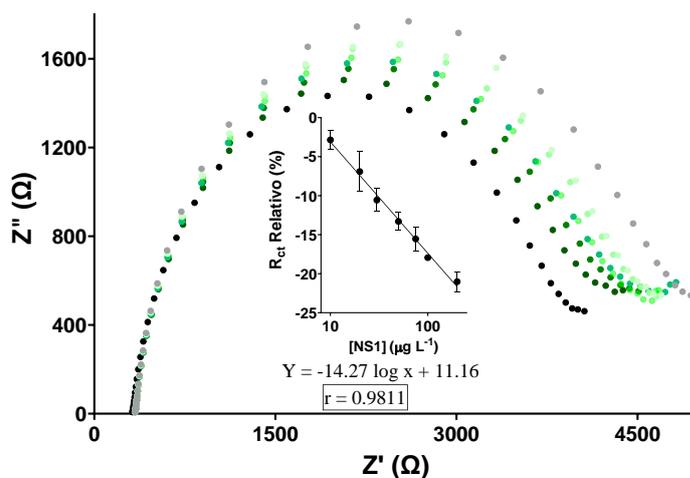
Fonte: Do autor.

Legenda: Variações de R_{ct} relativo após incubação com 100 µg L⁻¹ de NS1 desnaturada.

As variações no R_{ct} observadas no PIM foram proporcionais ao tempo nas incubações de 20 a 40 min, conforme o esperado. Em incubações com menos de 10 min, a variação foi de baixa amplitude e em sentido oposto ao esperado. Esta observação pode estar relacionada com os fenômenos de adsorção específica e inespecífica. A variação observada na incubação por 50 min se enquadra nesta teoria, sendo que a redução do sinal pode ocorrer por uma mistura de eventos de adsorção específica e não específica.

Foi feita uma nova avaliação da capacidade de reconhecimento da NS1 pelo sensor 4AFE1, agora com o tempo de incubação otimizado e em uma faixa de concentração reduzida, com os pontos de 10, 20, 30, 50, 75, 100 e 200 µg L⁻¹ (Figura 57).

Figura 57 – Reconhecimento da Proteína não estrutural 1 desnaturada pelo modelo 4AFE1.



Fonte: Do autor.

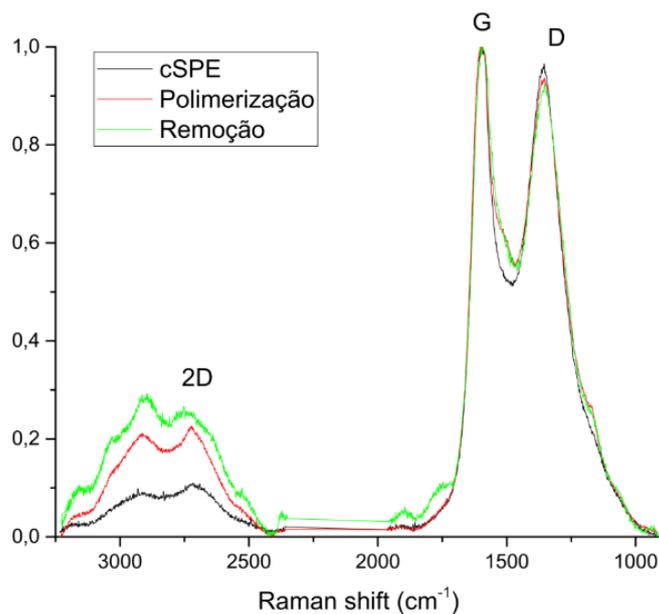
Legenda: Leituras EIE do PIM. Na representação, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de 10 a 200 μg L⁻¹, da cor mais clara para a mais escura (n=2). No diagrama de dispersão foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{\text{estabilização}}$, %) pela concentração (mg L⁻¹).

Foi observada correlação linear entre todos os pontos analisados, com um aumento na sensibilidade, duas vezes maior que a observada no item anterior. Entretanto, o sinal não é preciso na concentrações de 10 a 30 μg L⁻¹ (DPR de 14.04 a 40.53%).

6.2.3.2.5 Caracterização estrutural do filme 4AFE1

Espectros de Raman do eletrodo de trabalho foram coletados em diferentes etapas da modificação do eletrodo, tanto na construção do PNI (Figura 58) quanto do PIM (Figura 59).

Figura 58 – Caracterização estrutural por Raman do polímero não impresso de 4-AF.

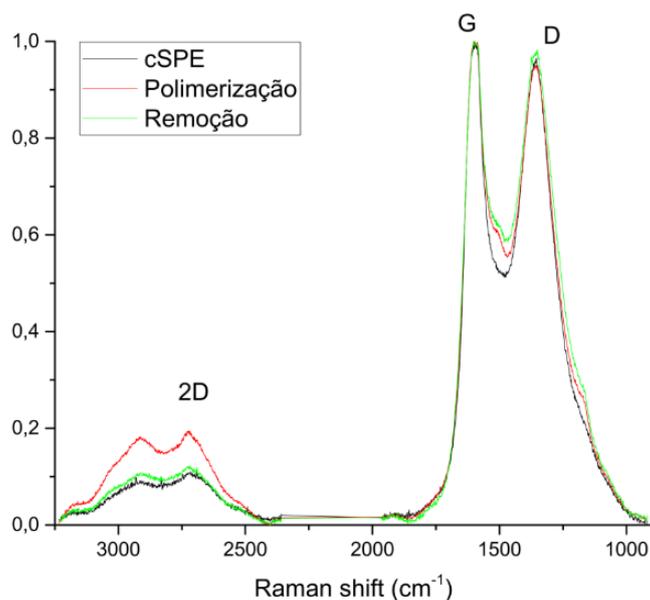


Fonte: Do autor.

Legenda: Espectro Raman de eletrodos trabalho em diferentes etapas da modificação durante a construção do PNI de 4-aminofenol. Gráfico de número de onda (cm^{-1}) do Raman shift pela intensidade normalizada dos picos.

Com a polimerização do filme a partir do 4-aminofenol a relação I_D/I_G foi de 0,9723 para 0,9422. A redução do valor observada durante a polimerização foi menor do que a observada para o 3-aminofenol. Como o filme de 4-aminofenol é mais espesso, a contribuição de C=C é mais elevada, e pode contribuir para um aumento da banda G. Após o tratamento da remoção, o valor da relação caiu para 0,9306. Novamente, os ciclos aplicados na remoção podem promover o entrecruzamento de pontos da malha que não haviam reagido, aumentando assim o contingente de C=C. O aumento de frequência de shifts na banda 2D sinaliza aumento da dopagem da malha tanto após a polimerização quanto após a remoção. Este aumento posterior à remoção pode estar relacionado à alterações químicas do filme pela enzima.

Figura 59 – Caracterização estrutural por Raman do polímero impresso de 4-AF.



Fonte: Do autor.

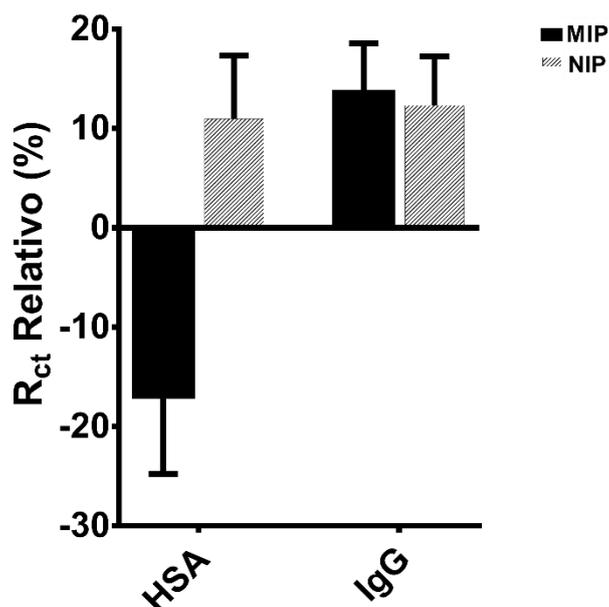
Legenda: Espectro Raman de eletrodos trabalho em diferentes etapas da modificação durante a construção do PIM de 4-aminofenol. Gráfico de número de onda (cm^{-1}) do Raman shift pela intensidade normalizada dos picos.

No PIM, o valor da relação foi de 0,9723 para 0,9530 após a polimerização, novamente similar ao PNI. Após a remoção, o PIM de 4-aminofenol também apresentou um aumento na relação para 0,9837. Este fenômeno pode ser correlacionado com a formação das cavidades impressas, acentuando a irregularidade do filme e contribuindo para um aumento da banda D. A banda 2D reflete um aumento da dopagem após a polimerização, compatível com a formação de filme, e retorna para frequências próximas de shift após a remoção. Este último evento se deve à remoção da sequência peptídica impressa. A contribuição da remoção observada no PIM de 4-AF é maior do que na do 3-AF. Uma vez que o filme é mais espesso, a molécula-modelo pode ficar aprisionada de mais frequentemente, sendo necessária a clivagem prévia para remoção. Como um maior contingente da molécula-modelo fica aprisionada após a polimerização, um maior contingente vai ser removido. Isto justifica as maiores amplitudes da banda 2D para o 4-AF, quando comparadas ao observado para o 3-AF.

6.2.3.2.6 Seletividade

A seletividade do dispositivo 4AFE1 foi determinada através de incubações com Albumina Sérica Humana e IgG nas concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, desnaturadas nas mesmas condições utilizadas para a NS1 (Figura 60).

Figura 60 – Avaliação da seletividade do modelo 4AFE1.



Fonte: Do autor.
 Legenda: Comportamento dos polímeros de 4-AF impresso (sólido) e não impresso (hachurado) com o EPT-I na presença de albumina (esquerda) e IgG (direita). Variações (n=3) de R_{ct} relativo após incubação com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de proteína/imunoglobulina desnaturada.

Nas condições testadas, apenas na presença de albumina o PIM exibiu um comportamento distinto com significância estatística (*two-way analysis of variance* com $p < 0,01$). Contudo, o sinal observado com a albumina foi semelhante ao sinal observado com a NS1, mostrando que o sinal detectado pelo dispositivo 4AFE1 não distingue o analito deste interferente. Além disso, a amplitude de interferência observada na presença de IgG é elevada, podendo comprometer a leitura da porção do sinal referente ao analito. Estudos posteriores foram dispensados frente a ausência de precisão e seletividade do modelo com relação ao principal interferente de amostras reais, a albumina.

6.2.4 Sensor para *Zika virus*

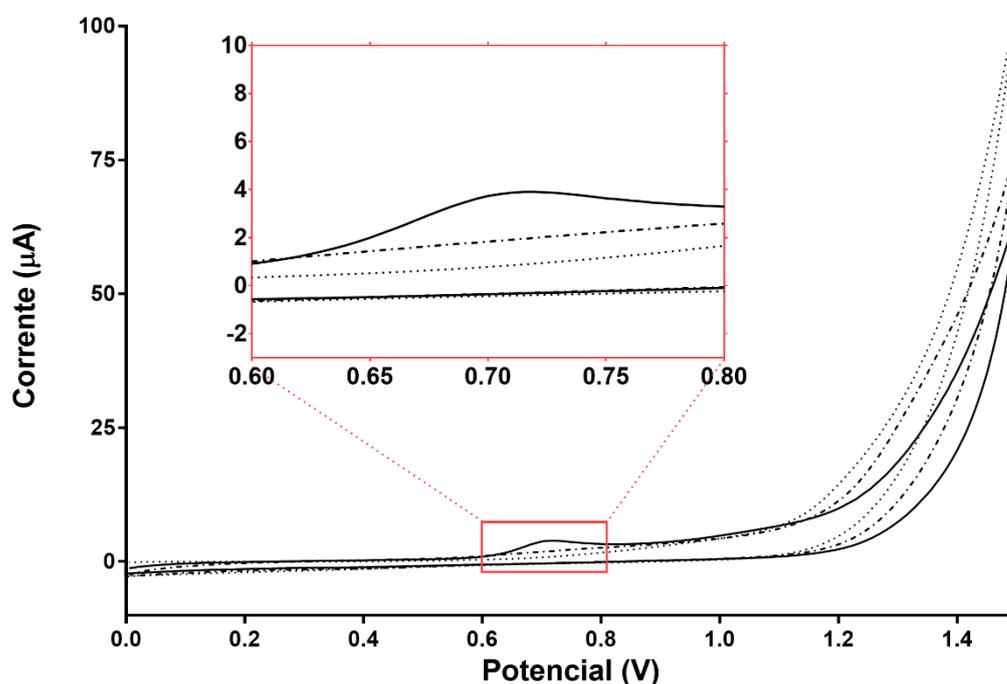
6.2.4.1 Sensor com 3-aminofenol/EPT-III (3AFE3)

As condições de polimerização otimizadas para o modelo de 3-aminofenol na sessão 6.2.3. foram reproduzidas na impressão do EPT-III, fragmento da NS1 de ZIKV previamente discutido na sessão 6.1.3.

6.2.4.1.1 Eletroatividade do EPT-III

A Figura 61 apresenta uma superposição da eletroatividade do EPT-I com o EPT-III. É observado que os perfis de eletroatividade são muito similares, exceto por um pico observado entre +0,60 e +0,80 V para o EPT-III. Entretanto, este comportamento distinto se encontra fora da faixa de potencial empregada no preparo e avaliação do sensor. Para a aplicação proposta nesta sessão, a eletroatividade do EPT-III será, portanto, considerada equivalente à do EPT-I.

Figura 61 – Avaliação da eletroatividade do tampão fosfato salino (pontilhado), do EPT-I (tracejado) e do EPT-III (sólido).

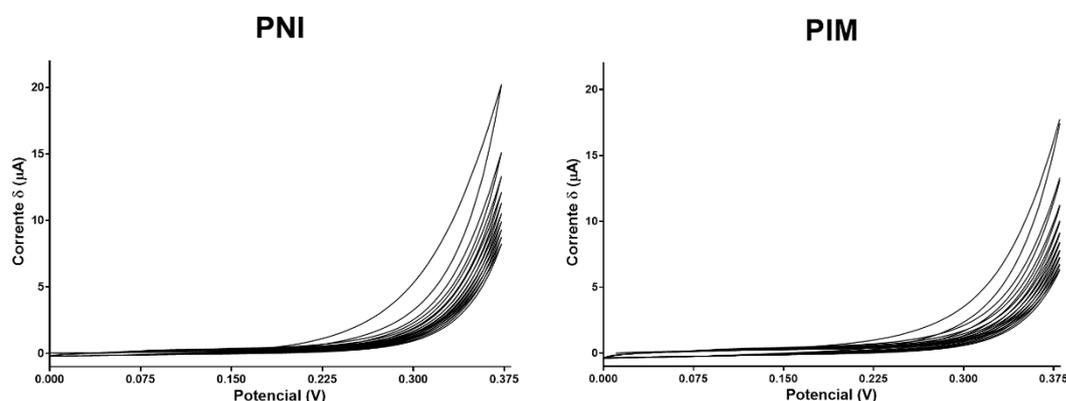


Fonte: Do autor.
 Legenda: Varredura à 25 mV s⁻¹. Representação de potencial aplicado (abscissas em volts) por corrente (ordenadas em amperes).

6.2.4.1.2 Construção do sensor 3AFE3

O voltamograma da Figura 62 obtidos durante a polimerização deste PIM deste modelo apresentou carga similar à do PIM 3AFE1 (Figura 39). A carga calculada pelo software Nova foi de 330 μC para PIM 3AFE3. Através da análise coulométrica considerando-se a densidade do poliaminofenol a mesma do 3-AF ($1,195 \text{ g cm}^{-3}$), foi determinada a espessura de 24,87 nm para o PIM. O polímero impresso na presença do EPT-III se mostrou mais espesso que o polímero impresso na presença do EPT-I (17,51 nm).

Figura 62 – Voltamograma de polimerização do 3-AF para polímeros impresso na presença do EPT-III e não impresso.

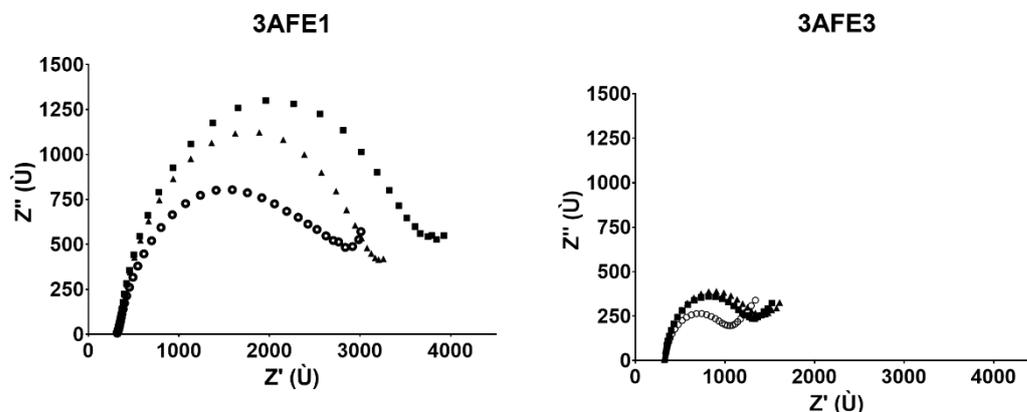


Fonte: Do autor.

Legenda: Voltamogramas cíclicos da Eletropolimerização do 3-AF não impresso (esquerda) e do impresso com o EPT-III (direita). Representação de potencial aplicado (x em volts) por corrente (y em amperes).

A Figura 63 traz um comparativo entre as construções do modelo 3AFE1 e 3AFE3. Este comparativo mostra que, apesar do filme ser mais espesso no modelo 3AFE3, este apresenta uma impedância muito inferior aos valores das etapas correspondentes da construção no 3AFE1. Outra diferença notável é que após a incubação com a proteinase, a impedância do modelo reduz, tendo tendência oposta ao observado no modelo 3AFE1. Ambos os eventos observados corroboram com uma rede menos densa, aparente mais permeável à sonda e ao efeito da proteinase K.

Figura 63 – Construção do elemento de reconhecimento do modelo 3AFE3 na superfície do eletrodo de trabalho.



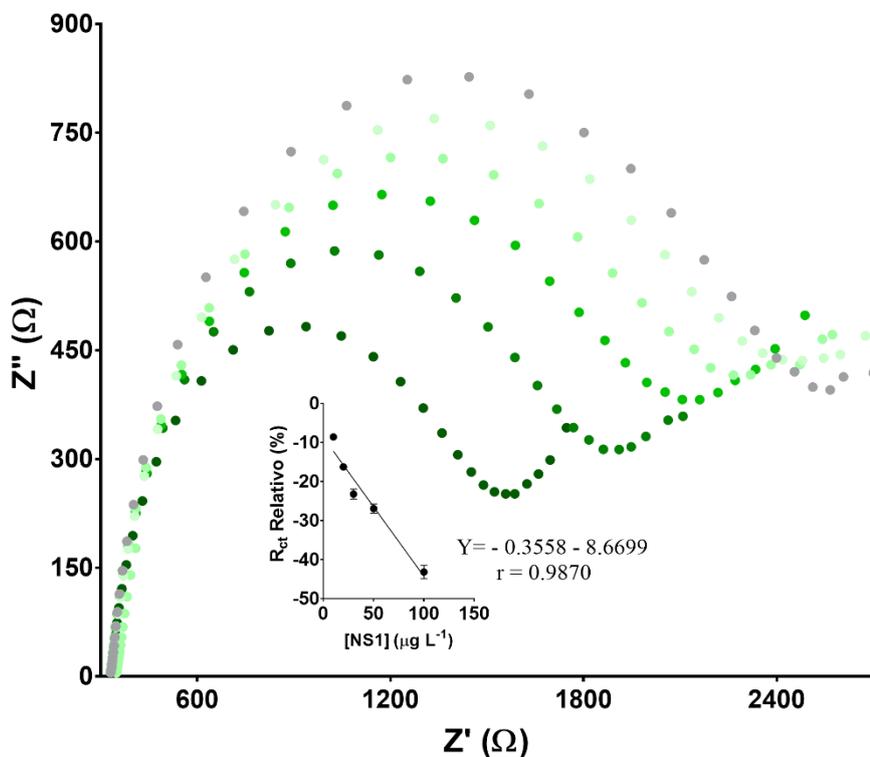
Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras de EIE de PNI (à esquerda) e PIM (à direita). Nas representações, leituras após a polimerização (▲), incubação com a proteinase (■) e após a estabilização com incubações sucessivas em tampão fosfato salino (○).

6.2.4.1.3 Detecção da NS1 de ZIKV pelo sensor de 3AFE3

Assim como observado nos modelos 3AFE1 e 4AFE1, a adsorção da NS1 promoveu uma redução do R_{ct} relativo do sistema, proporcionalmente à sua concentração. A Figura 64 ilustra o comportamento do sensor 3AFE3 após incubações sucessivas de concentrações crescentes da NS1 de ZIKV. O PIM apresentou resposta linear ($r = 0.9870$) entre as concentrações de 10 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ com DPR abaixo de 7.48%. Os LOD e LOQ calculados foram de 11.20 e $33.95 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 64 – Reconhecimento da NS1 de ZIKV em tampão fosfato salino pelo modelo 3AFE3.



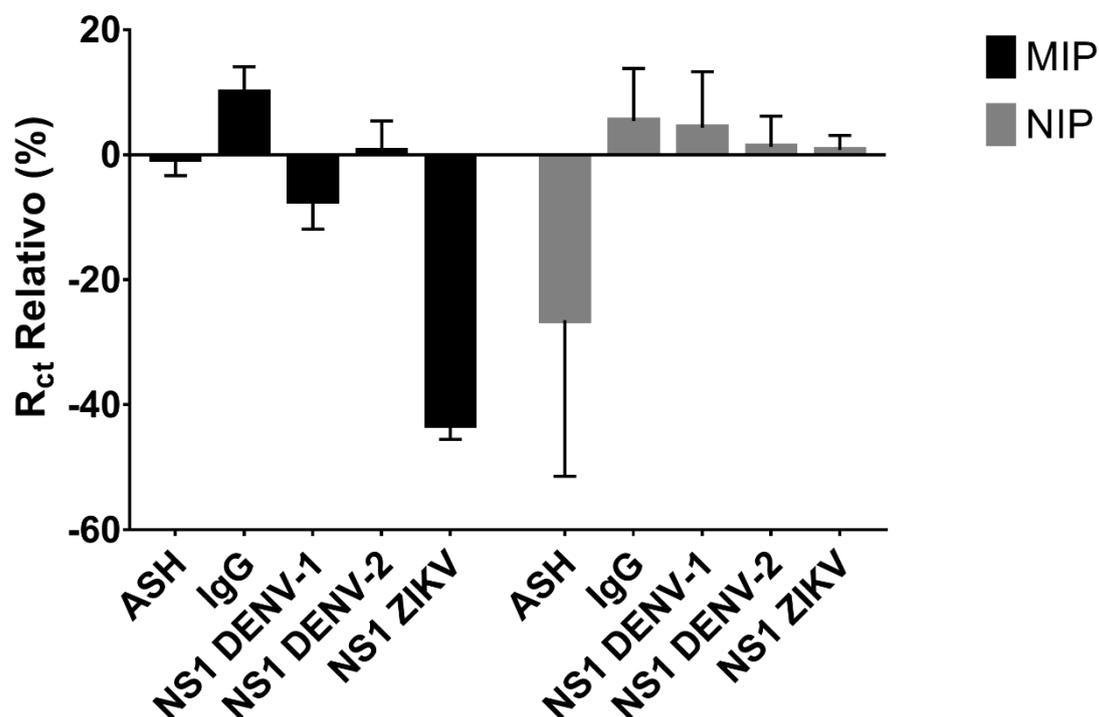
Fonte: Do autor.

Legenda: Leitura do PIM de EIE com a respectiva curva de calibração. Na representação, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, da cor mais clara para a mais escura. No diagrama de dispersão do gráfico de EIS foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{\text{estabilização}}$, %) pela concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$).

6.2.4.1.4 Seletividade e especificidade

Seguindo o delineamento experimental aplicado nos modelos anteriores, a seletividade do modelo 3AFE3 foi determinada através de incubações com Albumina Sérica Humana e IgG, e a especificidade do dispositivo foi avaliada através de incubações com as proteínas NS1 desnaturadas de DENV-1 e DENV-2 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. As incubações foram realizadas nas concentrações de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com os analitos desnaturados nas mesmas condições utilizadas para a NS1 (Figura 65).

Figura 65 - Avaliação de seletividade e especificidade do modelo 3AFE3.



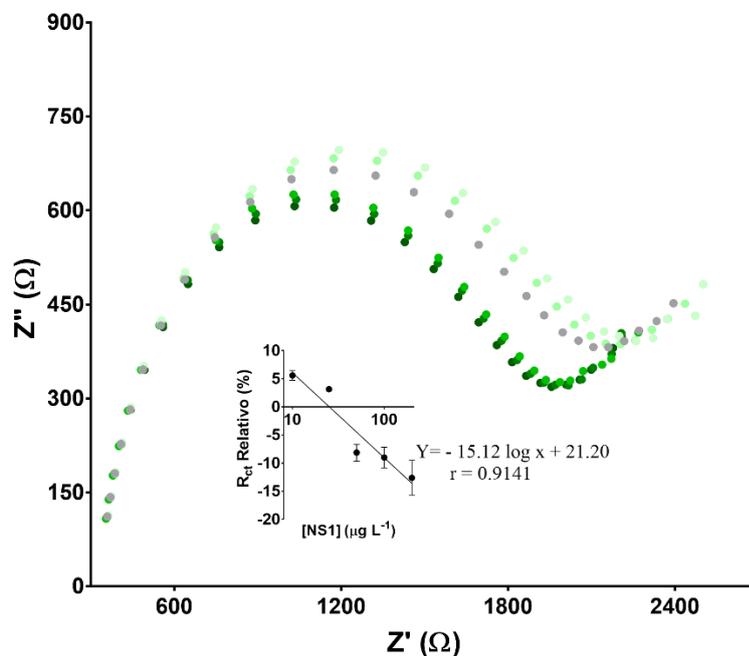
Fonte: Do autor.

Legenda: Comportamento dos polímeros de 3-AF impresso (sólido) e não impresso (rachurado) com o EPT-III na presença de albumina (esquerda) e IgG (direita). Variações (n=3) de R_{ct} relativo após incubação com 100 µg L⁻¹ de proteína/imunoglobulina desnaturada.

Para o IgG, assim como observado no 3AFE1, PNI e PIM apresentaram aumento do R_{ct} relativo, reforçando a hipótese de que a composição da malha polimérica de 3AF favorece a adsorção do interferente. A avaliação por *two-way analysis of variance* (p<0,01) reforça que não há significância estatística entre PIM e PNI para nenhum dos interferentes testados. Não obstante, para a albumina a presença das cavidades impressas proporcionou uma redução significativa da aleatoriedade observada na variação do sinal. O dispositivo 3AFE3 manifestou comportamento similar entre PIM e PNI para a NS1 de DENV-2, sem variações expressivas de sinal. No entanto, para a NS1DV foi possível observar comportamento contrário entre PNI e PIM, e a variação de sinal observada no PIM para a NS1 segue a mesma tendência da NS1 de ZIKV. Este fenômeno pode resultar em reatividade cruzada com resultados falso-positivos. A Tabela S2 do Arquivo Suplementar 1 indica para o EPT-III uma identidade máxima de apenas 33.33% para com a NS1. Mesmo com este baixo grau de similaridade, por se tratar de uma região em forma de alça, a elevada flexibilidade da região pode favorecer

o fenômeno de adsorção dos resíduos comuns a ambas as sequências.

Figura 66 - Reconhecimento da Proteína não estrutural 1 de ZIKV desnaturada na presença de soro humano diluído (1:1000).



Fonte: Do autor.

Legenda: Leituras EIE do PIM. Na representação, o sensor estabilizado em tampão fosfato salino (cinza) e as concentrações crescentes de 10 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, da cor mais clara para a mais escura ($n=2$). No diagrama de dispersão foram utilizadas as R_{ct} relativas ($R_x / R_{\text{estabilização}}$, %) pela concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$).

O efeito de matriz observado no teste de seletividade em soro humano diluído (1:1000)(Figura 66) impediu a detecção da NS1 de ZIKV nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Apesar de se observar uma redução do R_{ct} na faixa de concentração de 50 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, a amplitude da variação também reduziu muito, mostrando que a sensibilidade do modelo foi fortemente comprometida.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou o potencial e algumas variáveis possíveis provenientes da combinação da impressão de epítomos à eletropolimerização de redes molecularmente impressas. Também foi elencado o planejamento racional de epítomos com orientação estrutural baseada em cálculos *in silico* sobre dados cristalográficos do alvo. Foi ainda introduzido o conceito inédito de desnaturação prévia da proteína alvo para adsorção de epítomos internos, dispensando a abordagem tradicional de exposição de epítomos internos via digestão enzimática ou *epitope fingerprinting* (BOSSI *et al.*, 2012; QADER *et al.*, 2014).

Uma vez determinado o modelo experimental *in silico* de planejamento de epítomos, se torna cômodo aplicar o fluxo de trabalho a diversas regiões de uma mesma proteína, elaborando diferentes estratégias de reconhecimento. Apesar de o presente estudo propor 6 protótipos para a impressão, a complexidade da otimização das condições de impressão impossibilitou que o potencial de todos os protótipos fosse explorado empiricamente.

Os ensaios de eletroatividade dos tampões, monômeros e moléculas modelo ilustraram uma forma prática de manipular a faixa de potenciais a ser empregada na eletropolimerização de forma a se manipular características como porosidade, regularidade de relevo e espessura do filme. Estes aspectos estão atrelados à sensibilidade, estabilidade, especificidade e linearidade do sistema e são determinantes nas etapas de remoção do molde e adsorção do analito.

O dispositivo 3AFE1 cumpriu o objetivo geral proposto pelo projeto. Apesar de não distinguir os sorotipos de dengue testados, o modelo cumpre a proposta clínica de distinguir a NS1 de dengue de componentes da matriz e da NS1 de zika. Além disso, este modelo prova que a desnaturação prévia da proteína alvo é capaz de expor a região impressa, promovendo a adsorção seletiva do analito conforme delineado no planejamento racional do epítomo. Mesmo na presença de soro, o dispositivo ainda apresentou sinal em concentrações baixas (25 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$), se aproximando do limite inferior de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ reportado na literatura (sessão 2.2.1.2).

O modelo 4AFE1 exibiu uma rede polimérica aparentemente mais instável. Esta instabilidade refletiu em uma baixa seletividade na presença de interferentes. A capacidade de reconhecimento do modelo foi seriamente comprometida na presença de albumina e os estudos com o modelo foram abortados. No entanto, o resultado de 50

minutos do estudo de tempo de incubação realizado na sessão 6.2.3.2.4 fornece uma evidência que reforça a teoria de que a desnaturação da proteína contribui com a adsorção da proteína alvo. Tempos de incubação muito extensos podem promover um reenovelamento da proteína, obstruindo o acesso à região impressa.

O dispositivo 3AFE3 não apresentou seletividade e especificidade comparáveis ao 3AFE1. Entretanto, vale ressaltar que as condições de polimerização empregadas haviam sido otimizadas para a impressão do EPT-I. Mesmo com as condições de polimerização *reaproveitadas*, o modelo foi capaz de detectar a NS1 de ZIKV na presença de soro diluído em concentrações baixas, de 50 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, também próximas do limite inferior de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Apesar dos resultados promissores, os testes feitos em soro contaram com um fator de diluição de 1:1000. Com isso, as concentrações detectadas em testes reais pelos dispositivos propostos são 1000x maiores que as descritas anteriormente. Esse fato torna os dispositivos inadequados para a aplicação real, uma vez que os modelos são capazes de detectar apenas concentrações elevadas da proteína, que se aproximam do limite superior reportado na literatura, de 50 mg L^{-1} .

Mesmo com a inviabilidade de aplicação do modelo em testes reais, a conclusão é de que o presente estudo cumpriu o seu objetivo ao provar o conceito inédito de desnaturação prévia como coadjuvante na adsorção de epítomos internos em polímeros impressos molecularmente e estabelecendo um sistema capaz de distinguir as proteínas NS1 de *Dengue virus* e *Zika virus*.

REFERÊNCIAS

AKEY, D. L. *et al.* Flavivirus NS1 Structures Reveal Surfaces for Associations with Membranes and the Immune System. **Science**, v. 343, n. 6173, p. 881–885, 21 fev. 2014.

ANSELL, R. J. **Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 150

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. Second ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000.

BLACKSELL, S. D. Commercial dengue rapid diagnostic tests for point-of-care application: Recent evaluations and future needs? **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 1, 2012.

BOSSI, A. M. *et al.* Fingerprint-imprinted polymer: Rational selection of peptide epitope templates for the determination of proteins by molecularly imprinted polymers. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 4036–4041, 2012.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry - Principles, methods and applications**. Oxford: Oxford University Press, 1993. v. 98

BROWN, W. C. *et al.* Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. **Nature structural & molecular biology**, v. 23, n. July, p. 1–4, 2016.

BULUSHEVA, L. G. *et al.* Effect of nitrogen doping on Raman spectra of multi-walled carbon nanotubes. **Physica Status Solidi (B) Basic Research**, v. 245, n. 10, p. 1971–1974, 2008.

CARNEIRO, M. C. C. G. *et al.* Homemade 3-carbon electrode system for electrochemical sensing: Application to microRNA detection. **Microchemical Journal**, v. 138, p. 35–44, 2018.

CASTELLANOS, J. Dengue disease diagnosis: A puzzle to be solved. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 62, n. 4, p. 617–629, 7 maio 2015.

CDC. **Zika MAC-ELISA**, 2016. Disponível em 25 abr. 2016: <http://www.cdc.gov/media/releases/2016/s0226-laboratory-test-for-zika-virus.html>

CHEN, C.-H.; LUO, S.-C. Tuning Surface Charge and Morphology for the Efficient Detection of Dopamine under the Interferences of Uric Acid, Ascorbic Acid, and Protein Adsorption. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 39, p. 21931–21938, 7 out. 2015.

CHEN, H. J. *et al.* Surface-imprinted chitosan-coated magnetic nanoparticles modified multi-walled carbon nanotubes biosensor for detection of bovine serum albumin. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 163, n. 1, p. 76–83, 2012.

CHEN, L. K. *et al.* Persistence of Japanese encephalitis virus is associated with abnormal expression of the nonstructural protein NS1 in host cells. **Virology**, v. 217, n.

1, p. 220–229, 1996.

CHURINSKY, C.; GRGICAK, C. The Effect of Repeated Activation on Screen-Printed Carbon Electrode Cards. **ECS Transactions**, v. 61, n. 26, p. 1–8, 2014.

DARWISH, N. T.; ALIAS, Y. B.; KHOR, S. M. An introduction to dengue-disease diagnostics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 45–55, abr. 2015.

DECHTRIRAT, D. *et al.* Protein rebinding to a surface-confined imprint. **Advanced Functional Materials**, v. 22, n. 24, p. 5231–5237, 2012.

DROPSSENS. **General Catalogue**. Disponível em: <http://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/dropsens_catalogue.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2016.

DUSSART, P. *et al.* Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1185–1189, 2006.

EDELING, M. A.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 11, p. 4285–90, 2014.

EMINI, E. A. *et al.* Induction of Hepatitis A Virus-Neutralizing Antibody by a Virus-Specific Synthetic Peptide. **American Society for Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 836–839, 1985.

ERDÖSSY, J. *et al.* Electrosynthesized molecularly imprinted polymers for protein recognition. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 179–190, maio 2016.

FALCONAR, A. K. I.; YOUNG, P. R.; MILES, M. A. Precise location of sequential dengue virus subcomplex and complex B cell epitopes on the nonstructural-1 glycoprotein. **Archives of Virology**, v. 137, p. 315–326, 1994.

FARES, R. C. G. *et al.* Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

FERRARI, A. C. *et al.* Raman spectrum of graphene and graphene layers. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 18, p. 1–4, 2006.

FIGUEIREDO, A. *et al.* Electrical Detection of Dengue Biomarker Using Egg Yolk Immunoglobulin as the Biological Recognition Element. **Scientific reports**, v. 5, p. 7865, 2015.

FRANCO, D. L. *et al.* Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 107, n. 2–3, p. 404–409, 2008.

GARCÍA, I.; MARRADI, M.; PENADÉS, S. Glyconanoparticles: multifunctional nanomaterials for biomedical applications. **Nanomedicine**, v. 5, n. 5, p. 777–792, jul.

2010.

GE, Y.; TURNER, A. P. F. Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 218–224, 2008.

GELANEW, T.; POOLE-SMITH, B. K.; HUNSPERGER, E. Development and characterization of mouse monoclonal antibodies against monomeric dengue virus non-structural glycoprotein 1 (NS1). **Journal of Virological Methods**, v. 1, p. 1–10, 2015.

GIRAULT, H. H. **Analytical and Physical Electrochemistry**. 1. ed. Lausanne: EPFL Press, 2004.

GREENBAUM, J. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. **Immunogenetics**, v. 63, n. 6, p. 325–335, 2011.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8–9, p. 876–921, 2007.

GURYANOV, I.; FIORUCCI, S.; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 890–903, nov. 2016.

GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. *et al.* Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 561–569, 2019.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 2010.

HAUPT, K. Plastic antibodies. **Nature Materials**, v. 9, n. 8, p. 612–614, ago. 2010.

HAWLEY, D.; ADAMS, R. Homogeneous chemical reactions in electrode processes: Measurement of rates of follow-up chemical reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry (1959)**, v. 10, p. 376–386, 1965.

IEDB. **Immune Epitope Database and Analysis Resource**. Disponível em: <<http://www.iedb.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

ISKIERKO, Z. *et al.* Molecularly imprinted polymers for separating and sensing of macromolecular compounds and microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 1, p. 30–46, 2016.

KARKHAH, A. *et al.* Zika virus: epidemiology, clinical aspects, diagnosis, and control of infection. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 11, p. 2035–2043, 2018.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins. **Naturwissenschaften**, v. 72, n. 4, p. 212–213, abr. 1985.

KAWASHIMA, Y.; KATAGIRI, G. Fundamentals, overtones, and combinations in the

- Raman spectrum of graphite. **Physical Review B**, v. 52, n. 14, p. 10053–10059, 1995.
- KHAN, M. A. R. *et al.* Plastic antibody for the electrochemical detection of bacterial surface proteins. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 233, p. 697–704, 2016.
- KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. **Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1996.
- KOPPOLU, V.; SHANTHA RAJU, T. Zika virus outbreak: a review of neurological complications, diagnosis, and treatment options. **Journal of NeuroVirology**, v. 24, n. 3, p. 255–272, 2018.
- LANGERAK, T. *et al.* The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007640, 2019.
- LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 7, p. 1–7, 2006.
- LI, X. *et al.* A new threat to human reproduction system posed by Zika virus (ZIKV): From clinical investigations to experimental studies. **Virus Research**, v. 254, n. September 2017, p. 10–14, 2018.
- LINDENBACH, B. D. *et al.* Flaviviridae. In: COHEN, J. I. *et al.* (Eds.). . **Fields Virology V. I**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 2664.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular Biology of Flaviviruses. In: CHAMBERS, T. J.; MONATH, T. P. (Eds.). . **The Flaviviruses: Structure, Replication, and Evolution**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2003. p. 23–62.
- LIU, Y. *et al.* Quantum-dots-encoded-microbeads based molecularly imprinted polymer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 886–893, 2016.
- MA, M. *et al.* A disposable molecularly imprinted electrochemical sensor based on screen-printed electrode modified with ordered mesoporous carbon and gold nanoparticles for determination of ractopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 775, p. 171–178, 2016.
- MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. DE F. F. DE M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4–10, fev. 2016.
- MENEZES, H. A.; MAIA, G. Films formed by the electrooxidation of p-aminophenol (p-APh) in aqueous medium: What do they look like? **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 586, n. 1, p. 39–48, 2006.
- MOREIRA, F. T. C. *et al.* Electrochemical biosensor based on biomimetic material for myoglobin detection. **Electrochimica Acta**, v. 107, p. 481–487, 2013.
- MOREIRA, F. T. C. *et al.* Screen-printed electrode produced by printed-circuit board technology. Application to cancer biomarker detection by means of plastic antibody as

sensing material. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 223, p. 927–935, fev. 2016.

MUSSO, D.; J.GUBLER, D. Zika Virus. **Nature**, v. 11, n. 1, p. 10–20, 2016.

NAKABAYASHI, Y. Amperometric biosensors for sensing of hydrogen peroxide based on electron transfer between horseradish peroxidase and ferrocene as a mediator. **Analytical sciences**, v. 16, n. June, p. 1–2, 2000.

PAL, R. K. *et al.* Conducting polymer-silk biocomposites for flexible and biodegradable electrochemical sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 81, p. 294–302, 2016.

PARKASH, O.; SHUEB, R. H. Diagnosis of dengue infection using conventional and biosensor based techniques. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5410–5427, 2015.

PETERS, B.; SETTE, A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. **BMC Informatics**, v. 9, p. 1–9, 2005.

PETERS, R.; STEVENSON, M. Zika virus diagnosis: challenges and solutions. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 2, p. 142–146, 2019.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Flaviviruses. In: COHEN, J. I. *et al.* (Eds.). **Fields Virology V. I**. Sixth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 747–794.

PLETCHER, D. *et al.* **Instrumental Methods in Electrochemistry**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001.

PLETNEV, A. G. *et al.* Molecularly engineered live-attenuated chimeric West Nile/dengue virus vaccines protect rhesus monkeys from West Nile virus. **Virology**, v. 314, n. 1, p. 190–195, 2003.

QADER, A. A. *et al.* Peptide imprinted receptors for the determination of the small cell lung cancer associated biomarker progastrin releasing peptide. **Journal of Chromatography A**, v. 1370, p. 56–62, 2014.

REBELO, T. S. C. R. *et al.* Protein imprinted materials designed with charged binding sites on screen-printed electrode for microseminoprotein-beta determination in biological samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 223, p. 846–852, fev. 2016.

REINHOLD, J. M.; LAZZARI, C. R.; LAHONDÈRE, C. Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: A review. **Insects**, v. 9, n. 4, 2018.

RIBEIRO, J. A. *et al.* Electrochemical detection of cardiac biomarker myoglobin using polyphenol as imprinted polymer receptor. **Analytica Chimica Acta**, v. 981, p. 41–52, 2017.

ROSCHER, S.; HOFFMANN, R.; AMBACHER, O. Determination of the graphene-

graphite ratio of graphene powder by Raman 2D band symmetry analysis. **Analytical Methods**, v. 11, n. 9, p. 1180–1191, 2019.

SALLES, T. S. *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 264, 24 dez. 2018.

SANKARAPAPAVINASAM, S. Kinetics and mechanism of electropolymerization of m-aminophenol. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 1105–1109, 1993.

SARAVANAN, M.; DOMB, A. J. A contemporary review on - Polymer stereocomplexes and its biomedical application. **European Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 81–96, 2013.

SAXENA, S. K. *et al.* Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **VirusDisease**, v. 27, n. 2, p. 111–115, 20 jun. 2016.

SCATURRO, P. *et al.* Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1–32, 2015.

SCHIRHAGL, R. Bioapplications for Molecularly Imprinted Polymers. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 1, p. 250–261, 7 jan. 2014.

Screen-Printed Electrode Information: Carbon and Ceramic Electrode Information. DurhamPine Research, , 2016. Disponível em: <<https://www.pineresearch.com/shop/wp-content/uploads/sites/2/2016/10/DRP10036-Screen-Printed-Electrodes-Overview-REV001.pdf>>

SETTE, A. *et al.* The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 153, n. 12, p. 5586–92, 15 dez. 1994.

SHAPSHAK, P.; SINNOTT, J. T. **Global Virology I - Identifying and Investigating Viral Diseases.** New York, NY: Springer New York, 2015.

SILVA, B. V. M. *et al.* An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 978–985, mar. 2016.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentals of analytical chemistry.** 8th. ed. Boston: Cengage Learning, 2003.

SONG, H. *et al.* Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature structural & molecular biology**, v. advance on, n. 5, p. 3–6, 2016.

SOUTHWOOD, S. *et al.* Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160,

n. 7, p. 3363–73, 1998.

SUNI, I. I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 604–611, jul. 2008.

TAI, D.-F. Artificial Receptors in Serologic Tests for the Early Diagnosis of Dengue Virus Infection. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1486–1491, 22 jun. 2006.

TAI, D.-F. *et al.* Artificial-epitope mapping for CK-MB assay. **The Analyst**, v. 136, n. 11, p. 2230, 2011.

TAI, D. F. *et al.* Recognition of dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 16, p. 5140–5143, 2005.

TAI, D. F. *et al.* Epitope-cavities generated by molecularly imprinted films measure the coincident response to anthrax protective antigen and its segments. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2290–2293, 2010.

TU-XUAN NHAN, D. M. Emergence of Zika Virus. **Clinical Microbiology: Open Access**, v. 04, n. 05, p. doi:10.4172/2327-5073.1000222, 2015.

VILLORDO, S. M. *et al.* RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 270–283, 2016.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 4, p. 860–7, 2016.

WALLIS, T. P. *et al.* Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20729–20741, 2004.

WANG, Y.-Z. *et al.* Epitope imprinted polymer nanoparticles containing fluorescent quantum dots for specific recognition of human serum albumin. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 7–8, p. 1465–1472, 18 jun. 2015.

WEISKOPF, D. *et al.* Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. E2046-53, 2013.

WEN, Y. *et al.* Biomedical Applications of DNA-Nanomaterials Based on Metallic Nanoparticles and DNA Self-Assembled Nanostructures. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 34, n. 3, p. 283–290, 2016.

WHITCOMBE, M. J. *et al.* The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection. **Chemical Society reviews**, v. 40, n. 3, p. 1547–1571, 2011.

WHITCOMBE, M. J.; LAKSHMI, D. Imprinted Polymers. In: **Electropolymerization**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010. p. 133–151.

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

XU, J. *et al.* Toward a Universal Method for Preparing Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles with Antibody-like Affinity for Proteins. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 1, p. 345–353, 2016a.

XU, X. *et al.* Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. **The EMBO journal**, v. 35, n. 20, p. 2170–2178, 2016b.

YAKOB, L.; WALKER, T. Zika virus outbreak in the Americas: the need for novel mosquito control methods. **The Lancet Global Health**, n. 16, p. 6–7, 2016.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; CAMPUZANO, S.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical sensors based on magnetic molecularly imprinted polymers: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 960, p. 1–17, 2017.

YANG, S.-T. *et al.* Biosafety and Bioapplication of Nanomaterials by Designing Protein-Nanoparticle Interactions. **Small**, v. 9, n. 9–10, p. 1635–1653, 27 maio 2013.

YANG, X. *et al.* A molecularly imprinted polymer as an antibody mimic with affinity for lysine acetylated peptides. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 5, p. 920–928, 2016.

YARMAN, A. *et al.* Cytochrome c-Derived Hybrid Systems Based on Molecularly Imprinted Polymers. **Electroanalysis**, v. 27, n. 3, p. 573–586, 2015.

YUQING, M.; JIANRONG, C.; XIAOHUA, W. Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 227–231, 2004.