



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

GABRIELLI MARIA FERREIRA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOESTRUTURADA DE
SENSORIAMENTO ÓPTICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *CANDIDA*
*ALBICANS***

Recife
2017

GABRIELLI MARIA FERREIRA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOESTRUTURADA DE
SENSORIAMENTO ÓPTICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *CANDIDA*
*ALBICANS***

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.

Área de concentração: Bioengenharia

Linha de pesquisa: Instrumentação Diagnóstica e Terapeuta

Orientador: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo

Recife
2017

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

- | | |
|------|--|
| O48d | <p>Oliveira, Gabrielli Maria Ferreira de.</p> <p>Desenvolvimento de plataforma nanoestruturada de sensoriamento óptico para a identificação de <i>candida albicans</i> / Gabrielli Maria Ferreira de Oliveira. – 2017.</p> <p>58folhas, Il., Abre. e Sigl.</p> <p>Orientadora: Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação de Engenharia Biomédica, 2017.</p> <p>Inclui Referências e Apêndices.</p> <p>1. Engenharia Biomédica. 2. <i>Candida albicans</i>. 3. Biossensor óptico. 4. Nanopartículas. I. Araújo, Renato Evangelista de (Orientador). II. Título.</p> <p>UFPE</p> <p>610.28 CDD (22. ed.)</p> <p>BCTG/2017-367</p> |
|------|--|

GABRIELLI MARIA FERREIRA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA NANOESTRUTURADA DE
SENSORIAMENTO ÓPTICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE *CANDIDA*
*ALBICANS***

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

Orientador: _____

Prof. Dr. Renato Evangelista de Araújo, Doutor pela
Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil

Banca Examinadora:

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

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

Prof. Dr. Armando Marsden Lacerda Filho, UFPE
Doutor pela University of St Andrews, Escócia

Recife, fevereiro de 2017.

A Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

A minha mãe, pelo amor incondicional, pelas palavras de sabedoria, por sempre me apoiar e me incentivar a nunca desisti dos meus sonhos.

*A minha família: avós, tios e tias, primos e primas, pelo amor, apoio, confiança e motivação.
Que sempre me impulsionam em direção às vitórias dos meus*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar á **Deus** que iluminou o meu caminho durante esta jornada e que me deu força e saúde para finalizar mais um ciclo importante na minha vida.

A minha mãe **Graça Ferreira** meu alicerce, a pessoa que me incentiva, e me apóia em todos os momentos da minha vida e por quem eu tenho uma admiração e um amor incondicional, TE AMO. A meu irmão **Gabriel Júnior**, meu presente de Deus, ele que me faz sorrir em meio às turbulências diárias, TE AMO.

Aos meus familiares, meus avôs, meus tios e tias e aos meus primos, que me deram força, coragem e me apoiaram nos momentos de dificuldades e tristezas e vibraram comigo nos momentos de alegria.

Durante estes dois anos muitas pessoas participaram da minha vida. Algumas já de longas datas, outras mais recentemente. Dentre estas pessoas algumas se tornaram muito especiais, cada uma ao seu modo, seja academicamente ou pessoalmente, e seria difícil não mencioná-las.

A meu orientador **Prof. Dr. Renato Evangelista de Araujo** por toda paciência, durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado, pelos ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo destes dois anos de pesquisa e estudo.

A **Emmerson Dantas** pela compreensão, paciência, força e por estar comigo em todos os momentos de dificuldades.

Aos professores da Universidade Federal de Pernambuco, que iluminaram de maneira especial os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos, em especial, ao professor **Dr. Reginaldo Gonçalves**, por todas as oportunidades oferecidas ao longo desse caminho e ensinamentos. A professora **Drª Rosa Dutra** por tudo que me ensinou, pelo incentivo, compreensão e oportunidades durante esses dois anos de pesquisa.

Aos meus companheiros de trabalho que estiveram comigo durante essa caminhada, meu obrigada a todos do LOBI (Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens) em especial a **Wellington, Marcos, Fabio e Sajid**.

Aos meus colegas de turma que, além de se tornarem AMIGOS, juntos, tornaram essa caminhada mais leve. Meu muito obrigado á **Thaís Nayara, Leandro, Ana Paula, Valter, Heuryk, Flávia, Ossamu, David, Dayvisson e Thiago**, pelos

momentos de amizade e descontração no decorrer do Mestrado. Hoje estamos colhendo, juntos, os frutos do nosso empenho.

A todos os amigos do LAPED (Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico), **Gilvânia, Elaine Vaz, Erika Lima, Erika Trindade, Cybelle, Anne Kelly...** E em especial á **Priscila Dias Mendonça**, pela força e amizade durante todo esse período.

A **Wendell Wons Neves**, pela amizade e incentivo durante o mestrado.

Aos amigos de convivência diária, em especial a **Luiz Maia, Ertênia e Robson**.

A professora **Dr^a Ivone Antônia de Sousa** e aos colegas e amigos conquistados em seu laboratório, pela força e carinho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Obrigado a todos que participaram diretamente e indiretamente desta etapa da minha vida e por estarem comigo neste momento tão especial, que Deus abençoe cada um de vocês.

A todos, o meu muito obrigado!

Gabrielli Maria Ferreira de Oliveira

“Maravilhoso é volver os olhos para trás e constar quantos obstáculos vencidos, quantos sacrifícios, quantos esforços, quantas preocupações... Mas é maravilhoso ainda olhar para frente com fé, sabendo que existe uma força maior, que nos acompanha dia-a-dia, e que, ao descortinarmos um novo horizonte poderemos fazer o bem, doando àqueles que precisam, um pouco do que sabemos” (autor desconhecido).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

A frequência de infecções hospitalares por fungos patogênicos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, acarretando altos níveis de mortalidade. O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui uma causa relevante de infecções da corrente sanguínea em pacientes imunodeprimidos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Testes específicos para diagnóstico de infecções hematogênicas por *Candida albicans* possuem custos elevados e necessitam de um longo período para a obtenção de resultados, o que indica a necessidade de novas alternativas para o diagnóstico de candidemias. No presente trabalho, uma plataforma coloidal de nanopartículas de ouro foi desenvolvida para a detecção de leveduras de *Candida albicans*. Aqui, explora-se a interação de luz com a plataforma nanoestruturada para a identificação de leveduras. Em particular, a interação da luz com nanopartículas metálicas pode levar a uma oscilação coletiva dos elétrons do metal, induzindo um espalhamento da radiação incidente (ressonância de plasmon localizado). A plataforma de sensoriamento corresponde a uma solução aquosa com nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpos monoclonais anti-*candida* da classe das imunoglobulinas IgG. No desenvolvimento da plataforma, foram explorados colóides com nanopartículas de 5nm e 50nm diâmetro. Moléculas de Cisteamina foram empregadas como ligantes no processo de funcionalização de anticorpos e a Glicina foi utilizada para bloquear os sítios não funcionalizados da plataforma. A plataforma e todas suas etapas de fabricação foram avaliadas por espectroscopia de absorção. Foi observado que o pico de ressonância de plasmon sofre deslocamento espectral quando Cisteamina, anticorpos, Glicina e antígenos são associados à superfície nanoestruturada de ouro. Com o sistema desenvolvido, foi possível identificar antígenos de *Candida albicans* (concentrações maiores que 3µg/mL) em solução aquosa, indicando a possibilidade do uso da plataforma como imunossensor.

Palavras-chaves: *Candida albicans*. Biossensor óptico. Nanopartículas.

ABSTRACT

The frequency of nosocomial infections with pathogenic fungi has increased considerably in recent years, leading to high levels of mortality. *Candida* is responsible for about 80% of fungal infections in hospitals and is a relevant cause of bloodstream infections in immunocompromised patients at intensive care units (ICUs). Specific tests for the diagnosis of hematogenous infections by *Candida albicans* have high costs and require a long period to obtain results, which indicates the need for new alternatives for the candidemia diagnosis. In the present work, a colloidal platform of gold nanoparticles was developed for the detection of *Candida albicans* yeasts. Here, we explore the interaction of light with the nanostructured platform for the identification of yeasts. In particular, the interaction of light with metallic nanoparticles can lead to a collective oscillation of electrons, inducing the scattering of incident radiation (localized plasmon resonance). The sensing platform corresponds to an aqueous solution of gold nanoparticles functionalized with anti-*Candida* monoclonal antibodies of the immunoglobulin class IgG. In the development of the platform, colloids with nanoparticles of 5nm and 50nm diameter were explored. Cysteamine molecules were employed as binders in the process of antibody functionalization and Glycine was used to block the non functionalized sites of the platform. The platform and all of its manufacturing steps were evaluated by absorption spectroscopy. It has been observed that the peak plasmon resonance undergoes spectral shift when Cysteamine, antibodies, Glycine and antigens were associated with the nanostructured gold surface. With the developed system, it was possible to identify *Candida albicans* antigens (concentrations greater than 3 μ g / mL) in solution, indicating the possibility of using the platform as an immunosensor.

Keywords: *Candida albicans*. Biosensor optical. Nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: (a) – Macroscopia de <i>C. albicans</i> em meio ágar Sabouraud; (b) – Micromorfologia de <i>C. albicans</i>	17
Figura 2: Representação esquemática dos elementos constituintes de um biossensor.....	23
Figura 3: Estrutura molecular do anticorpo da classe IgG, demonstrando a presença das cadeias leves e pesadas, e os sítios de reconhecimento antigênico.....	25
Figura 4: Representação esquemática da imobilização de anticorpos sobre a plataforma de sensoriamento.....	26
Figura 5: Reação de ativação dos grupos carboxílicos do anticorpo <i>via</i> EDC/NHS.	27
Figura 6: Ilustração da dispersão de colóides de ouro de vários tamanhos.....	29
Figura 7: Comportamento da nuvem eletrônica de uma esfera metálica.....	29
Figura 8: Sistema dispersivo.....	31
Figura 9: Representação Esquemática do Sistema.....	34
Figura 10: Nanopartículas de ouro funcionalizadas com Cisteamina.....	35
Figura 11: Imobilização de anticorpo anti- <i>Candida albicans</i> em NPAu com Cisteamina.....	36
Figura 12: Estrutura química da Glicina.....	36
Figura 13: Representação esquemática da plataforma de sensoriamento.....	37
Figura 14: Representação esquemática da plataforma de sensoriamento, para detecção de antígenos de <i>Candida albicans</i>	38
Figura 15: Espectro de absorção das NPsAu 5nm (a) e 50nm (b).....	39
Figura 16: Colóides com nanopartículas de diferentes tamanhos.....	40
Figura 17: Espectros de absorção das NPsAu 5nm (a) e 50nm (b) após a funcionalização com Cisteamina.....	40
Figura 18: Mudança no comprimento de onda do pico de plasmon em relação ao tempo, para NpsAu de 5nm (a) e 50nm (b) com a adição da Cisteamina.....	41
Figura 19: Espectros de absorção após a adição de anticorpos anti- <i>Candida albicans</i> na solução coloidal de NpsAu e Cisteamina, em (a) NpsAu com 5nm de diâmetro e (b) com NpsAu 50nm de diâmetro.....	42
Figura 20: Avaliação de diferentes concentrações de anticorpos anti- <i>Candida albicans</i> , quando adicionados a plataforma de sensoriamento, em (a) NpsAu 5nm e em (b) NpsAu 50nm.....	43
Figura 21: Espectros de absorção após a adição da Glicina, em (a) solução contendo NpAu com 5nm e em (b) solução contendo NpAu com 50nm.....	44
Figura 22: Comprimento de onda do pico de ressonância de plasmon localizado para diferentes etapas de preparação da plataforma com Nps de 5nm (a) e (b) 50nm de diâmetro.....	45
Figura 23: Comprimento de onda do pico de plasmon para as diferentes concentrações de antígenos de <i>Candida albicans</i>	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Au: Ouro

Ac: Anticorpo

Ag: Antígeno

C. albicans: *Candida albicans*

C. glabrata: *Candida glabrata*

C. tropicalis: *Candida tropicalis*

C. krusei: *Candida krusei*

C. parapsilosis: *Candida parapsilosis*

C. kefyr: *Candida kefyr*

(–COOH): Carboxila

DNA (RAPD): Random Amplification of Polymorphic

EDC: *N*-etil-*N*-(dimetilaminopropil) carbodiimida

g: Grama

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IgD: Imunoglobulina D

IgE: Imunoglobulina E

LSPR: Ressonância de plasmon de superfície localizada

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight

mL: Mililitros

(–NH₂): Amina

nm: Nanômetros

NHS: *N*-hidroxi-succinamida

NPs: Nanopartículas

(–OH): hidroxíla

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PCR-EIA: PCR-enzyme immunoassay

pH: Potencial Hidrogênionico

RNA: Ácido Ribonucléico

(–SH): Tiol

sp.: espécie

spp.: espécies

µg: Microgramas

µL: Microlitros

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Biologia e taxonomia do gênero <i>Candida</i> sp.	17
2.1.1 <i>Candida</i> como agente etiológico	18
2.1.2 Candidemia hospitalar	19
2.1.3 <i>Candida albicans</i>	20
2.1.4 Diagnóstico laboratorial da levedura.....	21
2.2 Biossensores.....	22
2.2.1 Classificação dos transdutores.....	23
2.2.2 Bioreceptores	24
2.2.3 Imobilização de anticorpos.....	26
2.3 Nanotecnologia.....	28
2.3.1 Interação da luz com nanopartículas	28
2.3.2 Espectroscopia óptica de nanopartículas	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Reagentes e Materiais.....	33
4.2 Caracterização das Nanopartículas de Ouro	33
4.3 Desenvolvimento da Plataforma de Sensoriamento	34
4.3.1 Funcionalização das nanopartículas	34
4.3.2 Imobilização dos anticorpos anti- <i>candida albicans</i>	35
4.3.3 Associação de glicina (ácido aminoacético).....	36
4.3.4 Conjugação antígeno - anticorpo.....	37

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1 Caracterização das nanopartículas.....	39
5.2 Análise das NpsAu funcionalizadas com cisteamina	40
5.3 Análises da imobilização dos anticorpos anti-<i>Candida albicans</i> na plataforma de sensoriamento.	41
5.4 Bloqueio utilizando glicina	43
5.5 Avaliação da plataforma na detecção de antígenos de <i>Candida albicans</i>	44
6 CONCLUSÕES.....	47
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE A – TRABALHO ENVIADO PARA O CLEO®/EUROPE EQEC 2017	58

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de infecções hospitalares por fungos tem aumentado de maneira significativa nos últimos anos, devido, sobretudo ao aumento da população de risco. O uso de dispositivos médicos invasivos por longos períodos, também constitui fator de risco para a ocorrência destas infecções, uma vez que estes podem ser colonizados por micro-organismos, constituindo assim uma porta de entrada para o patógeno. O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções hematogênicas em pacientes imunodeprimidos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (MENEZES *et al.*, 2012; DEMITTO *et al.*, 2012).

Em casos de infecção grave e sistêmica, a melhora ou até a sobrevivência do paciente depende da rápida identificação do patógeno e, consequentemente, da introdução precoce da terapia antifúngica apropriada (MIMICA *et al.*, 2009). Apesar de a *Candida albicans* ser a espécie mais comumente isolada nas infecções superficiais ou invasivas, a incidência de infecções provocadas por *Candida* não-*albicans* é crescente (TAMURA *et al.*, 2007; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; EGGIMANN *et al.*, 2011). No Brasil, as principais espécies causadoras de candidemia são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. (COLOMBO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014).

Atualmente, 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 (MIMICA *et al.*, 2009).

O diagnóstico clínico, com base na sintomatologia e na anamnese do paciente não é conclusivo tendo em vista que os sinais e sintomas clínicos não são específicos. O isolamento da levedura a partir de uma única hemocultura pode ser evidência suficiente para iniciar o tratamento da infecção. No entanto, a positividade das hemoculturas é estimada entre 40% e 60% nos casos de doença invasiva. Em pacientes pediátricos, os níveis de sensibilidade podem ser ainda mais reduzidos, devido à coleta de pequenos volumes de sangue (EGGIMANN *et al.*, 2011).

A partir década de 90, surgiram os meios de cultura cromogênicos, onde auxiliam na triagem de leveduras patogênicas, bem como métodos sorológicos, nos quais é avaliada a presença de antígenos ou anticorpos anti-*Candida* no soro e as técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) (MENEZES, *et al.*, 2012), *PCR-enzyme immunoassay* (PCR-EIA) e a técnica de sequenciamento de DNA (THAMURA *et al.*, 2001; MIMICA *et al.*, 2009; CHIBANA; MIKAMI, 2003). No entanto, o uso de algumas destas ferramentas é extremamente limitado por várias razões, como: são onerosas, requerem uma considerável experiência do manipulador e não são adequadas para diagnóstico de rotina (KANDE, *et al.*, 2002).

Uma das alternativas para superar determinadas limitações decorrentes de técnicas tradicionais na identificação de fungemias consiste no desenvolvimento e aperfeiçoamento de biossensores. Os biossensores são dispositivos capazes de interpretar as mudanças químicas produzidas na presença de um composto biológico, originando um sinal mensurável (MURUGAIYAN *et al.*, 2014).

Quando o material biológico é um antígeno ou anticorpo, esses sensores são denominados imunossensores. A alta afinidade da interação do anticorpo ao seu alvo antigênico, associada aos sistemas transdutores, possibilita a aplicação dos imunossensores para detecção de diferentes analitos com alta seletividade e sensibilidade (TRILLING *et al.*, 2013).

Considerando a necessidade de implementar novas técnicas para o diagnóstico rápido e preciso de leveduras do gênero *Candida* em pacientes com candidemia, o presente estudo teve por objetivo desenvolver um imunossensor óptico baseado em uma plataforma coloidal de nanopartículas de ouro para detecção de *Candida albicans*.

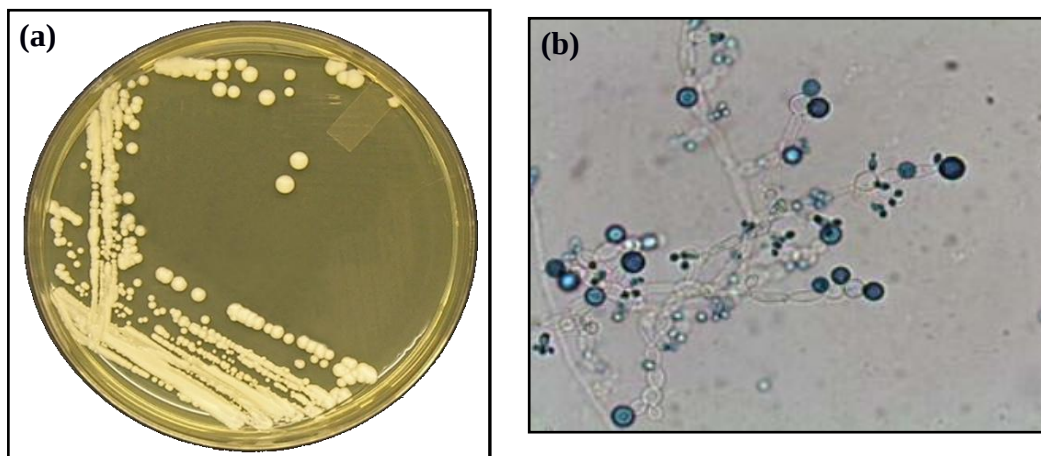
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biologia e taxonomia do gênero *Candida* sp.

As leveduras são fungos unicelulares de forma esférica, ovóide ou mesmo alongada, capazes de se reproduzirem por brotamento ou gemulação. As leveduras estão amplamente distribuídas no meio ambiente, podendo ser encontradas no solo, água e objetos contaminados por material orgânico de homens e animais (LACAZ *et al.*, 2002).

São classificadas taxonomicamente no reino *fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptoccaceae* (LACAZ *et al.*, 2002; KURTZMAN *et al.*, 2011). Do ponto de vista taxonômico cerca de 200 espécies de *Candida* são reconhecidas, das quais aproximadamente 10% podem causar infecções em seres humanos. Destas, *Candida albicans*, representada na Figura 1a e 1b, é a espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções hospitalares em vários países (GIOLO, SVIDZINSKI, 2010). No entanto, *C. parapsilosis* tem emergido nos últimos anos, sendo um isolado comum em candidemias, sobretudo em alguns grupos de pacientes, como neonatos e pacientes transplantados, além de indivíduos que estão recebendo nutrição parenteral (MARLUCHE; SANTOS, 2008; TROFA *et al.*, 2008; MENESES *et al.*, 2012).

Figura 1: (a) – Macroscopia de *C. albicans* em meio ágar Sabouraud; (b) – Micromorfologia de *C. albicans*.



Fonte: OLIVEIRA, 2014.

Segundo Sidrim e Rocha (2004), a primeira documentação de levedura do gênero *Candida* como patógeno é atribuída a Langenbeck em 1839. Esses micro-organismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, que são elementos essenciais ao seu desenvolvimento. Devido a sua capacidade adaptativa, essas leveduras podem se desenvolver tanto na presença de oxigênio (leveduras aeróbias), como na ausência (anaerobiose). Na maioria das vezes se reproduzem de maneira assexuada, por meio de estruturas denominadas conídios, entretanto algumas espécies se multiplicam sexualmente (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). A parede celular fúngica é uma estrutura complexa composta por proteínas, polissacarídeos (80-90% da composição) e glicoproteínas. Estes componentes promovem rigidez, suporte osmótico e proteção física à célula. Os polissacarídeos compreendem as glucanas, mananas e, em menor quantidade, a quitina. (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Algumas espécies de *Candida* sp. habitam primariamente o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota normal da vagina, da uretra e do trato respiratório (ALONSO-VALLE *et al.*, 2003). No entanto, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro esses fungos podem se tornar patogênicos, por isso são considerados oportunistas. A transformação da levedura da forma comensal, para a forma patogênica, ocorre devido ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro (imunossupressão), ou rompimento das barreiras anatômicas, como queimaduras, cateteres ou cirurgias invasivas (DIGNANI *et al.*, 2003; STEINBACH, *et al.*, 2010; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

2.1.1 *Candida* como agente etiológico

As infecções por leveduras do gênero *Candida* são iniciadas por modificações que ultrapassam o equilíbrio do binômio parasito/hospedeiro. Dessa forma, quando as defesas do organismo estão comprometidas, o fungo, por mecanismos de patogênese, rompe o equilíbrio entre o comensal e o hospedeiro, causando a infecção (FERREIRA; GBSON, 2008; DJORDJEVIC *et al.*, 2015).

Os fatores de virulência associados ao fungo são determinados geneticamente, porém expressos pelo micro-organismo quando submetidos a condições favoráveis, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. A capacidade da levedura se aderir, infectar e causar a doença é definida como potencial de virulência, sendo a

adesão as células epiteliais o evento inicial à patogênese das infecções (O'TOOLE *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

Durante o processo de estabelecimento da infecção por *Candida* sp., ocorre à expressão de diversos outros fatores de virulência: dimorfismo, a presença de adesinas, produção de enzimas (proteínases e fosfolipases), capacidade de crescer a 37° C e adaptar-se a variações de temperatura e pH (FURLANETO-MAIA *et al.*, 2007).

Bem como, variações fenotípicas e moleculares, as quais favorecem a adesão às células epiteliais e capacidade de sobrevivência dentro dos fagócitos, produção de toxinas *Killer* e a formação de biofilme na qual os micro-organismos formam agregados celulares que se aderem às superfícies de dispositivos médico-hospitalares, desencadeando a infecção e a resistência das cepas das leveduras aos antifúngicos (EGGIMANN *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2013).

2.1.2 Candidemia hospitalar

Infecções fúngicas hospitalares constituem uma causa crescente de morbidade e mortalidade em hospitais de todo o mundo, afetando tanto a pacientes internados, como profissionais de saúde (MARLUCHE; SANTOS, 2008). Entre as infecções invasivas causadas por leveduras de *Candida* spp, a candidemia ou candidíase hematogênica, engloba situações clínicas envolvendo desde episódios isolados, até casos onde o fungo está presente na corrente sanguínea, disseminando-se para vários órgãos do hospedeiro infectado (BOW *et al.*, 2010; DJORDJEVIC, *et al.*, 2015).

Acredita-se que a maioria dos casos de candidemia seja adquirida por via endógena, através da translocação do patógeno pelo trato gastrointestinal, local onde ocorre a colonização por *Candida* sp. em aproximadamente 70% da população hígida. No entanto, a candidemia pode ser adquirida por via exógena, através do contato das mãos de profissionais da área da saúde, com pacientes portadores de cateter venoso central, bem como pela administração parenteral de soluções contaminadas e implante de próteses contaminadas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; COLOMBO *et al.*, 2006; BASSETTI *et al.*, 2014).

A candidemia tornou-se a causa mais comum de infecções na corrente sanguínea em hospitais terciários, e sua ocorrência tem sido associada à longa permanência hospitalar e alta mortalidade. O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das

infecções fúngicas no ambiente hospitalar, sendo *Candida albicans* o quarto patógeno mais isolado de infecções da corrente sanguínea. Acredita-se que haja uma ação sinérgica entre mecanismos de agressão, que em associação à debilidade na resposta do hospedeiro, podem conduzir ao desencadeamento da infecção. (HINRICHSEN *et al.*, 2008; RUHNKE *et al.*, 2012; YANG, *et al.*, 2014; QUINDÓS *et al.*, 2014; BAILLY *et al.*, 2016).

Em indivíduos imunologicamente competentes, a resposta imune aos fungos acontece de forma eficaz, o que não ocorre em pacientes imunodeprimidos, onde a resposta imune antifúngica requer ação tanto da defesa imune inata quanto da defesa imune adaptativa (COSTA *et al.*, 2008). Desta forma, para se tornar patogênico o fungo, lança mão de várias estratégias de virulência como, por exemplo, a habilidade de se aderir em superfícies epiteliais, evasão do sistema complemento e resposta celular e invasão do tecido através de produção de enzimas. (FURLANETO-MAIA *et al.*, 2007; EGGIMAN *et al.*, 2011; LIM *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2013).

Segundo a Sociedade de Doenças Infecciosas da América, a terapia antifúngica deve ser iniciada até 24 horas após a obtenção de hemocultura positiva para *Candida* sp., uma vez que a demora no início da terapia em pacientes hospitalizados com candidemia está associada ao aumento da mortalidade. É notório que o diagnóstico fidedigno dessas espécies de *Candida* sp. é fundamental para estudos clínicos e epidemiológico, assim como, é de grande importância para que a intervenção terapêutica seja imediata (COLOMBO *et al.*, 2006; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

2.1.3 *Candida albicans*

A biologia de *C. albicans* apresenta diferentes aspectos, entre eles, a habilidade de se apresentar com distintas morfologias. Apresentando-se sob aspecto leveduriforme (blastocóndio) no estado de saprobiose, ou na forma filamentosa em processos patogênicos (LACAZ *et al.*, 2002; ÁLVARES *et al.*, 2007). A capacidade de dimorfismo da *C. albicans* também é vista como um importante fator de virulência onde a levedura é a forma de disseminação do fungo e a hifa garante a invasão do fungo no epitélio tecidual. A capacidade de se aderir e formar biofilme são um dos vários fatores de virulência expressos por essa espécie de fungo (LIM *et al.*, 2012). Da mesma forma a ação das adesinas é essencial para que o fungo sobreviva superficialmente aderido às

células epiteliais ou internalizado por elas (DE ROSSI *et al.*, 2011). A produção de enzimas hidrolíticas confere à *C. albicans* ferramentas necessárias ao processo de invasão do hospedeiro, agindo na degradação de membranas e digestão de proteínas, o que dificulta a atividade do sistema imune (OLIVEIRA, 2009; DE ROSSI *et al.*, 2011).

Desta forma, *C. albicans* continua sendo considerada o agente mais incidente em casos de candidemia (COLOMBO *et al.*, 2006; MÍMICA *et al.*, 2009; PAPPAS *et al.*, 2009; TAJ-ALDEEN *et al.*, 2014). Embora, espécies não-*albicans* venham emergindo como importantes patógenos nosocomiais, devido ao aumento indiscriminado do uso profilático de drogas antifúngicas (BASSETTI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2012).

2.1.4 Diagnóstico laboratorial da levedura

Definir corretamente o diagnóstico de infecções fúngicas hematogênicas causadas por espécies de *Candida* sp. é um dos pontos de maior importância para o sucesso terapêutico (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Febre e leucocitose seriam os principais indícios de fungemia, porém 20% dos pacientes não desenvolvem hipertermia e apenas 50% apresentam leucocitose (BLOT *et al.*, 2002; VERONESI, 2005). Ademais, as manifestações clínicas de uma candidemia é muitas vezes similares à de uma bacteremia, o que pode levar a um falso-positivo (BORGES, *et al* 2009).

A confirmação laboratorial pode ser feita utilizando a técnica de hemocultura, porém este exame é de baixa sensibilidade e o resultado muitas vezes é tardio (BORGES, *et al* 2009; EGGIMANN *et al.*, 2011). 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).

Esses testes fazem parte dos métodos fenotípicos tradicionais para a identificação de leveduras usadas mundialmente, considerados métodos clássicos e padrão ouro para esta finalidade (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). No decorrer da década de 1990 surgiram vários métodos diagnósticos para a identificação de leveduras, dentre eles meios de cultura cromogênicos (CHROMagar), métodos sorológicos, nos quais é avaliada a presença de antígenos ou anticorpos anti-*Candida* no soro e as técnicas

moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações e sistemas semi-automatizados e automatizados, como por exemplo o VITEK® 2 (MARLUCHE *et al.*, 2008; MIMICA, *et al.*, 2009).

Atualmente, 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. Este método poderia representar uma alternativa válida e rápida para ambos os métodos convencionais e moleculares para identificação de leveduras na prática laboratorial. No entanto, este método não foi ainda avaliado comparativamente utilizando-se um grande número de isolados clínicos (SPANU *et al.*, 2016).

2.2 Biossensores

O biossensor é definido como uma ferramenta ou dispositivo analítico que combina elementos biológicos imobilizados em transdutores físico-químicos, criando assim uma superfície que permite a medição direta de um analito específico. Sua principal característica é a capacidade de combinar a atividade seletiva de um elemento de reconhecimento biológico, a um analito de interesse, e um transdutor que converte um sinal biológico em elétrico (MELO, 2008; MURUGAIYAN *et al.*, 2014).

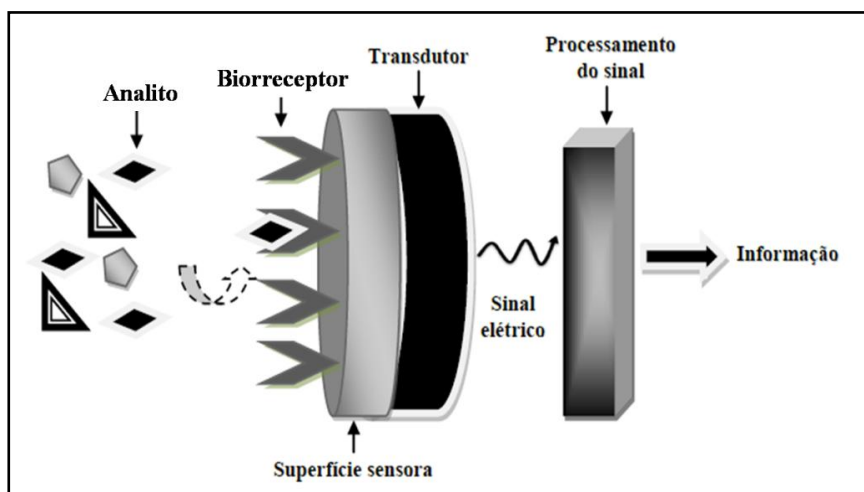
Dentre os elementos de reconhecimento biológicos utilizados na construção de biossensores, destacam-se: sequências de DNA ou RNA, enzimas, antígeno, anticorpo, organelas, peptídeos, organismos, células e aptâmeros (STREHLITZ *et al.*, 2008; HANG *et al.*, 2010; SOUZA, 2011; SONG *et al.*, 2012).

No início dos anos 60 foi publicada a primeira pesquisa sobre biossensores, por Clark e Lyons (1962), onde se apresenta a imobilização da glucose oxidase em um detector eletroquímico. Desde então os biossensores tornaram-se um novo campo da ciência, que se expandiu consideravelmente nos últimos anos (MURUGAIYAN *et al.*, 2014). Esses dispositivos estabelecem uma escolha rápida e com conveniência, quando comparados com algumas técnicas tradicionais para medidas analíticas, tendo por objetivo fornecer um elevado grau de seletividade para um determinado analito (LABUDA *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2014).

O princípio básico de funcionamento de um biossensor baseia-se na interação seletiva do analito com o biorreceptor. Esta interação resulta na variação de

propriedades físico-químicas que são reconhecidas e medidas por um transdutor adequado. E finalmente, ocorre à amplificação e o processamento do sinal correspondente a concentração do analito na amostra, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática dos elementos constituintes de um biossensor.



Fonte: FREITAS *et al.*, 2014.

2.2.1 Classificação dos transdutores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento biológico de reconhecimento ou com o transdutor (SU *et al.*, 2011). Estes podem ser de diversos tipos, tais como, eletroquímico, óptico, piezoelétrico, etc (MEHRVAR; ABDI, 2004).

Os transdutores eletroquímicos transformam o efeito de interações eletroquímicas entre analito e eletrodo em sinais elétricos. 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).

Os transdutores ópticos transformam informação luminosa em um sinal elétrico, permitindo a identificação das características ópticas do sistema (biorreceptor/superfície sensora) analisado. Nestes biossensores um estímulo luminoso incide sobre a camada biológica imobilizada. A interação de analitos com os bioreceptores, de um biossensor, pode levar a variações da absorção ou do espalhamento da luz que incide no transdutor (LIGLER, 2008; DAMBORSKY *et al.*, 2016).

Alguns biossensores também exploram a identificação da emissão fluorescente do par analito-bioreceptor. A intensidade do sinal obtido é frequentemente proporcional a quantidade de material biológico presente na amostra (MEHRVAR; ABDI, 2004; LIGLER, 2008).

Em particular, novos biossensores ópticos têm sido demonstrados explorando o efeito de ressonância de plasmon localizada (SANTOS *et al.*, 2016). Dentre as vantagens de se utilizar biossensores ópticos destacam-se, a facilidade de integração e a boa biocompatibilidade (MAYER; HAFNER, 2011).

Outro tipo bastante utilizado de transdutor é o piezoelétrico, que produz um sinal elétrico de saída quando excitado mecanicamente. A piezoeletricidade é então uma maneira de converter-se energia mecânica em energia elétrica, ou vice-versa. Um dos exemplos do uso da piezoeletricidade é o sistema de microbalança de cristal de quartzo (QCM). O propósito desse sistema é provocar uma oscilação num cristal piezelétrico através de um circuito oscilador, sendo capaz de detectar valores reduzidos de variação de massa (MEHRVAR; ABDI, 2004; WANG *et al.*, 2011).

2.2.2 Bioreceptores

Diferentes componentes biológicos podem ser explorados em sistemas de biossensores, dentre estes se destacam as enzimas, receptores (proteínas), ácidos nucléicos, aptâmeros, antígenos e anticorpos.

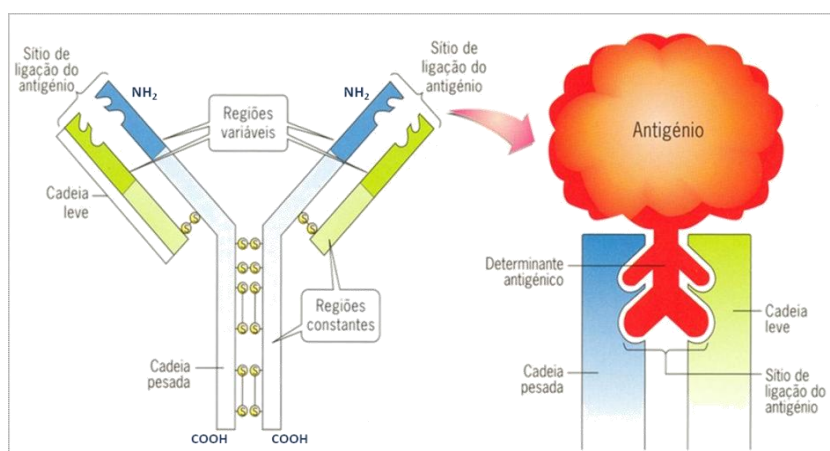
As enzimas são elementos de reconhecimento, que podem catalisar reações biológicas, ou seja, as enzimas aumentam a velocidade de uma reação química sem interferir no processo. Em muitas enzimas, especialmente as utilizadas para a construção de biossensores, o modo de ação envolve uma reação de oxidação ou redução que pode ser detectada eletroquimicamente. A utilização de enzimas na construção de biossensores possui certas vantagens: elas se ligam ao substrato, são altamente seletivas, têm atividade catalítica aumentando a sensibilidade e agem rapidamente (WANG, *et al.*, 2008; CHAMBERS *et al.*, 2008). Quanto aos receptores, estes 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 (CHAMBERS *et al.*, 2008).

O uso de ácidos nucleicos e aptâmeros no desempenho de biossensores de DNA são fortemente influenciados pelas propriedades físicas do DNA, como, por exemplo, pureza e comprimento médio da cadeia (RAVERA *et al*, 2007). Novas tecnologias de biossensores têm sido investigadas baseando-se na imobilização de filamentos de DNA em diferentes transdutores físico-químicos que convertem o evento da hibridização num sinal elétrico ou óptico (AHAMMAD *et al*, 2009). Esses biossensores têm grande aplicação em diagnóstico de doenças hereditárias, monitoramento de expressão de genes e detecção rápida de infecções patogênicas (WANG, 2000).

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). Os anticorpos pertencem a uma família de glicoproteínas, chamadas imunoglobulinas (Ig), responsável por desencadear o mecanismo de defesa imunológica específica em resposta à presença de um determinado antígeno. São sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B, e são subdivididas em cinco tipos distintos de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgD e IgE), sendo a IgG a classe mais abundante (correspondendo a cerca de 70%).

A estrutura básica da IgG é constituída por duas cadeias polipeptídicas pesadas idênticas (de 55 a 75 kDa), ligadas entre si por pontes de dissulfeto (-S-S-), e duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (25 kDa) (Figura 3), que formam uma estrutura característica em forma de um Y. (KRYSCIO; PEPPAS, 2012).

Figura 3: Estrutura molecular do anticorpo da classe IgG, demonstrando a presença das cadeias leves e pesadas, e os sítios de reconhecimento antigênico.

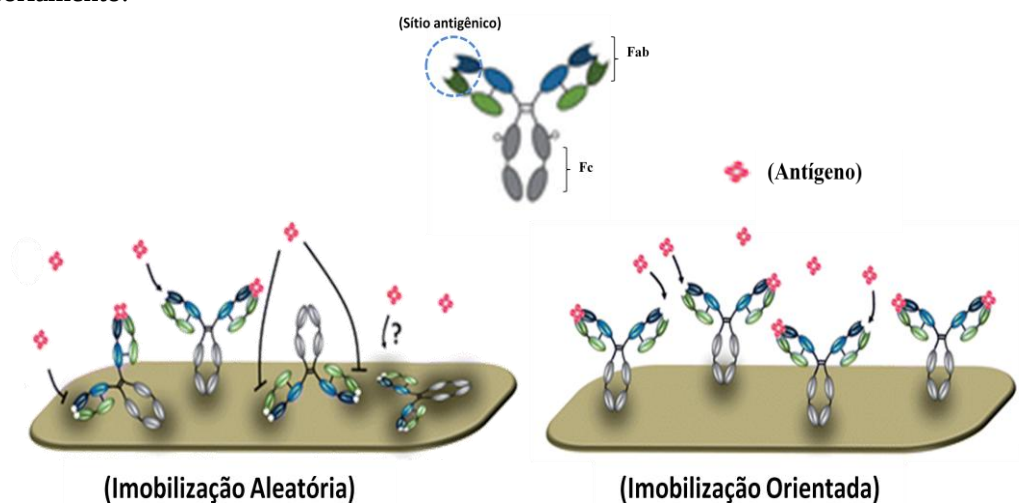


Fonte: Adaptado de: <http://antivirussoperativohumano.com.br>.

2.2.3 Imobilização de anticorpos

O procedimento de imobilização é uma importante etapa na construção dos imunossensores. Em geral, a superfície do sensor deve apresentar algumas características fundamentais como alta capacidade para ligação de imunoreagentes, ligação estável e não causar desnaturação da molécula imobilizada. A molécula de anticorpo é composta pelo fragmento (Fab), que possui o grupo amino terminal o qual interage com o sítio de ligação do antígeno, e uma fração (Fc), que pode ser utilizada estrategicamente para imobilização de biomoléculas de forma orientada, como representado na Figura 4 (REDEKER *et al.*, 2013). Portanto, ao propiciar a imobilização pela fração (Fc), permite-se uma orientação adequada do anticorpo imobilizado obtendo-se sítios ligantes direcionados, como mostra a Figura 4 (TRILLING, BEEKWILDER & ZUILHOF, 2013).

Figura 4: Representação esquemática da imobilização de anticorpos sobre a plataforma de sensoriamento.



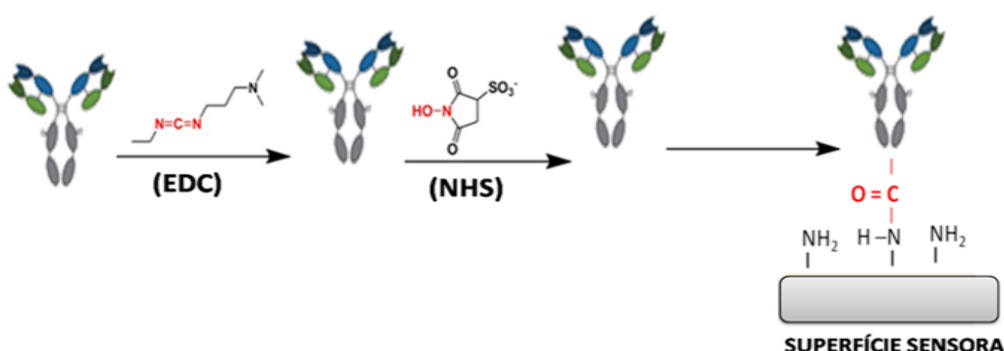
Fonte: Adaptado de: TRILLING, BEEKWILDER & ZUILHOF, 2013.

A imobilização aleatória dos anticorpos dificulta a exposição adequada dos sítios antígenicos, o que irá afetar a interação antígeno-anticorpo sobre a plataforma de sensoriamento. Os vários métodos de imobilização de anticorpos empregados na literatura baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e a superfície sensora (TRILLING, BEEKWILDER & ZUILHOF, 2013; SILVA, 2016).

Os mais utilizados são: adsorção física (interações hidrofóbicas e de van der Waals) e química (ligação covalente e iônica). O método de adsorção física embora seja bastante usual devido a sua simplicidade, leva a um baixo controle sobre a conformação da molécula imobilizada na superfície de sensoriamento, o que afeta a atividade funcional do componente bioativo (JUNG, JEONG & CHUNG, 2008; CARDOSO, 2009). A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos. Neste método, são utilizados grupos químicos reativos, o que pode promover um maior controle da orientação do anticorpo sobre a superfície de sensoriamento. (TRILLING, BEEKWILDER & ZUILHOF, 2013).

Vários trabalhos citados na literatura investigam a reatividade de grupos funcionais presentes nas cadeias de aminoácidos do anticorpo, tais como grupos amina ($-\text{NH}_2$), hidroxílicos ($-\text{OH}$) e carboxílicos ($-\text{COOH}$) (SILVA, 2016). A cisteamina ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NS}$), por exemplo, pode ser utilizadas para criar grupos sulfidrilo em proteínas (anticorpos), pela conjugação de um dos seus grupos amino terminais com os carboxílicos ($-\text{COOH}$) da proteína, estabelecendo uma reação carbodiimida como agente intermediário. O *N*-etil-*N*-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e o *N*-hidroxi-succinamida (NHS) também são utilizados para esta finalidade. O EDC é uma molécula que possibilita a formação de ligações amida. Além de reagir com carboxilatos, o EDC sozinho forma um complexo estável com grupos aminoácidos. O objetivo da adição de *N*-hidroxi-succinamida (NHS) às reações EDC é aumentar o número de ligações de moléculas carboxiladas com grupamentos amino expostos nas moléculas de interesse, como ilustra a Figura 5 (ERICSSON, 2013).

Figura 5: Reação de ativação dos grupos carboxílicos do anticorpo *via* EDC/NHS.



Fonte: Adaptado de: ERICSSON, 2013; SILVA, 2016.

2.3 Nanotecnologia

Nos últimos anos a nanotecnologia tornou-se numa das mais importantes e atrativas áreas de investigação. A nanotecnologia refere-se a tecnologias em que a matéria é manipulada em escala atômica e molecular para criação de novos materiais e processos, com características funcionais diferentes dos materiais comuns. O prefixo nano é utilizado para estruturas com dimensões na escala de 10^{-9} m. Com o desenvolvimento da nanotecnologia, houveram avanços inovadores em praticamente todas as áreas como, medicina, materiais e biotecnologia (RUMAYOR *et al.*, 2005; WEISS *et al.*, 2006). A utilização da nanotecnologia em sistemas biológicos tem sido viabilizada através da combinação das propriedades intrínsecas de nanopartículas com a imobilização de ligantes específicos, tais como proteínas e oligonucleotídeos em sua superfície para a realização de um reconhecimento específico. (AKIRA *et al.*, 2005; AZZAZY *et al.*, 2006). Assim, o desenvolvimento de novas nanopartículas, com a capacidade de segmentação específica por modificação de suas superfícies utilizando biomoléculas, é um tema contínuo de pesquisa (QUINA, 2004; SURENDIRAN *et al.*, 2009; TINGUELY *et al.*, 2011).

Atualmente, vários estudos estão sendo voltados para as nanopartículas metálicas, dentre elas as nanopartículas de ouro, (PANDEY *et al.*, 2007). Nanopartículas metálicas apresentam diversas características, tais como a facilidade de síntese e funcionalização da superfície, baixa citotoxicidade e uma biocompatibilidade elevada, o que tornam estes nanomateriais bastante atraentes no campo da bioanalítica, (YU, *et al.*, 2003; SHANG, *et al.*, 2007).

2.3.1 A Interação da luz com nanopartículas

As nanopartículas de ouro (NPsAu) estão entre as mais estudadas e utilizadas, devido à sua fácil preparação, estabilidade e funcionalização química da superfície bem estabelecida (CHI *et al.*, 2011; HARTMAN *et al.*, 2013). Além disto, as NPsAu apresentam algumas características colorimétricas e condutimétricas, que potencializam seu uso para a detecção de moléculas biológicas (KIM *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007; VIDOTTI *et al.*, 2011).

A interação de luz com NPsAu pode induzir uma oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução (ressonância de plasmon). A frequência de ressonância plasmônica é uma importante característica das NPsAu, e possui comprimentos de onda entre 510 e 530nm para nanopartículas esféricas de diâmetro entre 5 e 50nm. A Figura 7 mostra uma imagem de diferentes soluções aquosas com NPsAu de tamanhos distintos e, conseqüentemente, com diferentes cores. A ligação e proximidade de moléculas na superfície destas NPs podem modificar a frequência de ressonância de plasmon, este efeito pode ser utilizado para a detecção colorimétrica de analitos, e mudanças conformacionais de moléculas (WILSON, 2008; WALKEY *et al*, 2009; WANG *et al*, 2009).

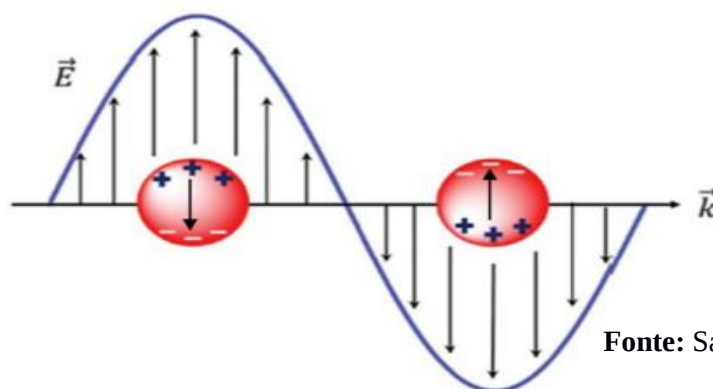
Figura 6: Ilustração da dispersão de colóides de ouro de vários tamanhos.



Fonte: Adaptado de MAYER; HAFNER, 2011.

O fenômeno de ressonância de plasmon localizado (*Localized Surface Plasmon Resonance*) consiste na oscilação coletiva e local dos elétrons livres da nanopartícula, induzida por luz. Tal oscilação provoca a separação de cargas entre os elétrons livres e íons metálicos, resultando na geração de dipolos (Figura 8). A interação da NP com a luz pode levar a um aumento do campo eletromagnético próximo a superfície (MAYER; HAFNER, 2011; GUO, 2012).

Figura 7: Comportamento da nuvem eletrônica de uma esfera metálica.



Fonte: Santos *et al.*, 2016.

Para os metais nobres como ouro, prata e cobre a ressonância de plasmon se manifesta na região visível do espectro eletromagnético. O efeito de Ressonância de Plasmon Localizado (RPL) é caracterizado por uma frequência (ou comprimento de onda) de ressonância, que depende da estrutura (forma e tamanho) e do material da NP, do meio onde ela se encontra e/ou da interface NP - meio, onde pode-se agregar diferentes moléculas (MAIER, 2007; UNSER *et al.*, 2015).

A interação da luz com um colóide pode ser quantificada pela lei de Beer – Lambert, que relaciona a quantidade de luz transmitida por uma amostra com sua espessura e concentração de partículas, expressa da seguinte forma:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}, \quad (1)$$

onde **I** é a intensidade da luz transmitida, **I₀** é a intensidade de luz incidente, **c** é a concentração da amostra em mols por litro, **l** é a espessura da amostra em cm e **ε** é o coeficiente de extinção molar, que é um parâmetro característico de cada partícula num comprimento de onda específico (SANTOS *et al.*, 2016). A razão **I/I₀** é a fração de luz incidente que é transmitida, e é chamada de transmitância (T). A interação da luz com um coloide pode também ser quantificada pela grandeza chamada Absorbância. A absorbância (A) é definida como:

$$A = \log (I_0 / I) = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (2)$$

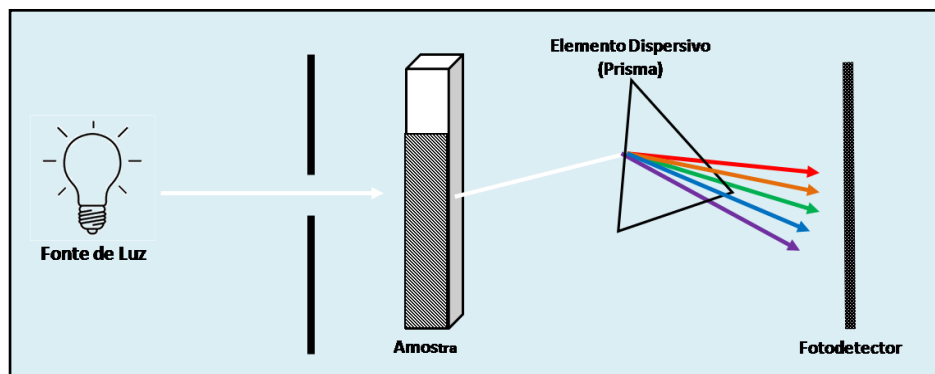
Como a absorbância é diretamente proporcional coeficiente de extinção molar, os valores de absorbância de um coloide também é função do comprimento de onda da luz incidente.

2.3.2 Espectroscopia óptica de nanopartículas

A espectroscopia de transmissão/absorção UV-Vis explora luz na faixa de do espectro eletromagnético que vão do ultravioleta (300-400 nm) ao visível (400-800 nm). Esta técnica permite estudar a interação de luz UV-Vis com diferentes tipos de amostras. Quando a luz emitida pela fonte é direcionada para a amostra. A luz que foi transmitida passa por um sistema dispersivo (prisma ou grade de difração), que separa

os diferentes componentes de cor do feixe. Em seguida, os diferentes componentes de feixe de luz incidem em um fotodetector, como ilustra a Figura 8. E por fim, a informação luminosa é então convertida em um sinal elétrico e posteriormente processada (SKOOG, *et al* 2008).

Figura 8: Sistema Dispersivo.



Fonte: OLIVEIRA, 2017.

Espectros de transmissão ou absorção de colóides de ouro (Au), por exemplo, apresentam bandas na região do ultravioleta-visível, devido ao fenômeno de ressonância com a onda de luz. Esta banda é denominada por banda de plasmons localizados (CREIGHTON *et al.*, 1991; DAS *et al.*, 2009; PAVIA *et al.*, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma plataforma coloidal utilizando nanopartículas de ouro para o imunosensoriamento óptico de leveduras de *Candida albicans*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar propriedades ópticas de nanopartículas de ouro;
- Produzir plataforma de sensoriamento, com imobilização de Anticorpo de *Candida albicans*;
- Avaliação da plataforma de sensoriamento na identificação de antígenos de *C. albicans*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e Materiais

Na preparação da plataforma foram utilizadas nanopartículas de ouro com 5nm de diâmetro (solução de ouro coloidal estabilizada em suspensão a 0,01% de HAuCl_4 , com concentração de $\sim 5,5 \times 10^{10}$ partículas/mL), e 50nm de diâmetro (solução coloidal estabilizada em suspensão de tampão citrato, com concentração de $\sim 3,5 \times 10^{10}$ partículas/mL), ambas obtidas da empresa Sigma-Aldrich. Também utilizou-se Cisteamina (2-aminoethanethiol) adquirida pela Sigma-Aldrich. Etildimetilamino-propil-carbodiimida (EDC), hidroxisuccinimida (NHS) e Glicina ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), adquiridos da Sigma-Aldrich, (Saint Louis, EUA). A plataforma de sensoriamento explorou anticorpos monoclonais anti-*Candida albicans*, produzidos em coelhos, da empresa GenWayBio Biotech. Inc (San Diego, CA). No processo de avaliação da plataforma, explorou-se antígenos manana de *Candida albicans*, produzidas em coelhos pela empresa GenWayBio Biotech. Inc (San Diego, CA).

Água ultra-pura utilizada no preparo de soluções foi obtida utilizando-se uma unidade milli-Q (Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA).

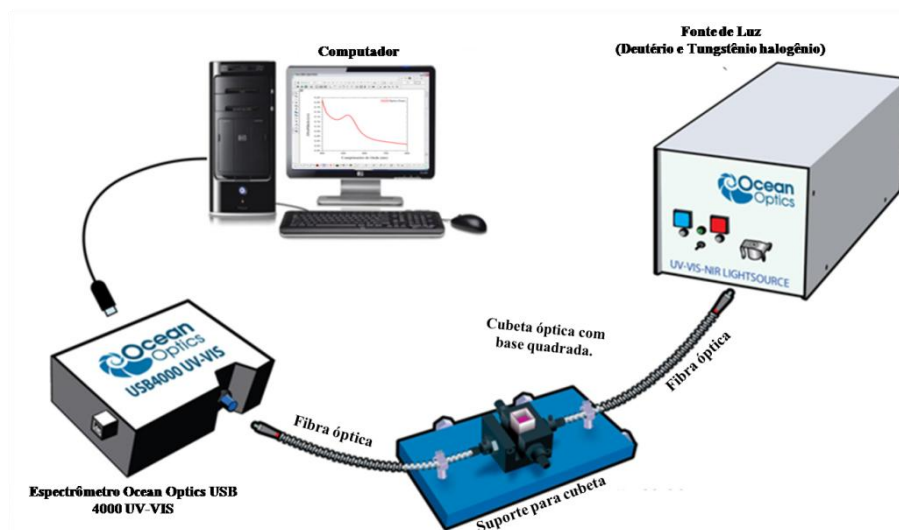
4.2 Caracterização das nanopartículas de ouro

A caracterização das NPsAu foi avaliada através da técnica de espectrometria de absorção no UV-VIS, utilizando-se um espectrofotômetro modular, da Ocean Optics (modelo: USB 4000). O espectrofotômetro inclui um detector Toshiba TCD 1304AP - CCD-array com 3648 pixels que permitem a análise do espectro óptica de 200 a 1100 nm. A análise espectral foi feita no LOBI (Laboratório de Óptica Biomédica e Imagens-UFPE), onde foram obtidas informações sobre o espectro de absorção das soluções em diferentes intervalos de tempo.

A Figura 9 ilustra o sistema de espectroscopia utilizado. O sistema é composto por uma fonte, com lâmpadas de deutério (200 a 400nm) e tungstênio halogênio (360 a 850nm), conectadas por uma fibra óptica ao suporte de cubetas ópticas de base quadrada (Largura interna: 10mm, Dimensão externa: 45 x 12,5 x 12,5mm, e Volume: 3,5mL),

para inserção da amostra estudada. Após atravessar a cubeta óptica, a luz é levada por uma fibra óptica ao espectrômetro Ocean Optics USB4000, conectado a um computador via USB.

Figura 9: Representação Esquemática do Sistema



Fonte: Adaptado de: <http://www.oceanoptics.com>

4.3 Desenvolvimento da plataforma de sensoriamento

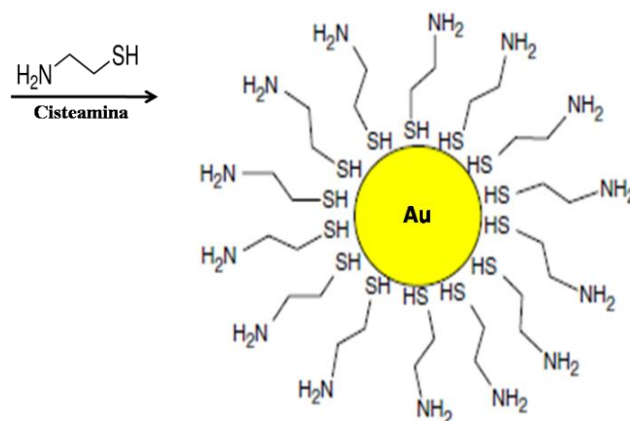
A plataforma de sensoriamento consistiu de uma solução aquosa (água mili-Q) contendo nanopartículas de ouro coloidal, Cisteamina (2- aminoethanethiol), anticorpo anti-*Candida albicans* ativados por EDC/NHS e Glicina (Ácido 2- aminoacético). Todas as etapas estabelecidas para o desenvolvimento da plataforma foram realizadas em triplicata.

4.3.1 Funcionalização das nanopartículas

Após a caracterização, as nanopartículas foram funcionalizadas com Cisteamina (2-Aminoethanethiol). A Cisteamina possui em sua estrutura um grupo tiol ($-SH$) que possibilita o estabelecimento de interações eletrostáticas com as nanopartículas de ouro

(Au-S), e um grupo amina (NH_2) que permite a ligação do grupo carboxílico dos anticorpos (Figura 10).

Figura 10: Nanopartículas de ouro funcionalizadas com Cisteamina.



Fonte: Adaptado de SHARMA *et al.*, 2010.

As concentrações de Cys foram testadas entre 50 e 400mM e 50mM e 150mM para as NPsAu de 5nm e 50nm, respectivamente.

O processo de funcionalização das NPsAu foi acompanhado em tempo real, pela técnica de espectrometria óptica (UV-VIS), nos intervalos de tempo entre (5, 10, 15, 20, 30, 40 50, 60 minutos após a incubação da Cisteamina à solução de NpAu).

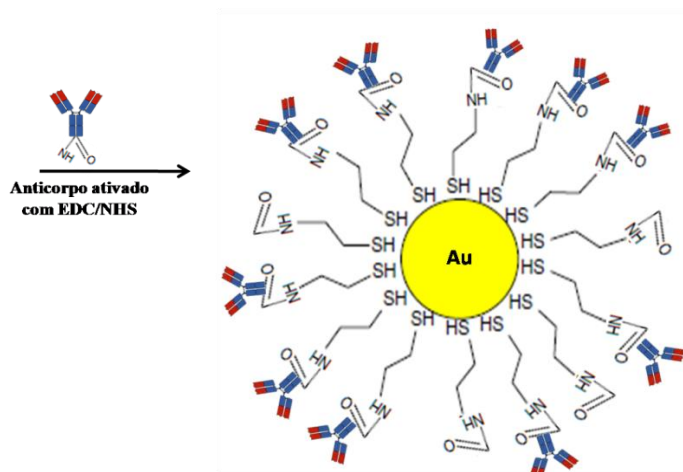
4.3.2 Imobilização dos anticorpos anti-*Candida albicans*

Para o processo de imobilização dos Anticorpos anti-*Candida albicans* nas NpAu, os anticorpos foram pré-ativados e incubados em uma solução aquosa [1:1] de 20 mM de EDC e 50 mM de NHS, em temperatura ambiente, deixada em repouso durante 1h (~ 24 °C). Em seguida, foi feita a avaliação do espectro de absorção em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 20,30, 40 50, 60 minutos).

A imobilização dos anticorpos foi realizada adicionando a plataforma coloidal de ouro alíquotas de anticorpos anti-*Candida albicans*. Para as soluções com nanopartículas de 5 nm, as concentrações de anticorpos avaliadas no colóide, foram de 0,4µg/mL, 0,6µg/mL, 0,8µg/mL, 1,0µg/mL e 2,0µg/mL. A escolha das concentrações adotadas foi baseada em estudos prévios realizados por CAMARA *et al.*, 2013. Para as

soluções com nanopartículas de 50 nm, as concentrações avaliadas foram de 0.8µg/mL, 1.0µg/mL, 2.0µg/mL, 3.0µg/mL e 4.0µg/mL. A figura 11 ilustra a associação dos anticorpos a plataforma de sensoriamento.

Figura 11: Imobilização de anticorpo anti- *Candida albicans* em NPAu com Cisteamina.

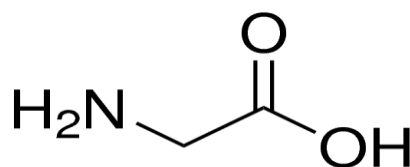


Fonte: Adaptado de SHARMA *et al.*, 2010.

4.3.3 Associação de glicina (ácido aminoacético)

Uma solução de Glicina (Figura 12) foi utilizada como um agente de bloqueio, para impedir que o antígeno/manana de *Candida albicans* se ligue a grupos amina livres da Cisteamina, garantindo assim que o antígeno interaja apenas com o anticorpo anti-*Candida* presente na plataforma.

Figura 12: Estrutura química da Glicina.

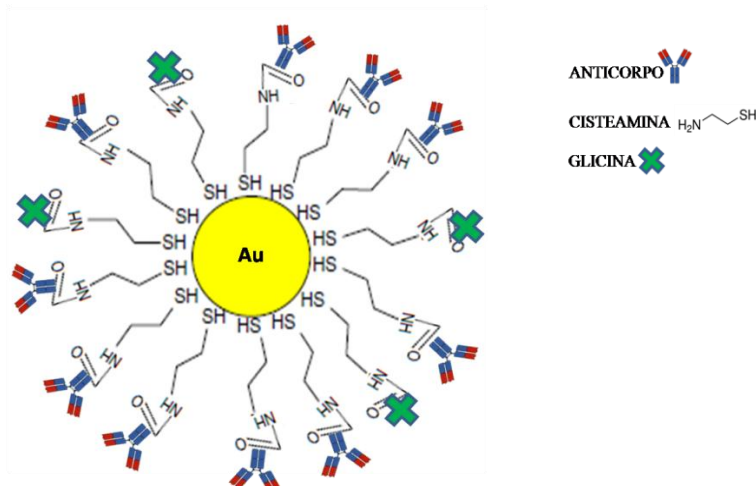


Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

Para o colóide com Np de 5nm de diâmetro foram adicionados dois volumes, 0,8 µL e 1,0 µL de Glicina a uma concentração de 50mM, e para o colóide com Np de

50nm de diâmetro foram adicionados três volumes, 1,0µL, 2,0 µL e 3,0 µL de Glicina a uma concentração de 50mM. Posteriormente foi obtido o espectro de absorção em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 20,30, 40 50, 60 minutos) e avaliado o deslocamento do pico de plasmon após a adição da Glicina ao colóide. Com a adição da Glicina, finaliza-se a estrutura da plataforma de sensoriamento, ilustrada na Figura 13.

Figura 13: Representação esquemática da plataforma de sensoriamento.



Fonte: Adaptado de SHARMA *et al.*, 2010.

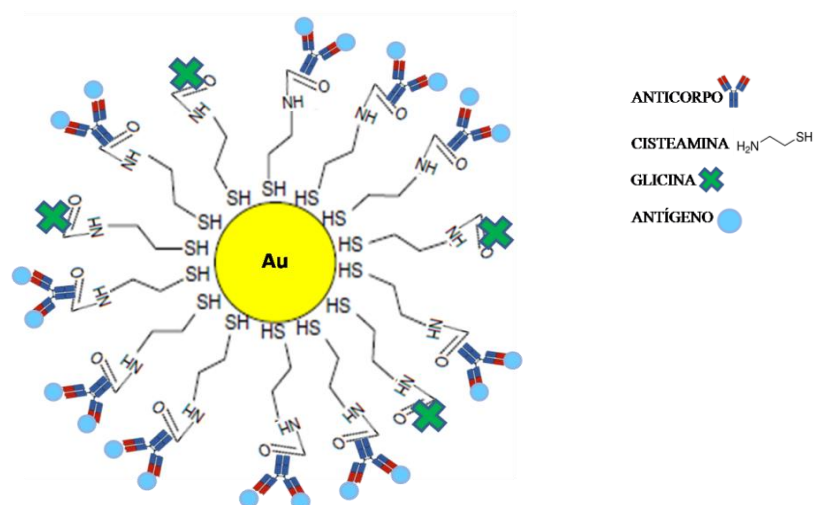
4.3.4 Conjugação antígeno - anticorpo

A plataforma na detecção de antígenos foi avaliada introduzindo alíquotas de antígenos/manana de *Candida albicans* produzidos pela empresa GenWayBio.

Para a realização do imunoensaio na plataforma contendo nanopartículas de ouro de 5nm, foram utilizadas as seguintes concentrações de antígenos: 1,0µg/mL, 3,0 µg/mL e 6,0 µg/mL. Na plataforma contendo nanopartículas de ouro de 50nm, foram utilizadas as seguintes concentrações: 3,0µg/mL, 8,0 µg/mL, 9,0 µg/mL e 10 µg/mL. Após adicionar cada concentração á plataforma de sensoriamento, os antígenos foram incubados por 30 minutos à temperatura de 37° C. O comportamento do sensor foi avaliado explorando espectroscopia de absorção UV-VIS.

Na figura 14 pode-se observar a representação esquemática da plataforma, obtida após a conjugação antígeno/anticorpo a superfície das nanopartículas de ouro com Cisteamina e Glicina aderida.

Figura 14: Representação esquemática da plataforma de sensoriamento, para detecção de antígenos de *Candida albicans*.



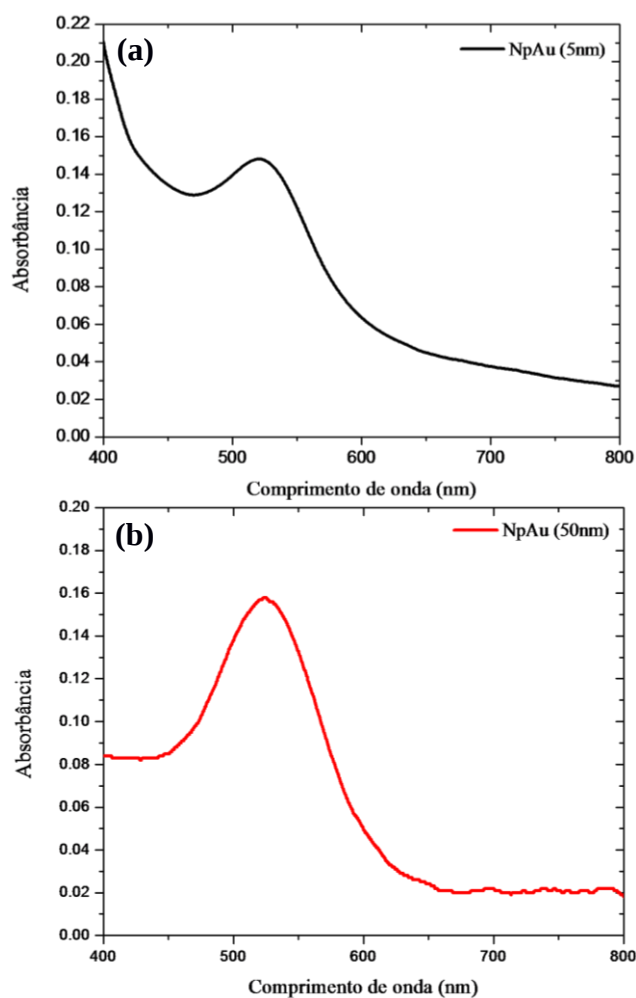
Fonte: Adaptado de SHARMA *et al.*, 2010.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização das nanopartículas

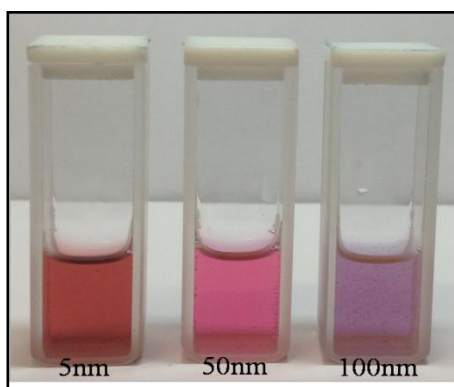
Analisando a Figura 15, observa-se que a bandas de plasmon dos colóides de ouro apresenta pico máximo em (a) ~ 521 nm e em (b) ~ 525 nm. A presença dos picos representa o efeito de plasmon correspondente à oscilação coletiva dos elétrons de condução, induzida pela aplicação de um campo eletromagnético externo.

Figura 15: Espectro de absorção das NPsAu 5nm (a) e 50nm (b).



A diferença no comprimento de onda do pico de plasmon é esperado para NpAu de diferentes tamanhos (NOVOTNY; HECHT, 2006). Esse fato é percebido na coloração de colóides com nanopartículas de diferentes tamanhos, como mostra a Figura 16.

Figura16: Colóides com nanopartículas de diferentes tamanhos.



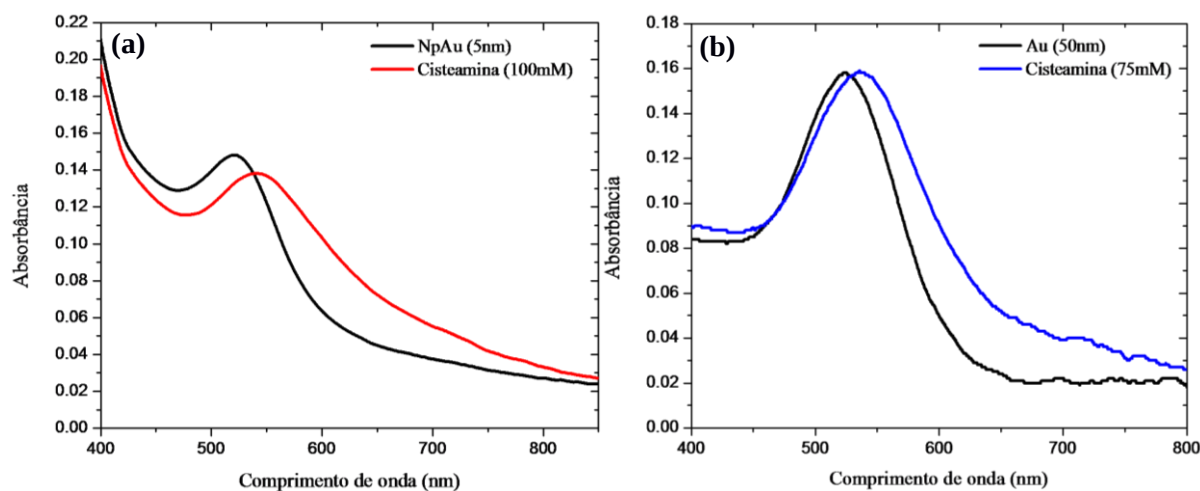
Fonte: OLIVEIRA, 2017.

O efeito de ressonância de plasmon modifica o campo elétrico próximo a superfície da NpAu. Partículas com maiores dimensão permitem a modificação do campo em regiões mais distante da superfície da nanoestrutura. Essa característica referente à modificação do campo é importante para a identificação de processos de agregação de moléculas na NpAu (NOVOTNY; HECHT, 2006).

5.2 Análise das NpsAu funcionalizadas com cisteamina

A cisteamina (2- aminoethanethiol) foi utilizada com o intuito de promover a adsorção de anticorpos anti-*Candida albicans* á solução coloidal de nanopartículas de ouro. A Figura 17 exibe o espectro de absorção no UV-Vis das nanopartículas de ouro de 5nm (a) e de 50nm (b) após a adição da Cisteamina.

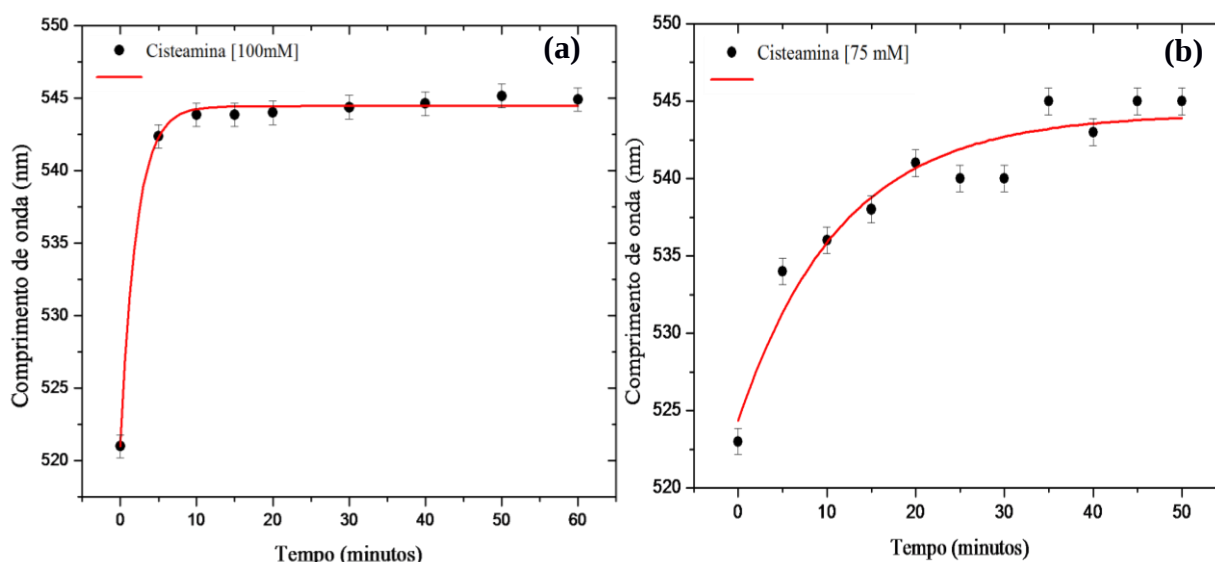
Figura 17: Espectros de absorção das NPs Au 5nm (a) e 50nm (b) após a funcionalização com Cisteamina.



Na figura 17 (a), foi observado um deslocamento do espectro de absorção de aproximadamente 23nm e (b) de aproximadamente 20nm nos espectros dos colóides de ouro após a adição da Cisteamina. O deslocamento do espectro indica que as nanopartículas presentes na solução coloidal de ouro foram funcionalizadas com a adição da molécula de Cisteamina.

Na figura 18 (a) e (b) pode-se observar a evolução temporal do deslocamento do pico de plasmon das nanopartículas de ouro, com a adsorção da Cisteamina, em (a) 100mM e em (b) 75mM. É notório que a Cisteamina leva um tempo menor que 30 minutos para associar Nps de 5nm e um tempo maior para associar nanopartículas com diâmetros maiores, como por exemplo, Nps de 50nm. Isso se deve ao fato que Nps com maior diâmetro apresentam maior área superficial e consequentemente requisitam de maior tempo para a adsorção da Cisteamina em toda sua superfície. Verificou-se que, ao adicionar concentrações mais elevadas de Cisteamina ao colóide contendo nanopartículas de ouro de 5nm (200mM, 300mM e 400mM) e 50nm (100mM e 150mM), não ocorreu um maior deslocamento do espectro, ou adsorção extra da molécula às nanopartículas. Isso se deve ao fato de uma possível saturação do ligante na solução.

Figura 18: Mudança no comprimento de onda do pico de plasmon em relação ao tempo, para NpsAu de 5nm (a) e 50nm (b) com a adição da cisteamina.

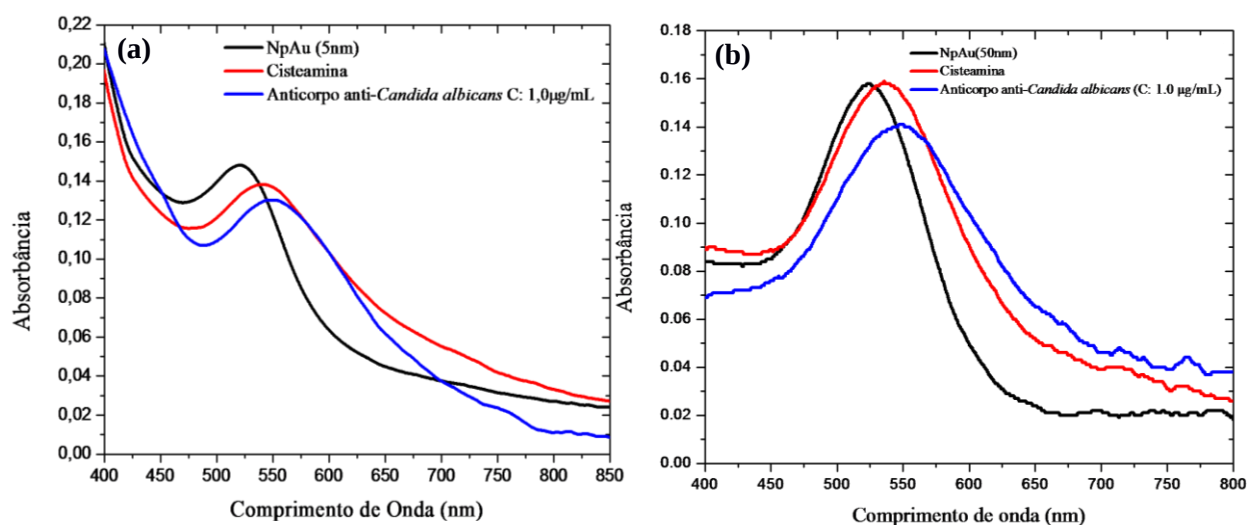


5.3 Análises da imobilização dos anticorpos anti-*Candida albicans* na plataforma de sensoriamento.

A Figura 19 representa a análise feita em espectrometria de absorção no UV-VIS após a adição dos anticorpos anti-*Candida albicans* na solução coloidal de ouro funcionalizada com Cisteamina (NPsAu+Cisteamina).

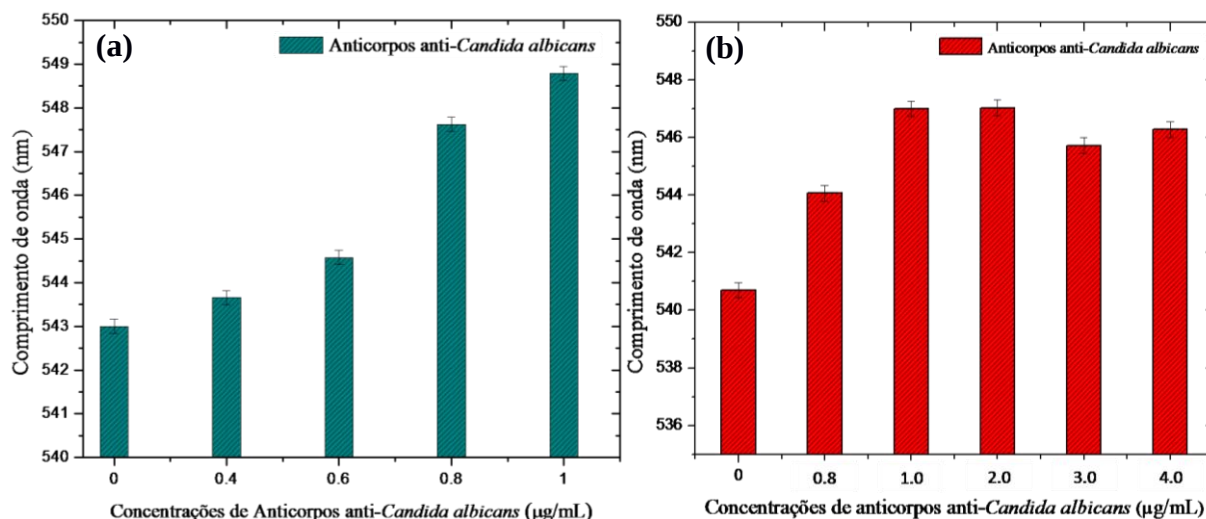
Na Figura 19, o espectro em azul (a. Nps 5nm e b. Nps 50nm) é obtido após a adição dos anticorpos anti-*Candida albicans* ao colóide de ouro (NpAu+ Cisteamina). Na Figura 19 (a) é observado um deslocamento do espectro de absorção de aproximadamente 7 nm. Na Figura 19(b) observa-se um deslocamento de aproximadamente 10 nm. Nota-se que o maior deslocamento foi obtido na associação dos anticorpos com o colóide de ouro contendo NpAu de 50nm de diâmetro. Isso ocorre porque partículas com maiores dimensões permitem a modificação do campo em regiões mais distantes da nanoestrutura. Desta forma a adsorção do anticorpo é melhor percebida (modificação do espectro) no colóide com nanoestruturas de maior diâmetro.

Figura 19: Espectros de absorção após a adição de anticorpos anti-*Candida albicans* na solução coloidal de NpsAu e Cisteamina, em (a) NpsAu com 5nm de diâmetro e (b) com NpsAu 50nm de diâmetro.



Os deslocamentos do pico de plasmon para diferentes concentrações de anticorpos no colóide são apresentados na Figura 20. A Figura 20a mostra o deslocamento gradativo do pico de plasmon para Np 5nm e a 20b para Np de 50 nm. É perceptível que em (a) e em (b), após concentrações de 1,0µg/mL de anticorpos anti-*Candida albicans*, não é observado nenhum aumento significativo do pico de plasmon para as demais concentrações. Esse fato ocorre porque quase todos os sítios de ligação para o anticorpo já foram ocupados.

Figura 20: Avaliação de diferentes concentrações de anticorpos anti-*Candida albicans*, quando adicionados a plataforma de sensoriamento, em (a) NpsAu 5nm e em (b) NpsAu 50nm.

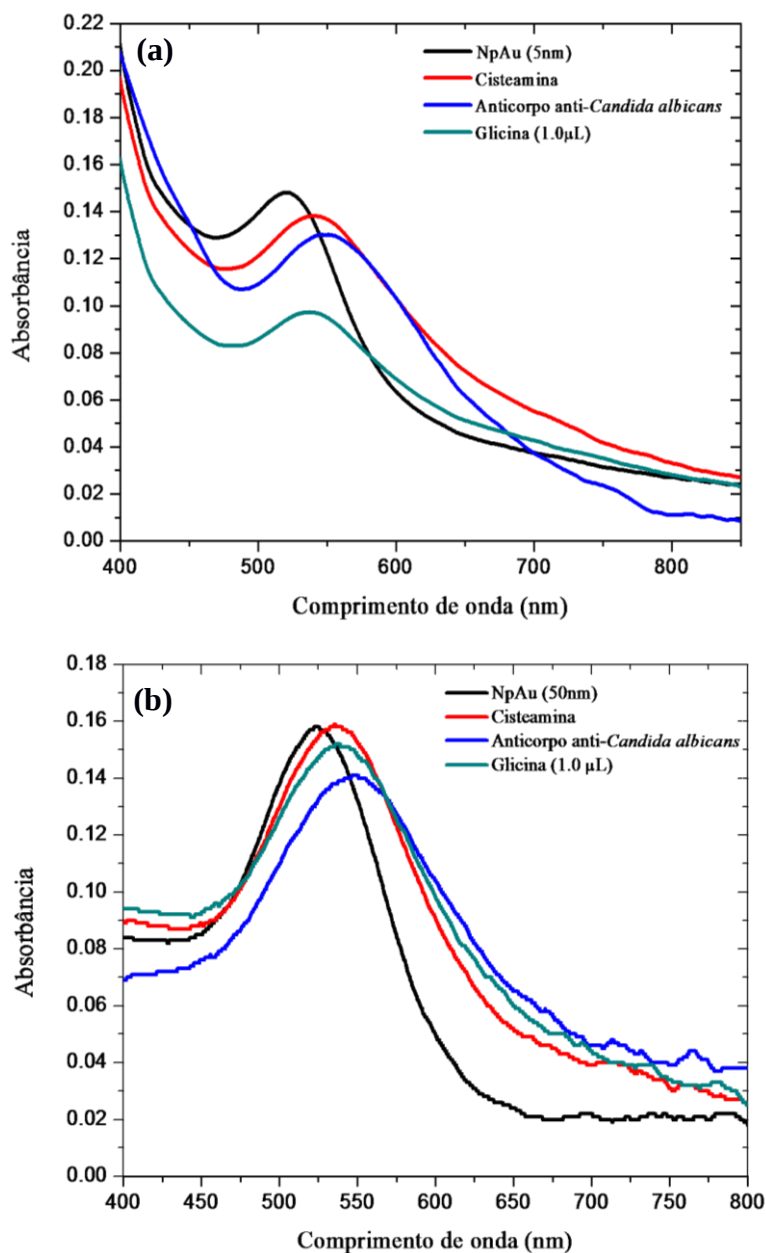


5.4 Bloqueio utilizando glicina

O uso de Glicina no processo de preparação da plataforma de sensoriamento impediu que os antígenos (a serem identificados pela plataforma) aderissem aos grupos funcionais amina livres presentes na Cisteamina, que não foram preenchidos com os anticorpos anti-*Candida albicans*. A Figura 21 apresenta o comportamento do pico de plasmon do sensor com o uso da molécula bloqueadora (Glicina). Pela Figura 21 verifica-se um deslocamento máximo do pico de ~10 nm, quando utilizado uma alíquota de 0,8µL de Glicina na solução contendo NpAu com 5nm e deslocamento máximo do pico de ~10 nm na solução contendo NpAu com 50nm de diâmetro, quando adicionado uma alíquota de 1,0µL de Glicina. Verificou-se que ao adicionar concentrações mais elevadas de Glicina ao colóide, contendo nanopartículas de ouro de 5nm e 50nm, não foi observado um maior deslocamento do espectro. Esse fato é explicado, pois os grupos amins livres presentes na Cisteamina, que não foram inicialmente ocupado pelos anticorpos, foram bloqueados pela Glicina, tendo o excesso de Glicina permanecido com sobrenadante. Com a adição da Glicina finaliza a estrutura da plataforma de sensoriamento.

Todos os experimentos com diferentes concentrações de Cisteamina, Glicina e Anticorpos foram realizados em triplicata.

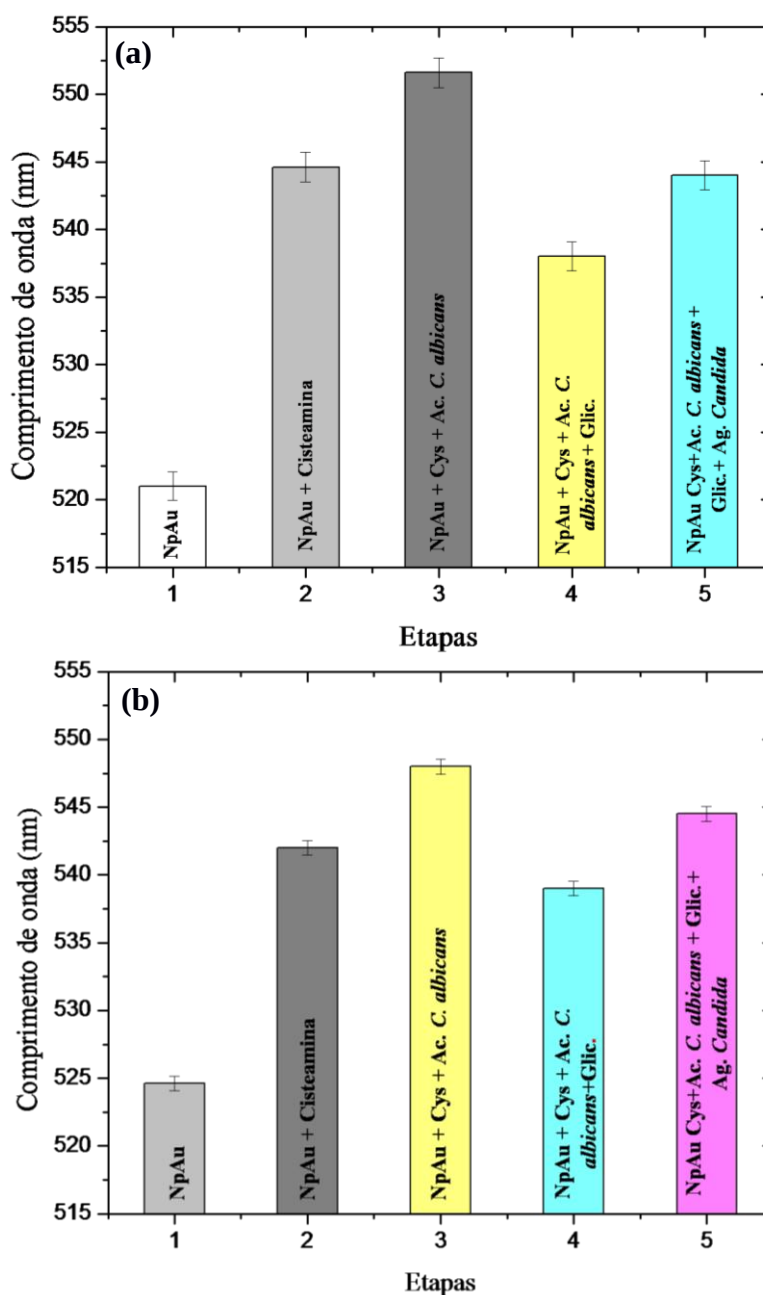
Figura 21: Espectros de absorção após a adição da Glicina, em (a) solução contendo NpAu com 5nm e em (b) solução contendo NpAu com 50nm.



5.5 Avaliação da plataforma na detecção de antígenos de *Candida albicans*.

A avaliação da plataforma de sensoriamento foi estabelecida analisando o deslocamento do pico de plasmon do colóide com a adição de antígenos de *Candida albicans* na solução nanoestruturada. A Figura 22a indica a posição do pico de plasmon da plataforma após a introdução de 3,0μg/mL de antígeno. Como mostra a Figura 22a para colóides com Nps de 5nm, foi verificado um deslocamento de ~ 6nm. Com as Nps de 50nm um deslocamento semelhante, ~7nm, foi observado (Figura 22b).

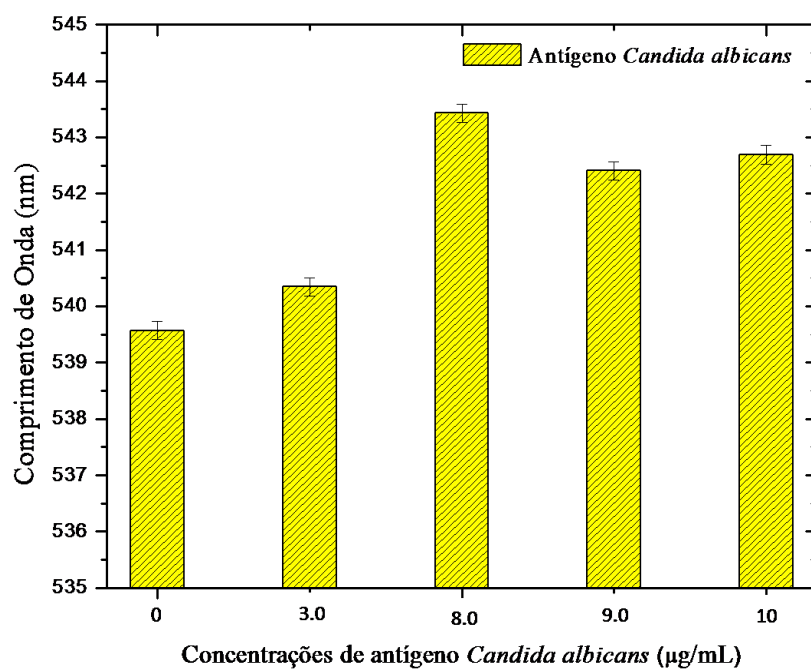
Figura 22: Comprimento de onda do pico de ressonância de plasmon localizado para diferentes etapas de preparação da plataforma, com Nps de 5nm (a) e (b) 50nm de diâmetro.



Para avaliar a capacidade de identificação de antígenos pela plataforma desenvolvida, os antígenos de *Candida albicans* foram introduzidos na plataforma em concentrações que variaram de 3,0µg/mL a 10µg/mL, como mostra a Figura 23.

Pela Figura 23 nota-se que mudanças significativas no deslocamento do pico de plasmon são perceptíveis para concentrações de antígenos maiores que 3,0µg/mL. Tal deslocamento corresponde a ligação do antígeno ao anticorpo proporcionado pela metodologia utilizada.

Figura 23: Comprimento de onda do pico de plasmon para as diferentes concentrações de antígenos de *Candida albicans*.



6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvida uma plataforma de sensoriamento baseada no efeito de ressonância de plasmon localizado, avaliada na detecção de antígenos de *Candida albicans*. O efeito de plasmon é caracterizado por uma frequência (ou comprimento de onda) de ressonância, que depende da estrutura (forma e tamanho, o material da NP, do meio onde ela se encontra e/ou da interface NP - meio, onde pode-se agregar diferentes moléculas (MAIER, 2007; UNSER *et al.*, 2015). A estrutura do novo imunossensor consiste basicamente de uma solução coloidal contendo nanopartículas de ouro e anticorpos anti-*Candida albicans*, que estão aderidos às nanoestruturas metálicas, por uma molécula de Cisteamina. A Glicina também foi utilizada como bloqueadora dos sítios não funcionalizados do sensor. Na construção da plataforma de sensoriamento. A adesão das diferentes moléculas nas nanopartículas foi comprovada com a análise do deslocamento do espectral do pico de plasmon do ouro.

A inserção do anticorpo de anti-*Candida albicans* na plataforma também estabeleceu modificações nos espectros dos colóides. 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 3.0µg/mL de antígeno de *Candida albicans*. Apesar da realização de estudos complementares para o estabelecimento dos limites de detecção e sensibilidade do sensor serem necessários, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a plataforma desenvolvida pode ser explorada como imunossensor para detecção de *Candida albicans*. Pelo fato de não encontrar na literatura valores de referência para a mínima concentração de antígenos em pacientes acometidos de Candidemia, a avaliação do desempenho da plataforma ainda é limitada. Outro fator que limita a exploração da plataforma é o volume de material empregado nos ensaios, que é superior a um mililitro (mL).

Volume bem menores de analitos podem ser utilizados na preparação de plataformas ópticas, com nanopartículas em superfície (NEVES *et al.*, 2014). Vale ressaltar que quando comparado com plataformas que exploram ressonância de plasmon de nanopartículas sob uma superfície (NEVES *et al.*, 2014; CAMARA *et al.*, 2013), a estrutura aqui proposta apresenta uma maior simplicidade de construção. Neste caso,

não há a necessidade de desenvolvimento de etapas para adesão de nanopartículas em substrato óptico (lamínula de vidro ou fibra óptica).

Com a metodologia de desenvolvimento da plataforma estabelecida, colóides de ouro podem ser explorados na identificação de diferentes antígenos. Em particular, foi demonstrado o uso da plataforma para a identificação de antígeno NS1 da Dengue, 0,07 $\mu\text{g/mL}$ (trabalho submetido para CLEO®/Europe-EQEC 2017, ver resumo no APÊNDICE 1).

Como resultados das atividades realizadas no período referente ao mestrado foram submetidos dois resumos para congresso internacional (CLEO®/Europe-EQEC 2017). Os resumos encontram-se na seção APÊNDICES desta monografia. Um artigo com os resultados apresentados nessa monografia está sendo elaborado, e tem seu *abstract* apresentado na seção APÊNDICES. Também, em colaboração com o grupo de pesquisa do Laboratório de Óptica Biomédica e Imagem, apoio foi dado na formulação de colóides de ouro para avaliação espectroscópica por telefone móvel. Este trabalho foi submetido à revista Sensors and Actuators B: Chemical, como indicado em ANEXO.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A plataforma desenvolvida representa uma proposta inovadora, pois até o presente momento não existem sensores de fungos baseados em ressonância de plasmon localizados. Porém estudos complementares ainda precisam ser realizados para o estabelecimento dos limites de detecção da plataforma de sensoriamento. Bem como, será necessária a realização de novos testes para a avaliação da possibilidade de detecção de antígenos na plataforma de sensoriamento, utilizando plasma sanguíneo.

REFERÊNCIAS

ALONSO-VALLE, H. et al. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 22, p. 254-7, 2003.

AKIRA, I. et al. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005; 100: 1-11. **amphiphilic molecules and their Langmuir – blodgett films**. Carbon , v. 41, p. 2385-2391, 2003.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319–327, 2007.

AZZAZY, H.M.E. et al. **Clinical Chemistry**, 2006; 52: 1238 - 1246.

AHAMMAD, A. J. Saleh; LEE, Jae-Joon; RAHMAN, Md. Aminur. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. **Sensors**, v.9, p.2289-2319, mar 2009.

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.

BALZANI, V., *Nanochemistry: A Chemical Approach to Nanomaterials*. Geoffrey A. Ozin and André C. Arsenault. **Small**, 2006. 2(5): p. 678-679.

BOW, E. J.; EVANS, G.; FULLER, J.; LAVERDIÈRE, M.; RENNIE, R.; SHAFRAN, S. D.; SHEPPARD, D.; CARLE, S.; PHILLIPS, P.; VINH, D. C. Canadian clinical practice guidelines for invasive candidiasis in adults. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 122-150, 2010.

BASSETTI, M., RIGHI, E., ANSALDI, F., MERELLI, M., CECILIA, T., DE PASCALE, G., DIAZ-MARTIN, A., LUZZATI, R., ROSIN, C., LAGUNES, L., TRECARICHI, E.M., SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., GARNACHO-MONTERO, J., SARTOR, A., RELLO, J., ROCCA, G.D., ANTONELLI, M. AND TUMBARELLO, M. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 6, p. 839-845, 2014.

BAILLY, S., MAUBON, D., FOURNIER, P., PELLOUX, H., SCHWEBEL, C., CHAPUIS, C., FORONI, L., CORNET, M., TIMSIT, J.F. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. – Trends over 10 years. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 103-11, 2016

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 102, p. 29-45, 1962.

CREIGHTON, J. A.; EADON, D. G. "Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements," Journal of the Chemical Society, **Faraday Transactions**, 1991, pp. 3881 - 3891.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infection due to *Candida* spp. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.

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

CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 1, 97-104, 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.

CHAMBERS, J. P. *et al.* Biosensor Recognition Elements. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v.10,p.1-12, 2008.

COSTA, I.C.; FELIPE, I.; GAZIRI, L.C.J. Resposta imune a *Candida albicans*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 27-40, 2008.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 175-187, 2009

CHI, X., HUANG, D., ZHAO, Z., ZHOU, Z., YIN, Z., GAO, J. (2012). Nanoprobes for in vitro diagnostics of cancer and infectious diseases. **Biomaterials** 33, 189–206. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.032

COLOMBO, A. L.; GARNICA, M.; ARANHA, C. L. F.; DA CUNHA, C. A.; BANDEIRA, A. C.; BORGHI, D.; CAMPOS, T.; SENNA, A. L.; VALIAS, D. M. E.; DIAS, V. C.; NUCCI, M. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, jul. 2012. Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13693786.2012.698024>. Acesso em: 13 jul. 2012.

CHEN, C. Y. et al. Clinical characteristics of candidaemia in adults with haematological malignancy, and antimicrobial susceptibilities of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-2010. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 6, p. 533–538, 2012.

CAMARA, A. R.; GOUVÊA, P. M. P.; DIAS A.C. M. S.; BRAGA A. M. B.; DUTRA, R. F.; ARAUJO, R. E.; CARVALHO, I. C. S. Dengue immunoassay with an LSPR fiber optic sensor. **Optics Express**. Vol. 21, No. 22, 2013.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN J. S.; NAISSIE, E. *Candida*. In: ANAÏSSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M.A. **Journal of Medical Mycology**, v. 1, p. 195-239, 2003.

DAS, R. S. S.; CHAKDAR, N. D. *et al.*, "Preparation of Silver Nanoparticles and Their Characterization," 2009.

DE ROSSI, T. et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

DEMITTO, F. D. O.; AMARAL, R. DO. Suscetibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina**, v. 48, p. 315–321, 2012.

DJORDJEVIC, Z. M.; MARKOVIC-DENIC, L.; FOLIC, M. M.; IGRUTINOVIC, Z.; JANKOVIC, S. M. Health care-acquired infections in neonatal intensive care units: Risk factors and etiology. **American Journal of Infection Control**, vol. 43: 86-88, 2015.

DAMBORSKY, P.; SVITEL, J.; KATRLIK, J. Optical biosensors. **Essays in Biochemistry** (2016) **60** 91–100 DOI: 10.1042/EBC20150010

EGGIMANN, P.; BILLE, J.; MARCHETTI, O. Diagnosis of Invasive Candidiasis in the ICU. **Annals of Intensive Care**. 1:37-46, 2011.

ERICSSON, E. Biosensor surface chemistry for oriented protein immobilization and biochip patterning. 1ª ed. Suécia: **Linköping University**, 64 p. 2013.

FURLANETO-MAIA L.; SPECIAN, A. F. L.; THORN, D. S. W.; OLIVEIRA, M. T.; FURLANETO, M. C. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 29, p. 33-37, 2007.

FREITAS, T. A.; MATTOS, A. B.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F. Amino-Functionalization of Carbon Nanotubes by Using a Factorial Design: Human Cardiac Troponin T Immunosensing Application. **BioMed Research International**, 2014, 1 - 9, 2014.

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

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

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatologia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da Candidemia. **Revista Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 225-234, 2010.

GUO, X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. **J. Biophotonics** 5, No. 7, 483–501 (2012) / DOI 10.1002/jbio.201200015.

HINRICHSSEN, S.L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 394-398, 2008.

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

HANG, K.; LIANG, Z.; ZHOU, N. **Design strategies for aptamer-based biosensors.** *Sensors* 2010, 10, 4541-4557.

HARTMAN, M.R., RUIZ, R.C., HAMADA, S., XU, C., YANCEY, K.G., YU, Y., *et al.* (2013). Point-of-care nucleic acid detection using nanotechnology. **Nanoscale** 5, 10141–10154. doi:10.1039/C3NR04015A

JUNG, Y.; JEONG, J. Y.; CHUNG, B. H. Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports. **Analyst**, 133, 697-701, 2008.

KANDE, T.; HORII, T.; ARJSHIMA, T.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**, v. 19, p. 973-989, 2002.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W., BOEKHOUT, T., editors. **The Yeasts, a Taxonomic Study.** Volume 2, 5th edition. New York, NY: Elsevier, 2011, p. 9-12.

KIM, C. K.; KALLURU, R. R.; SINGH, J. P.; FORTNER, A.; GRIFFIN, J.; DARBHA, G. K.; RAY, P. C. **Nanotechnology** 2006, 17, 3085.

KRYSCIO, D. R.; PEPPAS, N. A. Critical review perspective of macromolecularly imprinted polymers. **Acta Biomaterialia**, 8 (2), 461-473, 2012.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINSVACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica.** São Paulo: Sarvier, 2002, 257 p.

LEE, Jeong-O *et al.* Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. **Anal Bioanal Chem**, v.390, p.1023-1032, 2008.

LABUDA, J. *et al.* Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (**IUPAC Technical Report**). *Pure Appl. Chem.* 2010, 82(5), 1161-1187.

LIM, C. S.-Y. *et al.* *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 21–31, 2012.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* Biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.11, p. 3839-3846, 2006.

LIGLER, F. S. *Optical biosensors: today and tomorrow*, **Elsevier** (2008).

LUO, S. *et al.* Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 3, p. 161-169, 2013.

LI, Y. et al. Neutropenia and invasive fungal infection in patients with hematological malignancies treated with chemotherapy: a multicenter, prospective, non-interventional study in China. **Tumour Biology : the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 6, p. 5869–76, 2014.

MIE, G. Ann. Phys. (Weinheim, Ger.) 1908, 25, 377.

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

MAIER, S. A. *Plasmonics: Fundamentals and Applications*; Springer, 2007.

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.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida* spp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **RBAC**, v.40, p. 65-67, 2008.

MIMICA, L. M. J. et al. Diagnostico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, p. 17-23, 2009.

MAYER K. M.; HAFNER J. H. Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. **Chem. Rev.** 2011, 111, 3828–3857 | dx.doi.org/10.1021/cr100313v.

MENEZES, E. A.; JÚNIOR, A. A. V.; CUNHA, F. A.; CUNHA, M. C. S. O.; BRAZ, B. H. L.; CAPELO, L. G.; SILVA, C. L. F. Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina laboratorial**, v.48, n. 6, p. 415-420, 2012.

MURUGAIYAN, S. B., RAMASAMY, R., NIRANJAN GOPAL, N., KUZHANDAIVELU, V. Biosensors in clinical chemistry: An overview. **Adv Biomed Res.** 3, 67, 2014.

NEVES, W.W.; DUTRA, R. F.; PANDOLI, O.; NEVES, R.P.; ARAÚJO, R.E. Biossensor óptico para *Candida albicans* baseado em ressonância de plasmon localizado. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica **CBEB**, 2014.

O'TOOLE, G. A.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual review of microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

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.

PANDEY, P.; SINGH, S.P.; ARYA, S.K.; GUPTA, V.; DATTA, M.; SINGH, S.; MALHOTRA, B.D. **Langmuir**, 2007; 23, 3333–3337.

PEREIRA, F. C.; ZANONI, M. V. B.; MORETTO, L. M.; UGO P. Características ópticas e morfológicas de nanoestruturas de ouro. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 7, 1550-1554, 2007.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução á Espectroscopia; tradução d.; **Cengage learning**: São Paulo, 2010.

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

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de Autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 265-273 p.

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.

RAVERA, M. *et al.* DNA-Metallodrugs Interactions Signaled by Electrochemical Biosensors: An Overview. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v.2, 2007.

RUHNKE, M. *et al.* Anidulafungin for the treatment of candidemia/invasive candidiasis in selected critically ill patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 680–687, 2012.

REDEKER, E. S.; TA, D. T.; CORTENS, D.; BILLEN, B.; GUEDENS, W.; ADRIAENSENS, P. Protein engineering for direct immobilization. **Bioconjugate Chemistry**, 24, 1761-1777, 2013.

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

SHANG, L.; Wang, Y. Z.; Jiang, J. G.; Dong, S. J. **Langmuir** 2007, 23, 2714-2721.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Principios de Análisis instrumental. Editora: bookman, 5ª Edição, 2008.

STREHLITZ, B.; NIKOLAUS, N.; STOLTENBURG, R. **Protein Detection with aptamer biosensors**. *Sensors* 2008, 8, 4296-4307.

SURENDIRAN, A.; SANDHIYA S.; PRADHAN S.C.; ADITHAN C. Novel applications of nanotechnology in medicine. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 130, n. 6, p. 689-701, 2009.

STEINBACH, W. J. Epidemiology of invasive fungal infections in neonates and children. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 9, p. 1321-1327, 2010.

SHARMA, A.; MATHARU, Z.; SUMANA, G.; SOLANKI P. R.; KIM, C.G.; MALHOTRA, B. D. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. **Thin Solid Films**, Volume 519, Issue 3, Pages 1213–1218, 2010.

SU, L., W. Jia, et al. 2011. Microbial biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics** 26(5): 1788-1799.

SOUZA, E.V.M. et al. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. **Sensors** 2011, 11, 5616-5629.

SONG, K.; LEE, S.; BAN, C. **Aptamers and their biological applications**. **Sensors** 2012, 12, 612-631.

SILVA, B. V. M. **Desenvolvimento de sensores para imunoensaios aplicados ao diagnóstico do infarto agudo do miocárdio**. 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SPANU, T. *et al.* “Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: An Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories.” **Journal of Clinical Microbiology** 50.1 (2012): 176–179. *PMC*. Web. 27 Apr. 2016.

SANTOS, J. F. L.; SANTOS, M. J. L.; THESING, A., TAVARES, F. GRIEP, J.; RODRIGUES, M. R. F. Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Quim. Nova**, Vol. 39, No. 9, 1098-1111, 2016.

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

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.

TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal, pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 606-625, 2008.

TINGUELY, J.C.; SOW, I.; LEINER, C.; GRAND, J.; HOHENAU, A.; FELIDJ, N.; AUBARD, J.; KRENN, J. R. Gold nanoparticles for plasmonic biosensing: the role of metal crystallinity and nanoscale roughness. **BioNanoScience** 1:128–135. doi:10.1007/s12668-011-0015-4, 2011.

TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. **Analyst**, 138, 1619-1627, 2013.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: Performance of MALDI-TOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. **Infection**, v. 42, n. 2, p. 393–404, 2014.

UNSER, S.; BRUZAS, I.; HE, J.; SAGLE, L. Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing: Current Challenges and Approaches. **Sensors** 2015, 15, 15684-15716; doi:10.3390/s150715684.

VIDOTTI, M.; CARVALHAL, R. F.; MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.; KUBOTA, L. T. Biosensors Based on Gold Nanostructures. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 22, No. 1, 3-20, 2011.

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.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; CLEMENTS, J. C. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, West Sussex, v. 71, n. 9, p. R107-R116, 2006.

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

WANG, X. et al. Engineering Nanomaterial Surfaces for Biomedical Applications. **Exp Biol Med**, v.234, p.1128-1139, 2009.

WALKEY, C.; SYKES, E. A.; CHAN, W. C. W. Application of Semiconductor and Metal Nanostructures in Biology and Medicine. **American Society Of Hematology**, p.701-707, 2009.

YU, J.; LIU, S.; JU, H.; **Biosens. Bioelectron.** 2003,19, 509.

YANG L.; WEI W.; GAO X.; XIA J.; TAO H. A new antibody immobilization strategy basead on eletrideposition of nanometer-sized hydroxypatite for label-free capacitive immunosenror. **Talanta**. 68:40-46, 2005.

YANG Z. T., WU L., LIU X. Y., ZHOU M., LI J., WU J. Y., CAI Y., Mao En-Q., Chen Er- Z. and Lortholary O. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. **BMC Infectious Diseases** 2014, 14:241 doi:10.1186/1471-2334-14-241.

APÊNDICE A - Perspective on label-free *Candida albicans* diagnostic by exploring gold nanoparticle

Gabrielli M. F. de Oliveira¹, Sajid Farooq¹, Rosa F. Dutra² and Renato E. de Araujo¹

1. Laboratory of Biomedical Optics and Imaging, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

2. Department of Biomedical Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil

The prevalence of hospital-acquired infections by pathogenic fungi has increased considerably in recent years, leading to high levels of mortality. The genus *Candida* is responsible for about 80% of the fungal infections in the hospital environment and is relevant cause of bloodstream infections in patients admitted to intensive care units. Specific tests for the diagnosis of hematogênicas infections by *Candida albicans* have high costs and are limited on low resource environment. In this work we propose a new biosensor platform based on Localized Surface Plasmon Resonance for *Candida albicans* antigen identification. FEM calculations were used to investigate the electric field behavior around the nanostructure, and therefore to determine the proper NP dimensions for molecular sensing application. The sensing platform corresponds to an aqueous solution with gold nanoparticles, with 5nm or 50 nm diameter, functionalized with monoclonal antibodies of immunoglobulin class IgG anti-candida. The platform was evaluated by UV-VIS absorption spectroscopy. The results show the solution-based sensing platform ability to identify small concentration of *Candida* antigen.

Keywords: Plasmon resonance. Candidemia. Optical sensor. Diagnostic device.