



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

WENDELL WONS NEVES

**BIOSSENSOR ÓPTICO PARA *Candida albicans* BASEADO EM RESSONÂNCIA DE
PLASMON LOCALIZADO**

RECIFE / 2015

WENDELL WONS NEVES

**BIOSSENSOR ÓPTICO PARA *Candida albicans* BASEADO EM RESSONÂNCIA DE
PLASMON LOCALIZADO**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

RECIFE / 2015

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

N511b Neves, Wendell Wons.
 Biossensor óptico para *candida albicans* baseado em ressonância de
 plasmon localizado / Wendell Wons. – Recife: O Autor, 2015.
 54folhas, Il. e Abre.

 Orientadora: Prof.º Dr. Renato Evangelista de Araujo.
 Coorientador: Prof. Dr. Dra. Rejane Pereira Neves.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
 Programa de Pós-Graduação de Engenharia Biomédica, 2015.
 Inclui Referências e Apêndices.

 1. Engenharia Biomédica. 2. Candida albicans. 3. Biossensor. 4. Ressonância
 de plasmon. I. Araujo, Renato Evangelista de (Orientadora). II. Neves, Rejane
 Pereira (Coorientadora). III. Título.

UFPE

610.28 CDD (22. ed.)

BCTG/2015-126

WENDELL WONS NEVES

BIOSENSOR ÓPTICO PARA *Candida albicans* BASEADO EM RESSONÂNCIA DE PLASMON LOCALIZADO

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

Aprovado em: 23 de abril de 2015

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Marcos Tavares de Melo, UFPE, Doutor pela University of Birmingham – Birmingham, Inglaterra.

Profa. Dra. Adriana Fontes, UFPE, Doutora pela Universidade Estadual de Campinas – Campinas, Brasil.

Coordenador do PPGE: _____

Prof. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra

A Deus, que sem ele não seria nada. A meus familiares Luiz Firmino Neves, Beatriz Cleni Wons, Maxwell Wons Neves e Enya Wons Neves que sempre me apoiaram e me incentivaram a lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho, e mostrou-me a cada letra escrita que o sonho é possível. Aos meus pais **Luiz Firmino Neves** e **Beatriz Cleni Wons**, irmãos **Maxwell Wons Neves**, **Enya Christianne Wons Neves**, **Maxwell Wons Neves** e **Wagner Borges**, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Ao professor **Renato Evangelista de Araújo** pela exigência nas atividades, elegância nos ensinamentos, paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Ao professor e amigo **Reginaldo Gonçalves de Lima Neto**, pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade a mim oferecidas durante todo o tempo e que com muito amor a profissão e paciência passaram seus conhecimentos não só para a vida profissional como para o cotidiano. A minha co-orientadora **Rejane Pereira Neves** por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade, não somente por ter me ensinado, mas por ter me feito aprender.

Meus sinceros agradecimentos a todos professores que fazem parte do Mestrado em Engenharia Biomédica-UFPE, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação. Meus sinceros agradecimentos aos amigos **Carlos André**, **Lívia Maria** e **Allan Rivalles** pelos momentos de amizade e descontração no decorrer do Mestrado. Agradeço a todos que participaram diretamente e indiretamente desta etapa da minha vida. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A frequência de infecções hospitalares por fungos patogênicos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, acarretando altos níveis de mortalidade que atingem até 60% dos óbitos, frequentes em pacientes graves internados em Unidades de Terapia Intensiva. Testes específicos para diagnóstico de septicemia por *Candida albicans* possuem altos custos e necessitam um longo tempo para a obtenção de resultados. Diante desse quadro e considerando a necessidade da constante busca por alternativas no diagnóstico de septicemias por *Candida albicans*, nesse trabalho foi desenvolvido e avaliado uma nova plataforma de sensoriamento para um imunossensor óptico, baseado em Ressonância Localizada de Plasmon. Ressonância de Plasmon corresponde a oscilação coletiva dos elétrons de condução em resposta à excitação óptica promovida pela aplicação de um campo eletromagnético externo. A plataforma de sensoriamento corresponde a uma lâmina de vidro com nanopartículas de prata aderidas em sua superfície e funcionalizadas com anticorpos monoclonais anti-candida da classe das imunoglobulinas IgG. As nanopartículas utilizadas foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de absorção, indicando a presença de nanoestruturas com diâmetro médio de 15 nm. Moléculas de cisteamina foram utilizadas como ligantes no processo de funcionalização de anticorpos e glicina foi explorada como bloqueadores dos sítios não funcionalizados da plataforma. Os experimentos com diferentes concentrações de anticorpos foram realizados em quadruplicadas. Foi observado que quando adicionada cisteamina, glicina e anticorpos o pico de ressonância de Plasmon do sistema sofre um deslocamento para a região vermelha do espectro. Verificou-se deslocamentos do pico de Plasmon de até 30 nm. Na avaliação da plataforma como sensor de antígeno de *Candida albicans*, a detecção de diferentes concentrações de antígeno foi demonstrada. Plataformas de sensoriamento foram imersas em solução de PBS contendo antígenos nas alíquotas de 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL e 300 ng/mL, por um período de 1 hora, seguido de lavagem com água MiliQ. Os resultados mostram a capacidade do sistema em identificar alíquotas maiores que 50 ng/mL de antígeno de *Candida albicans*, indicando a possibilidade do uso da plataforma desenvolvida como imunossensor para *Candida*.

Palavras-chaves: *Candida albicans*. Biossensor. Ressonância de plasmon.

ABSTRACT

The frequency of hospital infections by pathogenic fungi has increased substantially in recent decades, leading to high levels of mortality reaching up to 60% of deaths, common in critically ill patients in intensive care units. Specific tests for the diagnosis of sepsis due to *Candida albicans* have high cost and require a long time to obtain results. Given this situation and considering the need for constant search for alternatives in the diagnosis of septicemia by *Candida albicans*, this work was developed and evaluated a new sensing platform for an optical immunosensor based on Resonance Localized Plasmon. Plasmon resonance corresponds to collective oscillation of conduction electrons in response to optical excitation promoted by the application of an external electromagnetic field. The sensing platform corresponds to a glass slide with nanoparticles of silver adhered on its surface and functionalized with monoclonal anti-candida antibodies of the IgG class of immunoglobulins. The nanoparticles used were evaluated by transmission electron microscopy and absorption spectroscopy, indicating the presence of nanostructures with an average diameter of 15 nm. Cysteamine molecules were used as ligands in the antibodies functionalization process and glycine as blockers of non-functionalized sites of the platform. Experiments with different concentrations of antibodies were performed in quadruplicate. It was observed that when added cysteine, glycine peak and antibodies specific Plasmon resonance is shifted to the red region of the spectrum. Peak shifts were found to Plasmon up to 54 nm. In the evaluation of the platform as a *Candida albicans* antigens sensor different antigen concentrations was demonstrated. The sensing platforms were immersed in PBS solution containing dilutions of antigens in 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL to 300 ng/mL for a period of 1 hour, followed by washing with MilliQ water. The results show the system ability to identify higher dilutions than 50 ng/mL of *Candida albicans* antigen, indicating the possibility of the use of the platform as developed immunosensor for *Candida*.

Keywords: *Candida albicans*. Biosensor. Plasmon resonance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação do princípio de funcionamento de um biossensor	15
Figura 2: Esquema da oscilação dos plasmons para uma esfera	20
Figura 3: Representação da lâmina funcionalizada com NPsAg	27
Figura 4: Lâmina com NpsAg e Cisteamina	28
Figura 5: Representação da lâmina com NPsAg e funcionalizada com cisteamina e anticorpos	29
Figura 6: Representação da lâmina com NPsAg e funcionalizada com cisteamina, anticorpos e glicina	29
Figura 7: Representação da lâmina completa	30
Figura 8: Microscópio de fluorescência	31
Figura 9: Espectrofotômetro UV-VIS	31
Figura 10: Espectro de absorção das NPsAg	32
Figura 11: Imagem das NPsAg por TEM	33
Figura 12: Espectro de absorção no UV-Vis das lâminas com NPsAg	33
Figura 13: Imagem da lâmina com silano e NPsAg	34
Figura 14: Espectro de absorção da lâmina de anticorpos anti-candida em diferentes diluições	35
Figura 15: Comportamento do pico de absorção de plasmon da lâmina funcionalizada com adição de anticorpos anti-candida	35
Figura 16: Espectro de absorção da lâmina funcionalizada com adição de anticorpos anti-candida e antígenos específicos	37
Figura 17: Posição de pico de plasmon localizado para diferentes etapas	37
Figura 18: Espectro de absorção da plataforma com adição de antígenos de <i>C. albicans</i> em diferentes diluições	38
Figura 19: Comportamento do pico de absorção de plasmon da plataforma com adição de antígenos de <i>C. albicans</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

EUA	Estados Unidos da América
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
PCR-EIA	PCR-enzyme immunoassay
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
SPR	Surface Plasmon Resonance
QCMB	Microbalanço de Cristal de Quartzo
ET	Eletrodo de Trabalho
ER	Eletrodo de Referência
CDR	Regiões Determinantes de Complementaridade
NPs	Nanopartículas
APTES	3-(Aminopropyl)triethoxysilane
HNO ₃	Ácido Nítrico
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
NHS	N-hydroxysuccinimide
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
µg	Microgramas
µl	Microlitros
ml	Mililitros
LEB	Laboratório de Óptica Biomédica
PUC-Rio	Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
nm	Nanômetros
MPTS	3- mercaptopropiltrimetoxisilano
NaBH ₄	Borohidreto de Sódio
AgNO ₃	Nitrato de prata
NPsAg	Nanopartículas de prata
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight
Ab	Anticorpos
Ag	Antígenos
ECN	Estafilococos coagulase-negativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	14
2.1 Geral	14
2.2 Específico	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 BIOSSENSORES	15
3.1.1 TRANSDUTORES	16
3.1.2 COMPONENTES BIOLÓGICOS DOS BIOSSENSORES	17
3.1.3 IMUNOSSENSOR ÓPTICO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA	18
3.2 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	20
3.2.1 <i>Candida</i> sp. COMO AGENTE DE INFECÇÕES	20
3.2.2 CANDIDÍASE	21
3.2.3 CANDIDEMIA HOSPITALAR	22
3.3 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DAS LEVEDURAS	23
3.3.1 DIAGNÓSTICO DA CANDIDEMIA POR PCR	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 PREPARAÇÃO DE LÂMINAS DE VIDRO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA	25
4.2 AVALIAÇÃO DO USO DAS LÂMINAS COM NPsAg PARA SENSORIAMENTO	27
4.3 PREPARAÇÃO DA PLATAFORMA DE SENSORIAMENTO	28
4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DOS ANTICORPOS DA PLATAFORMA	28
4.5 AVALIAÇÃO DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO DE <i>Candida albicans</i>	29
4.6 ANÁLISE POR MICROSCOPIA	30
4.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA UV-VIS	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32

6 CONCLUSÕES	39
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	40
REFERÊNCIA	41
APÊNDICES	47
APÊNDICE A	48

1. INTRODUÇÃO

Os biossensores são dispositivos no qual um material biológico, tal como enzima, organela, tecido animal ou vegetal, anticorpos, antígenos, lectina, ácidos nucleicos, dentre outros, são ligados à superfície ou biocamada de um transdutor. Este dispositivo é capaz de interpretar as mudanças químicas produzidas na presença de um composto biológico, originando um sinal capaz de ser interpretado (CLARKS & LIONS, 1962; FATIBELLO FILHO & CAPELATO, 1992). Quando este material é um antígeno ou anticorpo, estes sensores são denominados imunossensores ou biossensores imunológicos, que fazem uso da atividade antígeno/anticorpo como sinal analítico a ser monitorado (KARUBE, 1992; GUILBART & MONTANALVO, 1969).

Os imunossensores são sensores que envolvem a imobilização de anticorpos ou antígenos para uma superfície específica. As interações de antígenos com anticorpos imobilizados na superfície de um sensor podem provocar alteração de propriedades ópticas do sensor, como índice de refração ou absorção. Essas variações podem ser proporcionais à massa de antígenos que se ligam à superfície (HERKNER; WALDENHOFER; LAGGNER et al., 2001; SARKO & POLLACK JR., 2002). Em particular, novos biossensores ópticos tem sido demonstrado explorando o efeito de Ressonância de Plasmon Localizado (CARVALHO, 2013).

Vários autores destacam o gênero *Candida* como uma das espécies de fungos mais patogênicas ao homem e ainda relatam que este gênero é isolado, com frequência, em infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos como em mucosa oral, sobretudo em indivíduos imunossuprimidos os quais são gravemente acometidos por *C. tropicalis* e *C. albicans* (ABELSON et al., 2005). No Brasil, as principais espécies causadoras de candidemia são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (COLOMBO, 2000; COLOMBO et al., 2006). Diferente dos Estados Unidos da América (EUA), onde a emergência de espécies não-albicans parece estar associada à pressão seletiva do uso de fluconazol, no Brasil as espécies não-albicans mais prevalentes são sensíveis a este fármaco (REX & SOBEL, 2001).

A frequência de infecções hematogênicas por *Candida* sp. (candidemia) tem aumentado consideravelmente, especialmente em unidades de terapia intensiva e ou de assistência a pacientes críticos (ALMIRANTE, 2005; ANTUNES, 2004; AQUINO, 2005; COLOMBO, 2000; COLOMBO & GUIMARÃES, 2003). O aumento na frequência de

candidemia tem sido observado particularmente entre pacientes em uso de antibióticos, terapia imunossupressora, nutrição parenteral, e em pacientes expostos a múltiplos procedimentos invasivos. Espécies do gênero *Candida*, em particular *Candida albicans*, têm emergido como importantes patógenos nosocomiais, estando associadas a quase 80% de todas as infecções fúngicas nosocomiais, representando a maior causa de fungemia (ZEICHNNRER & PAPPAS, 2006; ALMIRANTE, 2005). Candidemia é a quarta causa mais comum de infecção na corrente sanguínea em hospitais terciários, e sua ocorrência tem sido associada à longa permanência hospitalar e alta mortalidade (ZEICHNNRER & PAPPAS, 2006; VIUDES et al., 2002; WEY et al., 1998).

Vários métodos são utilizados para o diagnóstico das candidemias, porém cada qual com diferentes tempos para a realização, bem como diferentes percentagens de sensibilidade e especificidade na detecção destes patógenos (AHMAD et al., 2002). Os métodos micológicos tradicionais de cultura, sorologia e estudos morfológicos vêm sendo enriquecidos com as novas aplicações moleculares (PFALLER, 1995) tais como a técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR) e suas variáveis: *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) (AHMAD et al., 2002), *PCR-enzyme immunoassay* (PCR-EIA) (AHMAD et al., 2004) e a técnica de sequenciamento de DNA (WAHYUNINGSIH et al., 2000; TAMURA et al., 2001; AHMAD et al., 2002; CHIBANA & MIKAMI 2003). Outros métodos incluem a detecção de manoses e outros componentes da parede celular (1-3-β-D-Glucan) (OBAYASHI et al., 1995).

O diagnóstico precoce desta doença tem sido extremamente difícil, pois os sinais e sintomas clínicos não são específicos, o que leva ao retardo no diagnóstico e, conseqüentemente, ao retardo na terapia antifúngica mais apropriada. Com frequência, as técnicas microbiológicas tradicionais como, “Meios de cultura”, para diagnóstico da candidíase invasiva falham em detectar a doença, sendo imprescindível recorrer a múltiplas coletas de sangue para que se tenha chance de obter cultura, uma vez que a fungemia é transiente. Além disso, o uso de técnicas invasivas de diagnóstico-específicas para estudos histopatológicos não é recomendado, pois, na maioria das vezes, os pacientes apresentam condições críticas devido ao fato de estarem imunocomprometidos (VANDEN BERGH et al., 1999; WALSH & CHANOCK, 1998).

A busca por alternativas no diagnóstico rápido e preciso de leveduras do gênero *Candida* em pacientes com candidemia consiste em um tema de significativa relevância para a área da saúde

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo geral deste trabalho é produzir um imunossensor óptico baseado em Ressonância Localizada de Plasmon (RLP) para detecção de leveduras do gênero *Candida*.

2.2 Específicos

- Desenvolver plataforma de sensoriamento de *Candida albicans*;
- Avaliação de dispositivo sensor na identificação de antígenos da *C. albicans*.

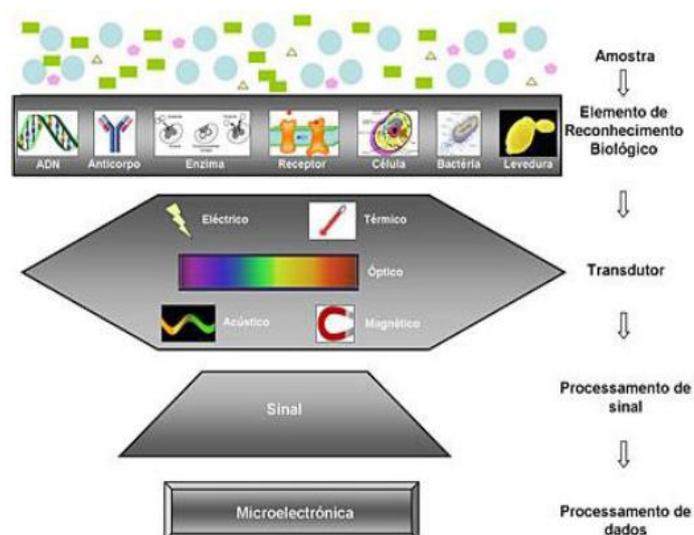
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de um determinado analito (WANG, 2000). Tais dispositivos combinam um componente biológico, que interage com um substrato alvo a biocamada de um transdutor, que converte os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis (WANG, 2000; PATHAK et al, 2007). Seu uso traz uma série de vantagens, pois são altamente sensíveis e seletivos, além de acessíveis. Entretanto, apresentam certas limitações, como interferências eletroquimicamente ativas na amostra e pouca estabilidade em longo prazo (MEHRVAR; ABDI, 2004; SONG et al, 2006).

Os biossensores podem ser de detecção direta (sistema não reticulado), nos quais a interação biológica é medida diretamente havendo uso de um ligante não-catalítico, como anticorpos e receptores celulares, ou de detecção indireta (sistema reticulado), em que há o uso de anticorpos fluorescentes marcados ou elementos como enzimas. Em geral, o sistema reticulado tem uma maior estabilidade e é mais simples para se utilizar, mas o sistema não reticulado possui melhor sensibilidade, tempo de operação mais curto e custos mais baixos (MEHRVAR; ABDI, 2004; PATHAK et al, 2007; LIU et al, 2009). Um diagrama básico de um biossensor é ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Representação do princípio de funcionamento de um biossensor.



Fonte: FERREIRA, 2005.

Os estudos sobre o desenvolvimento de biossensores iniciaram-se em 1962 por Clark e Lyons (GEORGE & MENONUS, 2000). O primeiro biossensor era conhecido como “eletrodo enzimático”, e utilizava a enzima glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida e um eletrodo para a medição de P_{O_2} (pressão parcial ou tensão de oxigênio). Na reação enzimática da oxidação da glicose, há um consumo de oxigênio proporcional à concentração do substrato (CLARK JR. & LYONS, 1962). O princípio básico de funcionamento de um biossensor envolve reações em um substrato, que são monitoradas e quantificadas através de um transdutor.

3.1.1 TRANSDUTORES

Os transdutores agem como uma interface, medindo a mudança física ou química que ocorre na reação com o biorreceptor, transformando essa energia em um produto mensurável, como massa, carga, calor ou luz. Existem diversos tipos, tais como, eletroquímico, óptico, piezoelétrico e calorimétrico (MEHRVAR et al, 2000; PATHAK et al, 2007; LEE et al, 2008).

Eletroquímicos – Exploram o movimento de íons e difusão de espécies eletroativas (EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 2008). São os biossensores mais utilizados nos testes de monitoramento e diagnóstico na área de análises clínicas (MEHRVAR; ABDI, 2004; GAUA *et al*, 2005). Suas principais vantagens são baixo custo, alta sensibilidade, *screening* rápido e estabilidade (SONG et al, 2006). Podem ser dos tipos amperométricos, potenciométricos ou condutimétricos (MEHRVAR; ABDI, 2004).

Ópticos – Baseiam-se na detecção das mudanças de propriedades ópticas de reagentes, produtos ou componentes do transdutor. São comumente utilizados na aplicação em sistemas de detecção direta. Em tais biossensores, fibras ópticas podem ser utilizadas para guiar as ondas de luz a detectores específicos. Entre as vantagens desses biossensores estão a facilidade de integração, imunidade a ruído eletromagnético e boa biocompatibilidade (MEHRVAR; ABDI, 2004).

Piezoelétricos – Exploram alteração de massa ou microviscosidade, onda de cisalhamento e superfície acústica (THÉVENOT et al, 2001; EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL, 2008). Baseia-se na medida de massa, que opera de acordo com o princípio de Sauerbrey e o fato de qualquer mudança na massa do cristal muda a frequência natural de oscilação (MEHRVAR; ABDI, 2004). Cristais de quartzo têm sido muito utilizados em sistemas piezoelétricos, pois sua frequência pode oscilar na faixa de

mega-hertz (10^6 ciclos/segundo) de maneira proporcional à massa do cristal, além de serem muito sensíveis às variações de massa. Essa alta sensibilidade levou à criação de um sensor denominado microbalança de cristal de quartzo (QCMB), que é capaz de detectar as variações de nanogramas que ocorrem em sua massa quando o alvo se liga ao sensor (WANG et al, 2011).

3.1.2 COMPONENTES BIOLÓGICOS DOS BIOSENSORES

Pode-se usar vários componentes biológicos para a produção de um biossensor, entre eles estão:

Enzimas. Elementos de reconhecimento baseados em enzimas catalíticas são muito atraentes como biossensores devido à variedade de produtos de reação mensuráveis de um processo catalítico, que incluem prótons, elétrons, luz e calor. Algumas enzimas como a urease têm sido muito usadas como um sensor para biorreconhecimento devido à necessidade de determinação/monitoramento da uréia, tanto em aplicações médicas quanto ambientais. Além do uso da enzima urease, várias outras enzimas são utilizadas na construção de biossensores, tais como a penicilinase e álcool desidrogenase (CHAMBERS et al, 2008). Os biossensores de bioluminescência ou bioanalíticos, por exemplo, são baseados na utilização de certas enzimas com habilidade de emitir fótons como um subproduto de suas reações. Tais biossensores possuem especificidade extremamente alta e podem distinguir células viáveis de células não-viáveis. Sua principal limitação é o tempo relativamente longo para análise e a falta de sensibilidade (MEHRVAR; ABDI, 2004).

Anticorpos/antígenos. Os anticorpos são proteínas que são sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B. Tais células são responsáveis por produzirem anticorpos contra antígenos, e sua função é definida pelo antígeno com o qual irá reagir. Assim, anticorpos gerais, com especificidade desconhecida (por exemplo, imunoglobulina sérica IgM), são chamados de imunoglobulina até serem definidos pelo antígeno específico (por exemplo, anti-sRBC IgM) (KLAASSEN, 2001). Os cinco tipos de imunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) são constituídas por cadeias pesadas (H), por cadeias leves (L) e regiões ou domínios constantes (C) e variáveis (V) (KLAASSEN, 2001; CHAMBERS et al, 2008). Na região V é onde se determina a especificidade do anticorpo, pois a maioria das diferenças entre os anticorpos está em três pequenas extensões com aproximadamente dez aminoácidos de suas cadeias pesada (V_H) e leve (V_L). Essas pequenas extensões assumem estruturas em alça que, em conjunto, formam uma superfície

complementar à estrutura tridimensional do antígeno ligado, sendo chamadas de segmentos hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDR). São ao todo seis alças na extremidade distal dos domínios V do receptor, sendo três de cada domínio (V_H e V_L). É possível observar por análise cristalográfica dos complexos antígeno/anticorpo, que os aminoácidos da região CDR formam múltiplos contatos com o antígeno (JANEWAY et al, 2007; ABBAS et al, 2008). A sensibilidade de um imunobiossensor depende da afinidade e da especificidade da ligação e do ruído do sistema transdutor. O uso de anticorpos como elemento de reconhecimento se baseia na alta sensibilidade e especificidade das interações antígeno/anticorpo (SONG et al, 2006; CHAMBERS et al, 2008).

Receptores. São alvos naturais para uma grande variedade de drogas e toxinas. São proteínas de natureza transmembrana e se ligam a moléculas específicas chamadas ligantes, induzindo uma resposta celular específica. A mudança conformacional no receptor induzido dá lugar a eventos subsequentes, como a abertura do canal, geração do segundo mensageiro adenil/guanil ciclase, e reações em cascata envolvendo um grande número de outras proteínas, incluindo as proteínas G, tirosina quinases, fosfatases, fosforilases e fatores de transcrição. Seu uso em biossensores é de grande interesse devido à alta especificidade e afinidade pelo ligante (CHAMBERS et al, 2008).

Ácidos Nucléicos e Aptâmeros. O desempenho dos biossensores de DNA é fortemente influenciado pelas propriedades físicas do DNA, como, por exemplo, pureza e comprimento médio da cadeia (RAVERA et al, 2007). A maioria dos biossensores de DNA é desenvolvida com base na imobilização de uma sonda feita a partir de uma fita simples de DNA (ssDNA) na superfície de um eletrodo marcada com um indicador eletroquímico que reconhece sua sequência-alvo complementar (WANG, 2000; AHAMMAD et al, 2009).

3.1.3 IMUNOSSENSOR ÓPTICO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O imunossensor é um tipo de biossensor baseado em reação imunológica, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor. Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado (MORGAN, 1996).

Os anticorpos (Ab) são moléculas de glicoproteína produzidas pelos linfócitos B em resposta a presença de um imunógeno (substância estranha ao organismo); com alta especificidade e afinidade ligam-se à substância particular (antígenos, Ag) (AMABIS & MARTHO, 2004).

Biossensores ópticos são baseados na medição das mudanças que ocorrem nas características da luz utilizada pelo sensor. Essas variações surgem como resultado da interação física ou química entre o analito a ser detectado e o elemento de reconhecimento biológico do biossensor. Este tipo de sensor explora as mudanças que ocorrem na absorção, fluorescência, luminescência, espalhamento ou índice de refração que são identificadas quando a luz interage com superfície de reconhecimento do transdutor. Podem ser usados em métodos indiretos, com a necessidade de marcação e direto, na qual utiliza-se apenas o elemento no sensor. Tais sensores podem ser conectados a elementos de reconhecimento biocatalíticos ou de bioafinidade. Os transdutores ópticos variam muito em função de suas propriedades e incluem sensores de fibra óptica (guia de onda) e sensores de Ressonância de Plasmon (RUMAYOR et al, 2005).

Vários sistemas ópticos são explorados na avaliação de imunorreações. Neste contexto, o uso de nanopartículas tem se mostrado bastante promissor. A interação entre nanomateriais e meios biológicos conduziu à criação de uma nova área, a nanomedicina. Neste sentido em nanopartículas metálicas (NPs) pode-se verificar o efeito de Ressonância Localizada de Plasmons que é observada quando as nanopartículas são irradiadas. A irradiação em um comprimento de onda específico pode induzir alterações no campo elétrico próximo às nanopartículas metálicas.

A frequência da luz que induz a oscilação coletiva dos elétrons depende do material formador das NPs e do meio em que elas são inseridas. Uma modificação do meio externo a partícula pode induzir um deslocamento da frequência de ressonância. A aderência de antígenos ou anticorpos na NP também pode ser acompanhada do deslocamento do pico de ressonância. Os sensores RLP baseiam-se na avaliação da posição espectral da frequência de ressonância. Uma variedade de sistemas ópticos de detecção explorando nanopartículas metálicas estão sendo utilizados em sensores e biossensores (RAY; BADUGU; LAKOWICZ, 2006).

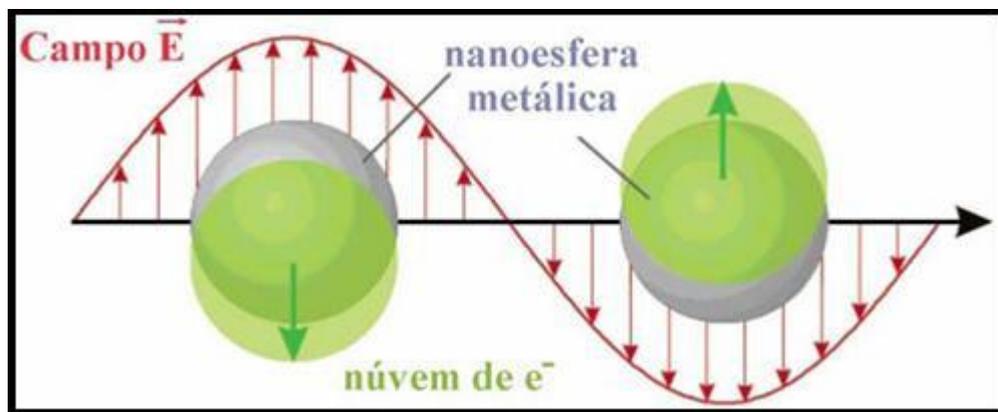
Em nanopartículas metálicas, os elétrons livres geram bandas de absorção referentes à ressonância dos plasmons na região visível do espectro. Em nanopartículas de prata, esféricas, e com tamanhos que variam entre 1 e 20 nm, as bandas da ressonância dos plasmons estão localizadas em torno de 420nm (XIA e HALAS, 2005).

A técnica de espectroscopia UV-Vis tornou-se uma maneira rápida e eficaz para detecção da presença, do tamanho médio e da distribuição de nanopartículas metálicas. Para isto, utilizam-se os valores de pico máximo e de largura à meia altura da banda dos Plasmons

(KIM, SONG e YANG, 2002; ZHAO, KELLY e SCHATZ, 2003; CHEN e CARROL, 2004). A figura 2 demonstra o esquema da oscilação de Plasmons para uma esfera metálica, mostrando o deslocamento da nuvem dos elétrons de condução da nanopartícula.

A Ressonância de Plasmon é um fenômeno físico utilizado na área de sensoriamento. Em determinados comprimentos de onda, ocorre a ressonância, energia luminosa é transferida para o metal com grande eficiência (SUN, MAYERS e col, 2005).

Figura 2: Esquema de oscilação dos Plasmons para uma esfera.



Fonte: KELLY, CORONADO, ZHAO E COL, 2003.

3.2 LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

3.2.1 *Candida* sp. COMO AGENTE DE INFECÇÕES

O reino Fungi compreende por volta de 1,5 milhões de espécies, destas aproximadamente 200 estão associadas com humanos (BUCKLEY, 2008), vivendo muitas vezes de forma comensal/sapróbia. Alguns, como diversas espécies de *Candida*, são patógenos oportunistas, causadores de infecções em hospedeiro imunossuprimido (RUIZ; ZAITZ, 2007).

As primeiras observações microscópicas da levedura ocorreram em 1839, com as pesquisas de Langenbeck, posteriormente confirmadas por Berg e Gruby. A denominação do gênero *Candida* foi internacionalmente estabelecida no VIII Congresso Europeu de Botânica, realizado em Paris (1954) (RIBEIRO et al, 2004; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Aproximadamente, 200 espécies de *Candida*, são aceitas e classificadas como pertencentes ao reino Fungi e divisão Eumycota. A maioria é classificada na subdivisão

Deuteromycetes, enquanto algumas espécies são da subdivisão Ascomycetes (KURTZMAN; FELL, 1999). Cerca de 10 % das espécies convivem de forma comensal ou causando doenças, afetando, principalmente, pele, trato gastro-intestinal, vagina e uretra, locais comuns de colonização (POULAIN et al, 2009). Atualmente, algumas espécies são reconhecidas como fungos oportunistas de maior ocorrência, sendo considerada a causa mais comum de infecções graves.

3.2.2 CANDIDÍASE

A candidíase é uma infecção micótica causada por leveduras de espécies de *Candida*, consideradas umas das leveduroses mais prevalentes, onde determinadas espécies estão presentes na microbiota da pele e mucosas, podendo acometer tecido, órgãos ou sistemas, favorecendo a ocorrência de diversos quadros clínicos (SQUIBBS, 1998; CARVALHO et al, 2003).

Vários autores destacam *C.albicans* como uma das espécies mais patogênicas ao homem e consideram essa espécie como frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos (CASTRO et al., 2006), entretanto outras espécies de *Candida* são reconhecidas como importantes no acometimento de infecções fúngicas em indivíduos imunodeprimidos (SQUIBBS, 1998; ABELSON et al, 2005).

Atualmente, a candidíase superficial está entre as infecções mais comuns de pele e mucosas. Entretanto, a candidíase profunda tem se tornado crescente, sobretudo, nos imunodeprimidos, constituindo um problema de saúde pública. Além da *Candida albicans*, outras espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* têm estado envolvidas de forma significativa na etiologia desta micose (LACAZ et al, 2002).

As infecções causadas por espécies de *Candida* têm se tornado frequente nos últimos anos e se transformado num grave problema de saúde que afeta preferencialmente imunossuprimidos e pacientes internados em UTI. Em estudo desenvolvido por Banerjee et al, (1991), em hospitais terciários, o gênero *Candida* respondeu por cerca de 80% das infecções fúngicas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções.

França (2006) afirma que dentre as infecções fúngicas hospitalares, 78,3% correspondem ao gênero *Candida*, predominando *C. albicans*. A apresentação clínica é inespecífica, sendo o estado febril o dado clínico mais comum em quadros de fungemia, estando à mortalidade por esse tipo de infecção estimada entre 40% e 60%.

Infecções por *Candida* envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções de pele e mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção, a exemplo de mulheres que desenvolvem candidíase vaginal. Por outro lado, candidíases sistêmicas podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica da levedura pelo organismo, complicações estas geralmente documentadas em pacientes críticos portadores de doenças degenerativas ou neoplasias (DIGNANI et al, 2003).

3.2.3 CANDIDEMIA HOSPITALAR

As infecções da corrente sanguínea (septicemia de origem bacteriana ou fúngica) representam importante problema de saúde pública mundial. São doenças de alta gravidade; acarretam aumento do tempo de internação hospitalar e conseqüentemente elevam os custos de hospitalização, além das elevadas taxas de morbimortalidade encontradas nos pacientes acometidos. Estudos estimam que a taxa de mortalidade da candidemia seja de 40% a 60%. Nos Estados Unidos, Gudlaugsson *et al.* registraram, no período de 1997 a 2001, a taxa de mortalidade bruta de 61%, e de mortalidade atribuída a candidemia, 49%. Entre pacientes hospitalizados e gravemente doentes, a sepse ainda é a principal causa de óbito. Nos EUA, no período de 1979 a 2000, houve um aumento significativo de casos anuais desta infecção, passando de 164 mil (82,7/100 mil pacientes) para 660 mil (240/100 mil pacientes). Neste mesmo período a prevalência de infecção da corrente sanguínea causada por fungos aumentou na ordem de 207% (GUDLAUGSSON et al,2003).

Atualmente vários estudos têm demonstrado a importância das leveduras do gênero *Candida* spp. como agentes de septicemia. Nos Estados Unidos, Edmond *et al.*, 1999, analisando a prevalência de infecções da corrente sanguínea durante três anos, em 49 hospitais, observaram que *Candida* spp. foi a quarta causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, responsável por 7,6% dos casos, superada apenas por estafilococos coagulase-negativa (ECN) (31,9%), *Staphylococcus aureus* (15,7%) e *Enterococcus* spp. (11,1%). No Brasil foram encontrados resultados semelhantes (COLOMBO et al,2007; HINRICHSEN et al 2009; MARTIN et al, 2003).

Entre outros, destaca-se um estudo epidemiológico conduzido por Colombo et al, 2006, realizado em 11 hospitais terciários. Foram confirmados 712 casos de candidíase

sistêmica. *Candida* spp. foi também o quarto patógeno mais frequentemente isolado, precedida por ECN, *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. O mesmo grupo de pesquisadores, em estudos envolvendo resultados de 45.468 hemoculturas de quatro hospitais terciários de São Paulo, observou que em 4% dos casos o agente isolado foi *Candida* spp.

3.3 IDENTIFICAÇÃO LABORATORIAL DAS LEVEDURAS

A partir de 1980, devido ao aumento do número de casos de candidemia em nível mundial, houve necessidade do aprimoramento das técnicas de diagnóstico laboratorial. Tendo em vista a gravidade das infecções fúngicas sistêmicas, bem como seu elevado custo socioeconômico é importante um diagnóstico rápido e preciso para que a intervenção medicamentosa possa ser iniciada precocemente na tentativa de minimizar as elevadas taxas de mortalidade.

O diagnóstico clínico, com base na sintomatologia e na anamnese do paciente, não é conclusivo, pois os sinais e sintomas são inespecíficos. Febre e leucocitose seriam os principais indícios de fungemia, porém 20% dos pacientes não desenvolvem hipertermia e apenas 50% apresentam leucocitose (BLÖT et al., 2002). Além disso, mesmo na presença desses sinais, não é possível supor uma candidemia considerando-se a semelhança com os sinais de bacteremia.

Assim, é imprescindível a confirmação laboratorial da candidemia por meio da técnica da hemocultura, a qual possui sensibilidade baixa, próxima de 50%, o que resulta num diagnóstico tardio, aumentando as chances de complicação (ALONSO-VALLE et al., 2003). A identificação de leveduras é baseada em várias provas que avaliam as características morfológicas e bioquímicas desses micro-organismos. Alguns testes são utilizados rotineiramente: produção do tubo germinativo, microcultivo em ágar fuba-*tween* 80, assimilação de carboidratos ou de nitrogênio (auxanograma) e fermentação dos carboidratos (zimograma) (LACAZ et al., 2002).

Essas provas fazem parte dos métodos fenotípicos tradicionais para a identificação de leveduras usadas em laboratórios do mundo todo, considerados métodos clássicos e padrão ouro para essa finalidade. A partir da década de 1990, surgiram meios de cultura cromogênicos que auxiliam na triagem de leveduras patogênicas, diferenciando as colônias conforme a cor produzida e facilitando a detecção de culturas mistas. Essa ferramenta pode também ser utilizada com o intuito de fornecer preliminarmente um laudo rápido para o clínico, para que a intervenção terapêutica seja imediata (MIMICA et al., 2009).

Cada vez mais são colocados no mercado sistemas automatizados e semi-automatizados para facilitar a identificação das leveduras (SANGUINETTI et al., 2007; VALENZA et al., 2008). Contudo, o uso destas ferramentas é ainda extremamente limitado por várias razões: custo elevado, falta de tradição, falta de produtos no mercado nacional. Além disso, o princípio dessas “novas” metodologias é o mesmo dos testes manuais, o que acaba acomodando os laboratórios, com a justificativa de que as metodologias clássicas ainda são as referências para a identificação de fungos patogênicos.

Nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado o desempenho da utilização da técnica MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) para a identificação de espécies de *Candida* clinicamente relevantes. É uma técnica físico-química que tem sido utilizada para a identificação microbiana rápida e confiável. O espectro gerado é analisado como um perfil de proteômica do agente com massa molecular entre 2.000-20.000 Da, onde as proteínas ribossomais importantes aparecem.

Este método poderia representar uma alternativa válida e rápida para ambos os métodos convencionais e moleculares para identificação de leveduras na prática rotineira. No entanto, este método não foi ainda avaliado comparativamente a um grande número de isolados clínicos concomitantemente (KUHN et al, 2013).

3.3.1 DIAGNÓSTICO DA CANDIDEMIA POR PCR

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular utilizando o DNA de agentes infecciosos tem-se mostrado uma estratégia clinicamente viável. A PCR é a técnica mais utilizada para este fim, pois permite a identificação de alguns fungos. Entretanto, para o diagnóstico da candidíase ainda não mostra uma melhor razão custo/eficácia em relação aos métodos clássicos.

Para fins epidemiológicos, a técnica derivada da PCR denominada de “amplificação aleatória de DNA polimórfico”, conhecida pela sigla na língua inglesa RAPD, fornece bons resultados. Esse ensaio utiliza uma sequência pequena (nove a 10 pares de bases) como *primers* aleatórios para a amplificação do DNA. Essa variação da PCR permite avaliar a correlação genética entre isolados da mesma espécie (KANBE et al., 2002).

É uma das técnicas mais empregadas para esse propósito devido a sua facilidade de execução, muito utilizada para comparar isolados obtidos de amostras clínicas com os de fontes inanimadas, auxiliando na análise de inquéritos epidemiológicos de surtos hospitalares (LEHMANN et al., 1992).

Por esse método de genotipagem pode-se analisar a similaridade entre isolados clínicos e se micro-organismos da mesma espécie são iguais, similares ou diferentes, discriminando subpopulações intraespecies. Essa metodologia também tem aplicação para se demonstrar a provável origem daquela infecção fungica. Por meio da tipagem molecular de micro-organismos isolados em colonização (mãos, superfícies dispositivos), e em comparação com isolados infectantes, pode-se comprovar se as mesmas são ou não geneticamente idênticas (RESENDE et al., 2004).

As principais vantagens da RAPD-PCR em relação às demais técnicas moleculares são: rapidez de execução, baixo custo, facilidade de implantação em laboratórios, facilidade de aplicação em estudos epidemiológicos, além de não haver necessidade de se conhecer previamente o DNA a ser analisado (KLEMPF et al., 2000).

Devido às limitações decorrentes do uso das técnicas diagnósticas tradicionais, ainda há necessidade de desenvolvimento de outros métodos, que permitam um diagnóstico rápido, sensível, preciso e confiável.

4. METODOLOGIA

As atividades para o desenvolvimento e avaliação de um novo biossensor óptico baseado em ressonância de plasmon estão sendo realizadas no Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens da UFPE, em parceria com o grupo de pesquisa do professor Omar Pandoli, da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

4.1 PREPARACAO DE LÂMINAS DE VIDRO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As lâminas com NPsAg utilizadas nesse trabalho foram produzidas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Omar Pandoli, professor da Pontifícia Universidade Católica-RJ. A metodologia aqui descrita foi utilizada na síntese e caracterização das nanopartículas de prata, bem sua deposição em lâmina de vidro. A preparação das lâminas com NPsAg não fizeram parte das atividades desta monografia, mas é aqui apresentada de forma a estabelecer um registro de todas as etapas de desenvolvimento do sensor.

A síntese das NPsAg foi feita a partir da redução do precursor nitrato de prata AgNO_3 com borohidreto de sódio, com auxílio da tecnologia de microreator em fluxo contínuo. As

soluções de AgNO_3 , do ligante orgânico específico (tartarato de sódio e potássio) e do borohidreto de sódio NaBH_4 foram preparadas a fim de se obter concentração de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Na etapa de complexação, o nitrato de prata AgNO_3 e o ligante são injetados diretamente no reator microfluídico variando as proporções ligante/ Ag^+ em função da velocidade de fluxo de entrada no microreator. A velocidade de fluxo pode variar entre 0,25-0,5 mL min^{-1} . Na saída do microreator, o complexo ligante/ Ag^+ é gotejado diretamente na solução do agente redutor $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ sob contínua agitação com o auxílio de um agitador magnético. A razão molar entre Ag^+ e NaBH_4 foi 1:1,5.

Após a etapa da síntese das nanopartículas os vidros foram limpos com detergente (Extran neutro 5% em água) com auxílio de um pano de superfície macia. O detergente foi retirado com água destilada e água MiliQ. Os vidros foram colocados em uma cuba de vidro com água MiliQ e ultrassom por 10 min. Após esta etapa a água foi trocada e a cuba colocada novamente no ultrassom por 10 min. Por seguinte, os vidros foram colocados em uma cuba com uma solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=1:3$) e adicionada novamente ao ultrassom por 30 min.

Os vidros foram enxaguados abundantemente com água MiliQ para eliminar os resíduos da solução piranha e novamente adicionado em uma cuba contendo água MiliQ, que posteriormente foi colocada no ultrassom por 5 min. Os vidros foram mergulhados em etanol e em seguida secados com N_2 .

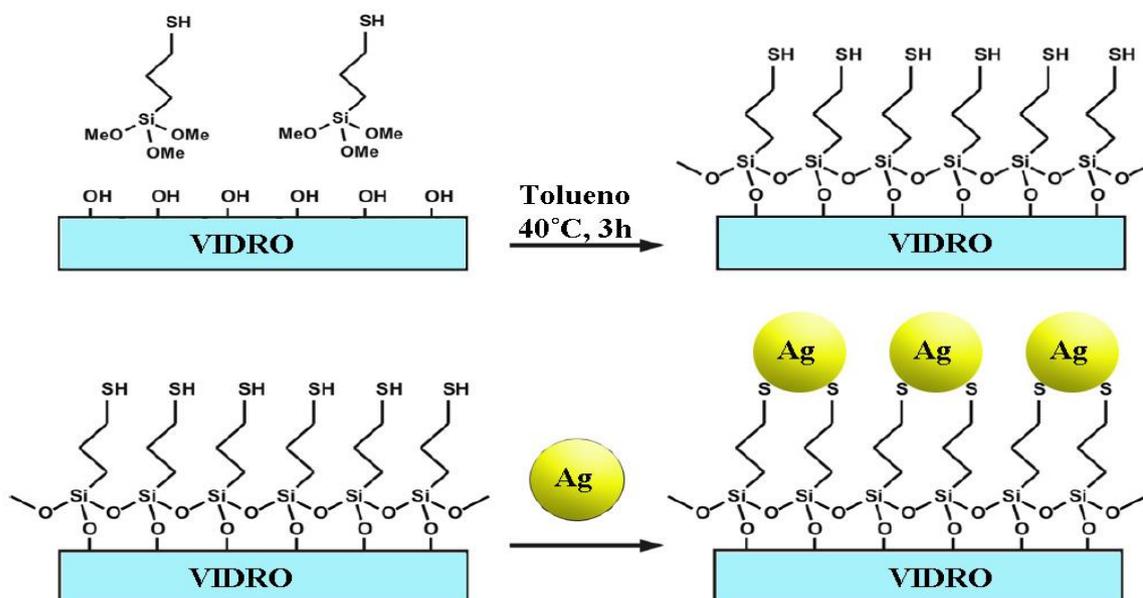
Para etapa de silanização das lâminas, foi preparado uma solução de MPTS (3-mercaptopropiltrimetoxisilano) a 5 % em tolueno e colocada em uma cuba de vidro. Inseriu-se os vidros nessa cuba e depois foi aquecida até 40°C por 2 horas. Ao terminar, enxaguou-se os vidros com Tolueno e Etanol em proporção de 1:1. Após essa etapa foi colocado em estufa a 100°C até secar (aproximadamente 5 minutos) (SMIRNOV, 2001).

A plataforma de sensoriamento consiste em uma lâmina de vidro contendo nanopartículas de prata aderidas em sua superfície com anticorpo funcionalizado.

Para adesão das nanopartículas de prata, primeiramente, foi feita a limpeza das laminas de vidro com detergente e água ultrapura milliQ ($18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-2}$) em um banho ultrassom. Depois o vidro foi funcionalizado com 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS). Posteriormente, o vidro foi imerso em uma solução de nanopartículas de prata fazendo com que se crie uma monocamada de NPs-Ag covalentemente ligada ao vidro. No caso da funcionalização do vidro com MPTS, as nanopartículas são quimicamente ligadas ao vidro (SiO_2) através da ponte S-Ag com afinidade química pela superfície metálica das NPs de prata

previamente funcionalizado como mostra a figura 3. Para o processo de adesão de nanopartículas de prata nas lâminas foram utilizadas a afinidade da nanopartícula de prata a porção enxofre do processo de silanização.

Figura 3: Representação das lâminas funcionalizadas com NPsAg.



4.2 AVALIAÇÃO DO USO DAS LÂMINAS COM NPsAg PARA SENSORIAMENTO

Antes de iniciar a preparação da plataforma de sensoriamento um teste inicial foi realizado para verificar a potencialidade do uso de ressonância localizada de plasmon na identificação do imunocomposto.

Nesta primeira etapa foram utilizadas soluções de EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) a 2 mM^{-1} e NHS (N-hydroxysuccinimide) a 5 mM^{-1} . Homogeneizou 10 mL de EDC com 10 mL de NHS. Os anticorpos utilizados foram as imunoglobulinas IgG de coelhos marcados com FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (Sigma-Aldrich). Posteriormente alíquotas de $20 \text{ }\mu\text{L/mL}$ de anticorpos marcados com FITC em uma concentração de $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ foram adicionados a solução de EDC+NHS juntamente com as lâminas, permanecendo por um período de 2h para ativar o grupamento carboxila dos anticorpos, representadas na figura 5 (DUTRA, 2013).

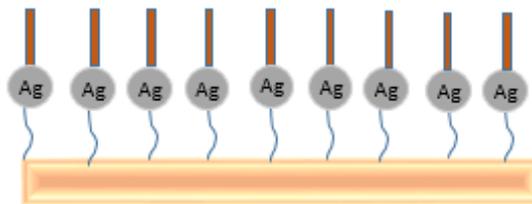
Após a realização desta etapa as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de anticorpos da superfície da lâmina para posterior leitura no microscópio por fluorescência.

4.3 PREPARAÇÃO DA PLATAFORMA DE SENSORIAMENTO

Inicialmente as lâminas contendo nanopartículas aderidas foram imersas em uma solução de água e ácido nítrico (HNO_3) (Sigma-Aldrich) em uma concentração de 0.2M, afim de retirar possíveis microrganismos que venham a afetar as reações nas próximas etapas.

As lâminas foram imersas por 2 horas em uma solução de Cisteamina (2-aminoethanethiol) (Sigma-Aldrich) a 50 mM em etanol. A Cisteamina possui em sua estrutura um enxofre no grupo tiol que se ligará covalentemente as nanopartículas de prata, e uma função amina (N_2H) que permitirá a ligação do grupamento carboxila dos anticorpos, criando uma “ponte” entre a nanopartícula e o anticorpo, como ilustra a figura 4 (CARVALHO, 2013).

Figura 4: Lâmina com NpsAg e Cisteamina.

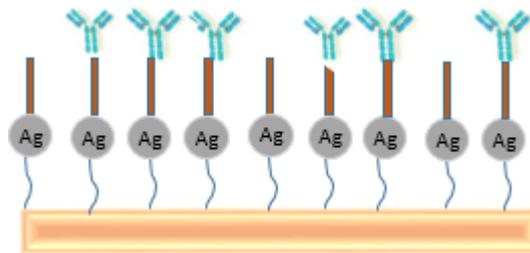


4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DOS ANTICORPOS DA PLATAFORMA

A funcionalização de anticorpos em laminas com prata foram realizadas em duas etapas. A primeira etapa consiste no uso de anticorpos marcados com molécula fluorescente, para a verificação, por microscopia de fluorescência, da ligação anticorpo-plataforma de sensoriamento, como descrito no item 4.2. Em uma segunda etapa foram funcionalizados anticorpos monoclonais anti-Candida da classe das imunoglobulinas IgG produzidas em coelhos (GenWayBio), seguindo a mesma metodologia descrita por Dutra (2013) no item 4.2,

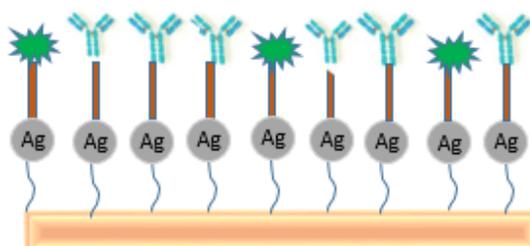
utilizando soluções com 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL e 300 ng/mL de anticorpos de uma concentração final de 5 µg/mL. A figura 5 representa a adição dos anticorpos a plataforma de sensoriamento.

Figura 5: Representação da lâmina com NPsAg e funcionalizada com cisteamina e anticorpos.



As lâminas foram imersas em uma solução aquosa de Glicina (Sigma-Aldrich) a 50 mM por 1 hora. Após esta etapa as lâminas foram lavadas com água MilliQ para retirar o excesso de Glicina na amostra. Esta etapa evitou que os antígenos utilizados aderissem aos grupos funcionais amina livres presentes na Cisteamina que não foram preenchidos com os anticorpos, como ilustrado na figura 6 (CARVALHO, 2013).

Figura 6: Representação da lâmina com NPsAg e funcionalizada com cisteamina, anticorpos e glicina.



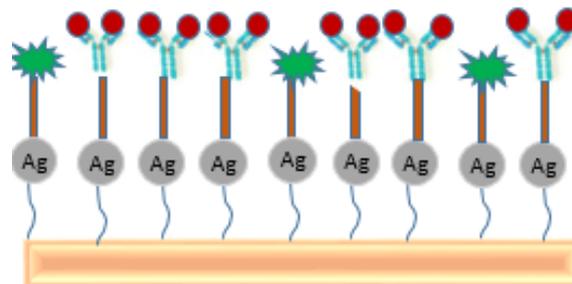
4.5 AVALIAÇÃO DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO DE *Candida albicans*

Para a avaliação da plataforma como identificador de antígeno de *Candida albicans*, foram utilizados para ligação antígeno/anticorpo os antígenos/manana de *Candida albicans* produzidas em coelhos pela empresa (GenWayBio).

As lâminas preparadas foram imersas em solução de PBS contendo antígenos (GenWayBio) em soluções de 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL e 300 ng/mL por um período de 1 hora, seguido de lavagem com água MilliQ.

O comportamento do sensor para diferentes concentrações de antígenos foi avaliado explorando espectroscopia de absorção UV-VIS. A figura 7 representa a plataforma com adição de antígenos de *C. albicans*.

Figura 7: Representação da lâmina completa.

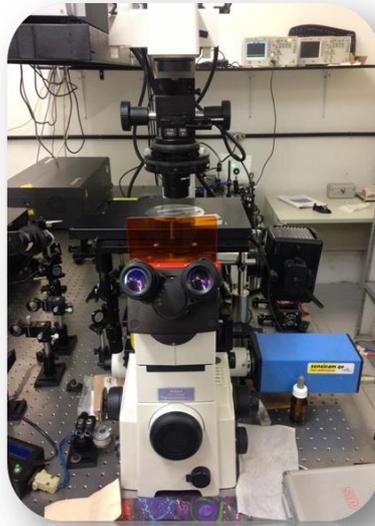


4.6 ANÁLISE POR MICROSCOPIA

A técnica de microscopia de fluorescência foi utilizada na avaliação do resultado do processo de funcionalização de anticorpos marcados com FITC na plataforma do sensor. As lâminas preparadas foram analisadas em microscópio por fluorescência da NIKON (figura 8) com a câmera (Sensicam qe - The Cook Corporation) em exposição por 24s em ambiente escuro para a detecção da fluorescência dos anticorpos ligados ao grupamento amina da lâmina silanizada e das NPsAg.

Microscopia eletrônica de transmissão também foi explorada para na análise das nanoestruturas metálicas na superfície da lâmina, como ilustra a figura 11. As imagens foram feitas e cedidas pelo grupo do professor de Omar Pandoli na PUC-Rio.

Figura 8: Microscópio de fluorescência.



4.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA UV-VIS

As lâminas foram avaliadas através da técnica de espectrometria de absorção no UV-VIS modelo Evolution 600 (Figura 9). O equipamento de espectroscopia está disponível no Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens. Os espectros foram adquiridos na região de 350 a 800 nm. O sistema possui resolução espectral de 0,2nm.

Figura 9: Espectrofotômetro UV-VIS.

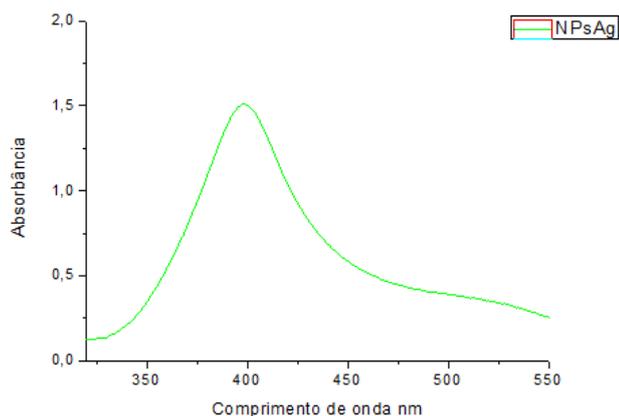


5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas de prata foram sintetizadas e avaliadas por espectroscopia ótica de absorção feitas pelo grupo de pesquisa de Omar Pandoli da PUC-Rio. A figura 10 mostra o espectro de absorção das NPsAg em solução (antes da deposição na lamina de vidro) com um pico no comprimento de onda em 400 nm, o que indica a existência de nanopartículas de prata como resultado da síntese estabelecida. Essas nanopartículas de prata foram utilizadas para deposição em lâminas de vidro silanizadas com MPTS.

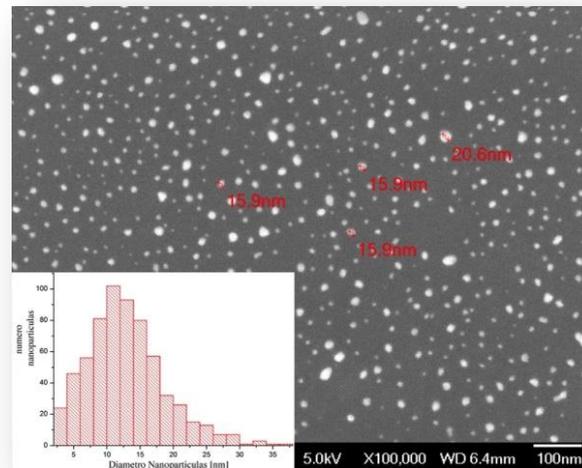
Figura 10: Espectro de absorção das NPsAg.



5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS LÂMINAS COM NPsAg

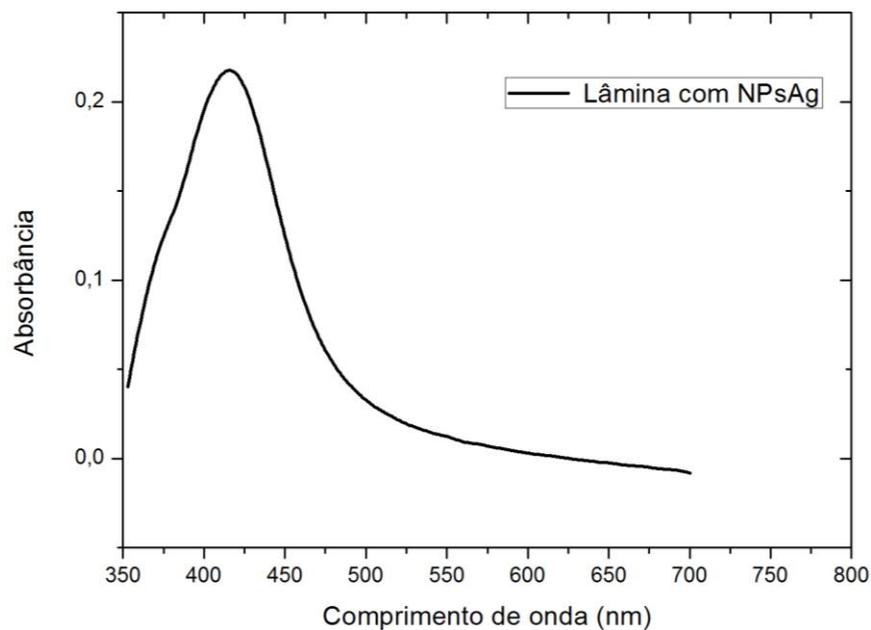
Nanopartículas de prata já depositadas em lâminas de vidro funcionalizado com MPTS, foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão, indicando a presença de NPsAg com diâmetro médio de 15 nm, como apresenta a figura 11, corroborando assim com a análise espectral no que se refere ao tamanho das nanopartículas.

Figura 11: Imagem das NPsAg por TEM.



A figura 12 mostra o espectro de absorção no UV-Vis das lâminas com nanopartículas de prata. Observa-se a curva referente a absorção das NPsAg. A análise espectral foi feita no LEB (Laboratório de Óptica Biomédica-UFPE). Ainda analisando informações retiradas do gráfico, observa-se que a banda de Plasmon apresentada no gráfico corresponde às nanopartículas de prata, tendo seu pico máximo em 420nm.

Figura 12: Espectro de absorção no UV-Vis das lâminas com NPsAg.



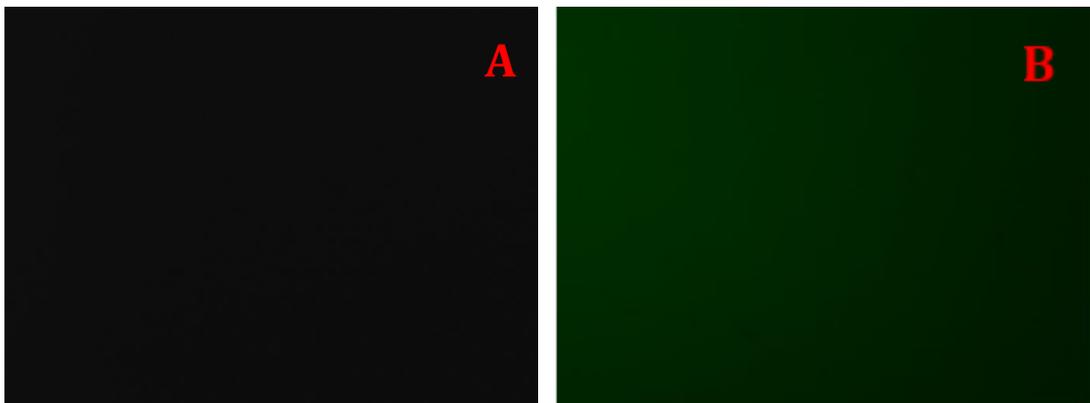
5.3 ANÁLISE DAS LÂMINAS COM ANTICORPOS MARCADOS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A avaliação da plataforma de sensoriamento, como dito anteriormente na metodologia, foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa, um estudo piloto foram adicionados anticorpos marcados com FITC. A figura 13 mostra a imagem obtida por microscopia de fluorescência da lâmina com NPsAg silanizadas (MPTS) sem anticorpos marcados (A) e com adição de anticorpos IgG marcados com FITC (B).

Verifica-se que a figura 13 (B) apresenta maior brilho que a figura 13 (A), mostrando que houve uma ligação entre os anticorpos e a plataforma de desenvolvida. O controle negativo (A), lâmina sem anticorpos, mostrou ausência de fluorescência. Constata-se que a intensidade média da imagem (B) é aproximadamente três vezes maior que a intensidade média referente a imagem (A).

Esse resultado indica a possibilidade de explorar ligação de imunocompostos em lâminas de vidro com NPsAg aderidas em sua superfície.

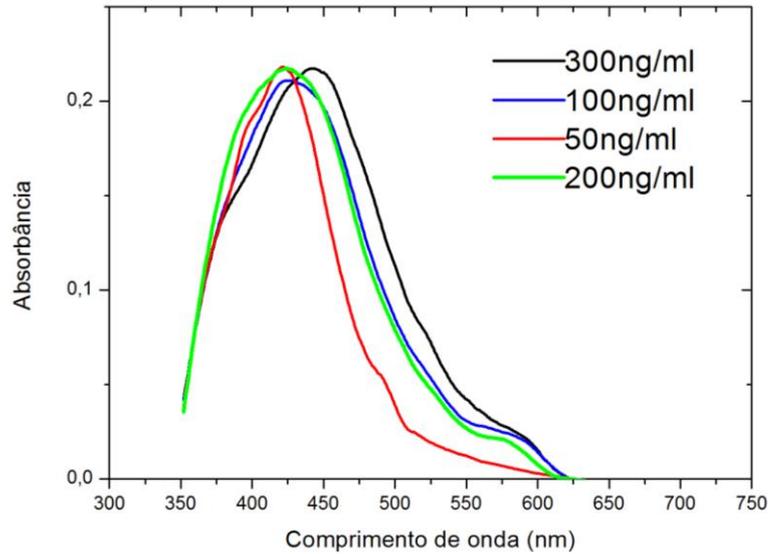
Figura 13: A) Imagem da lâmina com silano e NPsAg; B) Imagem da lâmina aderida com nanopartículas e anticorpos marcados.



5.4 ANÁLISE COM ANTICORPOS ANTI-CANDIDA

A figura 14 representa a análise feita em espectrometria de absorção no UV-VIS após a adição dos anticorpos anti-candida na lâmina funcionalizada (NPsAg+Cistemaina). Inicialmente foi utilizado soluções mínimas de 50 ng/mL e máximas de 300 ng/mL de anticorpos para avaliar a melhor diluição.

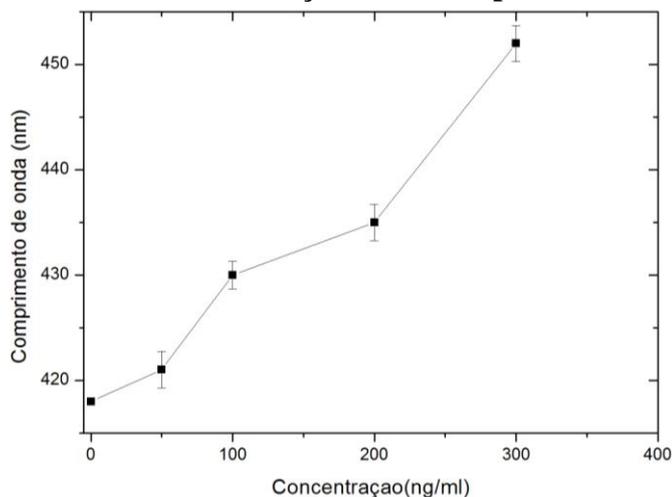
Figura 14: Espectro de absorção da lâmina de anticorpos anti-candida em diferentes diluições.



Foi analisado um aumento gradativo do espectro de absorção nas diferentes concentrações, podendo apenas ser observado um deslocamento de pico significativo quando utilizadas soluções máximas de 300 ng/mL de anticorpos, tornando assim a concentração ideal observada. A figura 15 representa o comportamento do pico de plasmon em diferentes alíquotas e comprimentos de onda, apresentando um deslocamento máximo do pico em ~31 nm, quando utilizadas as soluções de 300 ng/mL de anticorpos.

Todas as diluições testadas foram feitas em quadruplicada, onde estatisticamente foram avaliados a média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Figura 15: Comportamento do pico de absorção de Plasmon da lâmina funcionalizada com adição de anticorpos anti-candida.



5.5 AVALIAÇÃO DA PLATAFORMA NA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Candida albicans*

Em nanopartículas de ouro e prata, os elétrons livres geram bandas de absorção referentes à ressonância dos plasmons na região visível do espectro. De acordo com Ray, 2006 uma modificação do meio externo a partícula, pode induzir um deslocamento da frequência de ressonância, manifestando-se por alteração do espectro de absorção. A figura 16 mostra quatro espectros, resultado desta interação, para diferentes etapas de preparação da plataforma e também na detecção.

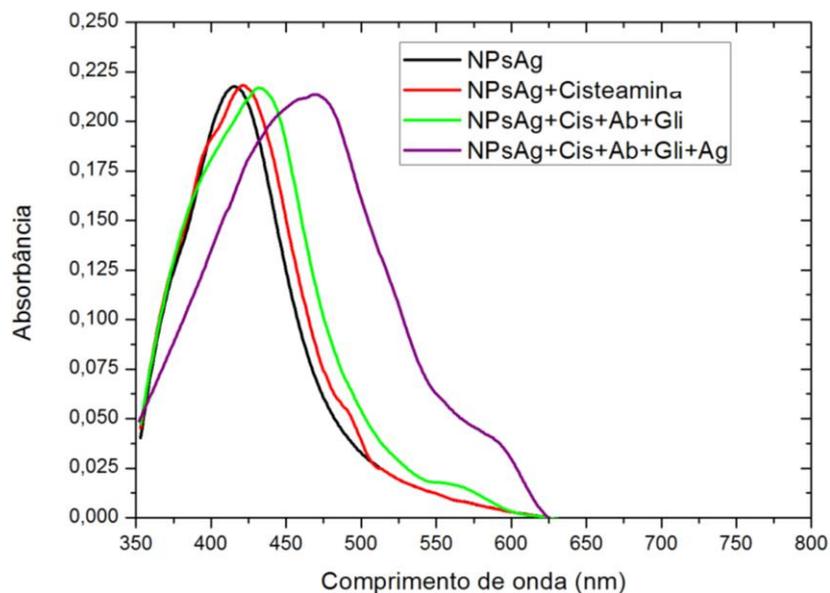
A linha representada pela cor preta mostra o pico de ressonância da lâmina funcionalizada apenas com nanopartículas de prata em 423 nm. Após a adição do ligante cisteamina a superfície das nanopartículas de prata, representada pela linha vermelha, é observado um deslocamento de ~10 nm do pico de ressonância em relação ao gráfico da lâmina apenas com as nanopartículas.

Na figura 16 o espectro em verde é obtido após a adição dos anticorpos anti-candida a superfície das nanopartículas de prata com cisteamina e glicina aderidas. Um deslocamento de 30 nm em relação a primeira curva é observado devido ao deslocamento da frequência de ressonância.

Como resultado da detecção de antígenos específicos para *C. albicans* representado pela curva roxa, podemos observar o deslocamento de 52 nm em relação ao primeiro pico, representado apenas por nanopartícula aderidas no vidro. Tal deslocamento se deve a confirmação da ligação antígeno/anticorpo proporcionada pela metodologia utilizada.

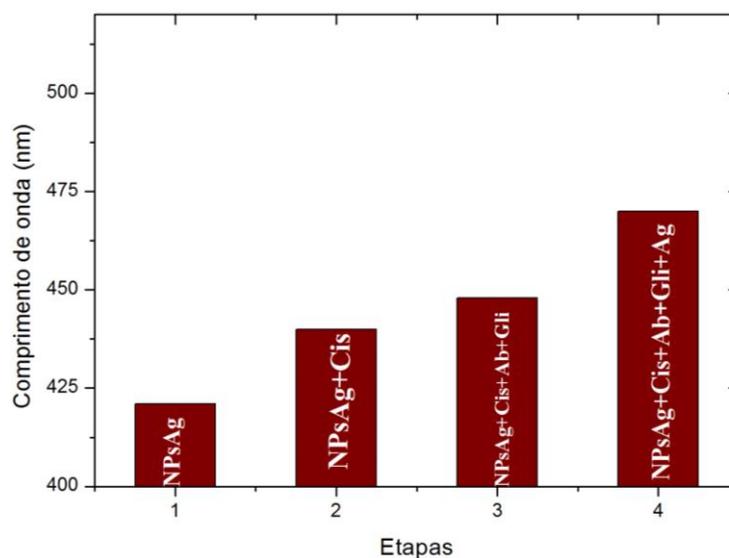
Houve um deslocamento significativo da absorção após a adição dos antígenos, o que mostra que há um potencial para o desenvolvimento de imunossensores eficientes baseados em ressonância de plasmons.

Figura 16: Espectro de absorção da lâmina funcionalizada com adição de anticorpos anti-candida e antígenos específicos.



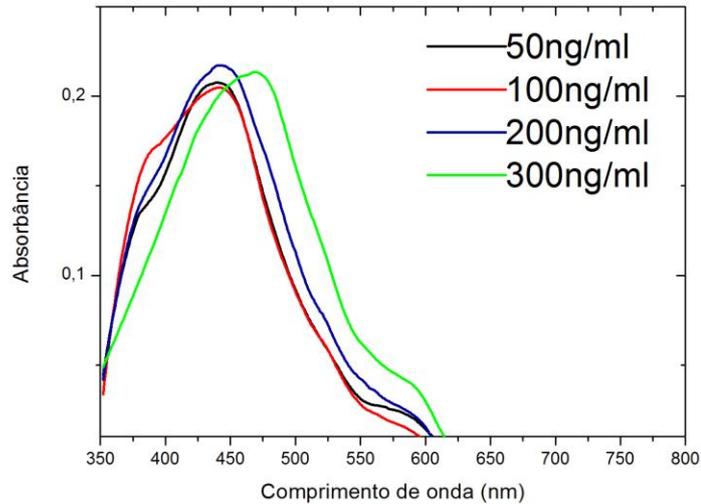
A figura 17 confirma os resultados anteriores referentes as etapas de preparação da plataforma de sensoriamento, onde é observado um deslocamento gradual do pico de ressonância de Plasmon em relação a concentrações do sistema antígeno/anticorpo na superfície das nanopartículas de prata aderidas no vidro.

Figura 17: Posição de pico de Plasmon localizado para diferentes etapas.



Para avaliar a capacidade de identificação de antígenos pela plataforma desenvolvida os antígenos de *Candida albicans* foram depositadas na superfície da plataforma em soluções que variaram de 50 ng/mL a 300 ng/mL, como mostra a figura 18.

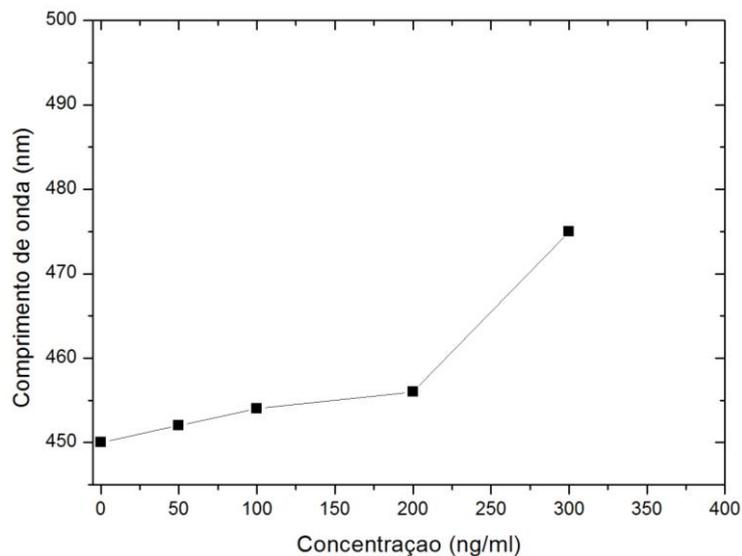
Figura 18: Espectro de absorção da plataforma com adição de antígenos de *C. albicans* em diferentes diluições.



A figura 19 representa o comportamento do pico de Plasmon do sensor com o uso de diferentes concentrações de antígenos, mostrando um deslocamento máximo do pico em ~30 nm, quando utilizado soluções de 300 ng/mL de antígenos.

Vale ressaltar que, quanto maior a concentração de Ag maior é o deslocamento do pico de absorção.

Figura 19: Comportamento do pico de absorção de plasmon da plataforma com adição de antígenos de *C. albicans*.



6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado o potencial de uso de uma nova plataforma de sensoriamento baseada no efeito de ressonância de plasmon localizados. A nova plataforma foi avaliada na detecção de antígenos de *Candida albicans*. Ressonância de plasmon corresponde a oscilação coletiva dos elétrons de condução em resposta à excitação óptica promovida pela aplicação de um campo eletromagnético externo. A frequência de ressonância dos Plasmons, associado ao comprimento de onda de pico no espectro de absorção, depende de fatores tais como o tamanho médio, a forma, o meio no qual estão as nanopartículas, a densidade de elétrons e a massa eletrônica efetiva.

A estrutura do novo sensor consiste basicamente de uma lamina de vidro com nanopartículas de prata com aproximadamente 15nm, e uma camada de anticorpo de *C. Albicans* aderida a nanoestrutura metálica, por uma molécula de Cisteamina. Glicina também foi utilizada como bloqueadora dos sítios não funcionalizados do sensor. O desenvolvimento da plataforma de sensoriamento foi estabelecido em parceria com um grupo de pesquisa da PUC-Rio, que silanizaram com MPTS as lâminas de vidro bem como o depositaram nanopartículas de prata na superfície do vidro.

Microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de transmissão foram utilizadas na avaliação da aderência das NP na lâmina de vidro.

Na construção da plataforma de sensoriamento, diferentes concentrações de Cisteamina foram exploradas. A adesão da Cisteamina nas NP foi comprovada com a análise do deslocamento do espectro de absorção da prata. A incorporação de anticorpo de *C. albicans* na plataforma também introduziu modificações no espectro do sistema. Foi avaliada a resposta óptica da estrutura estabelecida com o uso de diferentes soluções de anticorpos (50 ng/mL até 300 ng/mL). Utilizando soluções de 300 ng/mL de anticorpos foi observado um deslocamento de ~50nm do pico de Plasmon ao adicionar alíquotas de 60 µL/ml de antígenos.

Na avaliação da plataforma como sensor de antígeno de *Candida albicans*, a detecção de diferentes concentrações de antígeno foi demonstrada. Os resultados mostram a capacidade do sistema em identificar alíquotas maiores que 50 ng/mL de antígeno de *Candida albicans*.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos verificaram-se que a plataforma desenvolvida pode ser explorada como imunossensor para *C. albicans*. Não existem sensores de fungos baseados em ressonância de plasmon localizados, o que torna a plataforma desenvolvida em um sistema inovador. Porém estudos complementares ainda precisam ser realizados para o estabelecimento dos limites do sensor. É necessária a avaliação da detecção de antígeno em plasma sanguíneo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6.ed.Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 576 p.
- ABELSON, J. A., et al. Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. **Pediatrics**. v. 116, p.61–67, 2005.
- ADAMCZYK, M.; MATTINGLY, P.G.; SHREDER, K.; YU, Z. G.; *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1032.
- AHAMMAD, A. J. Saleh; LEE, Jae-Joon; RAHMAN, Md. Aminur. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. **Sensors**, v.9, p.2289-2319, mar 2009.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUES D.; PARK, B. J. Epidemiology and predictor of mortality in cases of Candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology** 43: 1829-1835, 2005.
- ALONSO-VALLE, H. et al. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. *Europ Clin Microbiol Infect Dis*, v. 22, p. 254-7, 2003.
- AMABIS, J. & MARTHO, G. *Biologia das Populações*. São Paulo: Moderna, 2004.
- ANTUNES, A. G. V.; et al. Candidemia in a Brazilian Tertiary Care Hospital: Species, Distribution and Antifungal Susceptibility Patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46: 239-241, 2004.
- BADER, O.; WEIG, M. Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1359–1365.
- BLOT, S. I. *et al.* Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *The Americ J of Med*, v. 113, p. 480-5, 2002.
- BRANDÃO, H. M. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. *Revista CRMV, Brasília*, v.17, n. 53, p 61-67, 2011.
- BRECHT, A.; GAUGLITZ, G.; *Biosens. Bioelectron.* **1995**, *10* , 923.
- BUZEA, C.; PACHECO, B. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, New York, v. 2, n. 4, p. 100-103, 2007.
- CARVALHO, L. DE; BACELAR, O.; NEVES, N.; E.M.; JESUS, A.M. R. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 571-576, 2003.
- CHAMBERS, J. P. *et al.* Biosensor Recognition Elements. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v.10,p.1-12, 2008.

CHIBANA, H.; MIKAMI, Y. Genomic analysis in *Candida albicans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2003, 44: 81-5.

CLARK JR., L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Acad. Sei, NEW YORK*, 1962, 29.

COLOMBO, A. L. Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian prospective. *Brazilian Journal Infectious Diseases* 4: 113-118, 2000.

COLOMBO, A. L, GUIMARÃES, T. Epidemiology of Hematogenous Infections due to *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L., et al. **Brazilian Network Candidemia Study**. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 2816-23, 2006.

COLOMBO A. L. *et al.* Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 28, p. 570-6, 2007.

DENG, A. P.; YANG, H. A multichannel electrochemical detector coupled with an ELISA microtiter plate for the immunoassay of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid. *Sensors and Actuators, Maryland Heights*, v. 124, n. 1, p. 202-208, 2007.

DIGNANI M, C.; SOLOMOKIN, J. S.; ANAÏSSIE E. CANDIDA. IN: AMAÏSSIE E, MCGINNS MR, PFALLER MA. **Medical Mycology**. 1 Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

DUTRA et al. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. *Talanta* 117(2013)431–437.

DUTRA, R. F. et al. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl dextran-modified gold chip. **Clinica Chimica Acta**, New York, n., p.114-120, 14 maio 2007.

EDMOND, M. B. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis*, v. 29, p. 239-44, 1999.

EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL. **Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos**. Fortaleza: Documentos, 2008. v.117.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D.; *Quimica Nova* 1992, 15, 28.

FERREIRA, L. F. Biosensor amperométrico à base de tirosinase na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais. 2005. f Dissertação - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

FRANÇA, J.C.B. Estudo das candidemia no Hospital de Clínicas no período de janeiro a dezembro de 2004. **Dissertação de Mestrado e Medicina Interna**. Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GAUA, V. *et al.* Electrochemical Molecular Analysis without Nucleic Acid Amplification. **Methods**, v.37, n.1, p.73-83, set 2005.

GEORGE, J.; MENONU, C. S. Electrical and optical properties of beam evaporated ITO thin films. **Surface and Coatings Technolog**, v. 132, n. 1, p. 45-48, 2000.

GUDLAUGSSON, O. *et al.* Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*, v. 37, p. 1172-7, 2003.

GUILBAUT, C. C.; MONTALVO, J. G. Journal of the American Chemical Society **1969, 91, 2164**.

HERKNER, H.; WALDENHOFER, U.; LAGGNER, A. N., et al. Clinical application of rapid quantitative determination of cardiac troponin-T in an emergency department setting. *Resuscit* 2001;49:259-64.

HINRICHSEN, S. L. *et al.* *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. *Braz J Microbiol*, v. 40, p. 325-8, 2009.

HOLLISTER, P.; WEENER, J. W.; ROMÁN, C.V.; HARPER, T. Nanoparticles: technology white papers. São Paulo: Científica, 2002. 11p.

JANEWAY JR, C. A. *et al.* **Imunologia; O Sistema Imune na Saúde e na Doença**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 848 p.

KARUBE, I. Em *Handbook of Measurement Science*; Sydenham, P. H.; Thom, R., eds.; Wiley: Chichester, 1992.

KLAASSEN, C. D. (ED.). **Casarett and Doull's Toxicology; The Basic Science of Poisons**. 6.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 1236 p.

KURTZMAN, C.P, FELL J. W. YARROW, D. Yeast: characteristics and identification. Cambridge: University press 2000; 1139p.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.T. (2002). **Tratado de Micologia Médica**, 9 ed., São Paulo, Sarvier, 2002.

LACAZ, C. S. *et al.* *Tratado de micologia médica*: LACAZ. Sao Paulo: Sarvier, 2002. p. 34, 125.

LEE, P. C. e MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* v. 86, p. 3391. 1982.

LEDRU, S.; RUILLE, N.; BOUJTITA, M. One-step screen-printed electrode modified in its bulk with HRP based on direct electron transfer for hydrogen peroxide detection in flow injection mode. **Biosensors And Bioelectronics**, Paris, n. ,p.1591-1598, 15 fev. 06.

LEONARD, P.; HEARTY, S.; BRENNAN, J.; DUNNE, L.; QUINN, J.; CHAKRABORTY, T.; O'KENNEDY, R. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 32, n. 1, p 3-13, 2003.

LIU, J.; CAO, Z.; LU, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. **Chem Rev**, v.109, n.5,p.1948-1998, mai 2009.

LIU, J.; CAO, Z.; LU, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. **Chem Rev**, v.109, n.5,p.1948-1998, mai 2009.

MARTIN, G. S. *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New EngJ Med*, v. 348, p. 1546-54, 2003.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v.20, p.1113-1126, agosto 2004.

MELO, A. F. **Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor Enzimático para Determinação de Taninos Hidrolisáveis**. 2008. 104f. (Dissertação Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

MIMICA, L. M. J. et al. Diagnostico de infeccao por *Candida*: avaliacao de testes de identificacao de especies e caracterizacao do perfil de suscetibilidade. *J Bras Patol Med Lab*, v. 45, p. 17-23, 2009.

MORGAN, C. L.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P.; *Clin. Chem.* 1996, 42, 193

OBAYASHI, T., et al. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. 1995, *Lancet* 345: 17-20.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **AZojono Journal of NanotechnologyOnline**, v.3, set 2007.

POULAIN D, SENDID B, STANDAERT-VITSE, A. FRADIN, C. JOUNALT, T. JAWHARA, S. Yeasts: neglected pathogens. *Dig Dis.*2009;27 Supple 1:104-10.

RAVERA, M. *et al.* DNA-Metallodrugs Interactions Signaled by ElectrochemicalBiosensors: An Overview. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v.2007, 2007.

RAY, K.; BADUGU, R.; LAKOWICZ, J. R. Metal-enhanced fluorescence from CdT e nanocrystals: A single-molecule fluorescence study. **J Am Chem Soc.** v. 128, p. 8998. 2006.

REX, J. H.; SOBEL, J. D. Prophylactic antifungal therapy in the intensive care unit. *Clinical Infectious Diseases* 32: 1191-1200, 2001.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R.I; INÁCIO, M.C.C; FERREIRA, W.N; CARDOSO, C.G; DIAS, S.M.S. Aspectos das leveduras de candida vinculada as infecções nosocomiais. **News Lab**, v.64, p. 106-26, 2004.

RUIZ, L. R. B.; ZAITZ C. Dermatofitos e dermatofitoses na cidade de São Paulo no período de agosto de 1996 a julho de 1998. *An Bras Dermatol.* 2007;76:391-401.

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

SARKO, J. S.; POLLACK JR. C. V. **Cardiac troponins**. *Clinical laboratory inemergence medicine.* *J Emerg Med* 2002;23:57-65.

SAIDMAN, S. B.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P. Amperometric detection of D-sorbitol with NAD-Dsorbitol dehydrogenasse modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 424, n. 1, p. 45-50, 2000.

SANGUINETTI, M. et al. Evaluation of vitek 2 and rapid yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, v. 45, p. 1343-6, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M.F.G. (2004). **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 388p.

SHEN, G.; TAN, S.; NIE, H. Electrochemical and piezoelectric quartz crystal detection of antisperm antibody based on protected Au nanoparticles with a mixed monolayer for eliminating nonspecific binding. **Journal Of Immunological Methods**, Changsha, n., p.11-19, 30 jun. 06.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current andFuture Directions. **International Journal of Nanomedicine**, v.1, n.4, p.433-440, 2006.

SQUIBBS, B.M.; Nosocomiais, Infecções. Educação médica continuada. **Brasil**. n. 6, 1998.

STIEGLER, H.; FISCHER, Y.; VAZQUEZ-JIMENEZ, J. Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. **Clinical Chemistry**, Texas, n. , p.1338-1344, 24 set. 2000.

THAMURA, M., et al. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group I intron. *J Clin Microbiol.* 2001, 39: 4309-15.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions andClassification. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p.121-131, 2001.

TALARMIN, J. P. *et al.* Epidemiology of candidemia: a one-year prospective observational study in the west of France. *Med Mal Infect*, v. 39, p. 877-85, 2009.

VALENZA, G. *et al.* Evaluation of new colorimetric vitek 2 yeast identification card by use of different source media. *J Clin Microbiol*, v. 46, p. 3784-7, 2008.

VANDEN-BERGH, M. F.; VERWEIJ, P. E.; Voss, A. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. *Diagn Microbiol Infect* 1999.

VENUGOPAL, V. Biosensors in fish production and quality control. *Biosensors and Bioelectronics*, Oxford, v. 17, n. 3, p. 147-157, 2002.

VIUDES, A., *et al.* **Candidemia at a Tertiary-Care Hospital: Epidemiology, Treatment, Clinical Outcome and Risk Factors for Death.** *European Journal of Microbiology Infectious Diseases* 21: 767-774, 2002.

WAHYUNINGSIH, R., *et al.* Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. 2000, 38: 3016-21.

WALDNER J. B. *Nanocomputers and swarm intelligence.* London: Wiley & Son, 2008. 188p

WANG, G. *et al.* A Living Cell Quartz Crystal Microbalance Biosensor for Continuous Monitoring of Cytotoxic Responses of Macrophages to Single-Walled Carbon Nanotubes. **Particle and Fibre Toxicology**, v.8, n.4, 2011.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.16, p.3011-3016, 2000.

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

WEY, S. B., *et al.* **Hospital acquired candidemia.** The attributable mortality and excess length of stay. *Archives of Internal Medicine* 148: 2642-2645, 1998.

ZEICHNER, L.O.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. *Journal of Critical Care Medicine* 34: 857-863, 2006.

APÊNDICES

BIOSSENSOR ÓPTICO PARA *Candida albicans* BASEADO EM RESSONÂNCIA DE PLASMON LOCALIZADO

W.W. Neves*, R.F. Dutra*, O. Pandoli***, R.P. Neves****, R.E. Araújo**

* Departamento de Engenharia Biomédica – Centro de Tecnologia e Geociências – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

** Departamento de Eletrônica e Sistemas – UFPE- Centro de Tecnologia e Geociências – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

*** Departamento de Química – PUC-RJ – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

**** Departamento de Micologia Médica – UFPE- Centro de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pernambuco

E-mail: wendellbiomedicina@gmail.com

Resumo: A frequência de infecções hospitalares por fungos patogênicos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, acarretando altos níveis de mortalidade que atingem até 60% dos óbitos, frequentes em pacientes graves internados em Unidades de Terapia Intensiva. Testes específicos para diagnóstico de septicemia por *Candida albicans* possuem altos custos e necessitam um longo tempo para a obtenção de resultados. Diante desse quadro e considerando a necessidade da constante busca por alternativas no diagnóstico de septicemias por *Candida albicans*, nesse trabalho foi desenvolvido e avaliado uma nova plataforma de sensoriamento para um imunossensor óptico, baseado em Ressonância Localizada de Plasmon. Ressonância de Plasmon corresponde a oscilação coletiva dos elétrons de condução em resposta à excitação óptica promovida pela aplicação de um campo eletromagnético externo. A plataforma de sensoriamento corresponde a uma lâmina de vidro com nanopartículas (NP) de prata aderidas em sua superfície e funcionalizadas com anticorpos monoclonais anticandida da classe das imunoglobulinas IgG. As nanopartículas utilizadas foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de absorção, indicando a presença de nanoestruturas com diâmetro médio de 15 nm. Moléculas de cisteamina foram utilizadas como ligantes no processo de funcionalização de anticorpos e glicina foi explorada como bloqueadores dos sítios não funcionalizados da plataforma. Os experimentos com diferentes concentrações de cisteamina, glicina e anticorpos foram realizados em quadruplicadas. Foi observado que quando adicionada cisteamina, glicina e anticorpos o pico de ressonância de Plasmon do sistema sofre um deslocamento para a região vermelha do espectro. Verificou-se deslocamentos do pico de Plasmon de até 54 nm. Na avaliação da plataforma como sensor de antígeno de *Candida albicans*, a detecção de diferentes concentrações de antígeno foi demonstrada. Plataformas de sensoriamento foram imersas em solução de PBS contendo antígenos nas diluições de 10 µL/ml, 20µL/ml, 40µL/ml e 60µL/ml, por um período de 1 hora, seguido

de lavagem com água MiliQ. Os resultados mostram a capacidade do sistema em identificar diluições maiores que 10µL/ml de antígeno de *Candida albicans*, indicando a possibilidade do uso da plataforma desenvolvida como imunossensor para *Candida albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*; biossensor; ressonância de plasmon.

Abstract: *The frequency of hospital infections by* The frequency of hospital infections by pathogenic fungi has increased substantially in recent decades, leading to high levels of mortality reaching up to 60% of deaths, common in critically ill patients in intensive care units. Specific tests for the diagnosis of sepsis due to *Candida albicans* have high cost and require a long time to obtain results. Given this situation and considering the need for constant search for alternatives in the diagnosis of septicemia by *Candida albicans*, this work was developed and evaluated a new sensing platform for an optical immunosensor based on Resonance Localized Plasmon. Plasmon resonance corresponds to collective oscillation of conduction electrons in response to optical excitation promoted by the application of an external electromagnetic field. The sensing platform corresponds to a glass slide with nanoparticles (NP) of silver adhered on its surface and functionalized with monoclonal anti-candida antibodies of the IgG class of immunoglobulins. The nanoparticles used were evaluated by transmission electron microscopy and absorption spectroscopy, indicating the presence of nanostructures with an average diameter of 15 nm. Cysteine molecules were used as ligands in the functionalization process was explored antibodies and glycine as blockers of non-functionalized sites of the platform. Experiments with different concentrations of cysteamine and glycine antibodies were performed in quadruplicate. It was observed that when added cysteine, glycine peak and antibodies specific Plasmon resonance is shifted to the red region of the spectrum. Peak shifts were found to

Plasmon up to 54 nm. In the evaluation of the platform as *Candida albicans* antigens sensor detecting different antigen concentrations was demonstrated. The sensing platforms were immersed in PBS solution containing dilutions of antigens in 10 μ L/ml, 20 μ L/ml, 40 μ L/ml to 60 μ L/ml for a period of 1 hour, followed by washing with MilliQ water. The results show the system's ability to identify higher dilutions than 10 μ L/ml of *Candida albicans* antigen, indicating the possibility of the use of the platform as developed immunosensor for *Candida*.

Keywords: *Candida albicans*; biosensor; plasmon resonance.

Introdução

Os biossensores são dispositivos no qual um material biológico, tal como enzima, organela, tecido animal ou vegetal, anticorpos, antígenos, lectina, ácidos nucleicos, dentre outros, são ligados à superfície ou biocamada de um transdutor. Este dispositivo é capaz de interpretar as mudanças químicas produzidas na presença de um composto biológico, originando um sinal capaz de ser interpretado elaboração destes substitutos temporários [1].

Quando este material é um antígeno ou anticorpo, estes sensores são denominados imunossensores ou biossensores imunológicos, que fazem uso da atividade antígeno/anticorpo como sinal analítico a ser monitorado [2]. Vários autores destacam o gênero *Candida* como uma das espécies de fungos mais patogênicas ao homem e ainda relatam que este gênero é isolado, com frequência, em infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos como em mucosa oral, sobretudo em indivíduos imunossuprimidos os quais são gravemente acometidos por *C. tropicalis* e *C. albicans* [3], [4], [5], [6]. A frequência de infecções hematogênicas por *Candida* sp. (candidemia) tem aumentado consideravelmente, especialmente em unidades de terapia intensiva e ou de assistência a pacientes críticos [7].

Vários métodos são utilizados para o diagnóstico das candidemias, porém cada qual com diferentes tempos para a realização, bem como diferentes percentagens de sensibilidade e especificidade na detecção destes patógenos [8]. O diagnóstico precoce desta doença tem sido extremamente difícil. Com frequência, as técnicas microbiológicas tradicionais como, "Meios de cultura", para diagnóstico da candidíase invasiva falham em detectar a doença, sendo imprescindível recorrer a múltiplas coletas de sangue para que se tenha chance de obter cultura, uma vez que a fungemia é transitória [9], [10], [11]. A busca por alternativas no diagnóstico rápido e preciso de leveduras do gênero *Candida* em pacientes com candidemia consiste em um tema de significativa relevância para a área da saúde. No que diz respeito, os biossensores vem se demonstrando importantes ferramentas para o diagnóstico rápido e preciso de diversas patologias [12].

Materiais e métodos

Preparação de lâminas de vidro com nanopartículas de prata – As lâminas com NPsAg utilizadas nesse trabalho foram produzidas pelo grupo de pesquisa de Omar Pandoli, professor da Pontifícia Universidade Católica-RJ. A metodologia aqui descrita foi empregada pelo grupo de Omar Pandoli, onde foram feitas a síntese e caracterização das nanopartículas de prata, bem sua deposição em lâmina de vidro.

A síntese das NPsAg foi feita a partir da redução do precursor nitrato de prata AgNO₃ com borohidreto de sódio, com auxílio da tecnologia de microreator em fluxo contínuo. As soluções de AgNO₃, do ligante orgânico específico (tartarato de sódio e potássio) e do borohidreto de sódio NaBH₄ foram preparadas a fim de se obter concentração de 10⁻³ mol L⁻¹. Após a etapa da síntese das nanopartículas os vidros foram limpos com detergente (Extran neutro 5% em água) com auxílio de um pano de superfície macia. O detergente foi retirado com água destilada e água MilliQ [13].

Avaliação do uso das lâminas com NpsAg para sensoriamento – foram utilizadas soluções de EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) a 2mM⁻¹ e NHS (N-hydroxysuccinimide) a 5mM⁻¹. Homogeneizou 10mL de EDC com 10mL de NHS. Os anticorpos utilizados foram as imunoglobulinas IgG de coelhos marcados com FITC (Isotiocianato de fluoresceína). Posteriormente concentrações de 20 μ L de anticorpos marcados com FITC em uma concentração de 5mg/mL⁻¹ foram adicionados a solução de EDC+NHS juntamente com as lâminas, permanecendo por um período de 2h para funcionalizar o grupamento carboxila dos anticorpos [14].

Preparação da plataforma de sensoriamento – Inicialmente as lâminas contendo nanopartículas aderidas foram imersas em uma solução de água e ácido nítrico (HNO₃) (Sigma-Aldrich) em uma concentração de 0.2M, afim de retirar possíveis microrganismos que venham a afetar as reações nas próximas etapas.

As lâminas foram imersas por 2 horas em uma solução de Cisteamina (2-aminoethanethiol) (Sigma-Aldrich) a 50mM em etanol. A Cisteamina possui em sua estrutura um enxofre no grupo tiol que se ligará covalentemente as nanopartículas de prata, e uma função amina (N₂H) que permitirá a ligação do grupamento carboxila dos anticorpos, criando uma "ponte" entre a nanopartícula e o anticorpo [14].

Funcionalização dos anticorpos da plataforma – A funcionalização de anticorpos em lâminas com prata foram realizadas em duas etapas. A primeira etapa consiste no uso de anticorpos marcados com molécula fluorescente, para a verificação, por microscopia de fluorescência, da ligação anticorpo-plataforma de sensoriamento. Em uma segunda etapa foram funcionalizados anticorpos monoclonais anti-*Candida* da classe das imunoglobulinas IgG produzidas em coelhos (GenWayBio), seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, utilizando diluições de 10 μ L, 20 μ L, 40 μ L e 60 μ L de anticorpos. As lâminas foram

imersas em uma solução aquosa de Glicina (Sigma-Aldrich) a 50mM por 1 hora. Após esta etapa as lâminas foram lavadas com água MiliQ para retirar o excesso de Glicina na amostra. Esta etapa evitou que os antígenos utilizados aderissem aos grupos funcionais amina livres presentes na Cisteamina que não foram preenchidos com os anticorpos[14].

Análise por microscopia – Foram avaliadas as propriedades microestruturais, físicas, mecânicas e espectroscópicas dos filmes.

A técnica de microscopia de fluorescência foi utilizada na avaliação do resultado do processo de funcionalização de anticorpos marcados com FITC na plataforma do sensor. As lâminas preparadas foram analisadas em microscópio por fluorescência da NIKON com a câmera (Sensicam qe - The Cook Corporation) em exposição por 24s em ambiente escuro para a detecção da fluorescência dos anticorpos ligados ao grupamento amina da lâmina silanizada e das NPsAg.

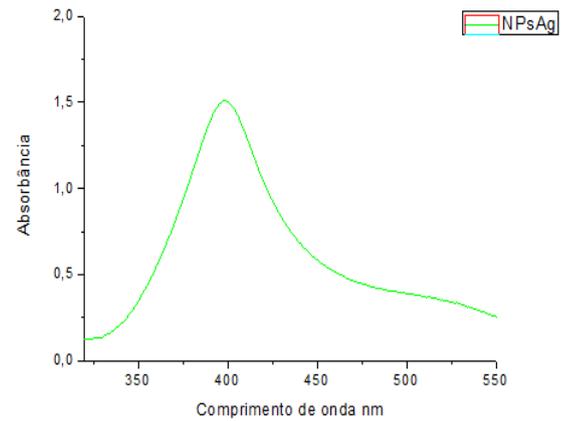
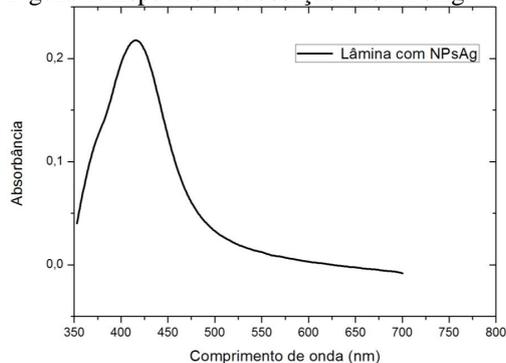
Microscopia eletrônica de transmissão também foi explorada para na análise das nanoestruturas metálicas na superfície da lâmina. As imagens foram feitas pelo grupo de pesquisa de Omar Pandoli na PUC-Rio.

Análise por espectrometria uv-vis- As lâminas foram avaliadas através da técnica de espectrometria de absorção no UV-VIS modelo Evolution 600 (Figura 8). O equipamento de espectroscopia está disponível no Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens. Os espectros foram adquiridos na região de 350 a 800 nm. O sistema possui resolução espectral de 0,2nm.

Resultados

Caracterização das nanopartículas em solução – Nanopartículas de prata foram sintetizadas e avaliadas por espectroscopia óptica de absorção feitas pelo grupo de pesquisa de Omar Pandoli da PUC-Rio. A figura 1 mostra o espectro de absorção das NPsAg em solução (antes da deposição na lamina de vidro) com um pico no comprimento de onda de 400nm, o que indica a existência de nanopartículas de prata como resultado da síntese estabelecida. Essas nanopartículas de prata foram utilizadas para deposição em lâminas de vidro silanizadas com MPTS.

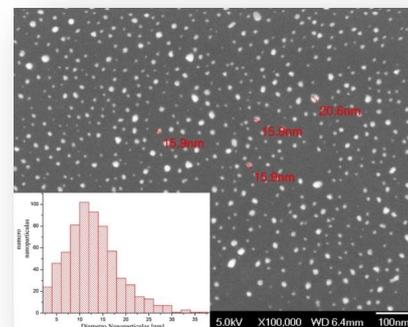
Figura 1: Espectro de absorção das NPsAg.



Caracterização das lâminas com NpsAg PUC-Rio– Nanopartículas de prata já depositadas em lâminas de vidro funcionalizado com MPTS, foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão pelo grupo de pesquisa de Omar Pandoli na PUC-Rio, indicando a presença de NPsAg com diâmetro médio de 15 nm, como apresenta a figura 2, corroborando assim com a análise espectral no que se refere ao tamanho das nanopartículas.

A figura 2 foi cedida por Omar Pandoli da PUC-Rio.

Figura 2: Imagem das NPsAg por TEM



A figura 3 mostra o espectro de absorção no UV-Vis das lâminas com nanopartículas de prata obtidas pelo grupo de professor Omar Pandoli (PUC-Rio). Observa-se a curva referente a absorção das NPsAg. A análise espectral foi feita no LEB (Laboratório de Óptica Biomédica-UFPE). Ainda analisando informações retiradas do gráfico, observa-se que a banda de plasmom representadas no gráfico corresponde às nanopartículas de prata, tendo seu pico máximo em 420nm.

Figura 3: Espectro de absorção no UV-Vis das lâminas com nanopartículas de prata.

Análise das lâminas com anticorpos marcados por microscopia de fluorescência- A avaliação da plataforma de sensoriamento, como dito anteriormente na metodologia, foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa, o estudo piloto, foi utilizado todo o sistema, mas como a adição de anticorpos marcados com FITC. A figura 4 mostra a imagem obtida por microscopia de fluorescência da lâmina com NPsAg sinalizadas (MPTS) sem anticorpos marcados (A) e com adição de anticorpos IgG marcados com FITC (B).

Verifica-se que a figura 4 (B) apresenta maior brilho que a figura 9 (A), mostrando que houve uma ligação entre os anticorpos e a plataforma de desenvolvida. O controle negativo (A), lâmina sem anticorpos, mostrou ausência de fluorescência. Constata-se que a intensidade média da imagem (B) é aproximadamente três vezes maior que a intensidade média referente a imagem (A).

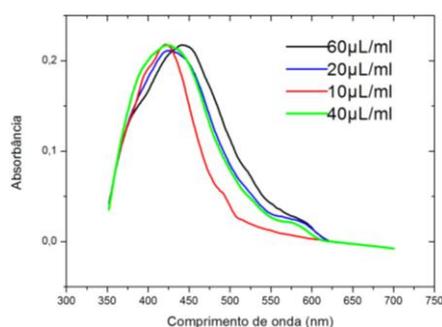
Esse resultado indica a possibilidade de explorar ligação de imunocompostos em laminas de vidro com NPsAg aderidas em sua superfície.

Figura 4: **A)** Imagem da lâmina apenas com silano e NPsAg; **B)** Imagem da lâmina funcionalizada aderida com nanopartículas e anticorpos marcados.



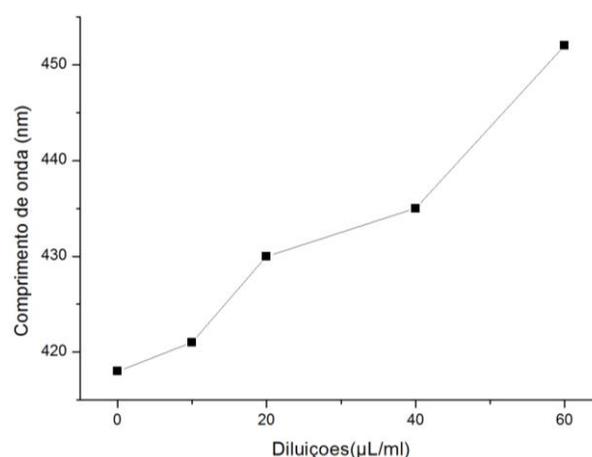
Análise com anticorpos anti-candida- A figura 5 representa a análise feita em espectrometria de absorção no UV-VIS após a adição dos anticorpos anti-candida na lâmina funcionalizada (NPsAg+cisteamina+Glicina). Inicialmente foi utilizado soluções mínimas de 50 ng/mL e soluções máximas de 300 ng/mL de anticorpos respectivamente.

Figura 5: Espectro de absorção da lâmina funcionalizada com adição de anticorpos anti-candida em diferentes concentrações.



Foi analisado um aumento gradativo do espectro de absorção nas diferentes concentrações, podendo apenas ser observado um deslocamento de pico significativo quando utilizado soluções máximas de 300 ng/mL de anticorpos, tonando assim a concentração ideal observada. A figura 6 representa o comportamento do pico de plasmon em diferentes concentrações e comprimentos de onda, apresentando um deslocamento máximo do pico em ~31nm, quando utilizado soluções de 300 ng/mL de anticorpos.

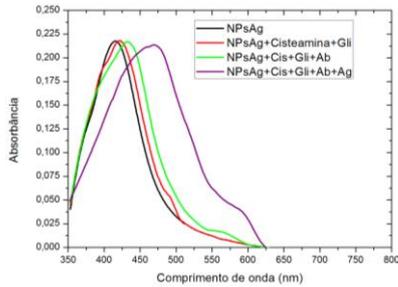
Figura 6: Comportamento do pico de absorção de plasmon da lâmina funcionalizada com adição de anticorpos anti-candida.



Avaliação da plataforma na detecção de antígenos de *Candida albicans*- A linha representada pela cor preta nos mostra o pico de ressonância da lâmina funcionalizada apenas com nanopartículas de prata em 423nm. Após a adição do ligante cisteamina e bloqueador glicina a superfície das nanopartículas de prata, representada pela linha vermelha, é observado um deslocamento de ~10nm do pico de ressonância em relação ao gráfico da lâmina apenas com as nanopartículas. Na figura 7 o espectro em verde é obtido após a adição dos anticorpos anti-candida a superfície das nanopartículas de prata com cisteamina e glicina aderidas. Um deslocamento de 20nm em relação a primeira curva é observado devido ao deslocamento da frequência de ressonância.

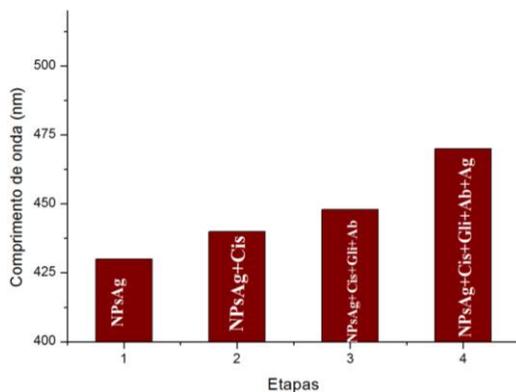
Como resultado da etapa final, ou seja, à adição dos antígenos específicos para *C. albicans* representado pela curva roxa, podemos observar o deslocamento de 52nm em relação ao primeiro pico, representado apenas por nanopartícula aderidas no vidro. Tal deslocamento se deve a confirmação da ligação antígeno/anticorpo proporcionada pela metodologia utilizada. Houve um deslocamento significativo da absorção após a adição dos antígenos, o que nos mostra que há um potencial para o desenvolvimento de imunossensores eficientes baseados em ressonância de plasmons.

Figura 7: Espectro de absorção da lâmina funcionalizada com adição de anticorpos anti-candida e antígenos específicos.



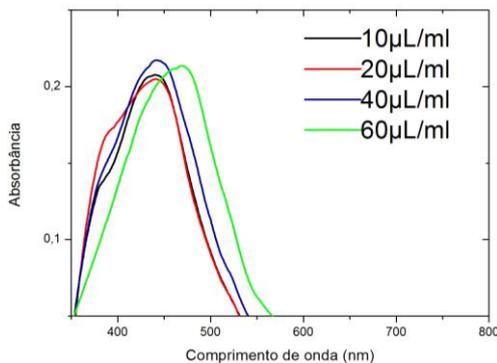
A figura 8 confirma os resultados anteriores referentes as etapas de preparação da plataforma de sensoriamento, onde é observado um deslocamento gradual do pico de ressonância de plasmon em relação a concentrações do sistema antígeno/anticorpo na superfície das nanopartículas de prata aderidas no vidro.

Figura 8: Posição de pico de plasmon localizado para diferentes etapas.



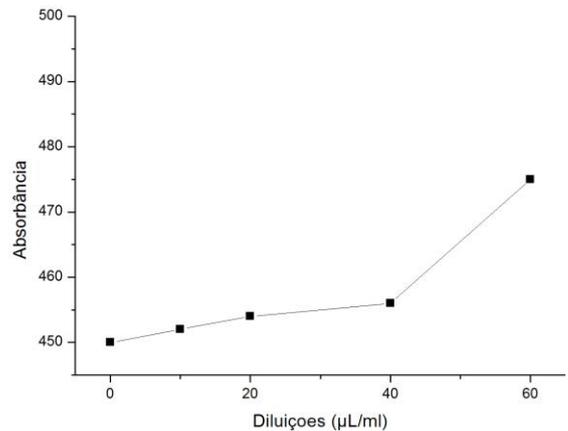
Para avaliar a capacidade de identificação de antígenos pela plataforma desenvolvida os antígenos de *Candida albicans* foram depositadas na superfície da plataforma em concentrações que variaram de 10 $\mu\text{L/ml}$ a 60 $\mu\text{L/ml}$, como mostra a figura 9.

Figura 9: Espectro de absorção da plataforma com adição de antígenos de *C. albicans* em diferentes concentrações.



A figura 10 representa o comportamento do pico de plasmon em diferentes concentrações e comprimentos de onda analisadas, mostrando um deslocamento máximo do pico em $\sim 52\text{nm}$, quando utilizado a diluições de 300 ng/ml de antígenos. Vale ressaltar que, quanto maior a concentração de Ag maior é o deslocamento do pico de absorção.

Figura 10: Comportamento do pico de absorção de plasmon da plataforma com adição de antígenos de *C. albicans*.



Discussão

Neste trabalho foi demonstrado o potencial de uso de uma nova plataforma de sensoriamento baseada no efeito de ressonância de plasmon localizados. A nova plataforma foi avaliada na detecção de antígenos de *Candida albicans*. Ressonância de plasmon corresponde a oscilação coletiva dos elétrons de condução em resposta à excitação óptica promovida pela aplicação de um campo eletromagnético externo. A frequência de ressonância dos Plasmons, associado ao comprimento de onda de pico no espectro de absorção, depende de fatores tais como o tamanho médio, a forma, o meio no qual estão as nanopartículas, a densidade de elétrons e a massa eletrônica efetiva.

A estrutura do novo sensor consiste basicamente de uma lamina de vidro com nanopartículas de prata (15nm), e uma camada de anticorpo de *C. Albicans* aderida a nanoestrutura metálica, por uma molécula de Cisteamina. Glicina também foi utilizada como bloqueadora dos sítios não funcionalizados do sensor. O desenvolvimento da plataforma de sensoriamento foi estabelecido em parceria com um grupo de pesquisa da PUC-Rio, que silanizaram com MPTS as lâminas de vidro bem como o depositaram nanopartículas de prata na superfície do vidro.

Microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de transmissão foram utilizadas na avaliação da aderência das NP na lâmina de vidro.

Na construção da plataforma de sensoriamento, diferentes concentrações de Cisteamina foram exploradas. A adesão da Cisteamina nas NP foi comprovada com a análise do deslocamento do espectro de absorção da prata. A incorporação de anticorpo de *C. albicans* na plataforma também introduziu modificações no espectro do sistema. Foi avaliada a resposta óptica da estrutura estabelecida com o uso de diferentes soluções de anticorpos (50 ng/mL até 300 ng/mL). Utilizando diluições de 300 ng/mL de anticorpos foi observado um deslocamento de 52nm do pico de Plasmon ao adicionar soluções de 300 ng/mL de antígenos.

Na avaliação da plataforma como sensor de antígeno de *Candida Albicans*, a detecção de diferentes concentrações de antígeno foi demonstrada. Os resultados mostram a capacidade do sistema em identificar diluições maiores que 50 ng/mL de antígeno de *Candida*.

Os resultados obtidos verificaram-se que a plataforma desenvolvida pode ser explorada como imunossensor para *C. albicans*. Não existem sensores de fungos baseados em ressonância de plasmon localizados, o que torna a plataforma desenvolvida em um sistema inovador. Porém estudos complementares ainda precisam ser realizados para o estabelecimento dos limites do sensor. É necessária a avaliação da detecção de antígeno em plasma sanguíneo.

Referências

- [1] CLARK JR., L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Acad. Sei, NEW YORK*, 1962, 29.
- [2] GEORGE, J.; MENONU, C. S. Electrical and optical properties of beam evaporated ITO thin films. **Surface and Coatings Technolog**, v. 132, n. 1, p. 45-48, 2000.
- [3] COLOMBO, A. L., et al. **Brazilian Network Candidemia Study**. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2816-2823, 2006.
- [4] COLOMBO A. L. *et al.* Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*, v. 28, p. 570-6, 2007.
- [5] FRANÇA, J.C.B. Estudo das candidemia no Hospital de Clínicas no período de janeiro a dezembro de 2004. **Dissertação de Mestrado e Medicina Interna**. Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- [6] JANEWAY JR, C. A. *et al.* **Imunologia; O Sistema Imune na Saúde e na Doença**. 6.ed.Porto Alegre: Artmed, 2007. 848 p.
- [7] ALMIRANTE, B.; RODRIGUES D.; PARK, B. J. Epidemiology and predictor of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology** 43: 1829-1835, 2005.
- [8] KURTZMAN, C.P, FELL J. W. YARROW, D. Yeast: characteristics and identification. Cambridge: University press 2000; 1139p.
- [9] LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.T. (2002). **Tratado de Micologia Médica**, 9 ed., São Paulo, Sarvier, 2002.
- [10] MIMICA, L. M. J. *et al.* Diagnostico de infeccao por *Candida*: avaliacao de testes de identificacao de especies e caracterizacao do perfil de suscetibilidade. *J Bras Patol Med Lab*, v. 45, p. 17-23, 2009.
- [11] ZEICHNNRER, L.O.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiases in the intensive care unit. *Journal of Critical Care Medicine* 34: 857-863, 2006.
- [12] AHAMMAD, A. J. Saleh; LEE, Jae-Joon; RAHMAN, Md. Aminur. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. **Sensors**, v.9, p.2289-2319, mar 2009.
- [13] Spectroscopic evaluation of surface functionalization efficiency in the preparation of mercaptopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayers on glass *Journal of Colloid and Interface Science* 332 (2009) 432-438.
- [14] DUTRA et al. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. *Talanta* 117(2013)431-437.