

Perspetivas de utilização de nanomateriais em nanodiagnóstico

Prospectives for the use of nanomaterials in nanodiagnostic

Santos J.M.¹, Rodrigues S.M.¹, Ribeiro D.M.¹, Prior J.V.¹

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

Os métodos de diagnósticos convencionais estão exclusivamente empenhados na deteção de sintomas associados a uma dada patologia. Qualquer processo que permita determinar o mais antecipadamente possível a ocorrência da doença, inclusive antes de surgirem os primeiros indícios, ou que permita avaliar o risco da doença ocorrer, reforçaria significativamente as hipóteses de sucesso da terapia e tornaria até praticável tomar medidas preventivas para evitar a sua progressão. Muita da investigação em curso na área da medicina passa pelo desenvolvimento de estratégias ou dispositivos capazes de efetuar a monitorização, o mais antecipadamente possível, destes indícios, ou então capazes de detetar e quantificar precocemente marcadores biológicos, usualmente em concentrações muito baixas, associados a uma dada patologia. Na pesquisa por métodos de diagnósticos alternativos, aptos a ultrapassar algumas das limitações dos métodos atuais, os nanomateriais assumem um papel decisivo e abrem perspectivas de desenvolvimento extremamente promissoras para a área do nanodiagnóstico.

Palavras-chave: Nanomedicina, nanodiagnóstico, nanomateriais, pontos quânticos, nanopartículas metálicas

ABSTRACT

Conventional diagnostic methods are exclusively focused on the detection of the symptoms associated to a given pathology. Any process able to determine with anticipation the occurrence of a disease, inclusively before the first symptoms, or providing the means to predict the possibility of occurrence of that disease, would significantly reinforce the effectiveness of the therapy allowing, at the same time, the establishment of prevention measures to avoid its progression. Much of the worldwide health research aims at the development of expedite devices or strategies capable of carrying out the monitoring of first level signs, or able to early detect and quantify biomarkers, usually at very low concentrations, associated to a given illness. In the search for alternative diagnostic methods able to overcome the limitations of available technology nanomaterials assume a decisive role and anticipate extremely promising developments in healthcare medicine.

Keywords: Nanomedicine, nanodiagnosics, nanomaterials, quantum dots, metallic nanoparticles

¹REQUIMTE/Laboratório de Química Aplicada, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal.

Endereço para correspondência: João L.M. Santos, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal. *E-mail:* joaolms@ff.up.pt

Submetido/ Submitted: 03 de fevereiro 2014 | Aceite/Accepted: 06 de março de 2014

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma das áreas do conhecimento que apresentou um desenvolvimento mais acelerado, com constantes e fulgurantes avanços tecnológicos, em particular desde o início dos anos 90 em que adquiriu uma grande visibilidade à luz do reconhecimento do enorme potencial da manipulação da matéria a uma escala atômica. Envolvida no desenho, conceção, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos estruturados, em pelo menos uma dimensão, numa escala nanométrica, a nanotecnologia assume-se como uma ciência multidisciplinar intervindo tanto ao nível do desenvolvimento de novos fármacos, como nas tecnologias da informação, eletrónica, ambiente, engenharia de materiais, etc. É no entanto na área da medicina, em particular no desenvolvimento de nanopartículas para distribuição controlada de fármacos, para terapia genética personalizada e para nanodiagnóstico, que a nanotecnologia se revela mais promissora¹. A nanomedicina surge desta forma associada ao diagnóstico, tratamento e prevenção da doença, garantindo a preservação ou melhoria das condições de saúde do doente através do recurso a ferramentas de natureza molecular ou tirando proveito do conhecimento molecular do corpo humano.

O nanodiagnóstico, definido como a utilização de materiais, dispositivos, ou sistemas, de base nanotecnológica, com o propósito de realizar um diagnóstico clínico² surgiu associado a duas ideias fundamentais e complementares: diagnóstico precoce e sensibilidade acrescida. O diagnóstico precoce, como forma de combate da patologia com garantias reforçadas de sucesso, pressupõe a deteção da doença no seu estado inicial e a elevada sensibilidade requer uma interação significativa entre as moléculas (e.g. biomarcadores), células (e.g. células cancerígenas) ou organismos (e.g. microrganismos patogénicos) alvo e as partículas (e.g. nano-sondas) geradoras de um sinal analítico mensurável possibilitando, inclusive, a determinação de uma única molécula. Em virtude das reduzidas dimensões dos nanomateriais, comparável a dos recetores, poros ou outras estruturas celulares, estas interações são maximizadas e resultam num reforço da sensibilidade e da seletividade da análise. Por outro lado, o conceito de nanodiagnóstico está intimamente ligado a análises mais racionais

(custo/benefício) e passíveis de serem realizadas *in situ* ou ao domicílio (análises point-of-care). Como consequência da precocidade do diagnóstico a terapia poderá ser menos agressiva e com maior taxa de sucesso. A facilidade da utilização dos métodos de nanodiagnóstico, idealmente menos invasivos e menos desconfortáveis para o doente, permitirá aumentar a sua adesão, possibilitando uma monitorização mais frequente em situações de risco acrescido, e culminando no estabelecimento de programas de prevenção personalizados.

Os elementos essenciais das plataformas e dispositivos que têm vindo a ser desenvolvidos com vista à sua utilização como ferramentas de diagnóstico são genericamente designados de nanomateriais. Estes nanomateriais, como os nanocristais semicondutores (pontos quânticos), nanopartículas metálicas, nanopartículas de sílica, nanotubos de carbono, pontos quânticos de grafeno, nanopartículas magnéticas, nanopartículas poliméricas, etc, têm vindo a ser cada vez mais utilizados como componentes de sistemas que têm como objetivo a recolha de informação sobre o estado de saúde do doente, ou a avaliação do seu potencial de risco, ou, por exemplo a avaliação da patogenicidade de um dado microrganismo. A sua utilização pode ter um carácter individual, como por exemplo como agentes de contraste em imagiologia ou como sondas moleculares fluorescentes, ou podem ser combinados em dispositivos mais complexos como os *nanochips* ou *lab-on-a-chip* (LOC), os quais podem funcionar como unidades automáticas capazes de executar de forma autónoma todas as etapas que cabem numa análise.

Muito do potencial reconhecido aos nanomateriais e ao nanodiagnóstico está estreitamente relacionado com a importância que os biomarcadores apresentam como forma de sinalização de um comportamento anormal do organismo associado a uma dada patologia. Na descoberta de novos biomarcadores e na capacidade de os detetar a concentrações infinitamente reduzidas, inclusive ao nível de uma única molécula, assenta o grande fascínio do nanodiagnóstico e o sucesso da terapêutica e da prevenção.

NANODIAGNÓSTICO E BIOMARCADORES

De uma forma geral o conceito de nanodiagnóstico pressupõe a ocorrência de uma ligação ou interação específica entre dois

elementos complementares: um sistema de reconhecimento (bio recetor) ou sinalização e um analito ou molécula alvo. Um terceiro componente (transdutor) assegura que a alteração físico-química (por exemplo de cor) subjacente à referida ligação, e que é relacionável com a concentração do analito, é convertida num sinal mensurável³. Nesta perspetiva, os biomarcadores, definidos como uma alteração celular ao nível do DNA, RNA, metabolitos ou proteínas, passíveis de serem relacionados com uma dada patologia, desempenham um papel crucial na perspetiva de uma visão personalizada da medicina sendo ponto de referência tanto para o diagnóstico como para a terapêutica⁴. Os nanomateriais apresentam propriedades óticas que os tornam particularmente atrativos para identificação e sinalização de biomarcadores. Materiais fluorescentes hidrossolúveis como nanocompósitos de prata, nanopartículas de ouro, pontos quânticos semicondutores, etc, têm vindo a ser usados no rastreamento de biomarcadores celulares *in-vitro*, como sinalizadores moleculares em estudos para diagnóstico precoce do cancro e na monitorização da eficiência terapêutica de fármacos ativos contra linhas celulares específicas. Por outro lado, intensifica-se a pesquisa por novos biomarcadores, vindo os nanomateriais a desempenhar um papel cada vez importante no desenvolvimento de plataformas analíticas capazes de identificar e isolar estas moléculas.

NANOMATERIAIS E NANOTECNOLOGIAS

Os nanomateriais são toda a classe de materiais que apresentam uma ou mais dimensões inferiores a 100 nm. Em virtude do seu reduzido tamanho, os nanomateriais apresentam um conjunto de propriedades físicas, químicas, mecânicas, elétricas, magnéticas, óticas, etc, que os distingue dos materiais de dimensões convencionais ou macroscópicas (materiais *bulk*) e que os tornam particularmente atrativos para aplicação em nanodiagnóstico. Entre estas salientam-se: elevada razão superfície-volume, o que permite uma grande reatividade e um aumento significativo da sensibilidade e do limite de deteção, possibilitando, por exemplo, que sejam apenas necessárias poucas moléculas de analito ou espécie alvo para garantir a sua deteção; confinamento quântico; prevalência de

fenómenos interfaciais; estrutura organizada e bem definida. De uma forma genérica, os nanomateriais podem ser utilizados em diagnóstico com diferentes propósitos, nomeadamente como sinalizadores, suportes, amplificadores de sinal, transdutores, etc. Há no entanto um conjunto de aplicações em que os nanomateriais têm vindo a assumir uma posição de relevo: na implementação de *biochips* e *nanarrays*; caracterização citogenética; rastreamento de células estaminais; descoberta de novos biomarcadores; deteção de moléculas ou células únicas; despistagem do cancro; monitorização de desenvolvimento de doenças do foro neurológico; pesquisa e deteção de agentes infecciosos.

Dada a ampla diversidade de materiais e tecnologias já desenvolvidas, é difícil estabelecer uma classificação das técnicas disponíveis para nanodiagnóstico, tanto mais que muitas vezes os sistemas analíticos propostos combinam mais do que uma nanotecnologia. No entanto alguns dos materiais com maior potencial fazem parte dos seguintes grupos:

1. Nanopartículas: *Metálicas; Pontos quânticos; Sílica; Magnéticas; Poliméricas.*
2. *Nanochips: Nanarrays; Lab-on-a-chip.*
3. Nanosensores: *Sensores óticos; Sensores eletroquímicos; Nanowires; Nanoshells; Cantilevers; Bio-barcode.*

Apesar da gama alargada de nanomateriais e nanoestruturas disponíveis para utilização em nanodiagnóstico há um conjunto de materiais que assumem um relevo particular e que serão por isso objeto de uma descrição mais pormenorizada.

Nanocristais semicondutores. Pontos quânticos

Os pontos quânticos (QDs) são nanocristais semicondutores coloidais (CdSe, CdTe, ZnSe, CdS, InAs, etc) que apresentam propriedades óticas (fotoluminescência) e reatividade diferente da dos materiais convencionais com a mesma composição⁵. Devido ao seu reduzido tamanho (usualmente entre 1 e 10 nm) os QDs estão sujeitos a confinamento quântico o que faz com que a energia do *band-gap* dependa do tamanho do nanocristal. Como consequência, os nanocristais apresentam uma banda de excitação larga e bandas de emissão estreitas. Mais ainda, como o comprimento de onda de emissão depende do tamanho do nano-cristal é

muito fácil preparar QDs capazes de emitir radiação em toda a zona do visível (400-800 nm) variando simplesmente o tempo de crescimento do cristal. Sendo materiais como grande estabilidade fotoquímica (não sujeitos a photobleaching), elevado rendimento quântico e facilmente funcionalizáveis, os pontos quânticos têm, nos últimos anos, sido utilizados como sondas fluorescentes em imagiologia de células e tecidos, na sinalização de moléculas alvo, na monitorização da distribuição controlada de fármacos, como nanos sensores, etc⁶. Em virtude da sua estabilidade e elevada absorvidade molar, os pontos quânticos substituem com sucesso as sondas moleculares fluorescentes funcionando como transdutores capazes de converter a energia resultante de processos físicos, químicos ou biológicos em luz, a qual, após aquisição e processamento, pode ser utilizada como forma de quantificação da extensão ou magnitude do referido processo⁷.

Nanopartículas metálicas de ouro e prata

As nanopartículas metálicas, sobretudo de ouro e prata, apresentam uma gama alargada de aplicações tanto na determinação de biomarcadores, como na sinalização celular ou na deteção de agentes infecciosos, podendo funcionar como sondas óticas, marcadores eletroquímicos, amplificadores ou mediadores de sinal em processos de transferência de energia por combinação com outras nanopartículas, etc. Apresentando propriedades óticas muito interessantes associadas à formação de plasmões de superfície (surface plasmons) capazes de interagir com uma radiação incidente, são também substancialmente inertes em fluidos biológicos o que os torna materiais particularmente atrativos para aplicação em nano-diagnóstico. Possuem também uma elevada área superficial sendo por isso capazes de adsorver biomoléculas sem afetar a sua atividade biológica. Por outro lado, são fáceis de sintetizar e as suas características (dependentes da forma e do tamanho) podem ser facilmente ajustadas a um tipo específico de aplicação. Constituídas por um núcleo metálico estas nanopartículas estão revestidas por uma camada orgânica a qual é fundamental para modular o tipo de interações que são estabelecidas com o ambiente circundante. Esta camada determina não só a estabilidade das nanopartículas mas também a sua reatividade. A incorporação de

ligandos ou a funcionalização com diferentes tipos de moléculas permite aumentar a variedade e a especificidade das interações, proporcionando uma grande versatilidade e diversidade de utilização. Utilizações correntes de nanopartículas metálicas incluem a sua incorporação como elementos sensores em testes imunocromatográficos (ICS-immuno-chromatographic strips) para determinação de agentes infecciosos e biomoléculas como toxinas e anticorpos, a incorporação em *bio-barcode*s, por exemplo para determinação de anticorpos específicos da próstata (PSA), e a aplicação em ensaios colorimétricos para deteção de DNA bacteriano. Em desenvolvimento encontram-se várias nano sondas que permitirão por exemplo, a pesquisa de marcadores tumorais, a tipificação de vírus em surtos gripais, o diagnóstico rápido da malária e do dengue, identificação de multirresistências na tuberculose, etc.

Nanopartículas de sílica

As nanopartículas de sílica dopadas com materiais fluorescentes têm vindo a ser cada vez mais utilizadas como etiquetas na sinalização de moléculas e células, nomeadamente através do recurso à microscopia de fluorescência e técnicas relacionadas. Uma das vantagens mais marcante dos materiais de sílica é a sua estabilidade química e caráter inerte, o que lhes confere um grande biocompatibilidade. Por outro lado, uma nanopartícula de sílica pode ser carregada com milhares de moléculas fluorescentes, inclusive com pontos quânticos, enquanto que, por exemplo, a marcação direta de anticorpos em ensaios de imunofluorescência utiliza apenas algumas moléculas da sonda. Daqui resulta que as nanopartículas exibem uma muito maior intensidade de fluorescência que assegura uma superior sensibilidade na deteção. Esta característica pode ser extremamente útil em situações em que se pretende detetar uma única molécula. Acresce que a química de superfície das nanopartículas de sílica permite que estas possam ser facilmente funcionalizadas e bioconjugadas com diferentes moléculas, como por exemplo anticorpos e ácidos nucleicos, o que lhes confere uma grande versatilidade operacional. As partículas têm sido utilizadas em diferentes situações, nomeadamente na deteção de bactérias com crescimento lento, como é o caso do *myco-bacterium tuberculosis*⁸, e pes-

quisa precoce de biomarcadores tumorais⁹.

Partículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas são um tipo de nanomaterial que exhibe um comportamento superparamagnético e que pode ser usado numa ampla variedade de aplicações biomédicas em que se inclui a utilização como agentes de contraste para imagiologia por ressonância magnética (MRI) e na destruição de células do cancro por hipertermia. À semelhança das outras nanopartículas, as partículas magnéticas podem ser objeto de funcionalização ou revestimento com materiais de natureza vária, que pode ser especificamente adaptado de acordo com a aplicação prevista, garantindo assim interações celulares ou moleculares mais controláveis. No caso particular da imagiologia MRI, a utilização de partículas magnéticas como agentes de contraste possibilita uma melhor diferenciação entre tecidos saudáveis e tecidos afetados, possibilitando também a visualização de eventos biológicos que possam ocorrer no interior do organismo. Os materiais magnéticos são também empregues como etiquetas na marcação de diferentes tipos de entidades biológicas, tais como as células, ADN e proteínas. Neste particular, as partículas magnéticas apresentam algumas vantagens em comparação com as etiquetas convencionais, como sejam enzimas, sondas moleculares fluorescentes e quimioluminescentes, e também radioisótopos, dado que os materiais magneticamente etiquetados podem ser posteriormente isolados e purificados por aplicação de um campo magnético, permitindo um rastreio simples e de baixo custo (como por exemplo, no isolamento de células do cancro em dispositivos *lab-on-a-chip*).

APLICAÇÕES

Devido às reduzidas dimensões dos nanomateriais usados, a grande maioria das aplicações em nanodiagnóstico pode ser integrada na categoria dos nano sensores ou nano sondas e dos *nanochips* ou *nanoarrays*, embora outras nanoestruturas como os *cantilevers*, *bio-barcodes*, ou *nanowires* apresentem um elevado potencial de desenvolvimento e de utilização. Tirando proveito das características específicas de alguns materiais, como por exemplo as

propriedades óticas dos pontos quânticos ou das nanopartículas metálicas, é possível encontrar um número crescente de propostas que se revelam extremamente eficientes na monitorização de um conjunto alargado de parâmetros.

Sensores

Um dos tipos de aplicação mais frequente dos nanomateriais, resultante da sua capacidade de interagir com o meio circundante, em particular com espécies em solução, é como sensores químicos e biológicos. A capacidade de produzirem resultados de qualidade em termos de sensibilidade e seletividade tem por isso vindo a ser explorada como instrumentos de diagnóstico, quer como sondas imobilizadas, quer inclusive como material de suporte. De entre os diferentes tipos de nano sensores já desenvolvidos salientam-se os nano sensores óticos, baseados em medidas colorimétricas, de fluorescência, FRET, etc, nano sensores eletroquímicos, *nanowires*, e *nanoshells*, aplicados na determinação de moléculas biologicamente ativas como ácidos nucleicos¹⁰, enzimas¹¹ e proteínas¹².

Uma das áreas mais importantes de aplicação de nano sensores é na deteção de agentes patogénicos, um dos aspetos mais crítico no diagnóstico clínico¹³ e que terá que ser realizada, desejavelmente, de forma rápida, seletiva e com elevada sensibilidade. As técnicas correntemente empregues, baseadas em métodos PCR, ensaios imunológicos, cultura e contagem de colónias, técnicas de fluorescência, etc, embora providenciando resultados de qualidade, são geralmente laboriosas, complexas e demoradas. A utilização de nanobiosensores² capazes de detetar, por exemplo, uma única bactéria em apenas 20 min¹⁴, permitem ultrapassar estas limitações, providenciando análise em tempo real, restringindo a exposição dos operadores, possibilitando o processamento paralelo de múltiplas amostras, etc.

Para além da utilização direta, em dispositivos simples, os nanomateriais podem ser utilizados como sensores em dispositivos de arquitetura mais complexa como sejam os *nanoarrays*, *cantilevers* and *bio-barcodes*. Os *nanoarrays* são matrizes de sensores que podem incorporar diferentes tipos de nanomateriais como partículas metálicas, dendrí-

meros, partículas poliméricas, magnéticas, nanocristais semicondutores, etc combinados com ácidos nucleicos, lípidos, péptidos sintéticos, vetores virais, etc, e que são capazes de fornecer múltipla informação por amostra ao mesmo tempo que processam rapidamente um número elevado de amostras. São correntemente utilizados no ensaio paralelo de ácidos nucleicos¹⁵ e na avaliação de perfis proteicos¹⁶. Os *cantilevers* são microplataformas analíticas, ancoradas numa das extremidades, construídas em silício ou em nanotubos de carbono. Os *cantilevers* são sensores mecânicos que respondem a variações de massa ou de stress provocados por processos químicos ou biológicos que ocorrem à sua superfície e que causam não só a deflexão do *cantilever* mas também a alteração da sua frequência de ressonância. São usados em ensaios multiplexados para deteção de biomoléculas e de sequências de DNA¹⁷. Os *bio-barcode*s são estruturas em sanduíche que funcionam com base na interação específica combinada de partículas magnéticas e nanopartículas sinalizadoras (nano sondas, como por exemplo pontos quânticos) com uma molécula biológica alvo. As nanopartículas magnéticas permitem a separação e isolamento das moléculas alvo enquanto que as nano sondas são usadas para deteção e amplificação, o que proporciona uma elevada sensibilidade. São aplicados na deteção de proteínas¹⁸, agentes patogénicos¹⁹, DNA²⁰, etc.

Lab-on-a-chip

A miniaturização de dispositivos analíticos, capazes de funcionar como uma unidade autónoma e autossuficiente, culminou no desenvolvimento dos sistemas microfluídicos ou *lab-on-a-chip*. Estes sistemas são baseados na manipulação automática de volumes de amostra e reagentes, a uma escala micro ou nano, com vista à obtenção de um sinal analítico, e incluem elementos propulsores de soluções, de separação, de aquecimento, pré-concentração, sensores, transdutores, etc. Estes sistemas apresentam várias vantagens como a possibilidade de utilização *in situ*, consumo de volumes extremamente reduzidos de amostra e reagentes, o que resulta na produção de menos resíduos, e entrega de resultados de qualidade em tempo real. Por outro lado, os LOC são extremamente compactos e a sua produção pode ser massificada e a custo reduzido, o que

possibilita uma utilização descartável. Podem também combinar múltiplos elementos sensores, para uma ou para várias moléculas alvos, providenciando um elevado ritmo de amostragem e a realização de análises multiparamétricas. Nos últimos anos a investigação com os LOC para diagnóstico molecular tem sofrido uma enorme expansão envolvendo a recurso a ferramentas poderosas como a sequenciação de DNA, análise *on-chip* de perfis genéticos e deteção de biomarcadores para determinar a suscetibilidade de um indivíduo a uma determinada doença ou situações patológicas existentes. Por exemplo, Christo-doulides *et al* desenvolveram um dispositivo LOC para determinação de proteína C reativa na saliva²¹ a uma concentração de 10 pg ml⁻¹. Os mesmos autores propuseram um método LOC para utilização no domicílio (*Point-of-Care*) capaz de determinar 21 proteínas no soro e na saliva e desta forma avaliar a ocorrência de enfartes agudos do miocárdio²². Outros trabalhos interessantes envolvem a utilização de dispositivos LOC para determinação de biomarcadores cardíacos²³, manipulação de células estaminais²⁴, deteção de agentes patogénicos²⁵, monitorização dos níveis de colesterol²⁶, etc.

Deteção de doenças de natureza genética

Uma das áreas que cria mais expectativas no que concerne ao desenvolvimento de métodos de nanodiagnóstico, prende-se com a deteção de genes associados a doenças específicas, em que, mais do que confirmar a ocorrência da doença, se pretende avaliar a predisposição do indivíduo ou o seu fator de risco. Têm vindo a ser desenvolvidos sensores eletroquímicos de DNA, baseados em interações à nanoescala entre a molécula alvo e a molécula de reconhecimento e que geralmente envolvem mecanismos de amplificação mediados por nanopartículas²⁷.

Doenças infecciosas

As doenças infecciosas são um dos mais sérios problemas de saúde pública, sobretudo nesta era da globalização, em que um dado foco de doença pode ser rapidamente disseminado por várias regiões²⁸. Por outro lado, nos países menos desenvolvidos a carência de recursos faz com que doenças como a sida, a tuberculose, a malária, etc, reclamem todos os anos milhares

de vítimas. Neste sentido, o diagnóstico destas doenças, desejavelmente na fase inicial, constitui um dos desafios mais importantes da moderna medicina.

O diagnóstico de uma doença infecciosa envolve a deteção do agente patogénico, tanto de forma direta como indireta, e deve preferencialmente ser efetuado de forma rápida, sensível e exata. A rapidez é importante para evitar a sua disseminação e facilitar o tratamento, uma elevada sensibilidade garante a deteção o mais precocemente possível e a exatidão permite eliminar falsos resultados, positivos ou negativos²⁹. Uma das vantagens da utilização de nanomateriais prende-se com o facto de apresentarem uma elevada área superficial, o que permite a ligação de um número alargado de moléculas capazes de sinalizar alvos moleculares específicos, proporcionando uma sensibilidade acrescida. Mais ainda, estes materiais apresentam um grande versatilidade em termos de modificação de superfície, a qual pode ser efetuada com recurso a proteínas, anticorpos, DNA, etc, através de adsorção física (interações electrostáticas e hidrofóbicas) ou por estabelecimento de ligações covalentes (funcionalização com tióis, amins ou grupos carboxílicos). Por outro lado, apresentam elevada reatividade, assegurando uma resposta num tempo relativamente curto, e podem ser usados em quantidades mínimas, o que reduz o custo dos ensaios. Finalmente, a miniaturização e automatização dos sistemas facilita a sua aplicação em situações de campo e simplifica os protocolos operacionais, além de que permite a implementação de dispositivos descartáveis de baixo custo e fáceis de utilizar.

Entre as nanopartículas usadas em nanodiagnóstico destacam-se os pontos quânticos, partículas magnéticas, lipossomas, partículas metálicas (soluções coloidais de metais nobres como a prata e o ouro) e nanopartículas de sílica (Tabela 1).

Nanodiagnóstico da tuberculose

A tuberculose continua a ser uma das mais sérias doenças infecciosas, requerendo por isso uma vigilância apertada e efetivos meios de diagnóstico e tratamento. A prevalência desta doença, sobretudo em países em vias de desenvolvimento e com poucos recursos médicos, motivou a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de deteção da tuberculose, baseadas na utilização de nanomateriais, que reúnem características como uma maior rapidez de resposta, menores custos e mais simples utilização⁴². Baseadas em mecanismos de reconhecimento biomolecular (envolvendo, por exemplo, ácidos nucleicos, anticorpos ou proteínas), os sistemas implementados recorrem essencialmente a nanopartículas metálicas (ouro e prata), de sílica e a pontos quânticos. A miniaturização permite uma elevada portabilidade facilitando a utilização destas plataformas em zonas remotas sem acesso ou com acesso limitado a equipamento convencional (Tabela 2).

PERSPETIVAS

Embora a medicina ainda assuma uma visão massificada do doente, tratando-o como um exemplar representativo de um grupo indivíduos com um conjunto de problemas comuns, existe uma tendência para efetuar cada vez mais uma abordagem personalizada. Esta

Tabela 1. Nanopartículas usadas em nanodiagnóstico

Agente patogénico	Tecnologia	Reconhecimento	Método de deteção	Referência
E. Coli	Pontos quânticos	Anticorpos	Microscopia fluorescência	30
B. anthracis	Nanopartículas sílica	Anticorpos	Microscopia fluorescência	31
S. typhimurium	Lipossomas	Anticorpos	Fluorescência	32
L. monocytogenes	Partículas magnéticas	Anticorpos	PCR	33
S. aureus	Partículas magnéticas	Anticorpos	Turbidimetria	34
H. pylori	Nanopartículas deAu	Anticorpos	SEM	31
K. Pneumoniae	Nanopartículas deAg		SERS	35
E. faecalis	Partículas magnéticas	Vancomicina	Deteção visual	36
M. pneumoniae	Nanopartículas deAu		SERS	37
HBV	Nanopartículas deAu	Proteína A	Deteção visual	38.39
HPV	Pontos quânticos	Anticorpo	Fluorescência	40

Giardia lamblia	Nanopartículas deAu	Anticorpo	UV/Vis	41
-----------------	---------------------	-----------	--------	----

Tabela 2. Nanopartículas metálicas e métodos de detecção

Nanopartículas	Método de detecção	Referência
Metálicas(Au)	Colorimétrico	43
Metálicas (Au)	Colorimétrico	44
Magnéticas	Relaxamento spin-spin	45
Sílica	Citometria de fluxo	46
Sílica	Microscopia de fluorescência	47
Pontos quânticos	Fluorescência	48

perspetiva irá intensificar-se no futuro reforçando o conceito: cada doente é um caso e cada caso tem a sua solução. Os tratamentos serão assim ajustados em função, por exemplo, de um perfil particular de biomarcadores ou as doses poderão ser adaptadas à capacidade metabólica do paciente. A miniaturização das ferramentas de diagnóstico poderá significar um menor consumo de reagentes e de amostra, aumentando em simultâneo a velocidade da reação. Ou um aumento da portabilidade dos sistemas analíticos possibilitando a sua aplicação *in situ*, mais confortável para o paciente porque evitará a sua deslocação. A integração de vários elementos sensores permitirá a execução de análises multiparamétricas com o concomitante acesso a quantidades acrescidas de informação. O diagnóstico privilegiará a análise e caracterização das proteínas do sangue uma vez que o sangue em circulação reflete o estado de saúde da maior parte dos órgãos.

A tecnologia evoluirá no sentido da construção de dispositivos de análise modulares, a partir de blocos sensores de reduzidas dimensões. Embora a utilização de sondas fluorescentes moleculares funcione como um elemento limitativo da miniaturização, uma vez que esta reduz a intensidade de sinal, o aparecimento de nanopartículas fotoluminescente com elevado rendimento quântico e grande estabilidade fotoquímica permitirá ultrapassar estas limitações.

Em conclusão, o nanodiagnóstico irá cada vez mais tirar partido do diagnóstico molecular e aproveitar as potencialidades apresentadas pelos nanomateriais no sentido de assegurar uma monitorização mais simples e rápida do estado de saúde do paciente, garantindo

avaliações da doença cada vez mais precoces e mais económicas, e inclusive, procurar uma maior proximidade do doente, através do desenvolvimento de dispositivos para análises *point-of-care*. Áreas como a despistagem do cancro, detecção de doenças infetocontagiosas e a procura por novos biomarcadores, serão claramente privilegiadas no futuro da nanomedicina e do nanodiagnóstico. Um conceito claramente em expansão é o conceito de teranóstico que pretende combinar na mesma nanopartícula ou nanoestrutura o diagnóstico e a terapêutica, proporcionando ferramentas capazes de em simultâneo sinalizar, tratar e vigiar uma doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care, Clin. Nanomed. 2007;3: 20-31.
- 2.Azzazy HME, Mansour MMH, Kazmierczak SC. Nanodiagnosics: a new frontier for clinical laboratory medicine. Clin. Chem. 2006; 52: 1238-1246.
- 3.Shinde SB, Fernandes CB, Patravale VB. Recent trends in in-vivo nanodiagnosics for detection of pathogens, J. Control. Release. 2012; 159: 164-180.
- 4.Jain KK. Role of nanobiotechnology in the development of personalized medicine, Nanomed. 2009; 4: 249-252.
- 5.Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Sundaesan G, Wu AM, Gambhir SS, S. Weiss S. Science. 2005; 307: 538-544.
- 6.Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging, Adv. Drug Deliv. Rev. 2008; 60: 1226-1240.
- 7.Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL,

- Urano Y, Yasuteru. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging, *Chem. Rev.* 2010; 110: 2620-2640.
8. Qin D, He X, Wang K, Zhao XJ, Tan W. Fluorescent nanoparticle-based indirect immunofluorescence microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Chen. J. Biomed. Biotech.* 2007; 1-9.
9. Guosong G, Wu J, Leng C, Ju H, Yan F. Disposable immunosensor array for ultrasensitive detection of tumor markers using glucose oxidase-functionalized silica nanosphere tags, *Biosens. Bioelectron.* 2011; 26: 3782-3787.
10. Litos IK, Ioannou PC, Christopoulos TK, Synodinos JT, Kanavakis E. Multianalyte, dipstick-type, nanoparticle-based DNA biosensor for visual genotyping of single-nucleotide polymorphisms *Biosens. Bioelectron.* 2009; 24: 3135-3139.
11. Hong S, Choi I, Lee S, Yang YJ, Kang T, Yi J. Sensitive and Colorimetric Detection of the Structural Evolution of Superoxide Dismutase with Gold Nanoparticles, *Anal. Chem.* 2009; 81: 1378-1382.
12. Hu j, Zheng PC, Jiang JH, Shen GL, Yu RQ, Liu GK. Electrostatic Interaction Based Approach to Thrombin Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* 2009; 81: 87-93.
13. Syed MA. Advances in nanodiagnostic techniques for microbial agents, *Biosens. Bioelectron.* 2014; 51: 391-400.
14. Zhao X, Hilliard LR, Mechery SJ. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: 5027-5032.
15. Niemeyer CM. Functional devices from DNA and proteins, *Nano Today* 2007; 2: 42-52.
16. Lynch M, Mosher C, Huff J, Nettikadan S, Johnson J, Henderson E. Functional protein *nanoarrays* for biomarker profiling, *Proteomics* 2004; 4: 1695-1702.
17. Raiteri R, Grattarola M, Butt HJ, Skladal P. Micromechanical *cantilever*-based biosensors, *Sens. Actuat. B* 2001; 79: 115-126.
18. Zhang X, Qi B, Li Y, Zhang S. Amplified electrochemical aptasensor for thrombin based on bio-barcode method, *Biosens. Bioelectron.* 2009; 25: 259-262.
19. Zhang D, Huarng MC, Alocilja E. A multiplex nanoparticle-based bio-barcoded DNA sensor for the simultaneous detection of multiple pathogens, *Biosens. Bioelectron.* 2010; 26: 1736-1742.
20. Nair PR, Alam MA. Theoretical detection limits of magnetic biobarcode sensors and the phase space of nanobiosensing, *Analyst.* 2010; 135: 2798-2801.
21. Christodoulides N, Mohanty S, Miller CS, Langub MC, Floriano PN, Dharshan P, Ali MF, Bernard B, Romanovicz D, Anslyn E, Fox PC, McDevitt JT. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva, *Lab on a Chip* 2005; 5: 261-269.
22. Floriano PN, Christodoulides N, Miller CS, Ebersole JL, Spertus WJ, Rose BG, Kinane DF, Novak MJ, Steinhubl S, Acosta S, Mohanty, Dharshan P, Yeh C, Redding S, Furmaga W, McDevitt JT. Use of Saliva-Based Nano-Biochip Tests for Acute Myocardial Infarction at the Point of Care: A Feasibility Study, *Clin. Chem.* 2009; 55: 1530-1538.
23. Mohammed M, Desmulliez MPY, Marc PY. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review, *Lab on a Chip.* 2011; 11: 569-595.
24. Gupta K, Kim DH, Ellison D, Smith C, Kundu A, Tuan J, Suh KY, A. Levchenko A. Lab-on-a-chip devices as an emerging platform for stem cell biology. *Lab on a Chip.* 2010; 10: 2019-2031.
25. Foudeh AM, Didar TF, Veres T, Tabrizian M. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics. *Lab on a Chip.* 2012; 12: 3249-3266.
26. Kim JE, Cho JH, Paek SH. Functional membrane-implanted lab-on-a-chip for analysis of percent HDL cholesterol. *Anal. Chem.* 2005; 77: 7901-7907.
27. Jain KK. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics, *Clin. Chim. Acta.* 2005; 358: 37-54.
28. Syed MA. Advances in anodiagnostic techniques for microbial agents, *Biosens. Bioelectron.* 2014; 51: 391-400.
29. Tallury P, Malhotra A, Byrne LM, Santra S. Nano- bioimaging and sensing of infectious diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010; 62: 424-437.
30. Hahn MA, Tabb JS, Krauss TD. Detection of single bacterial pathogens with semiconductor quantum dots, *Anal. Chem.* 2005; 77: 4861-4869.
31. Lin FYH, Sabri M, Alirezaie J, Li D, Sherman PM. Development of a nanoparticle-labeled

- microfluidic immunoassay for detection of pathogenic microorganisms. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12: 418-425.
32. Ho JA, Zheng SC, Tseng WH, Lin YJ, Chen CH. Liposome-based immunostrip for the rapid detection of Salmonella, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008; 391: 479-485.
33. Yang HY, Qu LW, Lin Y, Jiang XP, Sun YP. Detection of *Listeria monocytogenes* in Biofilms Using Immunonanoparticles, *J. Biomed. Nanotechnol.* 2007; 3: 131-138.
34. Lee H, Sun E, Ham D, Weissleder R. Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells, *Nat. Med.* 2008; 14: 869-872.
35. Liu TY, Chen Y, Wang H, Huang Y, Chao YC, Tsai KT, Cheng WC, Chuang CY, Tsai HT, Huang CY, Wang DW, Lin CH, Wang JK, Wang YL. Differentiation of Bacteria Cell Wall Using Raman Scattering Enhanced by Nanoparticle Array, *J. Nanosc. Nanotechnol.* 2012; 12: 5004-5008.
36. Kell AJ, Stewart G, Ryan S, Peytavi R, Boissinot M, Huletsky A, Bergeron MG, Simard B. Vancomycin-modified nanoparticles for efficient targeting and preconcentration of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *ACS Nano.* 2008; 2:1777-1788.
37. Driskell JD, Shanmukh S, Yong-Jun L, Hennigan S, Jones L, Yi-Ping Z, Dluhy RA, Krause DC, Tripp RA. Infectious agent detection with SERS-active silver nanorod arrays prepared by oblique angle deposition. *IEEE Sens.* 2008; 8: 863-870.
38. Wang YF, Pang DW, Zhang ZL, Zheng HZ, Cao JP, Shen JT. Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement, *J. Med. Virol.* 2003; 70: 205-2011.
39. Duan LL, Wang YF, Li SSC, Wan ZX, Zhai JX. Rapid and simultaneous detection of human hepatitis B virus and hepatitis C virus antibodies based on a protein chip assay using nano-gold immunological amplification and silver staining method. *BMC Infec. Dis.* 2005; 5: 53.
40. Klostranec JM, Xiang Q, Farcas GA, Lee JA, Rhee A, Lafferty EI, Perrault SD, Kain KC, Chan WCW. Convergence of quantum dot barcodes with microfluidics and signal processing for multiplexed high-throughput infectious disease diagnostics. *Nano Lett.* 2007; 7: 2812-2818.
41. Li XX, Cao C, Han SJ, Sim SJ. Detection of pathogen based on the catalytic growth of gold nanocrystals. *Water Res.* 2009; 43: 839-845.
42. Veigas B, Doria G, Baptista PV. in "Nanodiagnosics for Tuberculosis, Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis". Ed. Pere-Joan Cardona, InTech, 2012, pp. 257-276.
43. Baptista PV, Koziol-Montwka M, Paluch-Oles J, Doria G, Franco R. Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples. *Clin. Chem.* 2006; 52: 1433-1434.
44. Soo PC, Horng YT, Chang KC, Wang JY, Hsueh PR, Chuang CY, Lu CC, Lai HC. A simple gold nanoparticle probes assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* complex from clinical specimens. *Mol. Cell. Probes* 2009; 23: 240-246.
45. Kaittani C, Naser SA, Perez JM. One-step. Nanoparticle-mediated bacterial detection with magnetic relaxation. *Nano Lett.* 2007; 7: 380-383.
46. Qin D, He X, Wang K, Tan WH. Fluorescent nanoparticles and SYBR Green I based two-color flow cytometry to determine *Mycobacterium tuberculosis* avoiding false positives, *Biosens. Bioelectron.* 2008; 24: 626-631.
47. Qin D, He X, Wang K, Zhao XJ, Tan WH, Chen J. Fluorescent nanoparticle-based indirect immunofluorescence microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biomed. Biotech.* 2007; 89364
48. Gazouli M, Liandris E, Andreadou M, Sechi LA, Masala S, Paccagnini D, Ikononopoulos J. Specific Detection of Unamplified *Mycobacterial* DNA by Use of Fluorescent Semiconductor Quantum Dots and Magnetic Beads. *Clin. Microb.* 2010; 48: 2830-2835.