

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia

OLAVO DE OSTI COMPARATO FILHO

DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA E COLORIMÉTRICA ENTRE AS ESPÉCIES
Paracoccidioides brasiliensis* E *Paracoccidioides lutzii

São José dos Campos, S.P.

2020

OLAVO DE OSTI COMPARATO FILHO

**DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA E COLORIMÉTRICA ENTRE AS ESPÉCIES
Paracoccidioides brasiliensis E *Paracoccidioides lutzii***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Doutor em Física e Astronomia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero.

São José dos Campos, S.P.

2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Comparato Filho, Olavo de Osti
DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA E COLORIMÉTRICA ENTRE AS ESPÉCIES
Paracoccidioides brasiliensis E Paracoccidioides lutzii / Olavo
de Osti Comparato Filho; orientador, Leandro José Raniero. - São
José dos Campos, SP, 2020.
1 CD-ROM, 135 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José
dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia.

Inclui referências

1. Física e Astronomia. 2. Diferenciação bioquímica. 3.
Espectroscopia no infravermelho FT-IR. 4. Paracoccidioides
brasiliensis e lutzii. 5. Nanopartículas de ouro. I. Raniero,
Leandro José, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba.
Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia. III. Título.

Eu, Olavo de Osti Comparato Filho, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 3 de Dezembro de 2020.

Olavo de Osti Comparato Filho

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 23 / 11 / 2020

OLAVO DE OSTI COMPARATO FILHO

“DIFERENCIAÇÃO BIOQUÍMICA E COLORIMÉTRICA ENTRE AS ESPÉCIES
Paracoccidioides brasiliensis E *Paracoccidioides lutzii*.”

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

PROF. DR. MARCO ANTONIO RAMIREZ RAMOS _____

PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO _____

PROF.^a DR.^a ANGELA CRISTINA KRABBE _____

PROF.^a DR.^a LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA - Unesp _____

PROF.^a DR.^a ANDREA SANTOS LIU - IFSP _____

Prof.^a Dr.^a Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 23 de novembro de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos professores e pesquisadores envolvidos com a arte da docência e com os desafios da Ciência.

Aos alunos que se dedicam à conquista de um título de Mestre e de Doutor através da pesquisa.

Aos amores das minhas vidas passadas, da minha vida atual, das minhas vidas futuras e por toda a eternidade; sempre: Ana Paula e Paloma.

AGRADECIMENTOS

Àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esta minha conquista.

À Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, à Faculdade de Educação e Artes – FEA e ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D pela minha licenciatura em Matemática, pelo meu Mestrado e Doutorado em Física e Astronomia, pela infraestrutura e condições para a minha formação e o desenvolvimento de mais este trabalho. Foram somados, ao todo, dez anos de permanência nesta instituição de ensino.

Aos amigos, colegas, parceiros de estudos, pesquisas e trabalhos do Laboratório de Nanossensores – LNS do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, que me receberam e apoiaram durante toda a minha estadia do período da minha formação. Não tenho dúvidas que excelentes professores, pesquisadores e profissionais sairão dali. Convivi com estudantes incríveis e de um enorme potencial. Desejo muito sucesso a todos eles.

À Universidade do Porto – UP; à Faculdade de Engenharia – FEUP, ao Departamento de Engenharia Química – DEQ, ao Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE; ao Instituto Superior de Engenharia do Porto – ISEP, aos laboratórios da Rede de Química e Tecnologia – REQUIMTE; que me receberam e apoiaram durante toda a minha estadia no período do meu Doutorado Sanduíche que foi realizado naquelas instituições, em Portugal, por intermédio da Professora Doutora Maria do Carmo S. Pereira e da Professora Doutora Simone B. Morais. Aos Professores Doutores Fernando José Santos Rodrigues e Relber Aguiar Gonçalves da Universidade do Minho. Ao doutorando Pedro Carneiro e à pesquisadora Patrícia Reis. Foi a realização de um sonho poder estudar durante um ano naquele país, onde nasceram meus avós maternos, minha mãe e que me concedeu, com orgulho, sua cidadania.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelas bolsas de estudos concedidas: no Mestrado, no Doutorado e Doutorado Sanduíche. O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento

001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte aos projetos: 2009/09559-5 e 2013/17404-7. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte aos projetos: 470534/2012-5 e 302132/2015-5. À Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP, pelo convênio: 01.130275.00.

Ao meu orientador e professor: Dr. Leandro José Raniero, pelo acolhimento em seu laboratório, dedicação e compromissos assumidos na orientação deste trabalho, paciência, companheirismo e diálogos.

Aos meus pais: Leonor e Olavo, por tudo que sempre me proporcionaram.

À minha irmã: Carla, aos meus familiares e aos verdadeiros amigos que sempre torceram por mim.

À minha esposa Ana Paula e filha Paloma pelo apoio, amor incondicional e paciência durante todo este período de estudo, aprendizado, formação e planejamento de nossas vidas.

RESUMO

As espécies de fungos: *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*), são causadoras da paracoccidioidomicose (PCM), infecção com diferentes manifestações clínicas localizadas ou disseminadas, com possibilidade de evoluir para a letalidade. No diagnóstico da PCM, o principal antígeno é a glicoproteína exocelular de 43 KDa (Gp43), reagindo com 100% dos soros de pacientes inoculados *P. brasiliensis*. Entretanto o Gp43 não pode ser utilizado como um marcador para o *P. lutzii*, pois este antígeno não é reconhecido em pacientes infectados por ele. Neste contexto, o nosso trabalho buscou identificar e registrar diferenças na composição bioquímica entre essas duas espécies (*P. brasiliensis*: Pb03, Pb18 e *P. lutzii*: Pb01) por espectroscopia no infravermelho, uma vez que manifestações clínicas e o tratamento dos infectados diferem baseados no agente causador, tornando importante a sua identificação correta. De forma complementar, foi possível identificar molecularmente o *P. lutzii*, por meio de testes colorimétricos utilizando a metodologia *label-free*, combinando uma solução coloidal de nanopartículas de ouro (AuNPs), genes específicos e amostras testes. Para esse estudo, AuNPs foram sintetizadas por redução do cloreto de ouro por citrato de sódio, obtendo-se uma solução com um máximo de absorção na banda de 523 nm, obtendo-se como resultado, partículas com formato esférico e diâmetro médio de 22 nm. A diferenciação bioquímica entre as espécies foi realizada por meio da Transformada de Fourier no Infravermelho (FT-IR), uma técnica de obtenção rápida de resultados e de menor tempo necessário de preparação das amostras. Foram produzidos, na média, trinta espectros de cada amostra das culturas dos fungos. Nos resultados desta análise apareceram diferenças nos modos vibracionais de proteínas nas bandas em 1032, 1150, 1204, 1234, 1256, 1310, 1450, 1536, 1628 e 1656 cm^{-1} ; de lipídios nas bandas em 1744, 2852, 2922, 2956 cm^{-1} ; de material nuclear nas bandas em 1076 e 1116 cm^{-1} , de estiramentos OH nas bandas em 3290 e 3432 cm^{-1} . Com intuito de confirmação dos resultados obtidos com o FT-IR, o estudo estatístico *Principal Component Linear Discriminant Analysis* (PC-LDA) também foi utilizado para as conclusões. Com relação aos testes colorimétricos, foram realizados 50 testes, em triplicatas. Os resultados, após 3 metodologias estatísticas aplicadas, mostraram mudança de coloração da solução coloidal de nanopartículas de ouro na presença de DNA do fungo, para os testes positivos em 98% dos casos, confirmando que os microrganismos foram identificados molecularmente de forma correta.

Palavras-chave: Diferenciação bioquímica. Espectroscopia no infravermelho. FT-IR. *Paracoccidioides brasiliensis*. *Paracoccidioides lutzii*. Nanopartículas de ouro.

BIOCHEMICAL AND COLORIMETRIC DIFFERENTIATION BETWEEN SPECIES *Paracoccidioides brasiliensis* AND *Paracoccidioides lutzii*
ABSTRACT

The fungal species *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) and *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*) cause paracoccidioidomycosis (PCM), a chronic granulomatous disease with a wide variety of localized or disseminated clinical manifestations that may progress to lethality. In the diagnosis of PCM, the main antigen is the 43 kDa exocellular glycoprotein (Gp43), reacting with 100% of sera from patients inoculated with *P. brasiliensis*. However, Gp43 cannot be used as a marker for *P. lutzii* because this antigen is not recognized in patients infected with it. In this context, our work sought to identify biochemical differences between these two species (*P. brasiliensis*: Pb03, Pb18 and *P. lutzii*: Pb01) by infrared spectroscopy. Clinical manifestations and the treatment of the infected ones differ based on the causative agent, making important their correct identification. In a complementary way, we also sought to identify *P. lutzii* molecularly by means of colorimetric tests using the label-free methodology combining a colloidal solution of gold nanoparticles (AuNPs), specific genes and test samples. For this study, gold nanoparticles were synthesized by reduction of the gold chloride by sodium citrate, obtaining a solution with a maximum absorption in the 523 nm band, resulting in particles with spherical shape and average diameter of 22 nm. Biochemical differentiation between species was performed using a Fourier Transform in Infrared (FT-IR), a fast technique and short time needed to prepare the samples; thirty spectra of each sample of fungi cultures were produced. The results of this analysis showed differences in the vibrational modes of proteins in the 1032, 1150, 1204, 1234, 1256, 1310, 1450, 1536, 1628 and 1656 cm^{-1} bands; lipids in the 1744, 2853, 2922, 2956 cm^{-1} bands; nuclear material in the 1076 and 1116 cm^{-1} bands; of OH stretches in the 3290 and 3432 cm^{-1} bands. In order to confirm the results obtained with the FT-IR, the Principal Component Linear Discriminant Analysis (PC-LDA) statistical study was also used for the conclusions. Regarding colorimetric tests, 50 tests were performed, in triplicates. The results, after 3 applied statistical methodologies, showed a change in the color of the colloidal solution of gold nanoparticles in the presence of fungus DNA, for positive tests in 98% of the cases, confirming the correct molecular identification of the microorganisms.

Keywords: Biochemical differentiation. Infrared spectroscopy. FT-IR. *Paracoccidioides brasiliensis*. *Paracoccidioides lutzii*. Gold nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo biológico do <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	20
Figura 2– Morfologia das leveduras: a) <i>P. brasiliensis</i> e b) <i>P. lutzii</i>	22
Figura 3 – Valores médios de tamanhos e características dos conídios nos isolados de <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	23
Figura 4 – Hipótese da formação de membrana micélio e levedura do <i>P. brasiliensis</i>	24
Figura 5 – Distribuição da taxa absoluta e taxa de internação por milhão de habitantes por paracoccidioidomicose, por ano, no Brasil	26
Figura 6 – Predominância geográfica nacional do <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	27
Figura 7 – Absorção A) e espalhamento B) de uma mesma solução de AuNP esférica. Espectros de absorção e de espalhamento de nanopartículas em formato esférico C) e de bastão D).....	34
Figura 8 – Esquema do comportamento da pressão gerada por forças (Coulomb e Van Der Waals) em função da distância.	41
Figura 9 – Soluções coloidais de nanopartículas de ouro, demonstrando o processo de ressonância plasmônica, com resultados colorimétricos em função dos diâmetros.	43
Figura 10 – Ilustração do teste colorimétrico <i>cross-linking</i>	44
Figura 11 – Ilustração do teste colorimétrico <i>non-cross-linking</i>	46
Figura 12 – Ilustração do teste colorimétrico <i>label-free</i>	48
Figura 13 – Diagrama do mecanismo do teste <i>label-free</i>	49
Figura 14 – Resultado de teste colorimétrico <i>label-free</i> : a) teste positivo, b) teste negativo.....	51
Figura 15 – Representação dos níveis de energia eletrônica, vibracional e rotacional.	57
Figura 16 – Classificação vibracional de um grupo metileno	58
Figura 17 – Representação de um sistema de energia contínua, harmônica (A) e anarmônica (B). Potencial de uma molécula diatômica.....	60
Figura 18 – Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de Transformada de Fourier	61
Figura 19 – Interferograma da combinação de duas frequências diferentes.....	62
Figura 20 – Interferograma de um sinal típico	63
Figura 21 – Efeito do vapor d'água e dióxido de carbono no espectro de uma amostra.	64
Figura 22– Representação de dados e a região de decisão no espaço transformado.	69
Figura 23– Exemplos de aproximação de áreas escolhidas abaixo das curvas de um teste negativo e de um teste positivo.	75
Figura 24– Espectro médio, diferenças espectrais entre Pb01, Pb03 e valores de p	77
Figura 25– Espectro FT-IR médio, diferenças espectrais entre o Pb01 e o Pb18 e valores de p	78
Figura 26– Espectro FT-IR médio, diferenças espectrais entre o Pb03 e o Pb18 e valores de p	79
Figura 27– Gráfico de dispersão: a) variabilidade, b) PC1 e c) PC2.	82
Figura 28– Deconvolução dos espectros por ajuste de curvas Gaussianas	84

Figura 29– Espectros de absorção e soluções colorimétricas de um dos pares dos testes realizados.	87
Figura 30– Gráfico da estatística logarítmica (ln) referente aos testes realizados com a sonda do <i>P. lutzii</i> , utilizando a metodologia <i>label-free</i>	89
Figura 31– Exemplo de um espectro de absorção com as indicações de grandezas relevantes de uma Gaussiana.....	91
Figura 32– Análise estatística curvas Gaussianas em <i>box plots</i> : a) áreas abaixo das curvas, b) largura à meia altura e c) posição da banda de absorção máxima.	93
Figura 33– Curva ROC dos testes colorimétricos <i>label-free</i>	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Comparativo de quantidades de algumas proteínas do <i>P. brasiliensis</i> e do <i>P. lutzii</i>	24
Tabela 2 – Frequências de absorção no infravermelho características do <i>P. brasiliensis</i> nas suas fases.....	31
Tabela 3– Algumas notações e descrições utilizadas na LDA	69
Tabela 4 – Relações espectrais	80
Tabela 5 – Resultados do LOOCV	83
Tabela 6 – Área percentual sob a curva para bandas específicas, juntamente com as atribuições derivadas após a deconvolução e ajuste da curva de Gauss	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2DLDA	<i>2 Dimension Linear Discriminant Analysis</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
AuNPs	<i>Gold Nanoparticles</i> (Nanopartículas de ouro)
BAAR	Bactérias Álcool Ácido Resistentes
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FT-IR	Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier
<i>gp43</i>	Gene do <i>Paracoccidioides</i>
Gp43	Antígeno imunodominante do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
GP43	Proteína de peso molecular 43 quilodáltons
GPI	Glocosil Fosfatidil Inusitol
HMM	<i>Hidden Markov Model</i>
IFI	Imunofluorescência Indireta
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i>
LOOCV	<i>Leave One Out Cross Validation</i>
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
Pb01	Isolados do <i>P. lutzii</i>
Pb03	Isolados do <i>P. brasiliensis</i>
Pb18	Isolados do <i>P. brasiliensis</i>
PC, PCs	Principal(ais) componente(s)
PC-LDA	<i>Principal Component Linear Discriminant Analysis</i>
PC1, PC2	Componentes principais 1 e 2
PCA	<i>Principal Components Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>
PredGPI	<i>GPI-anchor Predictor</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROC	<i>Receiver</i> <i>Operating</i> <i>Characteristics</i>

SD	<i>Synthetic Defined</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Ressonance</i>
ssDNA	<i>DNA single-stranded</i>
STM	<i>Scanning Tunneling Microscope</i>
UV	Ultravioleta
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
U	Estiramento
δ	Deformação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 <i>Paracoccidioides</i> spp.....	19
3.2 A biologia do <i>Paracoccidioides</i> spp.....	22
3.3 Epidemiologia da paracoccidioidomicose	25
3.4 FT-IR como ferramenta de diagnóstico	29
3.5 Nanotecnologia	32
3.6 Testes colorimétricos	40
3.7 Nanotecnologia voltada ao diagnóstico de doenças	51
4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	55
4.1 Espectroscopia no UV-Visível.....	55
4.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	55
4.3 Espalhamento dinâmico da luz	65
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	67
5.1 <i>Principal Components Analysis</i>	67
5.2 Análise de discriminante linear com validação cruzada.....	68
6 MÉTODOS EXPERIMENTAIS	71
6.1 A cultura do <i>P. brasiliensis</i> e <i>P. lutzii</i>	71
6.2 Preparação das amostras.....	71
6.3 Espectroscopia e FT-IR.....	71
6.4 Análise dos dados.....	72
6.5 Testes colorimétricos	72
6.5.1 <i>Síntese das nanopartículas de ouro</i>	72
6.5.2 <i>Extração e amplificação do DNA do Paracoccidioides sp.</i>	73
6.5.3 <i>Testes colorimétricos</i>	74
6.5.4 <i>Análise logarítmica, curvas Gaussianas e curva ROC</i>	75
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
7.1 Comparação entre as espécies	77
7.2 Análise das componentes principais dos espectros FT-IR	82
7.3 <i>Deconvolução de bandas</i>	83
7.4 Análise estatística dos testes colorimétricos <i>label-free</i>	87
8 CONCLUSÃO	97
9 TRABALHOS FUTUROS	98
REFERÊNCIAS	101
ANEXO 1 – PUBLICAÇÕES	118
ANEXO 2 – PREMIAÇÕES	134
ANEXO 3 – CARTA E DECLARAÇÃO MOBILIDADE UP	136

1 INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma das mais frequentes, sistemáticas e endêmicas infecções por fungos na América Latina (FORTES *et al.*, 2011), sendo 80% dos casos reportados no Brasil (COLOMBO *et al.*, 2011). As estimativas de incidência, por ano, variam de 0,7 a 3,7 casos por 100 mil habitantes (MARTINEZ, 2017), sendo esta enfermidade a 8ª causa de mortalidade entre as doenças infecciosas parasitárias no país (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). Os agentes causadores desta doença são os fungos das espécies *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) e *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*).

Os testes sorológicos de diagnóstico da PCM tradicionais, baseados na identificação de anticorpos específicos, detectam a presença do antígeno Gp43, revelando o *P. brasiliensis* como o causador. O teste ELISA tem sido utilizado com mais frequência para o diagnóstico e para permitir avaliar a resposta à infecção (CASTILHO *et al.*, 2015). Em contrapartida, pacientes infectados, de específicas regiões do Brasil, principalmente no Centro-Oeste, apresentam pouca ou nenhuma presença do Gp43, quando submetidos aos testes de diagnósticos baseados na detecção de antígenos, convergindo a causa da infecção ao *P. lutzii*. Outro fato relevante para a identificação correta do patógeno é o relato de manifestações clínicas diferentes da PCM típica causada pelo *P. brasiliensis*, atribuídas ao *P. lutzii* (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Esta variação regional de antígeno necessita da administração de diferentes testes para uma maior sensibilidade (MARQUES, 2013). Neste contexto, tornam-se necessárias formas de diagnóstico mais precisas e identificação correta dos agentes causadores. Técnicas alternativas, baseadas em espectroscopia e na utilização da nanotecnologia que possam reconhecer essas diferentes espécies, aumentam a eficiência nas conclusões e respostas relacionadas a PCM.

A Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), um método de análise que identifica e diferencia, com rapidez, microrganismos (BEEKES *et al.*, 2007), pode ser utilizada na caracterização e discriminação de amostras biológicas (DUKOR; STORY; MARCOTT, 1999). Esta técnica baseia-se na interação da radiação eletromagnética, na região do infravermelho

médio, com o material de interesse (HELM *et al.*, 1991). Quando a frequência da radiação e a frequência de vibração das moléculas da amostra coincidem, existe a probabilidade dessa energia ser absorvida e gerar vibrações únicas que caracterizam o composto. Nos espectros obtidos, obtemos informações da composição química da matéria orgânica do material analisado (DAVIS; MAUER, 2010).

A Nanotecnologia é o estudo do entendimento, controle e reestruturação da matéria em escalas nanométricas para a criação e utilização de materiais com novas propriedades e funções (SANCHEZ; SOBOLEV, 2010). A sua utilização, com aplicações na área química, física, de biologia, dos materiais e de engenharia, visa, entre outras, a redução de custos de produção, melhora nos processos/produtos e resoluções na área da saúde (HORTON; KHAN, 2006). Essas estruturas de diferentes tamanhos e formas possuem propriedades específicas para aplicações na medicina, como na fabricação de fármacos, nos diagnósticos, em terapias, em implantes e nas cirurgias (JAIN, 2008). Nanopartículas metálicas, como a de ouro (AuNPs), são amplamente utilizadas em processos para auxílio aos diagnósticos, dadas as suas características de tamanho, geometria, estabilidade coloidal e propriedades óticas na região visível do espectro eletromagnético (FAGUNDES *et al.*, 2014). AuNPs reagem com moléculas de DNA em testes colorimétricos para detecção molecular. Essas metodologias, entre elas a *label-free*, se destacam como alternativas rápidas e baratas. Tais métodos buscam a obtenção de maior sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico.

Neste contexto, este trabalho buscou métodos alternativos para a diferenciação entre as duas espécies de *Paracoccidioides* estudadas, sendo realizados por meio da FT-IR e de teste colorimétrico via nanotecnologia (COMPARATO FILHO, 2017). A FT-IR foi utilizada para caracterizar e discriminar uma espécie de outra, pois apresentam composições bioquímicas diferentes, sendo confirmadas pela estatística multivariada com a utilização da análise de discriminante linear, baseada nas componentes principais (*Principal Component and Linear Discriminant Analysis* PC-LDA). Para os testes colorimétricos adotou-se a metodologia *label-free*, e os resultados foram analisados por um modelo matemático de separação, curva ROC e ajuste

Gaussiano dos espectros UV-visível. Os detalhamentos destes tópicos serão feitos na revisão bibliográfica, permitindo um melhor entendimento.

2 OBJETIVOS

A diferenciação bioquímica das espécies de fungos *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb03 e Pb18) e *Paracoccidioides lutzii* (Pb01) via FT-IR.

O desenvolvimento de um teste colorimétrico específico, via metodologia *label-free*, para a detecção molecular do *Paracoccidioides lutzii*.

2.1 Objetivos específicos

1 Destacar as diferenças espectrais e principais bandas de absorção das amostras de *Paracoccidioides* sp por FT-IR, para fundamentar a análise dos espectros.

2 Identificar as regiões de separação por meio da segunda derivada dos espectros FT-IR entre os fungos: a) Pb01 e Pb03; b) Pb01 e Pb18 e c) Pb03 e Pb18.

3 Exibir as diferenças quantitativas dos modos vibracionais nas regiões de polissacarídeos, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, fosfatos, citosina, timina, adenina e colágeno dos espectros dos fungos, por meio da deconvolução de bandas nas regiões espectrais.

4 Utilizar nanopartículas de ouro com a metodologia *label-free* para a identificação molecular do *Paracoccidioides lutzii* (Pb01).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Paracoccidioides* spp.

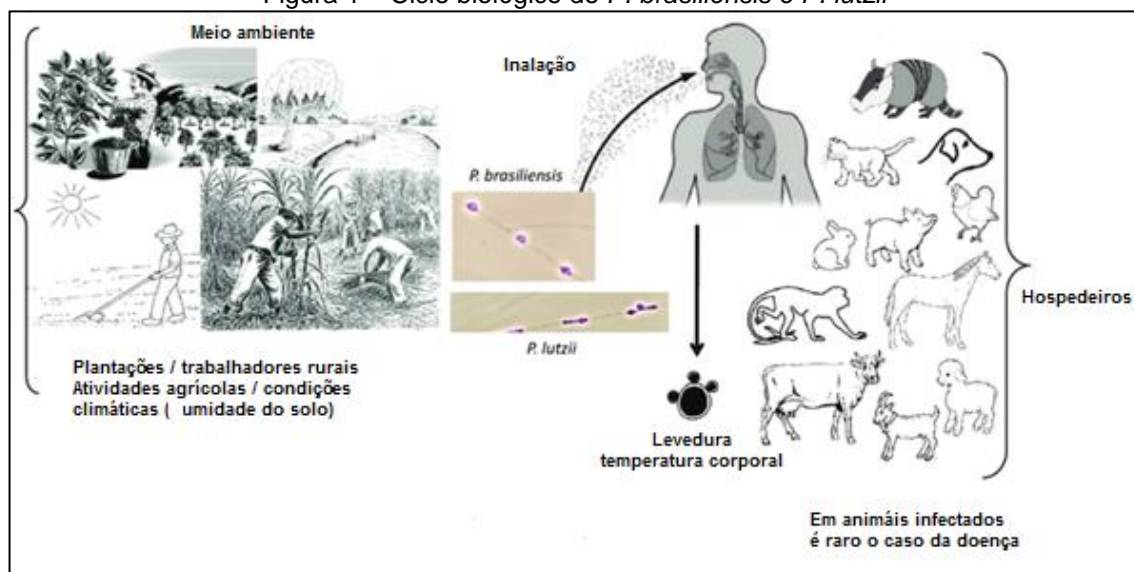
O gênero *Paracoccidioides* é classificado taxonomicamente no filo *Ascomycota*, na ordem *Onygenales* e família *Onygenaceae* (SAN-BLAS *et al.*, 2002). Em trabalho publicado no Boletim Epidemiológico Paulista, em 2008, Moreira (2008) os descreve no filo *Ascomycota*, classe *Pleomycetes*, ordem *Onygenales*, família *Onygenaceae*, gênero *Paracoccidioides* e espécies *brasiliensis* e *lutzii*, no caso do *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, respectivamente. Marques, em 2013, acrescentou a classe *Euromycetes* e especificou a família como *Ajellomycetaceae* (*Onygenaceae*). Esta família de fungos apresenta algumas características micológicas e ecológicas comuns, tais como dimorfismo, produção de artroconídios, ocorrência em áreas geográficas restritas e afinidades para derivados de produtos animais ou remanescentes como ácido úrico (BUSTAMANTE-SIMON *et al.*, 1985). Cinco espécies filogenéticas compõem o gênero, que diferem em virulência, adaptação da cultura e induzem distintas respostas imunes do hospedeiro (DESJARDINS *et al.*, 2011). Quatro das quais (S1, PS2, PS3 e PS4) compõem o complexo de espécies *brasiliensis*. As linhagens de genes nucleares suportam esse cenário de divergência (TURISSINI *et al.*, 2017).

O interesse em estudos no *P. brasiliensis* se intensificou em função da paracoccidioidomicose, doença importante no Brasil e em países da América Latina. Somente muitos anos depois, a espécie *P. lutzii* foi descoberta para estudos e pesquisas. Distinta das outras espécies, apresenta respostas diferentes ao hospedeiro. Possui exclusivos níveis de virulência, resistência a fungicidas e taxas de proliferação (TEIXEIRA *et al.*, 2009). Ambos os fungos são termodimórficos e sofrem uma transformação complexa *in vivo* e *in vitro*, à temperatura de 37°C, que consiste na mudança da sua forma micelial, não patogênica, que cresce em temperatura ambiente, para uma forma patogênica de levedura (QUEIRÓZ-TELES, 1994). Estudos proteômicos, ou seja, do conjunto de proteínas e suas isoformas expressas em uma amostra biológica, mostram comparações de micélios, micélio-a-levedura e levedura do *P. brasiliensis* (ARAÚJO *et al.*, 2019).

Dados computacionais permitiram a identificação de 312 proteínas diferencialmente expressas em diferentes estágios morfológicos. As células de levedura empregam, preferencialmente, a beta-oxidação aeróbica e o ciclo do ácido tricarboxílico, acompanhados de fosforilação oxidativa para produção de ATP, em comparação aos micélios e à transição das células micélio-a-levedura. Células de levedura apresentam uma reprogramação no metabolismo de aminoácidos e na indução de determinantes de virulência e proteínas de choque térmico, permitindo a adaptação às condições ambientais durante o aumento da temperatura.

Evidências apontam o solo como o mais provável habitat sapróbico do *P. brasiliensis* e do *P. lutzii* durante a fase micelial. A infecção começa pela inalação de conídios; crescentes no solo, água ou planta (MARTINS *et al.*, 2012) e transportados pelo ar, como exemplificado no diagrama da Figura 1.

Figura 1 – Ciclo biológico do *P. brasiliensis* e *P. lutzii*



Fonte: Shikanai-Yasuda *et al* (2017).

Ao atingirem as células epiteliais dos pulmões, ocorre a transformação morfológica para a forma de levedura, que se espalha pelo sistema sanguíneo, provocando a disseminação (BRUMMER *et al.*, 1993). Após a inalação, indivíduos infectados podem apresentar a forma aguda, subaguda ou crônica da doença, de acordo com a tolerância fúngica para várias condições, como influências hormonais e resposta do sistema imunológico (BAGAGLI *et al.*, 2008). O desenvolvimento da PCM entre jovens ocorre em semanas ou meses

após o contato com o fungo, o qual é mais severo e responsável por altas taxas de mortalidade. Contrariamente, em adultos pode permanecer em latência por alguns anos, embora a infecção ocorra na grande maioria dos casos em adultos (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

Durante as condições normais de crescimento, a levedura progride para um ponto inicial específico do ciclo celular, que precede o desencadeamento de três etapas, denominadas de brotamento, iniciação da síntese de DNA e duplicação do corpo do fuso, um passo primário da divisão celular (HARTWELL *et al.*, 1974). Estes organismos parecem possuir pontos de controle alternativos para a regulação da progressão do ciclo celular, especificamente no que diz respeito à síntese de DNA e à divisão celular (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Evidências de infecção natural foram observadas em alguns animais selvagens e domésticos, por via intradérmica e testes sorológicos; o fungo tem sido frequentemente isolado em tatus, consumidos como alimento suplementar por alguns povos da América Latina (CADAVID; RESTREPO, 1993). Os tatus constroem suas tocas no solo, em pequenas áreas e possuem hábitos de migração para áreas quentes. O habitat propício ao fungo, preferencialmente tem a presença de vegetação e umidade no solo (RESTREPO *et al.*, 2000). A ocorrência de queimadas ou incêndios em áreas florestais altera as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, como escassez de água, redução da taxa de infiltração do solo, dinâmica de nutrientes e degradação de ecossistemas. No solo, a atividade microbiana depende, em sua maioria, da temperatura e acidez. O fogo destrói os microrganismos à superfície (LEITE, 2011).

Uma característica dessa família de fungos é a sua capacidade de degradar a queratina, cabelos e unhas, e daí a sua associação frequente com animais e seus dejetos, penas e ossos (BAGAGLI *et al.*, 2006). Animais infectados sistematicamente, disseminam o fungo para o ambiente por meio de suas carcaças (BAGAGLI *et al.*, 2008). Este grupo de patógenos fúngicos adaptou-se para conseguir se manter associado a hospedeiros do reino animal, embora não se desvinculando da fase sapróbica no ambiente físico (UNTEREINER *et al.*, 2004).

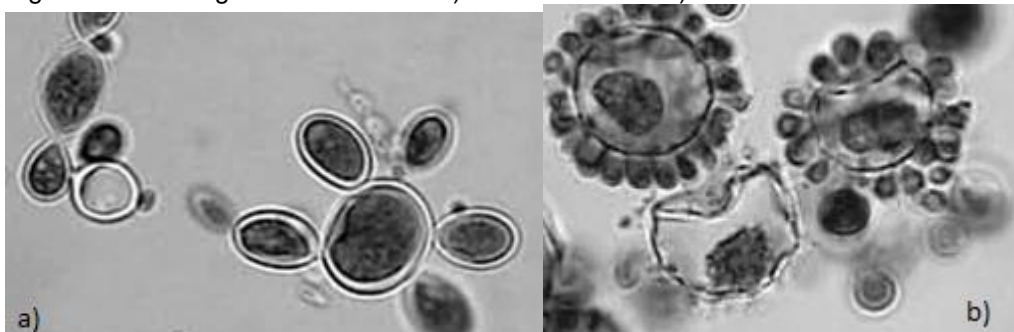
Durante o tempo de vida do fungo no hospedeiro, ocorrem adaptações para a sua sobrevivência. Alguns compostos de parede celular, considerados

importantes para a nutrição fúngica e invasão de tecidos animais, foram observados no gênero *P. brasiliensis* (ODDS, 1985). A genômica comparativa, como exemplo: o tamanho do genoma, o número de genes e a função metabólica, também fornece dados sobre a estratégia que os patógenos fúngicos produzem para se adaptar aos habitats e nichos específicos. Podem, conforme algumas análises, diminuir na medida que os organismos se tornam mais dependentes de seus hospedeiros (CUSHIOM, 2004).

3.2 A biologia do *Paracoccidioides* spp

A transição de micélio para levedura é essencial para que os membros do gênero estabeleçam a enfermidade, visto que as cepas que não se diferenciam em células de levedura são avirulentas (NEMECEK *et al.*, 2006), acontecendo na faixa de temperaturas entre 35°C e 37°C. Em tecidos, apresentam-se na forma de células globosas ou ovais grandes, como mostrado nas micrografias da Figura 2 (RICHARDSON; WARNOCK, 1997).

Figura 2– Morfologia das leveduras: a) *P. brasiliensis* e b) *P. lutzii*

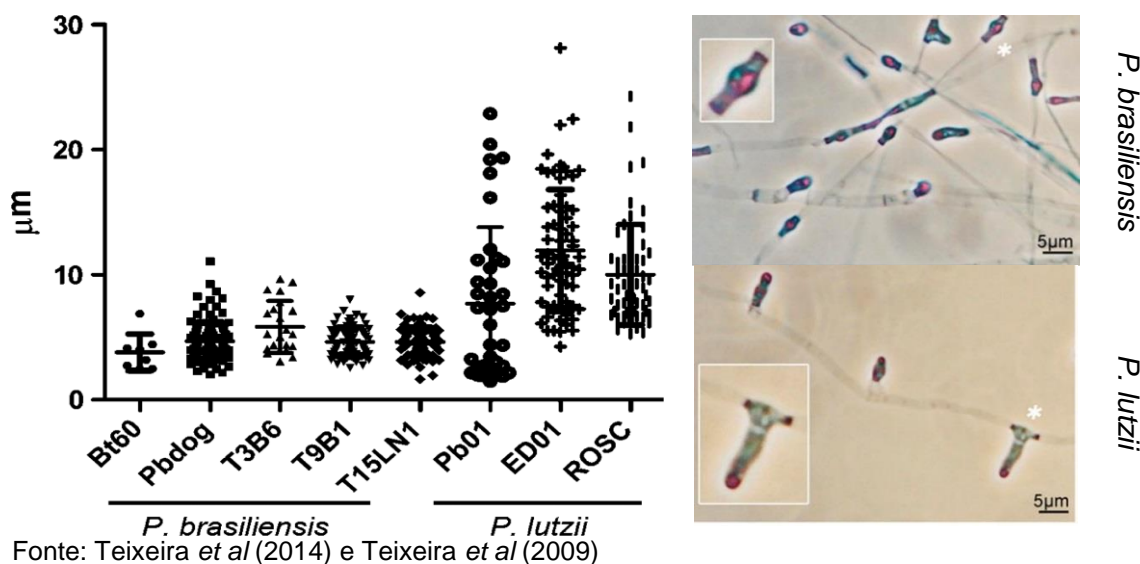


Fonte: Teixeira *et al* (2009)

Em temperatura ambiente, estes fungos crescem em forma de micélio, como hifas ramificadas e septadas das quais clamidósporos e aleuroconídios são produzidos (MANDOLESI, 2004). Em 2014, Teixeira *et al.* publicaram na *Medical Mycology*, uma análise morfológica, considerando o número de conídios entre grupos envolvendo o *P. brasiliensis* e o *P. lutzii*, que varia com a capacidade, de cada isolado, de produzi-los. Constataram algo entre 30 e 100 conídios por isolado. Os resultados estão mostrados no gráfico da Figura 3.

Para o *P. lutzii*, o comprimento varia entre 1,49 μm e 28,15 μm com valor médio 9,88 $\mu\text{m} \pm 5,00 \mu\text{m}$. Por outro lado, o do *P. brasiliensis*, varia entre 1,65 μm e 11,06 μm com valor médio 4,72 $\mu\text{m} \pm 1,50 \mu\text{m}$.

Figura 3 – Valores médios de tamanhos e características dos conídios nos isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*



Os genomas do *P. brasiliensis*, dos isolados Pb18 e Pb03, possuem tamanho similar entre 30,0 Mb e 29,1 Mb (DESJARDINS *et al.*, 2011; FEITOSA *et al.*, 2003). Enquanto para o *P. lutzii* o tamanho é de 32,9 Mb. O número total médio de genes iniciais previstos é de 7875 e 9132 para o *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, respectivamente. O Pb18 e o Pb03 apresentam 96% de similaridades em suas sequências, mas quando comparados ao *P. lutzii* o valor é de 90% (ARANTES *et al.*, 2015). Elementos transponíveis, ou seja, sequências de DNA que podem mudar suas posições dentro do genoma, podem ser uma das razões para o aumento do genoma do *P. lutzii*, já que eles constituem 16% do genoma total. No *P. brasiliensis* esse valor é de 8% ou 9% (DESJARDINS *et al.*, 2011). Proteínas antigênicas como 27 kDa e GP43, são menos abundantes no *P. lutzii* (PIGOSSO *et al.*, 2013). Fato que dificulta o diagnóstico da PCM por esta espécie (BATISTA JUNIOR *et al.*, 2010). A Tabela 1, mostra informações das quantidades de proteínas transmembranares, secretadas e ancoradas por GPI do *P. brasiliensis* e do *P. lutzii*, comparando os genomas dos isolados. Proteínas secretadas foram estimadas com a utilização do modelo markov

oculto (HMM). Ancoradas por GPI foram obtidas através do sistema de previsão GPI (PredGPI), com taxa de falsos positivos < 0,005.

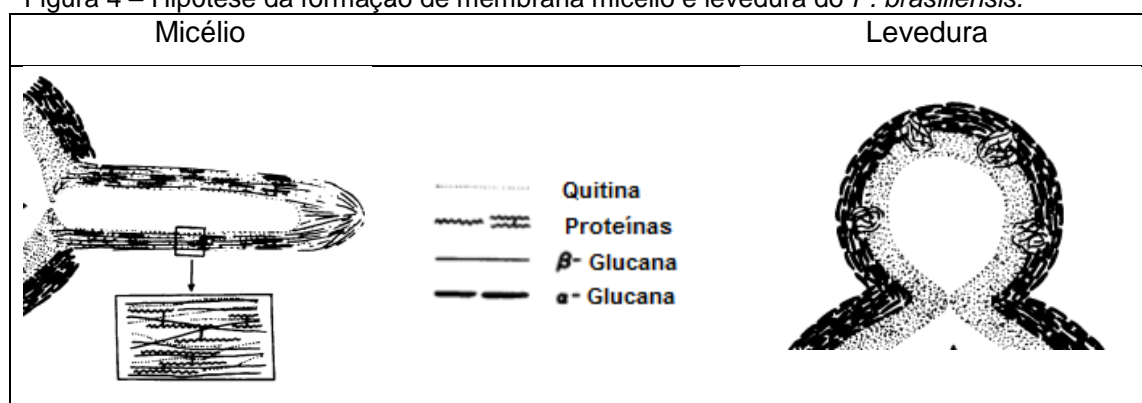
Tabela 1– Comparativo de quantidades de algumas proteínas do *P. brasiliensis* e do *P. lutzii*

	<i>P. lutzii</i>	<i>P. brasiliensis</i>	
		Pb03	Pb18
Proteínas transmembranas	1121	1057	1084
Proteínas secretadas	297	291	322
Proteínas ancoradas-GPI	61	63	62

Fonte: Desjardins *et al* (2011).

De forma geral, quanto a composição da parede celular, existem variações entre as espécies, como de proteínas, glicoproteínas, lipídios e polissacarídeos (quitina e glucanas), associadas à superfície (DE GROOT *et al.*, 2005). No *P. brasiliensis*, os componentes em maior número na parede celular são os polissacarídeos quitina e glucanas (KANETSUNA; CARBONELL, 1970). A quitina representa 43% do peso seco da parede na forma de levedura e 13% na forma de micélio (BULAWA; OSMOND, 1990). Quitina está em maior quantidade na forma de levedura (KANETSUNA *et al.*, 1969). Enquanto micélio, possui maior teor de proteínas, entre 24% e 41% do que a de levedura, entre 7% e 14% (MANOCHA, 1980). Lipídios representam entre 5% e 10% e glucanas entre 36% e 47%, em ambas as formas. A Figura 4 ilustra a forma com que as estruturas estão organizadas para ambas as fases (KANETSUNA *et al.*, 1972).

Figura 4 – Hipótese da formação de membrana micélio e levedura do *P. brasiliensis*.



Fonte: Kanetsuna *et al* (1972).

Considerando-se o total de lipídios extraídos da forma de levedura, há uma porcentagem de fosfolipídios. Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e

cerebrosídeos em maiores quantidades. Difosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e ácido fosfatídico em menores quantidades (MANOCHA, 1980).

A parede celular dos fungos é uma estrutura de proteção, tanto quanto ao meio ambiente e células do hospedeiro. Sua relevância durante a luta do fungo pela infecção relaciona-se com os processos de adesão, resposta imune, obtenção de nutrientes, virulência e dano aos tecidos (HEILMANN *et al.*, 2011). Basicamente são compostas de polissacarídeos que incluem quitina e glucanas, e diferentes proteínas frequentemente cobertas com carboidratos e lipídios (XIE; LIPKE, 2010). No *Paracoccidioides* sp, ela é estruturada em camadas. Em micélio (150 nm), apresentam β -1,3-glucana, β -1,6-glucana e quitina; em levedura (600 nm), apresentam β -glucana, α -glucana e quitina. Proteínas, produzidas de acordo com as condições de crescimento, fatores ambientais e estágio de desenvolvimento dos fungos (MORAN *et al.*, 2011); são encontradas nas paredes das duas formas (SAN-BLAS, 1982).

3.3 Epidemiologia da paracoccidioidomicose

As manifestações clínicas e radiológicas, ou sintomas da doença, podem ser confundidos com histoplasmoze, leishmaniose ou tuberculose. Essas manifestações podem sofrer variações, desde ulcerações bucais isoladas até envolvimento pulmonar. Outros órgãos podem ser atingidos, permanecendo sequelas quando não houver diagnóstico e tratamento corretos (TRAINOTTI *et al.*, 2016). No estado de Goiás, diferentemente de outras regiões do país, foram observadas em pacientes, a presença frequente de formas linfático-abdominais da PCM (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Assim como, em estados vizinhos cujo agente causador identificado foi o *P. lutzii*, relatadas intensas peritonites progressivas seguidas de disseminações no baço, fígado, linfonodos e mesentério intestinais, não observados em infectados hospedeiros pelo *P. brasiliensis* (MOLINARI-MADLUM *et al.*, 1999).

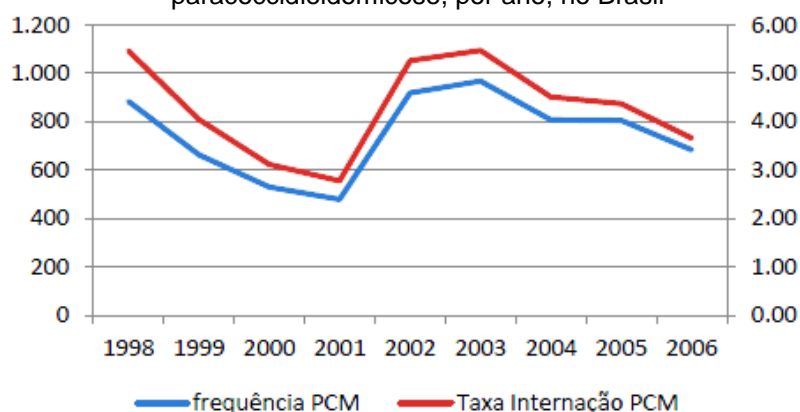
Podem ser classificadas como de forma aguda/subaguda, mais presentes entre crianças e jovens, ou crônica, atingindo mais homens adultos (ANASTÁCIO *et al.*, 2007). Na primeira forma, a doença se desenvolve em poucas semanas ou meses após contato com o fungo. Na segunda forma, o

período de incubação pode variar, mas a doença se manifesta depois de anos da exposição ao fungo (MARTINEZ, 2017).

As manifestações cutâneas são úlceras com base granulomatosa e pontilhado hemorrágico (MARQUES *et al.*, 2007). A observação de lesões infiltradas, pode ser mal interpretada e confundida com outras doenças granulomatosas, como tuberculose, devido às semelhanças clínicas e histopatológicas entre elas (MARQUES *et al.*, 2008).

Inferir o histórico epidemiológico não é uma tarefa simples devido à constante migração de hospedeiros humanos, ao prolongado período de latência da PCM e à escassez de isolados ambientais (THEODORO *et al.*, 2012). A Figura 5 mostra os dados de internações de casos da doença, de 1998 até 2006, no Brasil.

Figura 5 – Distribuição da taxa absoluta e taxa de internação por milhão de habitantes por paracoccidiodomicose, por ano, no Brasil



Fonte: Coutinho (2011).

Neste contexto, os trabalhadores rurais que convivem com atividades relacionadas ao solo e à agricultura são os mais infectados. Em 2013 foi publicado em um informativo da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, que o Brasil detinha 80% dos casos desta doença. Em 2016 já era responsável por 52% das mortes por micoses brasileiras (VARGAS, 2013).

Entre as regiões afetadas está o estado de Rondônia, onde foram relatados mais de 2163 casos no período de 1997 a 2012, confirmando a elevada incidência da enfermidade (SHIKANAI-YASUDA, 2015). Na época, a construção de hidrelétricas na região, atraiu milhares de pessoas para o estado, contribuindo para o aumento do número de casos de infecção

(MARTINEZ, 2017). A Figura 6 mostra regiões de maior incidência das espécies.

Figura 6 – Predominância geográfica nacional do *P. brasiliensis* e *P. lutzii*



Fonte: Adaptada de Gegembauer et al (2014).

Diferenças ecológicas em um espaço geográfico podem colaborar com o isolamento e divergência das espécies (ARANTES *et al.*, 2015). Variações climáticas e de recursos ambientais criam barreiras divisórias que apoiam estas divergências/adaptações das espécies e favorecem o isolamento reprodutivo (THEODORO *et al.*, 2012). A queima de biomassa nos ecossistemas, como tem ocorrido no norte do país, nas regiões amazônicas, há vários anos, é um dos fatores mais importantes de impacto sobre o clima, a biodiversidade e habitat de organismos/microrganismos (MÉLO *et al.*, 2011). Com o habitat e nichos destruídos, vários animais são mortos. Não havendo condições ideais no ambiente, o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, dos horizontes superficiais do solo, são reduzidos (GUIMARÃES *et al.*, 2014). A diminuição do número de animais, reduz a oferta de hospedeiros. As condições do solo desfavoráveis ao fungo impactam na sua proliferação. Embora, no Brasil, a região de maior incidência do *P. lutzii* seja a centro-oeste, já houve casos de registros da PCM, devido a esse agente causador, na região norte (SILVA *et al.*, 2012).

Na região centro-oeste do Brasil, a maior parte das chuvas ocorre no verão tornando os invernos secos. O clima é tropical, porém ao norte da região é equatorial. As temperaturas variem entre 15 °C e 30 °C. O relevo caracteriza-se por misturas sedimentares e rochosas no Planalto Central, pela Terra Rocha formada por restos de rochas basálticas no Planalto Meridional e uma depressão na Planície do Pantanal. Predomina-se o Cerrado, a Floresta Amazônica mais ao norte e a Vacaria (GEOGRAFIA OPINATIVA, 2013). Na região sudeste, o clima é tropical no litoral, setentrional na região mineira e oeste paulista com variações secas e chuvosas e quedas de temperatura nas maiores altitudes. O subtropical é encontrado ao sul de São Paulo com variações térmicas e pluviosidade. O semiárido ao norte de Minas. Seu relevo mostra planícies costeiras, serras com formações cristalinas, planaltos e escarpas. Encontram-se também sedimentos vulcânicos. A predominância é de florestas tropicais, mas há matas Ciliares, de Galerias, o Cerrado e a Caatinga (GEOGRAFIA OPINATIVA, 2013). Na região sul, o clima é temperado ou subtropical com amplitude térmica elevada. Há temperaturas negativas nas serras, regular distribuição de chuvas ao ano e ventos que influenciam nas temperaturas. O relevo predominante é planáltico. As Araucárias e as Pradarias estão nas regiões frias. Mangues e Restingas no litoral (MAXIEDUCA, 2018). Essas diferenças regionais são indícios de separação geográfica no território nacional mais adaptáveis ao habitat do *P. brasiliensis* e ao *P. lutzii*.

O diagnóstico definitivo desta infecção ocorre entre 2 e 3 semanas, verificado o aparecimento de colônias de micélios em amostras após incubação entre 25 °C e 30 °C. Identificação microscópica do *P. brasiliensis* tem sido usada como um método tradicional de diagnóstico. Um diagnóstico rápido em 24 horas pode ser feito por meio do teste de exoantígeno, com resultados satisfatórios superiores à 90%. Entretanto, soros de pacientes com blastomicose, esporotricose ou histoplasmose podem provocar reações cruzadas. O teste de imunodifusão também oferece um diagnóstico correto de aproximadamente 90% dos casos (RICHARDSON; WARNOCK, 1997). O teste sorológico, referência para a infecção, depende da presença da Gp43, que é a principal glicoproteína antigênica secretada pelo fungo (SAN-BLAS *et al.*, 2002). Entretanto, como relatado no item 3.2 o *P. lutzii* não responde à Gp43,

umentando o número de diagnóstico falso-negativo. Algumas formas de diagnóstico estão sendo substituídas por técnicas moleculares avançadas como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que é mais rápida, possui maior especificidade, sensibilidade e outras vantagens (BECK; HENRICKSON, 2010). Todavia, a utilização de equipamentos dedicados e mão de obra especializada tem sido uma barreira para sua disseminação.

Neste contexto, novas formas de diagnóstico com melhor custo/benefício são de extrema importância no combate desta enfermidade.

3.4 FT-IR como ferramenta de diagnóstico

Técnicas de análise e caracterização da saliva, por FT-IR, são utilizadas como alternativa no diagnóstico de distúrbios metabólicos e alterações fisiológicas em atletas, apresentando alta sensibilidade, informação em tempo real e a não necessidade de uso de reagentes (CAETANO JÚNIOR *et al.*, 2015). Componentes bioquímicos da saliva possuem bandas específicas na região do infravermelho, alguns são biomarcadores relevantes para avaliar o estresse físico (DIAZ *et al.*, 2013). A Biópsia líquida, uma ferramenta de diagnóstico não invasiva, baseada em líquidos corporais, como a saliva, é utilizada no auxílio ao diagnóstico de câncer bucal pelas informações obtidas sobre circulação de células tumorais, moléculas de DNA ou RNA e microvesículas extracelulares (LOUSADA-FERNANDEZ *et al.*, 2018; WONG; NONAKA, 2018). Espectros característicos da saliva de pacientes e de indivíduos saudáveis foram comparados, obtendo-se uma plataforma de auxílio no diagnóstico precoce de câncer bucal (ZLOTOGORSKI-HURVITZ *et al.*, 2019). A análise de bandas de absorção tem sido relevante em estudos de outros tipos de cânceres, como: de colorretal, mama, esôfago, pele e ovário, onde é possível se verificar que houve um aumento e replicação de DNA, como uma característica determinante da doença (GAO *et al.*, 2015). Dados mostram, para auxílio no diagnóstico, que os modos vibracionais moleculares em 2052 cm^{-1} e 924 cm^{-1} que identificam pacientes com doenças crônicas de rins, com especificidade superior a 85% e sensibilidade superior a 95% (RODRIGUES *et al.*, 2019). O sangue é um fluido biológico também estudado na espectroscopia no infravermelho, pois reúne moléculas bioquímicas

secretadas de vários tecidos. Esta prática é promissora para a clínica e para o diagnóstico de vários tipos de cânceres, Alzheimer, hipertensão pulmonar e no monitoramento de cirroses e diabetes. O diagnóstico da dengue viral, por espectroscopia, se demonstra um método alternativo para a distinção de pacientes infectados e não infectados (NASEER *et al.*, 2019).

A tecnologia de nanopartículas metálicas combinada com DNA, envolvendo propriedades óticas, surgiu como auxílio aos diagnósticos, em função das altas frequências de resultados cruzados dos testes sorológicos. Com o intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes para a PCM. Fagundes *et al.*, em 2014, após a utilização desta tecnologia em testes colorimétricos *non-cross-linking*, analisaram as diferenças bioquímicas obtidas com as amostras dos testes, de resultados positivos e negativos para a doença, através dos espectros da FT-IR. O estudo revelou a formação de bandas adicionais em um dos espectros, indicando a formação da fita dupla de DNA. As diferenças nos modos vibracionais foram determinantes para a diferenciação das amostras como um método de classificação dos resultados (FAGUNDES *et al.*, 2014). A mesma metodologia, com a utilização de nanopartículas de ouro e testes colorimétricos *non-cross-linking*, foi utilizada por Castilho *et al.*, em 2015. Neste trabalho, a sequência de DNA selecionada para a realização dos testes foi uma proteína de 27 kDa, secretada pelo *P. brasiliensis*. O grupo analisou os espectros das amostras com AuNPs, nos quais puderam confirmar, através dos modos vibracionais observados, a funcionalização das nanopartículas, realizada com a sequência desta proteína e grupo tiol. Através da FT-IR foi possível identificar as diferentes bandas presentes de uma maneira rápida e precisa (CASTILHO *et al.*, 2015).

O trabalho publicado por Ferreira *et al.*, em 2015, refere-se à mesma metodologia, com a utilização da glicoproteína Gp43, mais detectada nos testes sorológicos, para auxílio ao diagnóstico da PCM. Amostras do *Paracoccidioides brasiliensis*, foram analisadas por FT-IR. Os espectros característicos e distintos do fungo, na sua forma de micélio e de levedura, foram observados para ilustrar diferenças bioquímicas entre as duas formas. As principais diferenças se relacionam com os modos vibracionais de 1,3- β -glucana, geralmente encontrada na forma de micélio, de 1,3- α -glucana, encontrada em forma de levedura, e de quitina (FERREIRA *et al.*, 2015).

A Tabela 2 relaciona frequências de absorções registradas por FT-IR, de grupos funcionais, em estudos sobre o *Paracoccidioides brasiliensis*, tanto na sua fase micélio como levedura (FERREIRA *et al.* 2015).

Tabela 2 – Frequências de absorção no infravermelho características do *P. brasiliensis* nas suas fases (continuação...).

Nº de onda micélio (cm ⁻¹)	Nº de onda levedura (cm ⁻¹)	Atribuições de modos vibracionais	Referências
3485	3485	O – H ν de grupos hidroxila	[San-Blas et al., 2002]
3438	3442	ν assim. (NH)(NH ₂), quitina	[Tomazett et al., 2010]
3402	3402	ν (NH)	[Ferreira et al., 2015]
	3355	NH quitina	[Tomazett et al., 2010]
3197	3197	ν sim. N – H ν (amida A) de proteínas	[San-Blas et al., 2002]
	3100	ν assim. (NH)(NH ₂), NH quitina	[Tomazett et al., 2010]
3073		Overtone: 1533 x 2 = 3066 cm ⁻¹	[Ferreira et al., 2015]
3035		Banda de combinação: 1624+1435 = 3059 cm ⁻¹	[Ferreira et al., 2015]
	3011	Insaturado =CH ν de lipídios ou ácidos graxos	[Ferreira et al., 2015]
2964	2964	C – H ν assim. de – CH ₃	[San-Blas et al., 2002]
2927	2926	C – H vibração de ν (alifática), ácido linoleico	[Ferreira et al., 2015]
	2886	ν sim. (CH)(CH ₃) quitina alifática grupo CH ₂	[Ferreira et al., 2015]
2873		C – H ν sim. de – CH ₃	[San-Blas et al., 2002]
	2854	C – H ν sim. de > CH ₂ em ácidos graxos	[San-Blas et al., 2002]
1746	1746	> C O ν de ésteres, > C O ν de ácidos carbônicos, ácidos nucleicos	[San-Blas et al., 2002]
1722		ν (C = O) ácido carboxílico (ácido linoleico) + δ (NH ₂)	[Brummer et al., 1993]
1685	1685	Componentes da banda de amida I; ν (C = O) + δ (NH ₂)	[San-Blas et al., 2002]
1655	1659	Amida I de estruturas α -helicoidal; NH δ de grupos amida, α -quitina	[San-Blas et al., 2002; Tomazett et al., 2010; Silva et al., 1994]
1627	1627	Amida I; ν (C = N) + δ (NH ₂); típica de β -quitina	[San-Blas et al., 2002; Silva et al., 1994]
1544	1551	Típica de β -quitina	[Silva et al., 1994]
1452	1459	Amida II, ou δ (CH) desoxirribose C – H δ para o grupo metileno	[Brummer et al., 1993]
	1442	-CH ₂ δ	[Ferreira et al., 2015]
1407	1411	Amida II + ν (CN)	[Ferreira et al., 2015]
1376	1375	ν (CN) da amida; N – C, quitina	[Tomazett et al., 2010]
1341	1348	δ (HCH)(CH ₂)	[Ferreira et al., 2015]
1311	1314	δ (HCH)(CH ₂)	[Ferreira et al., 2015]
	1259	ν (CN) + δ (CH)	[Ferreira et al., 2015]
1240	1238	ν assim. PO ₂ – grupo fosfodiéster	[Ferreira et al., 2015]
1154	1151	Galactose, glucose, frutose	[Shikanai-Yasuda et al., 2006]
1077	1077	Glucose, frutose	[Shikanai-Yasuda et al., 2006]
1032		β -glucanas	[Kanetsuna et al., 1972]
	1027	α -glucanas; ν (CO), ν (CC), ν (CCl ₄) polissacarídeos; frutose, sacarose	[Shikanai-Yasuda et al., 2006; Kanetsuna et al., 1972]

1000		β -glucanas; ν (C – N) + δ (NH), galactose	[Shikanai-Yasuda et al., 2006; Kanetsuna et al., 1972]
------	--	---	--

Tabela 2 -Frequências de absorção no infravermelho características do *P. brasiliensis* nas suas fases (conclusão...).

	980	δ (CH)	[Ferreira et al., 2015]
960	960	β -glucanas; ν (CC) + ν (CO)	[Kanetsuna et al., 1972]
927	927	α -glucanas; δ (NCN); sacarose	[Shikanai-Yasuda et al., 2006; Kanetsuna et al., 1972]

Fonte: Ferreira *et al* (2015).

Esta técnica tem sido usada na caracterização biológica de amostras e de suas composições químicas, como uma alternativa aos testes clínicos. A espectroscopia vibracional se estabeleceu recentemente no campo da biomedicina por seus resultados satisfatórios e abrangência de aplicabilidades, como identificação e diagnóstico de isolados clínicos de espécies e o impacto de parâmetros como: polimorfismo do cariótipo, conteúdo de DNA e tratamento fúngico (POTOCKI *et al.*, 2019). Em sistemas biológicos complexos, como células, o espectro representa a soma das contribuições de biomoléculas como ácidos nucleicos, lipídios, açúcares, proteínas e parâmetros metabólicos presentes (PETIBOIS; DÉLÉRIS, 2006; PETIBOIS *et al.*, 2006). Passaram a ser estudadas também, as vibrações moleculares de estruturas de células e microrganismos. Artigos de revisão e capítulos de livros fornecem resultados e dados desses estados vibracionais (THEOPHANIDES *et al.*, 1988). Verificam-se as bandas com relação ao número de onda correspondente, que podem ser atribuídos às vibrações desses compostos.

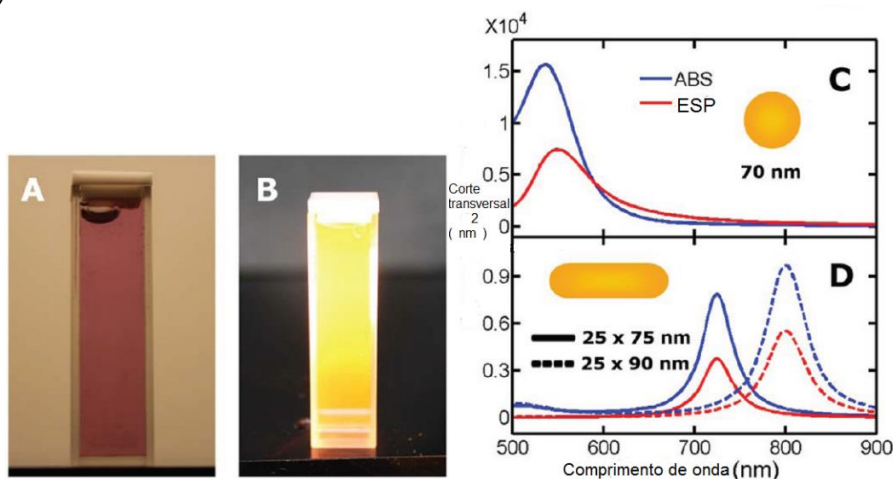
Como vantagens desta técnica pode-se destacar: alta sensibilidade e especificidade, possibilidade de automação, identificação e quantificação de grupos funcionais em estudos microbiológicos (WU *et al.*, 2014], identificação de microrganismos (MARTIN *et al.*, 2017) e distinção de espécies (ERGIN *et al.*, 2016).

3.5 Nanotecnologia

Há indícios da utilização de materiais ou compostos, como cosméticos, vitrais e armas metálicas, constituídos de partículas nanométricas, desde a antiguidade. Maquiagens encontradas dos antigos egípcios, analisadas quimicamente, revelaram a presença de nanopartículas de chumbo. Um sabre,

de rigidez extraordinária devido aos compostos de carbono semelhantes aos nanotubos, foi descoberto na Síria, datado entre os anos 1000 e 1300 (SILVA, 2015). No vitral multicolorido da Catedral de Notre Dame, em Paris, temos o resultado de um processo de fusão do vidro com materiais nanoestruturados. A luz solar ao atravessar os vitrais, contendo nanopartículas, se espalha de forma diferente em função da Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). Nanopartículas de ouro, com diâmetros de 50 nm e 100 nm, presentes nos compostos, proporcionam tons resultantes verde e laranja, respectivamente (TERRA *et al.*, 2014). Este efeito é devido à perturbação causada por uma onda eletromagnética. As nanopartículas podem ter uma oscilação coletiva dos elétrons, quando irradiadas por um comprimento de onda (λ) inferior ou igual a seu diâmetro. Dessa forma, os elétrons confinados ficam submetidos ao mesmo campo, logo, em um determinado intervalo de tempo ocorre a separação dipolar de cargas na superfície desta partícula (JAIN *et al.*, 2007, KREIBIG; VOLLMER, 1995). Estas oscilações plasmônicas são compostas de decaimentos radiativos (espalhamento) e não radiativos (absorção) temporais, compondo a extinção da luz visível, formando uma banda de absorção, denominada de SPR (MAIER, 2003). O fenômeno ocorre em nanopartículas onde existam elétrons livres, de condução, em suas superfícies (LIZ-MARZÁN, 2004). A Figura 7 ilustra como o espalhamento e a absorção afetam a aparência de uma solução coloidal de AuNPs com 70 nm de diâmetro, os espectros característicos desses efeitos em um intervalo de comprimento de onda entre 500 nm e 900 nm, e outros dois conjuntos de espectros característicos do mesmo fenômeno para AuNPs não esféricas, em formato de bastão.

Figura 7 – Absorção A) e espalhamento B) de uma mesma solução de AuNP esférica. Espectros de absorção e de espalhamento de nanopartículas em formato esférico C) e de bastão D)



Fonte: Chang *et al* (2012).

No destaque A), a solução é vermelha, pois absorve o verde/amarelo da luz. No espalhamento, destaque B), a solução é verde/amarelo. Em ambos os casos, a ressonância plasmônica de superfície ocorre na banda de 550 nm. Do destaque C) para o destaque D), observa-se um deslocamento dos espectros para regiões menos energéticas, além de uma redução nos valores máximos de absorção. Isto ocorre devido à alteração do formato das nanopartículas, de esféricas para bastão. A alteração no formato e tamanho, provoca resultados espectrais diferentes e conseqüentemente, cores observadas na solução também diferentes.

Mie, no final do século XIX, foi o precursor na explicação da origem das cores nessas nanoestruturas. Anos mais tarde, em 1904, sua teoria foi complementada com os modelos de Maxwell-Garnett, que explicavam as interações entre nanopartículas metálicas e o meio. Por equações propostas por Maxwell, em 1865, a luz podia ser classificada como uma onda eletromagnética, com oscilações de campos elétricos e magnéticos, perpendiculares entre si, em função do tempo. Teoria comprovada por Hertz, em 1888, que demonstrou que cargas em oscilação irradiavam ondas eletromagnéticas e eram captadas por antenas distantes. Paralelamente,

Faraday, em 1857, descreveu que a coloração de coloides dependia da concentração e do tamanho das partículas na solução. O conjunto dessas pesquisas e resultados contribuiu para despertar o interesse na interação dos campos eletromagnéticos com a matéria e nos fenômenos de transmissão, reflexão, espalhamento e absorção da luz (SANTOS *et al.*, 2016).

Mie iniciou suas explicações propondo equações matemáticas, considerando uma onda eletromagnética interagindo com uma esfera condutora circundada por um meio dielétrico com determinado índice de refração. As soluções para as interações e espalhamento das nanopartículas levam a séries de múltiplos dipolos induzidos, conforme Equações 1 e 2 (SANTOS *et al.*, 2016).

$$\sigma_{ext} = \frac{2}{x^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) \text{Re}(a_L + b_L) \quad , \quad [1]$$

$$\sigma_{esp} = \frac{2}{x^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L+1) (|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad , \quad [2]$$

sendo σ_{ext} e σ_{esp} soluções das equações para as seções de choque, L é um indexador do comportamento do campo da onda (bipolar ou quadripolar) sobre a partícula e, conforme Equação 3 (SANTOS *et al.*, 2016):

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{esp} \quad , \quad [3]$$

os valores de a_L e b_L são descritos através das Equações 4 e 5 (SANTOS *et al.*, 2016).

$$a_L = \frac{m\psi_L(mx)\psi_L'(x) - \psi_L'(mx)\psi_L(x)}{\psi_L(mx)\xi_L'(x) - m\xi_L(mx)\psi_L'(x)}$$

$$b_L = \frac{\psi_L(mx)\psi_L'(x) - \psi_L'(mx)m\psi_L(x)}{\psi_L(mx)\xi_L'(x) - \psi_L'(mx)m\xi_L(x)}$$
, [4] e [5]

$m = n_p/n_m$, sendo n_p o índice de refração da partícula e n_m o índice de refração do meio, ψ_L e ξ_L são funções cilíndricas de Ricatti-Bessel.

Considerando-se as nanopartículas com diâmetro muito menor que o comprimento de onda, a interação cria campos de dipolo induzido. Com essa particularidade em que o campo elétrico é considerado estático temporariamente Mie obteve a Equação 6 (SANTOS *et al.*, 2016).

$$\sigma_{\text{ext}} = 9 \frac{\omega}{c} \epsilon_m^{3/2} V \frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2(\omega)^2}$$
, [6]

sendo V o volume da partícula, ω a frequência angular da luz extinta, c a velocidade da luz, ϵ_m e $\epsilon(\omega) = \epsilon_1(\omega) + i\epsilon_2(\omega)$ são funções dielétricas do meio e do material. Dessa forma e com alguns valores condicionadores, a ressonância é atingida. A incidência do campo provoca deslocamento dos elétrons, que induzem ao dipolo e geram um campo elétrico restaurador. A força restauradora e a indução do dipolo, acopladas, geram a ressonância plasmônica (CHANG *et al.*, 2012).

Desconsiderando-se as restrições de Mie, quanto maiores as nanopartículas, maiores os desvios. As induções eletromagnéticas geradas não são uniformes e provocam deslocamentos da frequência de excitação plasmônica para bandas de energia menores, devido a maior densidade de cargas nas nanopartículas. Neste caso, a função dielétrica terá um comportamento diferente, explicado pelo modelo de Drude-Lorentz, que considera transições entre bandas de energia. Maxwell e Garnett

desenvolveram uma teoria que consideravam sistemas com interação entre campos eletromagnéticos de nanopartículas vizinhas, com formatos e tamanhos diferentes. Na teoria, determina-se um fator de ajuste, que leva em consideração volumes de partículas envolvidas e que deve ser considerado. Pela teoria de Lorentz, calcula-se a polarização das propriedades dielétricas e encontra-se o campo elétrico efetivo. A relação de Maxwell-Garnett é verificada pela Equação 7 (SANTOS *et al.*, 2016).

$$\frac{\epsilon_{efe} - \epsilon_m}{\epsilon_{efe} + 2\epsilon_m} = f \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m}, \quad [7]$$

A função do campo elétrico efetivo pode provocar uma maior separação de cargas no sistema e conseqüentemente, uma força de restauração menor, que se reflete no efeito da ressonância plasmônica (SANTOS *et al.*, 2016).

Na década de 90 houve um grande interesse científico na área de nanotecnologia, muitas vezes referenciada como a revolução nano e comparada, por muitos, à revolução industrial.

Em um breve relato visionário, em 1959, Richard Feynman ao palestrar para a Sociedade Americana de Física, referiu-se à manipulação da matéria em escalas atômicas e moleculares, dando uma ideia do que estaria por vir. O aperfeiçoamento de técnicas de caracterização, como o Microscópio eletrônico de varredura por Tunelamento (*Scanning Tunelling Microscope*, STM), Microscópio eletrônico de Transmissão (MET), como também modelos computacionais e técnicas de sínteses possibilitaram o controle refinado das nanoestruturas. Esta nanociência desenvolve pesquisas com materiais de dimensões da ordem de 1 a 100 nm, sendo um novo universo em virtude desses corpos possuírem propriedades singulares, não observadas quando em dimensões macrométricas (DISNER; CESTARI, 2016). Essa denominação foi citada, pela primeira vez, em um artigo científico publicado em 1974, pelo professor Norio Taniguchi, da Universidade de Ciência de Tóquio (ZHANG; WEBSTER, 2009]. Em 1986, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer receberam o prêmio Nobel de Física pelo invento do STM (FRITZ *et al.*, 2002).

Nos anos 80 a nanotecnologia foi difundida. O interesse pela ciência e novas descobertas, como o fulereno, uma molécula esférica de perfeita simetria, a consolidaram a partir daí. No início dos anos 90, a descoberta dos nanotubos de carbono revolucionou o mundo científico (IJIMA, 1991).

Grandes oportunidades, inúmeras aplicabilidades e importante utilização da nanotecnologia relacionam-se com diagnósticos, terapias e tratamentos de doenças, cosméticos, eletrônicos, equipamentos esportivos, agricultura, alimentos, energia e tecidos, dentre outros.

Nanofibras, se comparadas aos tecidos tradicionais como algodão e polyester, são extremamente resistentes, possuem elevada capacidade de absorção e de filtragem, que podem ser utilizadas, por exemplo, em máscaras de proteção; pela relação área superficial por massa. Outras aplicações são em roupas esportivas de alta performance, com preocupações relacionadas à transpiração corporal, à resistência ao vento, à umidade e ao conforto. Alguns polímeros podem ser transformados em nanofibras, por eletrospinning, uma tecnologia de grande potencial nesse segmento. Nanopartículas metálicas estão sendo usadas em tecidos ou fibras, com finalidades antibactericidas, protetoras de ultravioleta, catalizadoras, antichamas, dentre outras (KIEKENS, 2019). Técnicas de absorção, em monocamadas, envolvendo nanopartículas, também são utilizadas em materiais têxteis. Em 2017, grafeno foi introduzido em jaquetas de esqui, para garantir uma temperatura corporal uniforme, durante competição esportiva. Com o auxílio dessa tecnologia, roupas tendem a ser mais do que um acessório. Serão capazes de avaliar biologicamente os corpos: batidas do coração, pressão sanguínea e temperatura (MONTAZER; HARIFI, 2018). Poderão aquecer ou resfriar os corpos, dependendo das condições externas. Enfim, inúmeras propriedades poderão ser acrescentadas em tecidos ou fibras. Tudo isso, sem desconsiderar estudos conclusivos de toxicidade (KIEKENS, 2019).

Os cosméticos sempre acompanharam a humanidade ao longo da história. Nos últimos anos, produtos de beleza baseados em nanotecnologia contêm ingredientes benéficos nas categorias onde os medicamentos tradicionais podem não atuar (HAMEED *et al.*, 2019). Técnicas de modificação em nanocarreadores e de aplicação de antioxidantes são usadas na indústria de cosméticos (PATWEKAR *et al.*, 2014). Comercialmente, foram introduzidos

no início dos anos 90. Nos anos seguintes, marcas famosas como *Chanel* apareceram no mercado com desenvolvimento de novos produtos dessa linha. Maquiagem desenvolvida com titânio, por exemplo, causam o efeito fotocrômico, que permite um mesmo resultado na pele, esteja ela exposta à luz solar ou à luz artificial. Os nanossomos, são pequenas estruturas desenvolvidas que transportam ingredientes ativos ao exterior da pele. Cremes anti-rugas usam nanocápsulas para incorporar vitaminas. Empresas como *Johnson & Johnson* desenvolvem produtos com essa tecnologia. Nessa área, 312 patentes estão relacionadas com dermatologia e cosméticos. O processo químico de emulsão, que envolve tecnologia e está na maioria dos processos dessa linha, tem potencial para moldar o futuro dos produtos cosméticos (HAMEED *et al.*, 2019). Condicionadores ou loções para pele e cabelos utilizam essa técnica, que agrega ao produto propriedades atraentes ao consumidor (SHARMA; SARANGDEVOT, 2012).

Oportunidades envolvendo nanotecnologia também são discutidas na agricultura e segurança alimentar, que estão ainda em fase de pesquisas na sua maioria. J. Scott Angle, diretor do Instituto Nacional de Comida e Agricultura dos Estados Unidos, declarou que, diferentemente da área da saúde, em agricultura os investimentos são menores, embora existam centenas de ideias sendo desenvolvidas. As aplicações incluem produção agrícola, saúde animal e preservação de alimentos. A maior oportunidade envolve fertilizantes. Nesta área, essa tecnologia oferece formas de potencializar a obtenção de micronutrientes mais diretamente na parte comestível de uma colheita, o que reduziria a necessidade de solo melhorado. Outro exemplo, seria a redução de pesticidas, com a possibilidade de carreadores para alvos específicos. Sem falar na otimização das questões ambientais e redução de custos (MULLEN, 2019).

A energia renovável é um dos focos principais de pesquisa. A solar, tecnologia fotovoltaica, ainda é a menos utilizada no mundo. Com a nanotecnologia e engenharia viável pode-se criar um sistema capaz de aproveitar o trabalho fotovoltaico para produção de energia (SINGH; GUPTA, 2019). Um exemplo é a célula solar, que tem sido testada com vários componentes por questões de custo, e suas aplicações com *Plug-in Electric Vehicle* (SANDALOW, 2009). A corrente elétrica é produzida quando fótons de

luz caem sobre a placa, emitindo elétrons. A presença de óxidos contendo nanopartículas, com diâmetros entre 10 e 30 nm, no circuito é a única via para a circulação da corrente. A película fotovoltaica fina, um filme com espessura de poucos nanômetros, é uma tecnologia de sucesso na célula solar transparente. A tecnologia é de baixo custo e o resultado é um material de estrutura rígida, mas flexível (ZWEIBEL, 2000). O objetivo, para uma maior eficácia, é reduzir a espessura do filme, que só é possível com a manipulação de materiais e uso da nanotecnologia (SINGH; GUPTA, 2019).

Os avanços tecnológicos envolvendo materiais em escala nanométrica colaboraram com o surgimento de novos ramos do conhecimento, como a nanomedicina e a nanobiotecnologia (MARTINS; TRINDADE, 2012). Os chamados nanobiossensores, apresentam progressos positivos quanto à detecção de marcadores biológicos, detecção de bactérias, de vírus, diagnóstico de diabetes, infecções e doenças oncológicas (BARROSO, 2014). De fato, as novas áreas são multidisciplinares, chamadas de convergência tecnológica, envolvendo a nanotecnologia, a informática, a biotecnologia e as ciências cognitivas (MOREIRA, 2018), propiciando pesquisas e desenvolvimento de novos produtos (PACHECO, 2017).

3.6 Testes colorimétricos

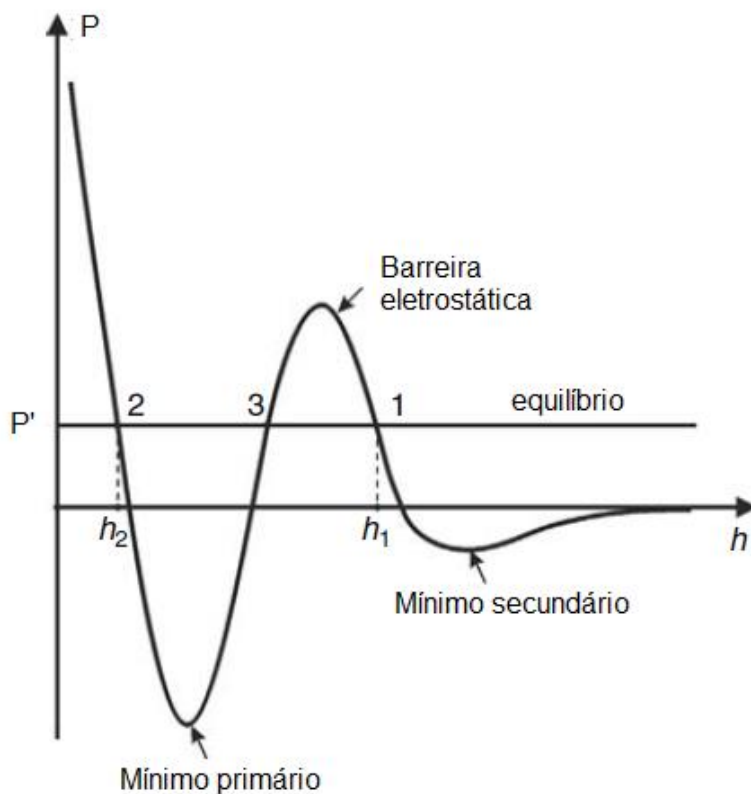
A demanda por formas de diagnóstico de doenças que reduzam custos, tempo de espera e que sejam mais precisas e eficazes é sempre crescente. Os resultados em pesquisa e desenvolvimento com nanopartículas metálicas, com resultados perceptíveis na região visível do espectro eletromagnético, têm colaborado muito como alternativas de trabalho nesse sentido. O efeito da mudança de cor em uma solução coloidal é causado pela aglomeração dessas nanopartículas e o processo envolvido é o da ressonância plasmônica. Nesta solução, é necessária a presença de um agente estabilizador para que se mantenha o tamanho, a morfologia e a não aglomeração das partículas (KRENN *et al.*, 1999).

A estabilidade dessa solução depende das interações entre as partículas presentes no meio. A repulsão por forças de Coulomb ocorre entre as nanopartículas, uma vez que suas áreas superficiais possuem cargas,

auxiliando para uma estabilização eletrostática, impedindo a aglomeração. Porém, se houver alteração de pH na solução, essa estabilidade pode ser interrompida. Por essa razão, a presença de um estabilizador, atua como uma camada protetora, envolvendo as nanopartículas, evitando a agregação entre elas e mantendo a solução coloidal estável por um período maior (KHLEBTSOV; KHLEBTSOV, 2011). Os primeiros trabalhos de referência sobre síntese de solução coloidal com nanopartículas foram publicados em 1951, por Turkevich *et al.*; e em 1973, por Frens.

Embora forças eletrostáticas repulsivas estejam presentes na solução e contribuindo para a estabilidade, as forças atrativas de Van Der Waals, entre partículas idênticas, também estão presentes, colaborando para o equilíbrio de forças e formando uma barreira energética (KRALCHEVSKY *et al.*, 2008]. Esta barreira, que caracteriza a estabilidade do sistema, pode aumentar ou diminuir, pois é influenciada pela constante de Hamaker (influência na intensidade da força de Van Der Waals), do potencial elétrico das superfícies das partículas e da concentração do eletrólito (meio) (ZHOU *et al.*, 2009). A Figura 8, mostra um esquema ilustrativo do comportamento da pressão de desequilíbrio (P), provocada por essas forças, em função da distância (h) ou tamanho, em escala nanométrica, dessa barreira de energia.

Figura 8 – Esquema do comportamento da pressão gerada por forças (Coulomb e Van Der Waals) em função da distância.



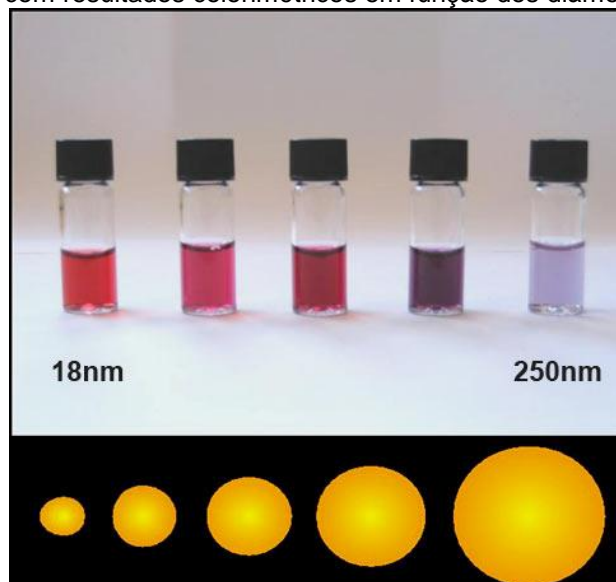
Fonte: Adaptado de Kralchevsky *et al* (2008).

Esse mínimo primário, representa a menor distância entre nanopartículas, na qual o processo de desestabilização seria irreversível. O mínimo secundário, representa uma distância limite para agregação, porém o processo é reversível. Condições melhores de equilíbrio estão representadas pelos pontos 1, 2 e 3. Quando as nanopartículas são envolvidas por uma camada orgânica, na sua síntese ou funcionalização, esses processos de desestabilização que provocaria a aglomeração das partículas, são eliminados ou minimizados (VIEIRA, 2015).

Neste contexto, nanopartículas de ouro apresentam propriedades diferenciadas como a elevada estabilidade química e eficiente absorção de luz visível na região SPR (ANIKEEVA; DEISSEROTH, 2012). Permitem a funcionalização com tióis, dissulfetos e aminas, conjugando-as com biomoléculas, visando aplicações biomédicas (OJEA-JIMÉNEZ; PUNTES, 2009). Possuem elevados coeficientes de extinção para as bandas que originam suas intensas cores, dependentes do tamanho, concentração e distância interpartículas; o que as tornam opções para estratégias

colorimétricas de detecção e sequenciamento de DNA (MIRKIN *et al.*, 1996). Alguns exemplos de resultados colorimétricos são mostrados na Figura 9.

Figura 9 – Soluções coloidais de nanopartículas de ouro, demonstrando o processo de ressonância plasmônica, com resultados colorimétricos em função dos diâmetros.



Fonte: Figueira; Santos (2017).

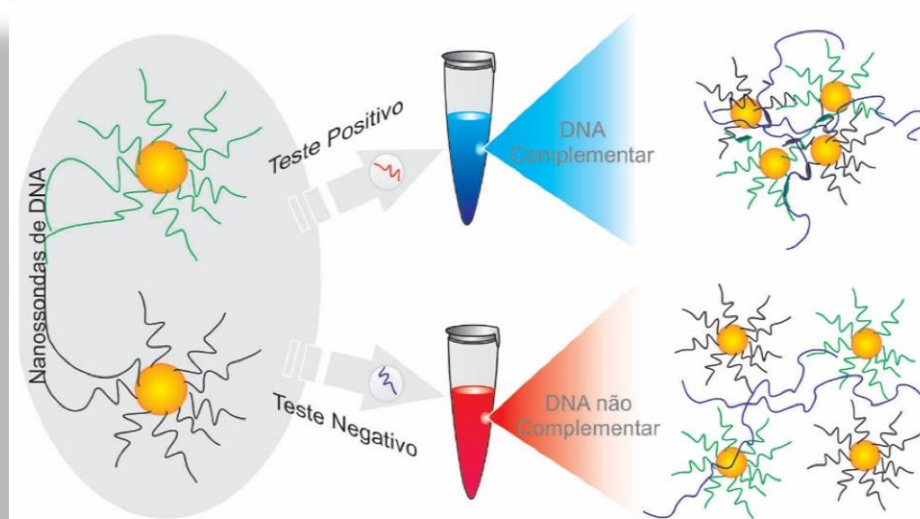
A detecção colorimétrica de DNA com a utilização de AuNPs foi descrita por Mirkin *et. al.* em 1996. Nesse trabalho, os autores potencializavam aplicações de soluções coloidais de metais e semicondutores, em sensores químicos, fabricação de nanoestruturas e métodos de microimagem. Propuseram a funcionalização de nanopartículas de ouro com sequências de oligonucleotídeos tiolados, complementares a uma sequência de DNA alvo, possibilitando explorar propriedades óticas, eletrônicas e estruturais dos colóides resultantes dessa hibridação. Demonstraram a atratividade dessas nanopartículas para utilização de sensores colorimétricos e estratégias de sequenciamento para DNA (MIRKIN *et al.*, 1996).

Em 1998, Storhoff *et. al.* descreveram a detecção de polinucleotídeos, alguns até com alguma mutação de base, baseada em sondas de nanopartículas de ouro, utilizando o processo de funcionalização das suas superfícies. Ao identificar o alvo, no processo de hibridação, o autor relata a mudança de cor observada na solução, do tom vermelho para um roxo, referindo-se à ressonância plasmônica. Essa metodologia de detecção colorimétrica e determinação da sonda, conclui, podem ser úteis no diagnóstico

de doenças genéticas que contenham mutações de nucleotídeo único (STORHOFF *et al.*, 1998).

Este método chamado de *cross-linking* utiliza nanossondas, que são nanopartículas de ouro funcionalizadas a duas sequencias diferentes de oligonucleotídeos complementares ao alvo de interesse. Quando acontece a hibridação destas nanossondas com o alvo, há uma aproximação/aglomeração das nanopartículas de ouro, alterando a cor da solução. A Figura 10, ilustra o teste *cross-linking* e o resultado colorimétrico.

Figura 10 – Ilustração do teste colorimétrico *cross-linking*



Fonte: Laboratório de Nanossensores (IP&D)

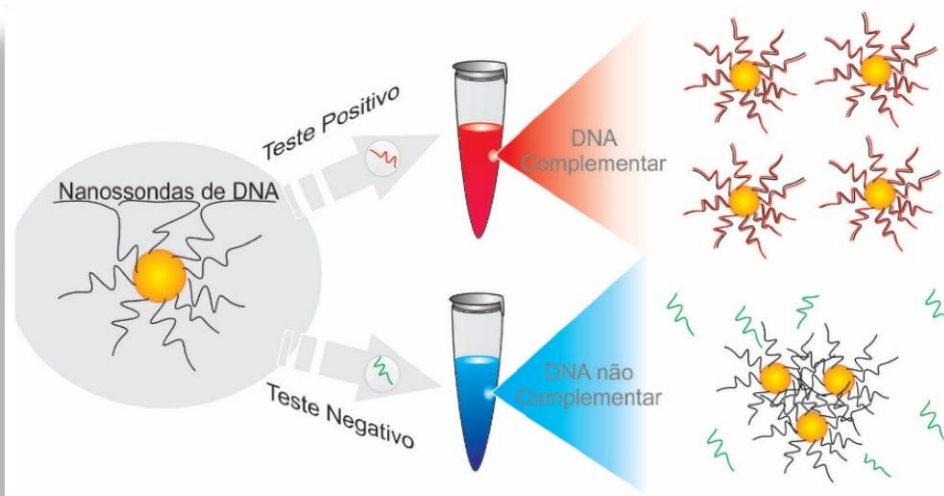
Esta metodologia foi aprimorada por Baptista *et al.* em 2005, passando a se chamar de *non-cross-linking*. De acordo com o seu trabalho, nanopartículas de ouro funcionalizadas com Tiol, foram utilizadas em ensaio colorimétrico para detecção de uma sequência específica de RNA total extraído de célula. Destaca o baixo custo da metodologia, a obtenção de resultados em menos de 15 min, a não necessidade de controle de temperatura e a fácil identificação dos resultados colorimétricos (BAPTISTA *et al.*, 2005).

Em 2006, P. Baptista *et al.* usaram o método colorimétrico para identificação rápida e com alta sensibilidade para detecção do *Mycobacterium tuberculosis*, em 73 amostras clínicas. Um oligonucleotídeo específico, com tiol (tiol-GGACGTGGAGGCGATC), foi utilizado para funcionalização da nanopartícula de ouro. Enfatizam que o custo total, por amostra, foi menor do que US \$0.35 (incluindo PCR de primeira rodada), que é consideravelmente menor do que para outros métodos, finalizam (BAPTISTA *et al.*, 2006). Em 2012, Martins *et al.*, realizaram testes colorimétricos semelhantes para a identificação do *P. brasiliensis*. Um fragmento específico (SH-TCCGTAGGTGAA), de uma sequência de DNA com 647 pares de bases, foi selecionado para a construção das nanossondas. Os resultados dos testes foram satisfatórios (MARTINS *et al.*, 2012). Em 2015, Ferreira *et al.* consideraram a técnica adequada por contribuir com estudos epidemiológicos e para realização de testes em áreas mais remotas e carentes de recursos pois não requer procedimentos adicionais, além da amplificação de genes, sendo mais seguras e baratas do que métodos de eletroforese. Nesse trabalho, funcionalizaram nanopartículas de ouro com tiol modificado e sequência específica (SC₄-GGTGCGAGGTC). O gene *gp43* foi a sequência alvo, pois é o maior componente antigênico do *P. brasiliensis*. Sugerem, portanto, que esta é uma alternativa de colaborar com diagnósticos relacionados ao fungo (FERREIRA *et al.*, 2015). Em publicação de 2019, Cândido *et al.*, utilizaram outra sequência com tiol (Tiol-GCGCACAAGTAGAGT), para identificação molecular do *P. brasiliensis*. O grupo realizou 100 testes no total, entre positivos e negativos. Os resultados colorimétricos foram acompanhados de análise por espectroscopia na região visível do espectro eletromagnético. Uma

das análises estatísticas utilizadas, calculou a sensibilidade dos testes em 92% e a especificidade em 80% (CÂNDIDO *et al.*, 2019).

A técnica possibilitou se reduzir a uma única sequência de oligonucleotídeos associada à adição de uma solução salina reveladora de baixo custo. O mecanismo de ação baseia-se na estabilização coloidal das nanossondas quando hibridizadas e, na mudança de coloração devido a aglomeração das nanossondas pela ação da solução reveladora para DNA não complementar (BAPTISTA *et al.*, 2005). Neste caso, nos testes positivos, o DNA complementar se liga às nanossondas, aumentando a estabilidade da solução. A mudança de cor, do tom vermelho para o azul, ocorre nos testes negativos por interferência da solução salina. Outra vantagem desse método, além do menor custo, é o aumento nos valores de sensibilidade e especificidade nas detecções de sequências de DNA e RNA (DORIA *et al.*, 2007). A Figura 11, ilustra o teste *non-cross-linking* e o resultado colorimétrico.

Figura 11 – Ilustração do teste colorimétrico *non-cross-linking*



Fonte: Castilho *et al.* (2015).

Porém este método também foi aperfeiçoado e substituído por uma versão mais simples chamada de *label-free*. Com esta técnica é possível reduzir custos com reagentes e tempo de procedimentos. Os testes são feitos utilizando soluções com nanopartículas de ouro, oligonucleotídeos e uma solução reveladora, que são adicionados ao DNA teste (COMPARATO FILHO, 2017). Os testes apresentaram bons resultados de especificidade e sensibilidade (WANG *et al.*, 2006).

Dentre estas metodologias, o *label-free* apresenta a grande vantagem de não haver a necessidade do procedimento de funcionalização, dispensando consumo de tempo e reagentes (HUIXIANG; ROTHBERG, 2004). Elimina-se a utilização de oligonucleotídeos tiolados, também a incubação e a purificação dos nanossensores. A funcionalização de AuNPs pode ocorrer entre 24 e 48 horas (CÂNDIDO *et al.*, 2019).

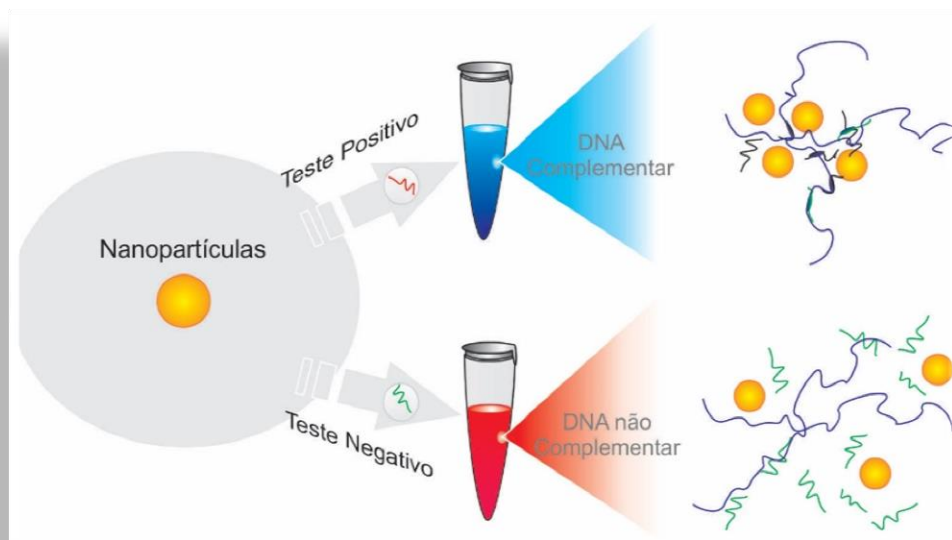
Em 2016, Comparato Filho *et al.* publicaram estudos sobre a influência da concentração de oligonucleotídeos, presentes em solução salina, na estabilidade coloidal de nanopartículas de ouro. A pesquisa obteve resultados importantes e necessários para a continuidade dos testes de identificação molecular pela metodologia *label-free* (COMPARATO FILHO *et al.*, 2016). Em 2018, realizaram testes colorimétricos com intuito de auxiliar no diagnóstico da paracoccidiodomicose. Para a identificação do agente causador, realizaram duas baterias de testes, uma para cada oligonucleotídeo. Utilizaram duas sequências específicas (GP43 e GP27) do patógeno. Para a primeira, os resultados de sensibilidade e especificidade foram superiores aos 95%. Para a segunda, os resultados foram superiores aos 91% (COMPARATO FILHO *et al.*, 2019). No mesmo ano, Baetsen-Young *et al.*, exploraram as propriedades óticas de nanopartículas de ouro para a detecção de DNA alvo e estudo da estabilidade coloidal. Utilizaram dextrina, em vez de citrato na síntese, para o desenvolvimento de um nanossensor de DNA genômico não amplificado, além de uma sequência específica para sonda. Concluíram que as nanopartículas, neste caso, são mais estáveis, mesmo para concentrações de soluções salinas cinco vezes maiores. A detecção do DNA alvo, também pôde ser efetuada em

limites menores, dispensando reagentes caros e sensíveis à temperatura (BAETSEN-YOUNG *et al.*, 2018).

Khanylle *et al.*, no artigo publicado de 2019, realizaram testes para detecção de dopamina. Várias concentrações foram testadas adicionadas às AuNPs, ocasionando, ao longo dos testes, mudanças na forma e tamanho das partículas e, conseqüentemente, na cor final da solução, que puderam ser confirmadas nas curvas espectrais observadas na região do visível. A partir de uma concentração 2,5 nM, as mudanças de cor puderam ser facilmente observadas. A sonda foi experimentada em amostras de sangue. Os resultados foram satisfatórios e conclusivos. Os autores acreditam se tratar de uma promissora alternativa para detecção da dopamina sem instrumentação e para aplicações de diagnóstico rápido (KHANYLLE *et al.*, 2019). Yousefi e Saraji, em artigo publicado no mesmo ano, desenvolveram um sensor ótico para a detecção da adenosina na urina humana. Utilizaram nanopartículas de prata, de ouro e uma sonda específica de reconhecimento. A faixa de concentração da adenosina foi de 60 nM até 280 nM, com limite de detecção a 21 nM. Os testes puderam ser realizados com amostras de urina de pacientes com câncer. Os resultados confirmaram o excelente potencial da metodologia (YOUSEFI; SARAJI, 2019). Os testes foram feitos em duas triplicatas. No artigo publicado em 2019, Cândido *et al.*, utilizaram a metodologia *label-free* para identificação do *P. brasiliensis* com uma outra sequência específica (rRNA). Os resultados foram satisfatórios. A estatística dos resultados foi apresentada através de dois métodos (curva ROC e ajuste de curvas Gaussianas). A acurácia, cujo valor mais próximo de 1 indica excelência nos resultados, calculada por ambos foi de 0,976. Uma conclusão de alta sensibilidade e alta especificidade (CÂNDIDO *et al.*, 2019).

A Figura 12, ilustra o teste *label-free* e o resultado colorimétrico. A Figura 13 mostra um diagrama dos testes, contendo, desde a desnaturação do DNA e a aglomeração das partículas.

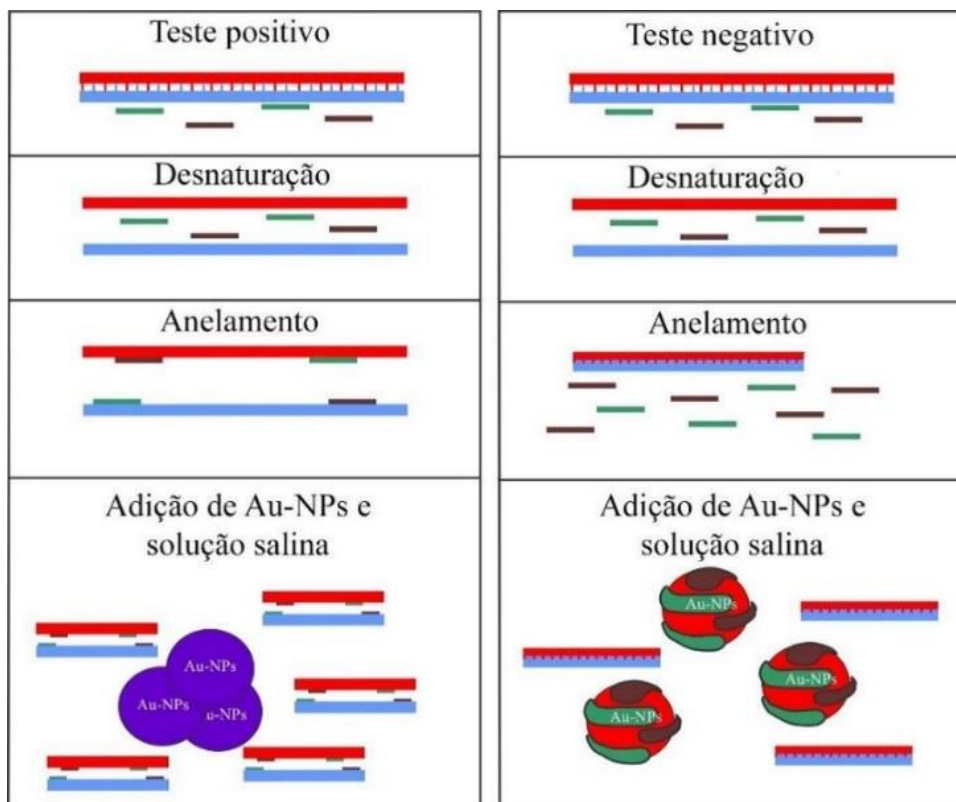
Figura 12 – Ilustração do teste colorimétrico *label-free*



Fonte: Laboratório de Nanossensores (IP&D)

Quanto ao processo de desnaturação do DNA, aumentando-se a temperatura, as pontes de hidrogênio se rompem. Diminuindo-se a temperatura, ocorre a hibridação, devido a interações intermoleculares relacionadas às cargas envolvidas, e uma hélice complementa a outra devido ao pareamento das bases nitrogenadas (ROSELINO, 2008).

Figura 13 – Diagrama do mecanismo do teste *label-free*

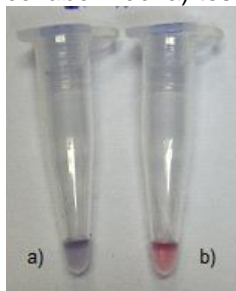


Fonte: Huixiang e Rothberg (2004).

Neste método, o teste positivo é feito utilizando uma mistura composta de nanopartículas de ouro, fita simples de DNA (ssDNA) e uma fita dupla de DNA complementar a ssDNA. No teste negativo, a ssDNA não é complementar a fita dupla de DNA. Ambas as amostras são submetidas a um ciclo de temperatura para a desnaturação e anelamento do DNA, possibilitando a estabilização das nanopartículas dependendo do DNA (HUIXIANG; ROTHBERG, 2004).

O teste positivo apresenta uma mudança de coloração de vermelho para azul, o teste negativo permanece vermelho, conforme demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – Resultado de teste colorimétrico *label-free*: a) teste positivo, b) teste negativo.



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores.

O teste negativo permanece na cor vermelha, pois as ssDNA apresentam uma forte atração eletrostática com a camada de citrato depositada na superfície das nanopartículas. Esta camada recobre as nanopartículas de ouro impedindo que ocorra uma aglomeração induzida pela adição da solução salina. Esta, adicionada ao meio, irá substituir o citrato, causando desestabilização e aglomeração, assim a solução muda de vermelho para azul. A eficiência dessa atração pode se alterar com o comprimento da fita de DNA e a variação da temperatura (HUIXIANG; ROTHBERG, 2004).

Conforme os vários exemplos citados, AuNPs têm diversas aplicações, como na detecção de biomoléculas, por sua alta relação superfície/volume e propriedades óticas únicas. Essas características, facilitam o desenvolvimento de ferramentas de biossensoriamento para a identificação seletiva de patógenos. As técnicas colorimétricas, aplicam-se a métodos rápidos, simples, confiáveis, eficientes e baratos no reconhecimento de DNA, RNA e biomoléculas de proteínas. As nanopartículas atuam de formas funcionalizadas e não funcionalizadas, o que otimiza ainda mais o processo em termos de redução de tempo e custo. Além disso, resultados conclusivos dispensam dispositivos adicionais, instrumentos caros e complexos. As metodologias apresentadas podem ser utilizadas em áreas remotas e de poucos recursos, que demandem grande número de análises de amostras (SHAFIEI *et al.*, 2019).

3.7 Nanotecnologia voltada ao diagnóstico de doenças

Na área médica, uma das mais promissoras, a maior aplicação é em diagnósticos e terapias. Os resultados abrangem desenvolvimento de nanossensores de alta precisão, não invasivos e maior especificidade em meios de contrastes (HEATH *et al.*, 2009). As nanopartículas têm recebido muita atenção em diversas áreas, incluindo funcionalidades biomédicas. Estudos e aplicações proporcionam contribuições para a prática clínica, no diagnóstico por imagem e na liberação controlada de fármacos (COIMBRA, 2013).

No diagnóstico de doenças, os métodos convencionais de detecção molecular, como o ELISA e Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), promovem, algumas vezes, reações cruzadas (YASUDA *et al.*, 2006). Testes como BAAR e broncoscopia são eficientes em diagnósticos, porém existem registros de resultados negativos, pois a sensibilidade destes métodos está associada a vários fatores (NOGUEIRA *et al.*, 2011). Novos métodos de diagnóstico baseadas em PCR e utilização de nanopartículas oferecem um aumento de sensibilidade e especificidade, permitindo uma forma de diagnóstico colorimétrico de menor custo.

As metálicas são utilizadas em diagnósticos devido a propriedades como geometria, alta reatividade em células vivas, estabilidade em altas temperaturas e propriedades óticas (CÂNDIDO *et al.*, 2019). As de ouro e prata são mais pesquisadas e aproveitadas. Ao contrário do que muitos podem imaginar, as sínteses de nanopartículas desses dois metais são realizadas a baixo custo. Não existe uma relação direta com o preço elevado dos metais sólidos comercializados. Coloides de cobre também apresentam a frequência de SPR na parte visível do espectro eletromagnético, motivando estudos de efeitos plasmônicos. As de óxidos de ferro, têm sido utilizadas em aplicações de imagens de ressonância magnética, fármacos e em hipertermia. Na Ressonância Magnética, para se obter uma melhora no sinal e melhores tons de cinza nas tomografias computadorizadas, essas partículas em escalas nanométricas, abaixo de 10 nm, são utilizadas (TOMA; ARAKI, 2011). Nanopartículas envolvendo ligas de ferro/platina e cobalto/platina também têm sido pesquisadas (MARTINS; TRINDADE, 2012).

O processo de funcionalização de nanopartículas envolvendo suas superfícies permite inúmeras possibilidades de aplicações (NGHIEM *et al.*,

2010), devido a características como o tamanho, a carga superficial entre outros, que se relacionam diretamente com a sua finalidade (BOULAIZ *et al.*, 2011). Estas propriedades permitem aplicações em novas formas de diagnósticos e terapias, (CARUSO *et al.*, 2012), podendo-se destacar os carreadores de drogas para aumento da eficiência farmacológica (HUANG *et al.*, 2006).

Complexos formados por nanopartículas funcionalizadas, seja com fármacos ou com moléculas de reconhecimento ou ambos, melhoram a biodistribuição, o acesso aos tumores e, conseqüentemente auxiliam no diagnóstico e aumentam a eficácia dos tratamentos (CASTILHO, 2017). Alguns grupos funcionais, como tiol, apresentam alta afinidade química pelas nanopartículas de ouro, o que permite a funcionalização de biomoléculas como lipídios, proteínas, oligonucleotídeos e fotossensibilizador (SHI *et al.*, 2004). Quando associadas a medicamentos, catalisadores, enzimas, DNA, anticorpos ou antígenos tornam-se transportadores químicos, guiados no corpo humano.

O tamanho do mercado global de nanomedicamentos foi de US\$ 53 bilhões em 2009, com taxa anual de crescimento superior aos 13%. Em 2014, ultrapassou os US\$ 100 bilhões. Em 2018, programas da União Europeia investiram €430 milhões em 84 projetos de pesquisa nessa área, enquanto os Estados Unidos investiram o equivalente a US\$ 445 milhões (BOSETTI; JONES, 2019). Desde o início dos 2000, governos de países como: Alemanha, Austrália, Brasil, Canadá, Estados Unidos, França, Índia, Itália, Japão, Reino Unido e Suíça investem nas áreas de biotecnologia e medicina. No caso dos Estados Unidos, trata-se de uma parcela de investimento em nanotecnologia da ordem de US\$ 3,7 bilhões; na União Europeia, da ordem de US\$ 2 bilhões e no Japão, da ordem de US\$ 750 milhões (SILVA, 2015). O mercado mundial em nanotecnologia deve superar os US\$ 125 bilhões até 2024 (MUFAMADI, 2019). Em 2015, investimentos dos governos da União Europeia, Estados Unidos e Japão superaram US\$ 3 bilhões (ADAM; YOUSSEF, 2019). A indústria de nanomedicamentos, estima-se, deverá atingir um valor de mercado em torno de US\$ 334 bilhões em 2025 (BOSETTI; JONES, 2019).

4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.1 Espectroscopia no UV-Visível

A análise de amostra por espectroscopia na região do UV-Visível baseia-se na interação de um feixe de radiação eletromagnética com a amostra, podendo acontecer os fenômenos de refletância, absorbância e transmitância. Quando esta radiação é absorvida pela estrutura atômica da amostra, existe a probabilidade de elétrons serem promovidos de um orbital menos energético para um mais energético (PAIVA *et al.*, 2013). Os registros de todas as absorções em função do comprimento de onda formam um espectro UV-Visível característico, permitindo calcular a concentração de um soluto em um solvente por meio de um gráfico de absorção versus concentração, quando obedecida a lei de Lambert-Beer (BARBOSA, 2007), descrita na Equação 8 (LIU *et al.*, 2007).

$$C = \frac{A}{\epsilon l}. \quad [8]$$

Nela, A é o valor da absorbância, l é o caminho ótico em cm e ϵ é o coeficiente de extinção molar (MAYERHOFER; POPP, 2019). O coeficiente, para nanopartículas de ouro, pode ser calculado pela Equação 9 (NAVARRO; WERTS, 2013).

$$\epsilon_{Máx}^{Ouro} = Ad^{\gamma} \begin{cases} A = 4,7 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}, \gamma = 3,3, d \leq 85 \text{ nm} \\ A = 1,6 \times 10^8 M^{-1} cm^{-1}, \gamma = 1.47, d > 85 \text{ nm} \end{cases} [9]$$

4.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Seu princípio de funcionamento baseia-se na interação da radiação infravermelha com a matéria (HELM *et al.*, 1991). No espectro eletromagnético, refere-se às ondas de comprimento entre 2,5 μm e 25 μm , que correspondem aos números de onda entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , respectivamente (MAITY *et*

al., 2013). Quando a radiação infravermelha passa através de uma amostra, em comprimentos de onda específicos, ela tem a probabilidade de ser absorvida, podendo ocasionar nos grupos funcionais das moléculas presentes estiramentos e deformações angulares. O espectro de absorção, obtido no final do processo, caracteriza o composto e nos fornece informações da sua composição química (DAVIS; MAUER 2010).

A teoria clássica de Maxwell sobre o eletromagnetismo propôs que energia é emitida em forma de ondas eletromagnéticas, geradas por cargas em aceleração ou em movimentos harmônicos. Planck propôs que essa energia emitida por um oscilador é determinada pela frequência, por uma constante e por um número inteiro, ou seja, uma energia quantizada, não contínua. Seu conceito de radiação emitida relacionava-se com a onda eletromagnética. Coube à Einstein definir o conceito de fóton, que possui a propriedade de onda eletromagnética e a propriedade de energia quantizada (ALPEN, 1998). A Mecânica Quântica define a radiação eletromagnética como fótons de energia que se propagam na velocidade da luz. Portanto, essa energia só é absorvida de forma discreta, em quantidades específicas e depende da frequência. Essa relação entre a energia e a frequência, que também poderia ser expressa em frequência angular (ω), é dada pela Equação 10 (PLANCK, 1901):

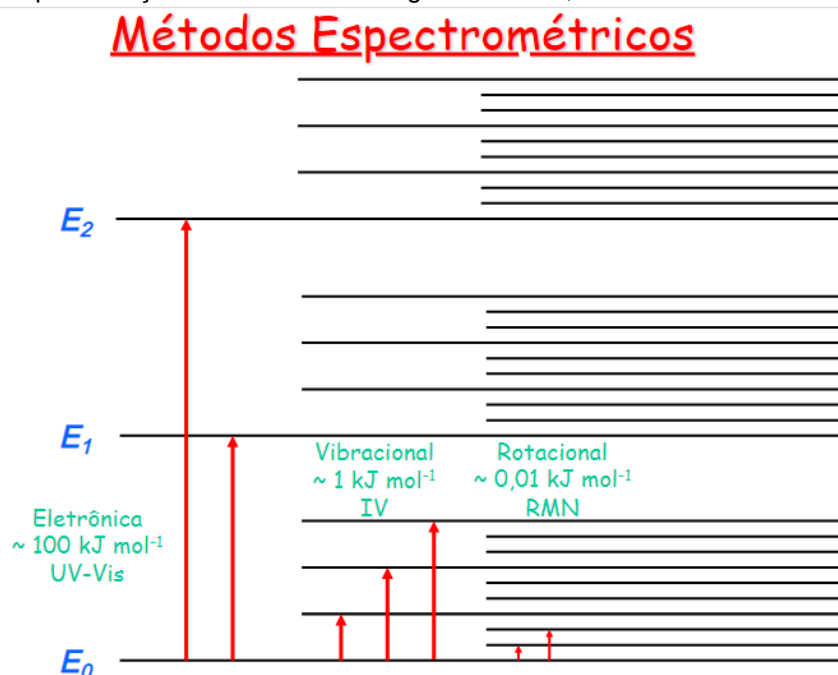
$$E = h\bar{\nu} = h \frac{\omega}{2\pi} = \hbar\omega \quad [10]$$

sendo h a constante de Planck ($6,6260 \times 10^{34}$ J.s).

Quando a frequência desta radiação incidente se aproxima de uma das frequências naturais de vibração da amostra, existe a probabilidade de ocorrer absorção do fóton, relacionado a um modo normal de vibração específico. Neste processo, ocorre uma transição entre os níveis de energia vibracionais, de um menos excitado para um mais excitado (PASQUINI, 2003), que podem resultar em estiramentos ou deformações nas ligações dos átomos que constituem a molécula. Em outras regiões do espectro, como: ultravioleta/visível ou micro-ondas, as transições seriam eletrônicas e rotacionais, respectivamente. A soma destes três tipos de energia compõe a

energia total da molécula (AGUIAR, 2016). A Figura 15 ilustra uma representação dos níveis de energia.

Figura 15 – Representação dos níveis de energia eletrônico, vibracional e rotacional.



Fonte: Juliano (2020)

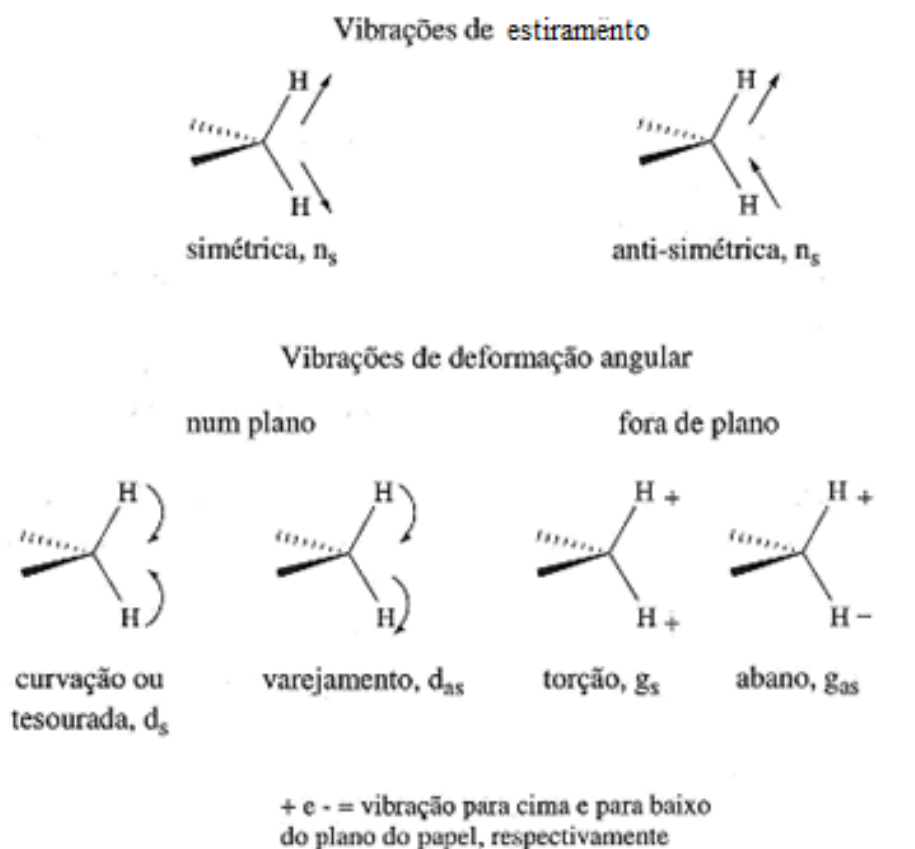
As perturbações causadas pela irradiação do material estão correlacionadas com as transições vibracionais, que podem ser quantificadas por meio das bandas de absorção registradas no espectro de infravermelho, que representam as ligações químicas intrínsecas de cada amostra (PAIVA *et al.*, 2013). Na identificação dos modos vibracionais consideram-se as vibrações de valência, na direção da ligação química de estiramento (“stretching”) ou de deformação, que são perpendiculares às ligações químicas (“bending” pura, “wagging”, “twisting” ou “rocking”) (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Alguns estão exemplificados na Figura 16.

A frequência de absorção depende das frequências naturais da amostra e a sua intensidade depende especificamente da eficiência de absorção, que é representada pela mudança no momento de dipolo elétrico das ligações em função das vibrações da estrutura atômica. Esse movimento pode ser representado pela série de Taylor, representada pela Equação 11 (TAYLOR, 1717):

$$\mu(q) = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dq}\right)_0 q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\mu}{dq^2}\right)_0 q^2 + \dots \quad [11]$$

sendo q a coordenada interna, μ_0 o vetor do momento do dipolo permanente. A derivada, que representa a posição de equilíbrio, deve ser diferente de zero, para que ocorra a interação da radiação com a molécula (SALA, 2008). Não existindo a variação do momento dipolar elétrico, não ocorre absorção da irradiação.

Figura 16 – Classificação vibracional de um grupo metileno



Fonte: Gonsalves *et al* (2005).

A absorção é mais intensa quanto maior for a diferença entre o momento dipolar elétrico dos estados fundamental e excitado (WARTEWIG, 2003). Um modelo clássico, embora simples, para uma analogia da interação entre radiação e matéria, envolve uma molécula diatômica (duas esferas de massa m_1 e m_2). Ambas estariam conectadas por uma mola de constante k , e sujeitas

a uma força de módulo constante. Pela lei de Hooke, da Mecânica, a energia do sistema é representada pela Equação 12 (HOOKE, 1678):

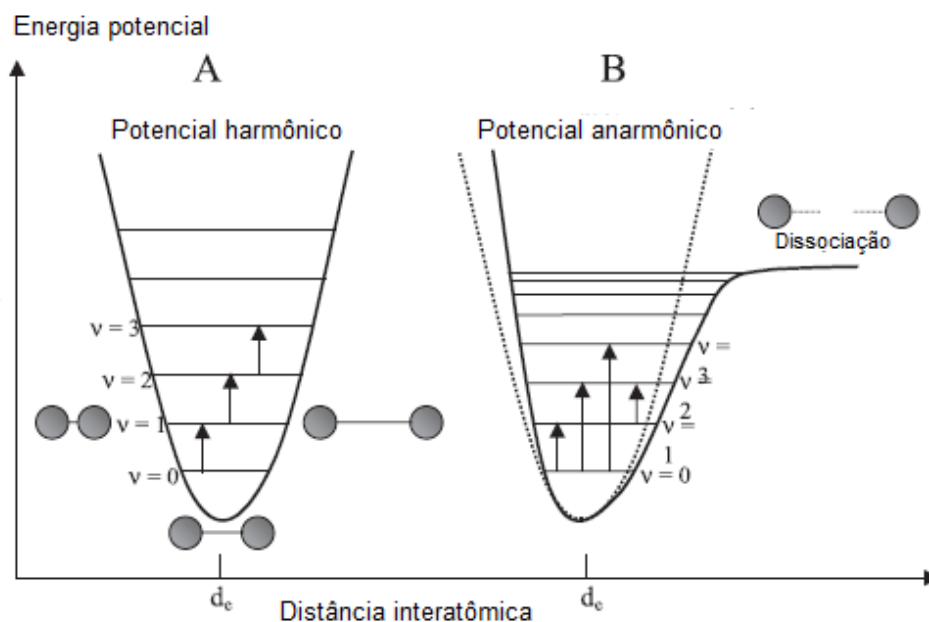
$$E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad [12]$$

sendo μ massa reduzida. A vibração molecular pode ser análoga a um oscilador harmônico, no qual, a energia potencial V , é dada em função do deslocamento x , dos átomos, conforme Equação 13 (PASQUINI, 2003):

$$V = \frac{1}{2} kx^2 \quad [13]$$

A Figura 17 ilustra como seria o comportamento dessa energia potencial em função do deslocamento dos átomos, das posições de equilíbrio, se fosse um sistema de energia contínua. A parábola do potencial é uma aproximação da situação ideal de vibração. As setas designam transições de absorção, setas invertidas indicariam transições de emissão (PASQUINI, 2003).

Figura 17 – Representação de um sistema de energia contínua, harmônica (A) e anarmônica (B). Potencial de uma molécula diatômica.



Fonte: Pasquini (2003).

A transação fundamental ocorre do estado fundamental ($v = 0$) para o excitado ($v = 1$). Transações que ocorram do estado fundamental, para outros estados excitados ($v = 2$, $v = 3$, etc.), como nos movimentos anarmônicos, são chamadas de *overtones* (WARTEWIG, 2003).

Vale ressaltar que, sistemas moleculares são discretos ou quantizados. Neste caso, sistema discreto ou quantizado, a energia de vibração de uma molécula diatômica, em cada nível vibracional, é descrita conforme Equação 14 (PLANCK, 1901):

$$E_{vib} = h\nu_0 \left(n + \frac{1}{2} \right), \text{ para } n = 0, 1, 2, 3 \dots \quad [14]$$

sendo ν_0 a frequência vibracional do estado fundamental da molécula e n é o número quântico vibracional. Ao considerarmos a série de Taylor para a

energia potencial da vibração em função da deflexão da coordenada interna q teríamos a Equação 15 (AGUIAR, 2016):

$$V(q) = V_0 + \left(\frac{dV}{dq}\right)_0 q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2V}{dq^2}\right)_0 q^2 + \dots \quad [15]$$

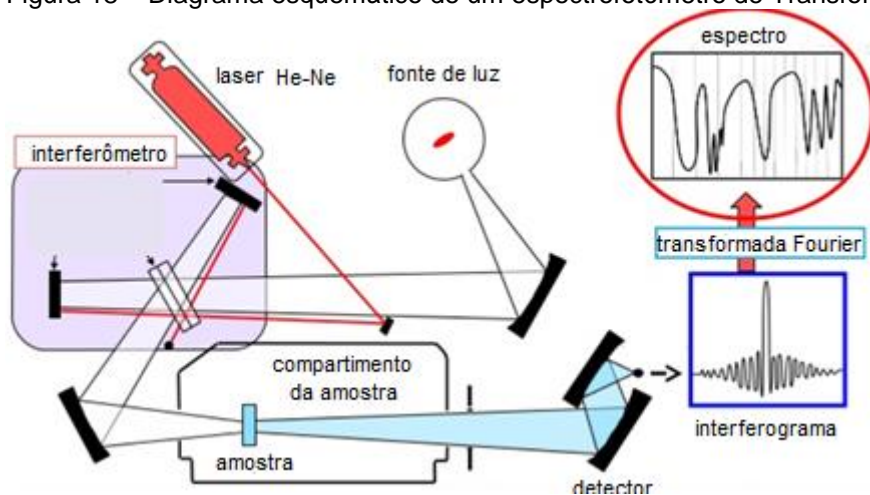
sendo V_0 o termo constante, que pode ser zero dependendo do referencial adotado; a primeira derivada refere-se a um pequeno deslocamento dos átomos; a segunda derivada resulta em uma curva de potencial, do movimento harmônico elétrico, representado por uma parábola conforme a Figura 17 (A). Movimentos anarmônicos, conforme representação em Figura 17 (B), ocorrem quando são consideradas as derivadas seguintes da série de Taylor (...)

(HOLLAS, 2004).

Neste contexto, a técnica de FT-IR permite caracterizar o material por meio das ligações químicas, mas com o conhecimento prévio da composição das amostras, permite quantificar substâncias presentes de forma rápida, reproduzível, confiável, não destrutiva e sem a necessidade do uso de reagentes químicos (CASTILHO *et al.*, 2015).

O princípio interferométrico de funcionamento de um espectrômetro de FT-IR é baseado no interferômetro de Michelson associado ao método da Transformada de Fourier, como exemplificado na Figura 18.

Figura 18 – Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de Transformada de Fourier



Fonte: Perkin, 1986.

Uma fonte de radiação, na região do infravermelho do espectro eletromagnético, emite um feixe de radiação direcionado a um divisor de feixes. Metade dele é refletido, outra parte é transmitido e ambos os feixes são combinados e direcionados para o compartimento da amostra. Então, após interagirem com o material, a radiação transmitida é registrada pelo detector.

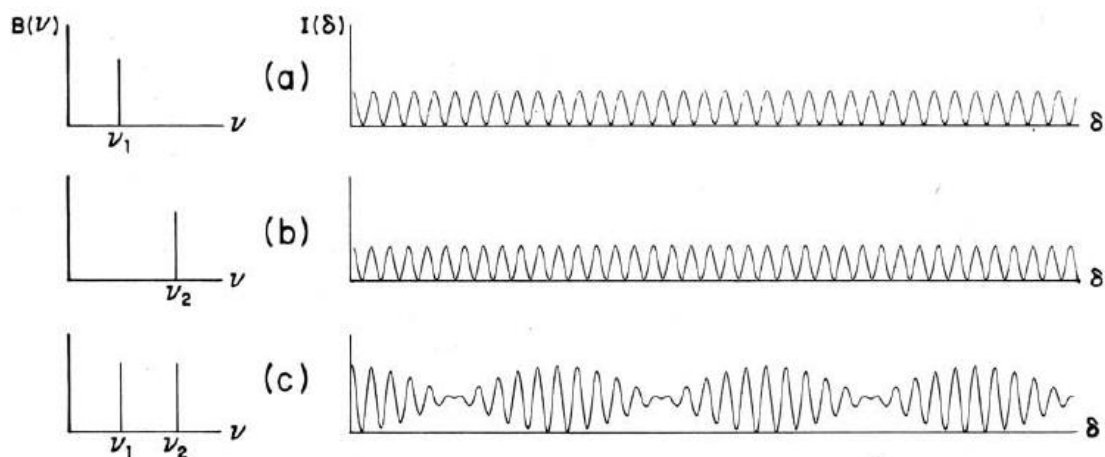
O espelho móvel permite um retardo ótico (δ), que dá origem ao fenômeno de interferência, devido a variação do comprimento do caminho ótico. Consequentemente, ocorrerão variações na intensidade dos sinais de saída, que terão valores máximos e mínimos para interferências construtivas e destrutivas, respectivamente. O sinal registrado no detector forma um interferograma, cuja intensidade pode ser descrita pela Equação 16 (PERKINS, 1986):

$$I(\delta) = B(\nu) \cos\left(2\pi \frac{\delta}{\lambda}\right), \quad [16]$$

sendo $I(\delta)$ a intensidade do sinal do detector em uma função de retardo ótico e $B(\nu)$ é a intensidade ou brilho da fonte em função da frequência.

Para exemplificar, considere uma fonte com apenas duas frequências de emissão, conforme diagrama da Figura 19. Quando as frequências estão em fase acontece uma interferência construtiva, sendo δ um múltiplo inteiro do comprimento de onda ($0, \lambda, 2\lambda, 3\lambda\dots$). Porém, para as ondas fora de fase ($\lambda/2, 3\lambda/2, 5\lambda/2, 7\lambda/2\dots$), as interferências são destrutivas.

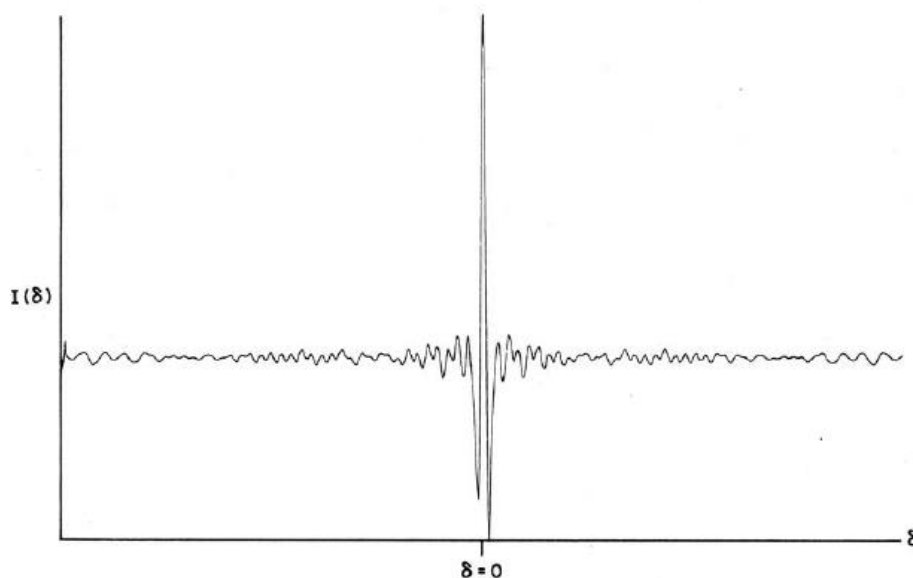
Figura 19 – Interferograma da combinação de duas frequências diferentes.



Fonte: Perkins (1986).

A mesma equação pode ser escrita em termos do número de ondas ν , que é o inverso do λ . No caso aplicado, a fonte de radiação emite fótons de diversos λ , o interferograma soma os sinais, conforme mostrado na Figura 20.

Figura 20 – Interferograma de um sinal típico



Fonte: Perkins (1986)

Neste gráfico podemos observar o sinal intenso para $\delta = 0$, devido as ondas estarem em fase. Todavia, com o aumento do deslocamento, as ondas tendem a ficar fora de fase e o sinal torna-se ruído. Esta intensidade de sinal pode ser representada pela Equação 17 (PERKINS, 1986):

$$I(\delta) = \int_0^{\infty} B(\nu) \cos(2\pi\delta\nu) d\nu. \quad [17]$$

A técnica matemática para a conversão do interferograma para o domínio da frequência utiliza a Equação 18 (PERKINS, 1986):

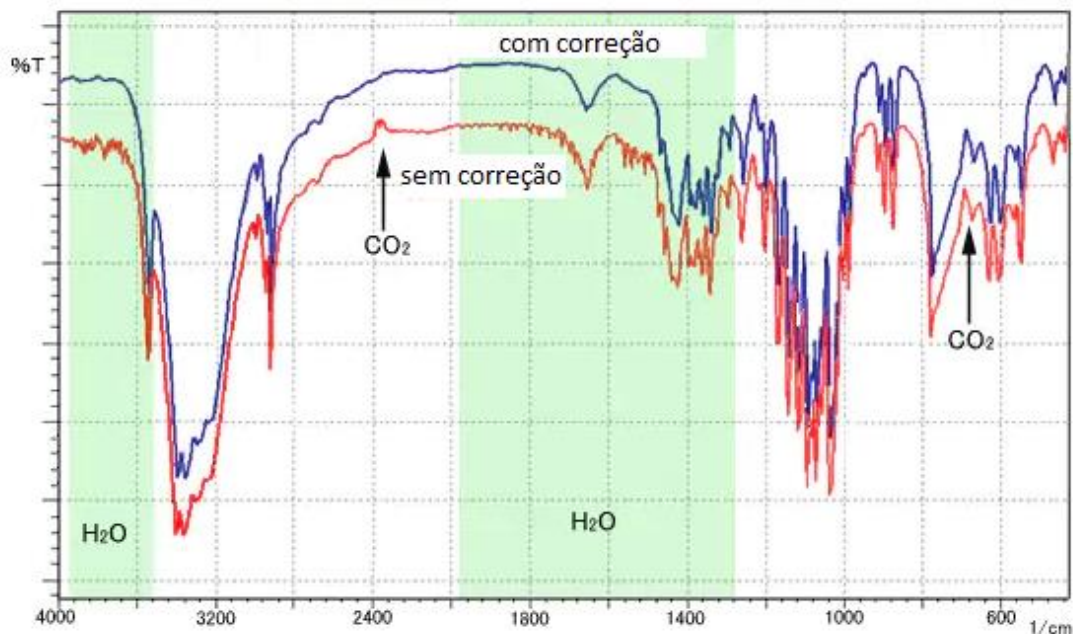
$$B(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d\delta, \quad [18]$$

sendo, $B(\nu)$ a intensidade do espectro em função do número de ondas.

Neste contexto, o interferograma e o espectro estão relacionados pela Transformada de Fourier (FT). Assim, este tipo de espectroscopia no infravermelho, na qual o espectro é obtido por meio da FT de um interferograma é conhecida como Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, ou FT-IR.

Esta técnica é muito sensível à micro atmosfera da sala em que o equipamento está instalado. As variações com vapor de água e dióxido de carbono contribuem para o resultado espectral da amostra. Portanto, é necessário adquirir um espectro cuja amostra representa a própria micro atmosfera da sala (*background*), subtraí-lo do espectro inicial da amostra e assim obter o espectro final. Na Figura 21, observa-se um exemplo do espectro inicial (em vermelho) de uma amostra e o espectro final (em azul), subtraído o *background*.

Figura 21 – Efeito do vapor d'água e dióxido de carbono no espectro de uma amostra.



Fonte: SHIMADZU Excellence in Science

4.3 Espalhamento dinâmico da luz

O método de espalhamento dinâmico da luz (DLS), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons ou fotônica (PCS), permite determinar os coeficientes de difusão e a sua distribuição para soluções coloidais de nanopartículas (PEREIRA, 2014). Sua determinação é possível por meio da análise das variações na intensidade da radiação dispersa e ele permite calcular o raio hidrodinâmico dessas nanopartículas (MILLER *et al.*, 2010). É baseado em uma medição da função de auto correlação para as flutuações da intensidade da luz espalhada (KHLEBTSOV; KHLEBTSOV, 2011).

Assim, a informação dos tamanhos, formas e interações dos difusores (em sistemas diluídos ou concentrados), bem como sua estrutura e dinâmica interna podem ser observadas (NOSKIN, 1983). A dispersão de luz acontece no momento que um feixe de luz interage com partícula com tamanhos menores ou iguais ao comprimento de onda deste feixe. Detectam-se flutuações na intensidade de luz dispersa, graças ao movimento Browniano (FIGUEIRA, 2011) dessas partículas, que depende das suas dimensões, já que as menores possuem maior mobilidade. O coeficiente de difusão das partículas

é obtido pela verificação das flutuações, sendo possível calcular o raio hidrodinâmico pela equação de Stokes-Einstein como mostrado na Equação 19 (HUNTER, 2013):

$$D = \frac{RT}{N_A 6\pi\eta a}$$

[19]

A grandeza D é a constante de difusão, R é a constante dos gases perfeitos, T é a temperatura absoluta da solução, N_A é a constante de Avogadro, η é a viscosidade do meio e a é o raio hidrodinâmico da partícula.

O valor do raio hidrodinâmico, por esse cálculo, é normalmente superior se comparado com outras técnicas como, a microscopia eletrônica de transmissão, de varredura e difração de raios-X. Este fato é devido a camada de solvatação (XU, 2008) que se forma eletrostaticamente ao redor da nanopartícula, aumentando efetivamente o seu raio (DASARY *et al.*, 2010). Por essa técnica, é possível determinar o tamanho das partículas em suspensão de uma forma rápida e confiável em amostras com baixa dispersão de tamanhos, além de depender consideravelmente da estabilidade das soluções coloidais.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

5.1 *Principal Components Analysis*

Os resultados de experimentos envolvem a análise de muitas variáveis e, muitas vezes poucas delas detêm informações relevantes. Os espectros de FT-IR de material biológico são muito similares, muitas vezes as variações não são perceptíveis sem utilizar ferramentas estatísticas e métodos matemáticos que permitam identificar, quantificar e discriminar as bandas neles contidas. Entre eles destaca-se aqui a análise multivariada, incluindo a de componentes principais (PCA, *Principal Components Analysis*) (SANTOS *et al.*, 2012).

A análise por componentes principais (PCA) é uma técnica estatística de muita utilidade com aplicações diversas e é uma técnica comum para encontrar padrões em dados de alta dimensão (SMITH, 2002). Permite, por exemplo, identificar, quantificar e discriminar as bandas contidas em espectros. Utiliza a matemática de transformações lineares, visando minimizar um grande conjunto de dados correlacionados em um pequeno número de dados não correlacionados, denominados de componentes principais (PC) (CAETANO JÚNIOR *et al.*, 2015, MOITA NETO; MOITA, 1998]. Em uma representação gráfica de dois eixos, (PC1) refere-se a maior parte da variação dos dados e (PC2) uma menor variabilidade em relação a (PC1) (JOLLIFFE; CADIMA, 2015). Neste trabalho, a análise permitiu diferenciar os espectros FT-IR de amostras.

Esta técnica possibilita identificar padrões em dados e expressá-los de modo a destacar suas semelhanças e diferenças. Por fim, reduzir o número de dimensões, minimizando perdas de informação. Transforma um conjunto de variáveis correlacionadas em um grupo reduzido de variáveis ortogonais (TURISSINI *et al.*, 2017). O primeiro passo está na escolha dos dados, pode-se partir, por exemplo, de duas dimensões. São calculadas as médias desses valores, conforme Equações 20 e 21 (SMITH, 2002); e, na sequência, calculada uma matriz de covariância. A covariância entre duas variáveis pode ser calculada pela Equação 22 (SMITH, 2002). Matrizes de autovetores unitários e autovalores da covariância também são calculadas.

$$Xm = \frac{\sum_{i=1}^n Xi}{n}, Ym = \frac{\sum_{i=1}^n Yi}{n}. \quad [20] \text{ e } [21]$$

$$cov(X, Y) = \frac{\sum_{i=1}^n (Xi - Xm)(Yi - Ym)}{n-1}.$$

[22]

Estes autovetores são perpendiculares entre si e mostram como os conjuntos de dados estão relacionados, verificando informações de maior ou menor relevância. No caso de se verificar autovalores com valores diferentes e autovetores com valores mais próximos, conclui-se que o autovetor com o maior autovalor é o principal componente do conjunto de dados. A definição de uma matriz de covariância para um grupo de dados de n dimensões pode ser representada pela Equação 23 (SMITH 2002).

$$C_{n \times n} = (c_{i,j}, = cov(Dim_i, Dim_j)).$$

[23]

5.2 Análise de discriminante linear com validação cruzada

Essa análise linear é bastante conhecida com relação à redução de dados. Dentre outras extensões, utiliza-se juntamente com a técnica PCA. Neste algoritmo de dois estágios, um passo intermediário de redução de dimensão usando PCA é aplicado antes do LDA. Algumas notações e descrições utilizadas estão listadas na Tabela 3. A diferença mais significativa entre o LDA tradicional e o 2DLDA (duas dimensões) está na forma de representação de dados. No primeiro utiliza-se a representação vetorizada, no segundo, os dados estão em representação matricial, o que reduz consideravelmente as complexidades de espaço e tempo de uma sobre a outra (YE; JANARDAN; LI 2005).

A análise discriminante deve ser realizada quando a atribuição do método de teste é conhecida para cada amostra, sendo então uma análise

supervisionada. São fornecidas combinações lineares dessas variáveis que maximizam, de certa forma, as informações do grupo nas amostras.

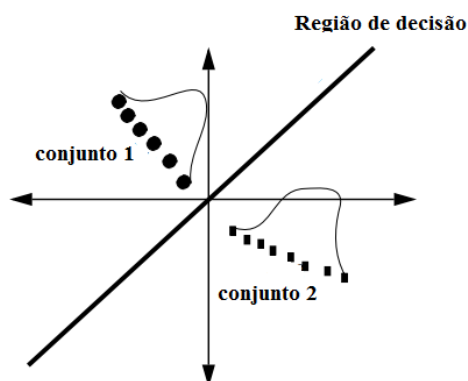
Tabela 3– Algumas notações e descrições utilizadas na LDA

Notação	Descrição
N	nº de imagens no conjunto de dados
K	nº de classes no conjunto de dados
A_i	imagem i em representação matricial
a_i	imagem i em representação vetorizada
R	nº de linhas em A_i
C	nº de colunas em A_i
N	dimensão de a_i ($N = r * c$)
Π_j	classe j no conjunto de dados
L	matriz de transformação (esq) por 2DLDA
R	matriz de transformação (dir) por 2DLDA
I	nº de interações em 2DLDA
B_i	representação reduzida de A_i por 2DLDA
l_1	nº de linhas em B_i
l_2	nº de colunas em B_i

Fonte: Ye, Janardan e Li (2005).

A técnica LDA, modela tanto a variância intraclasse como as Gaussianas multidimensionais. Procura direções no espaço que tem máxima discriminabilidade e são mais adequadas para suportar tarefas de reconhecimento de classe (PRINCE; ELDER 2007). Este método maximiza a proporção entre as variações de classes em qualquer conjunto de dados específicos, garantindo dessa forma uma maior capacidade de separação. A Figura 22 mostra como o processo de transformação linear pode ser visto projetando pontos de dados nos eixos de maximização representados pelos autovetores (BALAKRISHNAMA; GANAPATHIRAJU, 1998).

Figura 22– Representação de dados e a região de decisão no espaço transformado.



Fonte: Balakrishnama; Ganapathiraju (1998).

Para aumentar a confiabilidade da análise LDA, pode-se optar pela validação cruzada (do inglês *Leave One Out*, LOOCV), fornecendo uma estimativa por meio da probabilidade de erro de testes. Considerando a Equação 24 (CAWLEY; TABLOT, 2003):

$$E\{p_{error}^{l-1}\} = EL(x_1, y_1, x_2, y_2, \dots, x_l, y_l)l, \quad [24]$$

onde p_{error}^{l-1} é a probabilidade de erro de teste em uma amostra de tamanho $l - 1$ e $L(x_1, y_1, x_2, y_2, \dots, x_l, y_l)$ mede o número de erros *leave one out* em um conjunto de pares, $\{(x_i, y_i)\}_{i=1}^l$, de tamanho l . (CAWLEY; TALBOT 2003).

O método envolve o fracionamento da amostra em subconjuntos que se complementam e ao mesmo tempo, validando a análise em outro subconjunto. Com o intuito de minimizar a variabilidade, diversas rodadas de validação cruzadas são feitas utilizando diferentes partições, quando cada amostra é retirada/recolocada dos dados para validação do modelo (ZHANG; WANG, 2016).

6 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

6.1 A cultura do *P. brasiliensis* e *P. lutzii*

Os isolados de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb03) e *P. lutzii* (Pb01) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, responsável pelo laboratório de Micologia Médica e Molecular do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP de São Paulo. Estes três isolados representam linhagens filogenéticas de *Paracoccidioides*: PS2, S1 e *lutzii* respectivamente (DESJARDINS *et al.*, 2011). Os três foram selecionados pela *Broad Institute* e pela comunidade de pesquisa do *Paracoccidioides*, para sequenciamento e análise genômica (GONZALEZ; HERNANDEZ, 2016). Esses isolados foram armazenados, em sua fase leveduriforme, em meio YPD sólido a 4°C. A obtenção de células para a realização dos ensaios de FT-IR ocorreu por meio da adição de uma alçada de células leveduriformes armazenadas, de cada um dos isolados independentemente, a 20 mL de meio SD líquido (0,17% base nitrogenada de levedura, 2% glicose, 0,5% casaminoácidos, 0,5% sulfato de amônio, pH 4,5) e incubação, sob agitação (80 rpm), por 5 dias à 37°C.

6.2 Preparação das amostras

Leveduras de todos os isolados foram coletadas após centrifugação à 4000 rpm por 1 min, 25°C, formando “pellets”. Os sobrenadantes foram retirados e os tubos completados com água ultrapura deionizada até um volume total de 1 mL, para cada amostra. Após este processo ser repetido três vezes, os “pellets” foram fixados com 60% de isopropanol (250 µL), centrifugados à 6000 rpm por 1 min, 4°C e deixados para secar em fluxo laminar vertical por mais 24 h. Então, as amostras foram diluídas em 200 µL água ultrapura. Foram colocados 10 µL em cada janela e na sequência colocadas no vácuo por 30 min.

6.3 Espectroscopia e FT-IR

Os espectros de FT-IR foram registrados na região do infravermelho médio, 700 a 4000 cm^{-1} , com resolução espacial de 6,25 μm , com resolução espectral de 4 cm^{-1} , pelo equipamento *Spectrum 400* acoplado ao microscópio *Spotlight* da empresa *Perkin Elmer*. Um *background* de 60 varreduras foi adquirido por amostra. O *background* foi automaticamente subtraído dos espectros das amostras pelo *software*. Um total de dez espectros foram adquiridos por amostra. O experimento foi feito em triplicata, resultando em 30 espectros, em média, por grupo. As amostras foram colocadas em janelas de fluoreto de cálcio, por possuírem propriedades de transmissão ótica. Não foi utilizado atenuador ATR.

6.4 Análise dos dados

Considerando os espectros médios e desvios padrão, todos foram corrigidos para a linha de base subtraindo por meio de uma equação polinomial de quinto grau, seguida de normalização vetorial no *LabSpec 5*. Os espectros da diferença das espécies mostram a comparação dos espectros médios entre os grupos estudados, adicionando os valores de p ; valor numérico que variou entre 0 e 1, que indica o quanto são semelhantes (mais próximo de 1) ou apresentam diferenças (mais próximo de 0). A análise das componentes lineares (PCA), a análise de discriminante linear (LDA) e o método de validação cruzada (LOOCV) foram calculados por meio do programa *MATLAB 2011*, após a primeira derivada, interpolação na faixa espectral de 1200 a 1438 cm^{-1} e normalização do vetorial. A deconvolução por ajuste Gaussiano e os cálculos das áreas foram calculados no programa *OriginPro 8.5*, baseados nas bandas visualizadas na segunda derivada dos espectros médios.

6.5 Testes colorimétricos

6.5.1 Síntese das nanopartículas de ouro

Baseou-se na metodologia de Lee e Meisel com algumas pequenas modificações (LEE; MEISEL, 1982). Todos os reagentes foram adquiridos da *Sigma Aldrich*. Inicialmente, uma diluição de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) foi

feita em água ultrapura (18,2 MΩcm) para uma concentração final de 0,04%. Esta solução foi aquecida até 98°C com agitação rotacional constante. Ao estabilizar nessa temperatura, solução de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) a 1% foi acrescentada. Foram mantidas as condições, por uma hora. A solução coloidal foi conservada à temperatura de 4°C.

Um volume 2 µL da solução coloidal de AuNPs foi caracterizado pela espectroscopia UV-Visível (*DeNovix DS-11, USA*), o espectro foi coletado na região espectral de 190 nm a 840 nm, com resolução de 1 nm e caminho ótico de 1 mm.

A análise de DLS da solução coloidal de AuNPs foi realizada utilizando-se a cubeta de poliestireno 67758, *Sarstedt*, no equipamento *Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK)*. O diâmetro hidrodinâmico foi calculado considerando-se 200 µL da amostra a 21°C. A análise do potencial Zeta foi realizada em eletrodos capilares DTS 1070 da *Malvern Instruments*. A solução foi injetada, com a utilização de seringas, dentro dos eletrodos evitando-se a formação de bolhas. As medições foram feitas em triplicatas a uma temperatura de 21°C.

6.5.2 Extração e amplificação do DNA do *Paraccocidioides sp*

Para extração de DNA, as culturas foram processadas pelo método descrito por Avila-Campos *et al.*, (1994). Aproximadamente 10 mL de células úmidas do fungo foram lisadas mecanicamente por maceração em gral, na presença de nitrogênio líquido, até a formação de um pó. Este foi ressuspenso em 25 mL de uma solução 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA, 5% de sarcosil e proteinase K. Então, a solução foi homogeneizada cuidadosamente por 10 min, incubada por 2 h a 56°C e centrifugada. O DNA do sobrenadante foi purificado com pelo menos duas extrações de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção 50:49:1).

O levantamento dos diferentes isolados da espécie *P. lutzii* para o gene *gp43*, foram alinhados por meio do programa *MultAlin's* para determinar a região de amplificação. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que foram utilizados para a reação de amplificação do gene *gp43* específico para a detecção molecular do *P. lutzii* foram desenhados por meio do banco de dados

do *National Center for Biotechnology Information*. O fragmento amplificado trata-se de uma região conservadora presente nos diferentes isolados do *P. lutzii*, descrito pelos *primers* “forward” 5’ ACC AAG TCT TCG ATG AT 3’ e “reverse” 5’ TAG ACC TCG CAC A 3’. Entre as duas sequências, selecionamos também uma “sonda” descrita por 5’ CAG GGG TGC G 3’, para a realização dos testes.

A Reação em Cadeia da Polimerase utilizou 4 µL de DNA total extraído do fungo, 200 ng/mL, 45 µL de PCR *Supermix* (*Invitrogen*TM), 2 µL de cada *primer*, 10 mmol L⁻¹, específicos da sequência do *gp43*. O ciclo térmico foi realizado num termocilador *Biocycler* (MJ96G). Os resultados foram avaliados por um espectrofotômetro e gel de agarose a 1,5%. Neste processo, 4 µL da amostra do fragmento amplificado foi homogeneizada com 1 µL de *Blue Juice* (*Invitrogen*TM). A visualização do DNA amplificado foi feita por meio da fotodocumentadora *Bio-Imaging Systems Visible and Ultraviolet*. As amostras resultantes foram quantificadas para determinação da concentração dos produtos de amplificação obtidos, utilizando-se 1,5 µL da amostra, após processo de purificação.

6.5.3 Testes colorimétricos

Os testes foram preparados misturando-se 5 µL de solução coloidal de nanopartículas de ouro 4x10⁻⁹ mol L⁻¹, 2 µL de fragmento amplificado da sequência “sonda”, 10 µmol L⁻¹. Para o teste positivo, 2 µL de fragmento complementar. Para o teste negativo, 2 µL de fragmento não complementar. Os testes foram submetidos a um ciclo de temperaturas: 95°C por 5 min, 50°C por 10 min e 25°C por 10 seg (*Biocycler MJ96G, Biosystems*). Após este ciclo adicionou-se 1 µL de solução aquosa de MgCl₂ a 2,6 mmol L⁻¹. O tempo médio de observação das reações após a adição da solução salina, foi de 8 min.

Os resultados dos testes foram analisados por meio do espectro UV-Visível, permitindo desenvolver um método gráfico de análise por áreas abaixo das curvas espectrais, como também pela curva ROC, por meio do *OriginPro*TM (versão 8.6).

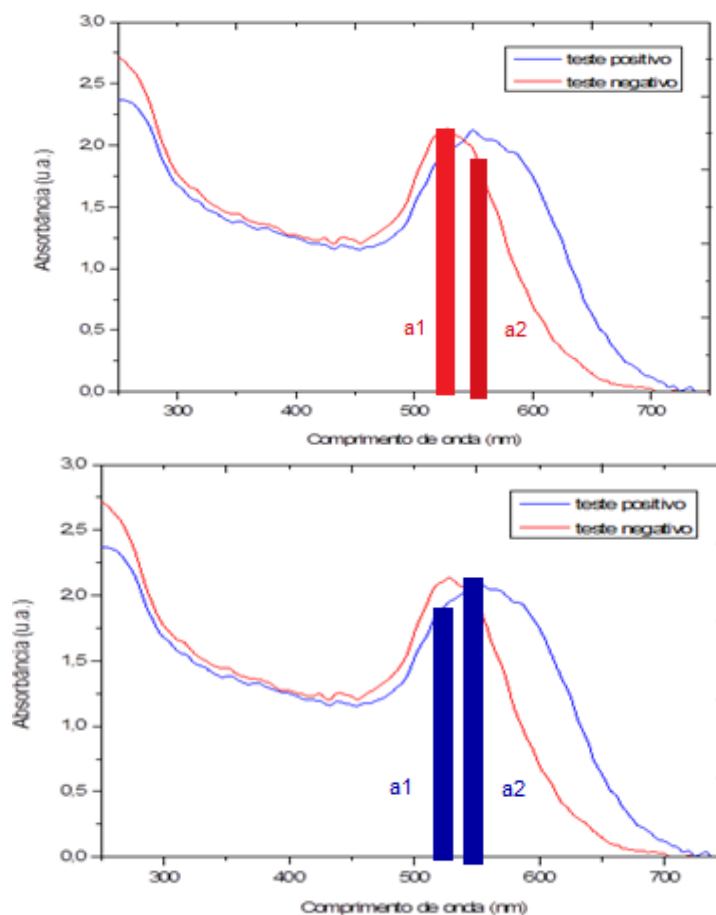
6.5.4 Análise logarítmica, curvas Gaussianas e curva ROC

Cinquenta pares de testes foram realizados. Por espectroscopia no UV-Visível, espectros de absorção foram obtidos para cada teste, individualmente. A análise da qualidade dos testes positivos/negativos e dos espectros, em ambos os casos, pôde ser verificada, primeiramente, por uma técnica matemática utilizando cálculos logaritmos de áreas. Nesta análise os testes positivos e negativos foram classificados por meio da Equação 25 (COMPARATO FILHO, 2017).

$$\ln \left(\frac{a_1}{a_2} \right) \quad [25]$$

sendo a1 e a2 os valores calculados de áreas, por meio da integração, de duas regiões espectrais. Os intervalos de integração das áreas foram definidos entre as bandas 488-530 nm (a1) e 533-575 nm (a2), respectivamente. A Figura 23 exemplifica áreas definidas (a1 e a2) para os testes negativos (espectro em vermelho) e para os testes positivos (espectro em azul).

Figura 23– Exemplos de aproximação de áreas escolhidas abaixo das curvas de um teste negativo e de um teste positivo.



Fonte: Laboratório de Nanossensores – IP&D.

Calculando-se as áreas, para um teste negativo e para um teste positivo, separadamente; se a_1 for igual a a_2 , a razão entre a_1 e a_2 seria igual a 1, o que significa que o cálculo do logaritmo dessa razão seria igual a zero ($\ln 1 = 0$). Se a_1 for maior que a_2 , a razão teria valor superior a 1, conseqüentemente o logaritmo natural desta razão seria positivo. Entretanto, se a_1 for menor que a_2 , a razão teria resultado menor que 1, portanto o $\ln (a_1/a_2)$ seria negativo.

O ajuste das curvas Gaussianas foi feito na região da SPR do espectro de absorção no UV-Visível, dos testes positivos e negativos, entre 490 e 660 nm.

A curva ROC foi obtida pela média dos espectros de absorção.

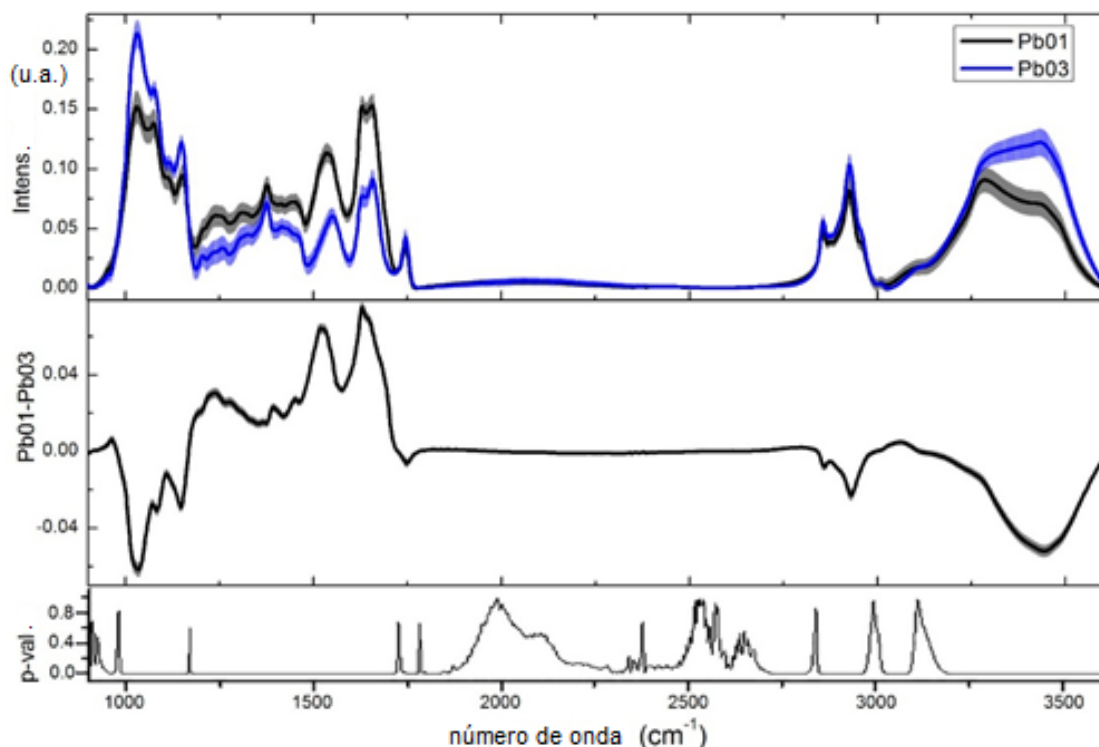
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Comparação entre as espécies

As Figuras 24 – 26 mostram uma comparação entre os espectros médios (linhas) das amostras, desvio padrão em forma de sobreposição (áreas sombreadas). Para uma melhor observação de diferenças comparativas nos espectros, foi feita a diferença espectral em cada banda, associada a comparações feitas por meio dos valores de p , destacando-se as regiões estatisticamente importantes.

Na Figura 24, Pb01 – Pb03, verificam-se valores negativos nas bandas: 1032 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} e 2922 cm^{-1} , associadas principalmente a contribuição de estruturas de DNA e lipídios; e valores positivos para as bandas em 1536 cm^{-1} , 1628 cm^{-1} e 1656 cm^{-1} , associadas principalmente aos modos vibracionais de proteínas. Nesta primeira abordagem, observou-se devido a diferença entre os espectros, mais lipídios/DNA e menos proteínas no Pb03 comparado ao Pb01.

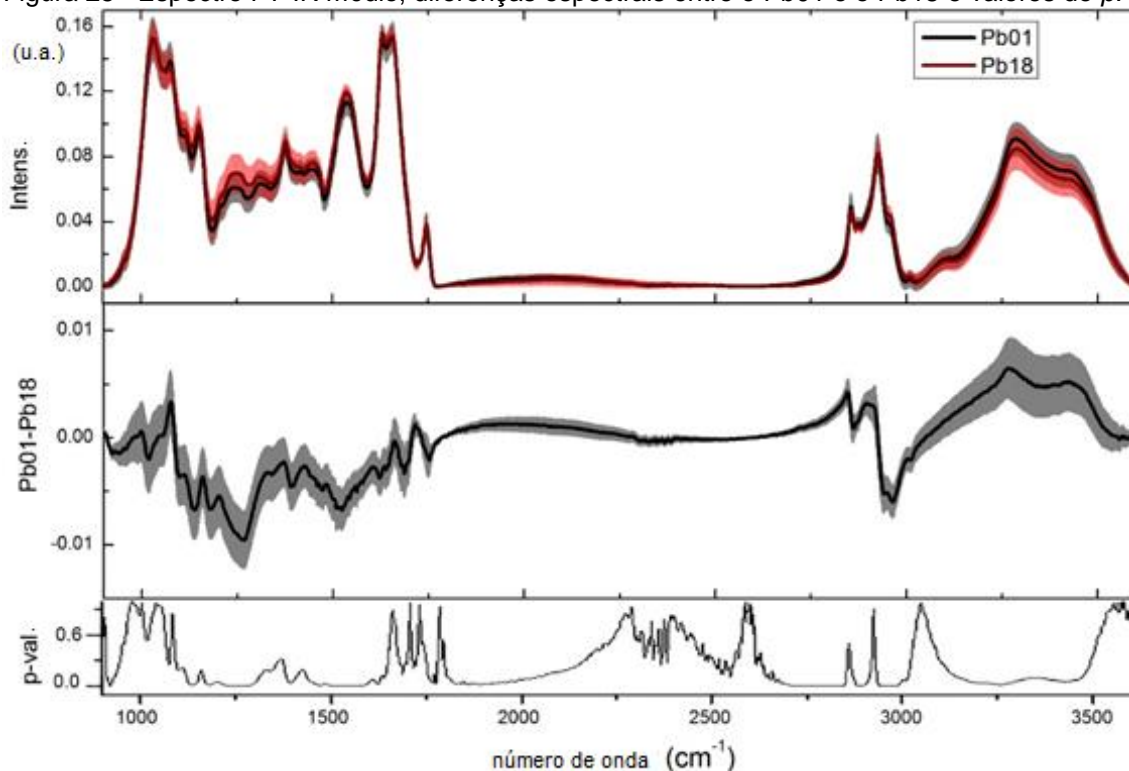
Figura 24– Espectro médio, diferenças espectrais entre Pb01, Pb03 e valores de p .



Fonte: Comparato Filho *et al.* (2019).

Na Figura 25, Pb01 – Pb18, verificam-se valores negativos nas bandas atribuídas a proteínas em 1234 cm^{-1} e 1256 cm^{-1} e lipídios em 2956 cm^{-1} . Esta diferença revela menos proteínas, mais lipídios e DNA no Pb01 quando comparado ao Pb18. Outra observação importante é que as amplitudes da diferença espectral são menores quando comparado ao Pb01 – Pb03 (Figura 24), sugerindo maior similaridade de composição entre os grupos.

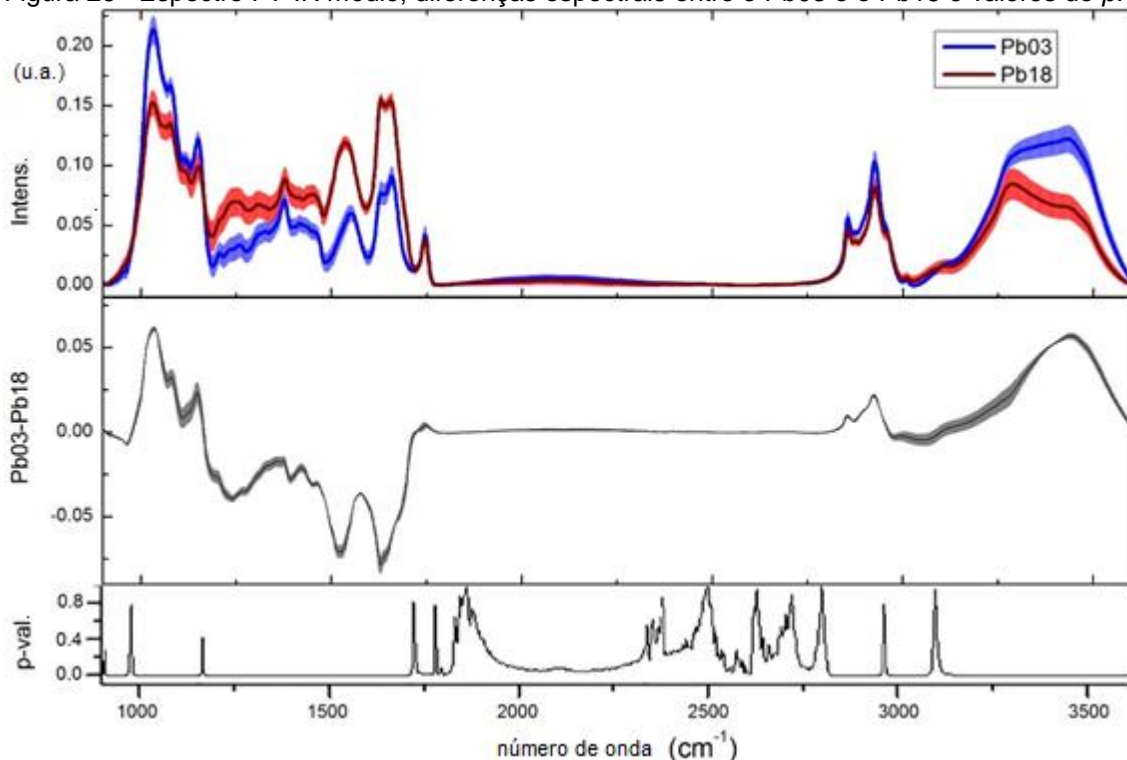
Figura 25– Espectro FT-IR médio, diferenças espectrais entre o Pb01 e o Pb18 e valores de p .



Fonte: Comparato Filho *et al.* (2019).

Na Figura 26, Pb03 – Pb18, utilizando a mesma metodologia verifica-se que a diferença entre os dois grupos é a maior (de aproximadamente -0,05 a 0,05), quando as contribuições dos modos vibracionais relevam menor similaridade de composição entre os grupos e menos proteínas, mais lipídios e DNA no Pb03 quando comparado ao Pb18.

Figura 26– Espectro FT-IR médio, diferenças espectrais entre o Pb03 e o Pb18 e valores de p .



Fonte: Comparato Filho *et al.* (2019).

Conforme descrito no item 3.2 e ilustrado na Figura 4 deste trabalho, a composição da parede celular praticamente se mantém, de micélio para levedura ou do *P. brasiliensis* para o *P. lutzii*. Em células de levedura, encontram-se proteínas por categorias de transporte celular, defesa e virulência. Em micélio, proteínas envolvidas com metabolismo de carboidratos ancoradas em GPI (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Os materiais analisados foram obtidos de leveduras. Na região entre 900 e 1700 cm^{-1} há diferenças nos espectros. Parte delas, características de modos vibracionais de glucanas. As bandas de 960 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} e 1038 cm^{-1} e as bandas observados centrados em 928 cm^{-1} e 1028 cm^{-1} podem indicar a presença de 1,3- β -glucano e 1,3- α -glucano (RUDALL; KENCHINGTON, 1973]. Bandas em 2904 cm^{-1} , 3199 cm^{-1} e 3355 cm^{-1} podem ser atribuídos à quitina, em 1549 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} à β -quitina (FIRON *et al.*, 2004).

Em trabalho de 1970, Kanetsuna e Carbonell (1970) consideram que glucanas desempenham um papel importante no termo dimorfismo das duas espécies e que as formas micélio e levedura são determinadas pelas diferenças de suas propriedades físicas e químicas. Acrescentam que quitinas

apenas mantêm as formas produzidas. Em publicação de 1972, (KANETSUNA *et al.*, 1972) propõem que a parede celular, na forma de levedura, contém α -1,3-glucano na camada externa, o que caracteriza o formato circular, quitina na camada interna e pequenas quantidades de β -glucano, proteínas e lipídios. Há um processo de perda de rigidez, na estrutura da parede, ao redor do β -glucano e a mudança no formato da parede. O formato alongado do β -1,3-glucano caracteriza o formato micélio.

A análise dos espectros indica diferença bioquímica. Contudo, é restrita pois foi considerada a comparação entre as médias espectrais. A maioria das bandas verificadas nos espectros médios podem ser atribuídos a vibrações de proteínas nas bandas em 1032, 1150, 1204, 1234, 1256, 1310, 1450, 1536, 1628 e 1656 cm^{-1} ; a lipídios nas bandas em 1744, 2852, 2922, 2956 cm^{-1} ; a material nuclear nas bandas em 1076 e 1116 cm^{-1} , estiramentos OH e água nas bandas em 3290 e 3432 cm^{-1} (MOVASAGHI *et al.*, 2008). A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos e os principais grupos funcionais em função do número de onda.

Tabela 4 – Relações espectrais

Número de onda	Grupos funcionais
1032	ν (CC) formação estrutural, ν (CH ₂ OH), ν (CO) estiramento, colágeno [Fagundes <i>et al.</i> , 2014; Schulz; Baranska, 2007; Barth, 2007]
1076	Conformação estrutural (CC) do DNA [Huleihel <i>et al.</i> , 2002]
1116	C – O vibração de estiramento do grupo C – OH da ribose (RNA) [Lin <i>et al.</i> , 2019; Fabian <i>et al.</i> , 1995]
1150	Deformação do CH ₈ [Schulz; Baranska, 2007; Naumann, 2000]
1204	Modos vibracionais de proteínas colágeno – amida III [Eckel <i>et al.</i> , 2001]
1234	Amida III [Chiriboga <i>et al.</i> , 1998; Maquelin <i>et al.</i> , 2002]

1256	PO ₂ assimétrico (fosfato I) [Caetano Júnior et al., 2015; Dovbeshko et al., 1997]
1310	Amida III [Richter et al., 2002; Barth, 2007; Naumann, 2000]
1450	CH ₃ , flexão assimétrica de proteína grupo metil [Caetano Júnior et al., 2015; Fujioka et al., 2004; Wang et al., 2010]
1536	Estiramento C = N, C = C [Dovbeshko et al., 1997]
1628	Amida I [Lin et al., 2019; Caetano Júnior et al., 2015; Wood et al., 1998]
1656	Amida I [Lin et al., 2019; Caetano Júnior et al., 2015; Richter et al., 2002]
1744	C = O modo do estiramento de lipídios [Lin et al., 2019; Sukuta; Brunch, 1999]
2852	Estiramento simétrico de CH ₂ de cadeias de acila (lipídios) [Lin et al., 2019; Fabian et al., 1995; Maquelin et al., 2002]
2922	Estiramento assimétrico de CH ₂ de cadeias de acila (lipídios) [Fagundes et al., 2014; Fabian et al., 1995; Maquelin et al., 2002]
2956	Estiramento assimétrico de CH ₃ de cadeias de acila (lipídios) [Fagundes et al., 2014; Fabian et al., 1995; Naumann, 2000; Saravia et al., 1989]
3290	Estiramento simétrico de O – H [Schulz; Baranska, 2007]
3432	Estiramento assimétrico de O – H [Dovbeshko et al., 1997; Colthup et al., 1997; Beekes et al., 2007]

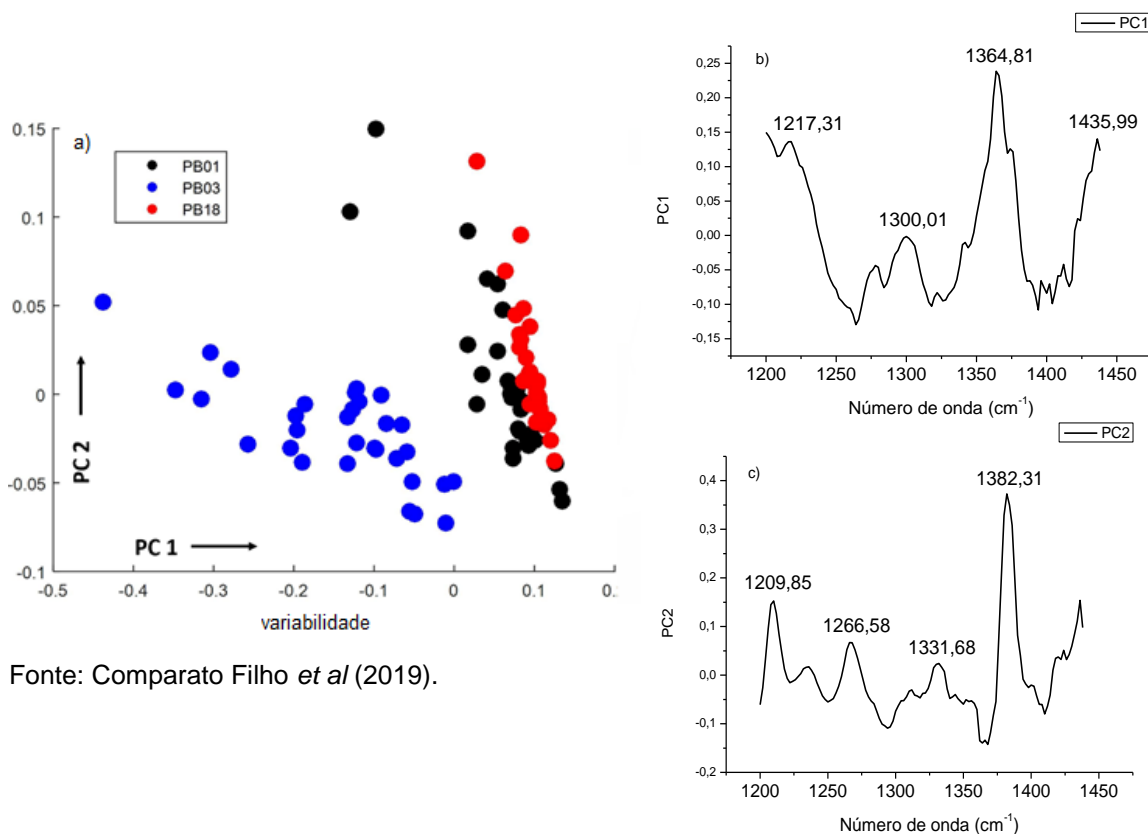
Fonte: Comparato Filho *et al* (2019).

Diferentes espécies do *Paracoccidioides* podem secretar quantitativamente diferentes proteínas, que podem influenciar nas características de virulência e processos relacionados com o hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

7.2 Análise das componentes principais dos espectros FT-IR

Embora as análises das diferenças espectrais permitam construir algumas hipóteses de diferenças bioquímicas entre as espécies, o desvio padrão associado não permite afirmar com certeza as melhores regiões de separação. Para elucidar esta questão, as análises das componentes principais foram calculadas. Na Figura 27, o PCA identifica diferenças nos espectros independentemente do grupo, pois esta análise não é supervisionada, ou seja, considera as cores que representam os grupos (preto, azul ou vermelho) e caso eles sejam estatisticamente diferentes, cada grupo deverá formar um conjunto de mesma cor.

Figura 27– Gráfico de dispersão: a) variabilidade, b) PC1 e c) PC2.



Fonte: Comparato Filho *et al* (2019).

Neste caso, as amostras possuem uma composição diferente que permite classificá-las, a melhor região entre os grupos está representada entre as bandas 1200 e 1438 cm^{-1} . PC2 destaca os valores nas bandas atribuídas a

fosfato em 1210 cm^{-1} e 1267 cm^{-1} , a proteínas 1332 cm^{-1} e a ácidos nucleicos em 1382 cm^{-1} . PC1 destaca as bandas atribuídas a fosfato em 1217 , a proteínas ou ácidos nucleicos em 1300 cm^{-1} e 1365 cm^{-1} e, a lipídios em 1436 cm^{-1} .

Uma análise complementar envolveu o LDA usando PCs. Uma técnica, na qual, como entrada de dados, usamos informações do grupo, ou seja, supervisionada. Os resultados são apresentados na forma de uma matriz que mostra qual espectro pertence a cada grupo (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados do LOOCV

LOOCV do PC-LDA	Pb01	Pb03	Pb18
<i>Pb01</i>	27 (96%)	0	1
<i>Pb03</i>	0	31 (100%)	0
<i>Pb18</i>	0	0	30 (100%)

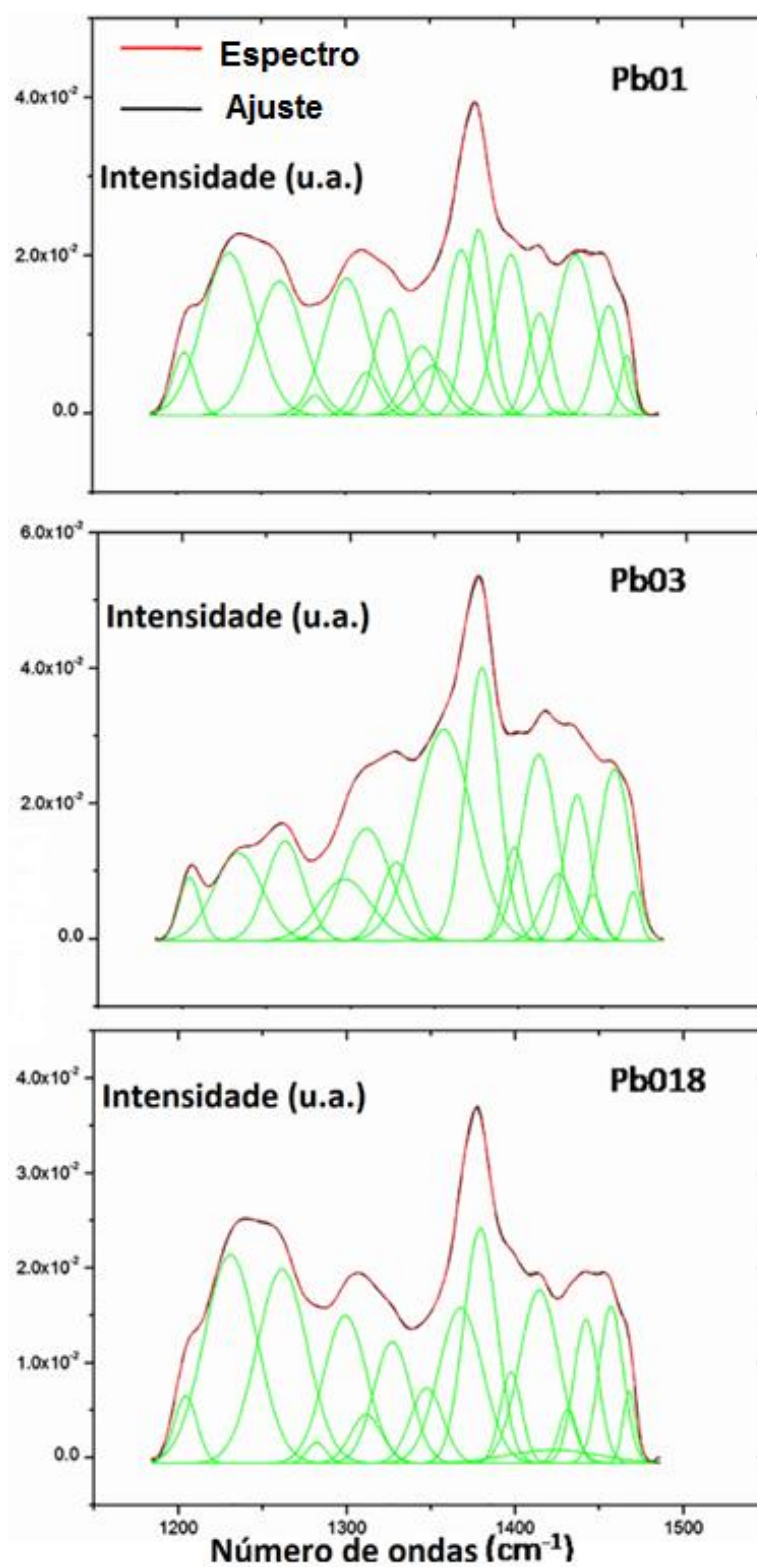
Fonte: Comparato Filho *et al.* (2019).

O resultado do PC-LDA mostrou que os espectros de cada grupo foram classificados corretamente em seus próprios grupos: 27 de 28 Pb01, 31 de 31 Pb03 e 30 de 30 Pb18, sendo importante acrescentar que estes resultados foram validados pela LOOCV.

7.3 Deconvolução de bandas

O melhor intervalo para esta informação bioquímica, conforme citado anteriormente, ocorreu entre 1200 e 1438 cm^{-1} . Para uma análise final foram feitas deconvoluções das bandas dessas regiões, ajustadas por Gaussianas e cálculo de áreas abaixo das curvas (Figura 28). Os resultados revelaram bandas espectrais comuns entre as espécies, embora tenham mostrado diferenças nos cálculos das áreas e bandas específicas para cada uma delas. Diferenças entre as Gaussianas indicam variações nas composições bioquímicas das espécies. Tais diferenças representam as variações de compostos químicos das membranas dos fungos. Essas observações implicam em melhores compreensões dos modos vibracionais dos grupos funcionais envolvidos (AGUIAR, 2016).

Figura 28– Deconvolução dos espectros por ajuste de curvas Gaussianas



Fonte: Comparato Filho *et al* (2019).

Um espectro de uma análise de FT-IR é uma sobreposição de contribuições de várias vibrações moleculares. A deconvolução é um método de separação dessas contribuições individuais, ajustando as curvas Gaussianas a cada banda. A informação relativa ao número de bandas presentes, e quantas curvas Gaussianas se ajustam, pode ser obtida a partir da segunda derivada espectral. Depois que as curvas estão ajustadas, a área pode ser calculada. Uma vez que essas áreas representam a composição bioquímica da amostra, podem ser comparadas e assim, fornecem mais informações sobre as diferenças bioquímicas. Os resultados das principais diferenças entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* são atribuídas aos modos vibracionais de proteínas e polissacarídeos, conforme apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Área percentual sob a curva para bandas específicas, juntamente com as atribuições derivadas após a deconvolução e ajuste da curva de Gauss

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	% de Área		
		<i>Pb01</i>	<i>Pb03</i>	<i>Pb18</i>
	Espécie/variação do fungo			
1204	Colágeno	2,4	2,1	2,2
1230-1233	Proteína/ácido nucleico	14,3	6,8	15,3
1260-1261	Fosfato	10,7	6,0	13,7
1281-1282	Colágeno	0,6	0,3	0,5
1296-1300	Citosina	10,0	5,1	8,9
1309-1312	Proteína amida III	1,8	8,5	2,1
1326-1327	Timina, adenina	5,4	4,1	6,3
1345-1347		3,9		3,4
1352-1355		3,2	19,1	
1367-1368	Polissacarídeos	9,3		9,6
1378-1379	Ácidos nucleicos	8,3	14,1	10,8
1397-1398	Proteínas	8,7	3,1	2,7
1412-1415	Estiramento C – O, Deformação C – H, Deformação N – H	4,2	10,5	9,6
1422-1426	Polissacarídeos	0,1	3,2	1,7
1431-1436	Lipídios, deformação C-H	11,1	6,1	1,4

Fonte: Comparato Filho *et al* (2019).

Diferenças mais significativas entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* correspondem aos modos vibracionais de proteínas e polissacarídeos. Nesta tabela podemos realçar alguns resultados, como os modos vibracionais de proteínas entre 1397 – 1398 cm⁻¹ sendo bem maior para *P. lutzii*, um aumento médio na área da Gaussiana, centrada nessa banda, de 200%. A banda de estiramento C – O, deformação C – H e deformação N – H, que apresentou uma redução média no cálculo de área de 140%, pode ser atribuída a proteínas

ou ácidos nucleicos. A banda de polissacarídeos entre 1422 – 1426 cm^{-1} é ainda menor no *P. lutzii*, apresentando uma redução de 3100% com relação ao Pb03 e 1600% com relação ao Pb18.

Diferenças nas bandas de absorção de polissacarídeos podem estar relacionadas com modificações na superfície das membranas. Contribuem para o aumento ou diminuição na quantidade de glicosil fosfatidil inositol (GPI), o que modifica a bioquímica da membrana para a distinção de uma espécie. Essas alterações, inclusive estruturais, das moléculas de GPI, podem facilitar ligações com glicoconjugados, formando uma camada espessa de proteção.

Dentro do grupo do *P. brasiliensis*, existem diferenças vibracionais em proteínas, fosfato e citosina. Pb18 e Pb01 assemelham-se nas vibrações de polissacarídeos entre 1367 – 1368 cm^{-1} e de colágenos entre 1281 – 1282 cm^{-1} , enquanto Pb03 é mais similar ao Pb01 do que o Pb18 é similar ao Pb01, quando consideramos regiões vibracionais de timina e adenina entre 1326 – 1327 cm^{-1} .

Destacam-se alguns resultados semelhantes do Pb01 e Pb18, embora sejam espécies diferentes. Outros destaques, curiosamente, são os resultados de áreas diferentes entre os dois isolados do *P. brasiliensis*. Destacam-se também as principais diferenças encontradas na deconvolução das bandas, entre os três isolados envolvidos nas análises.

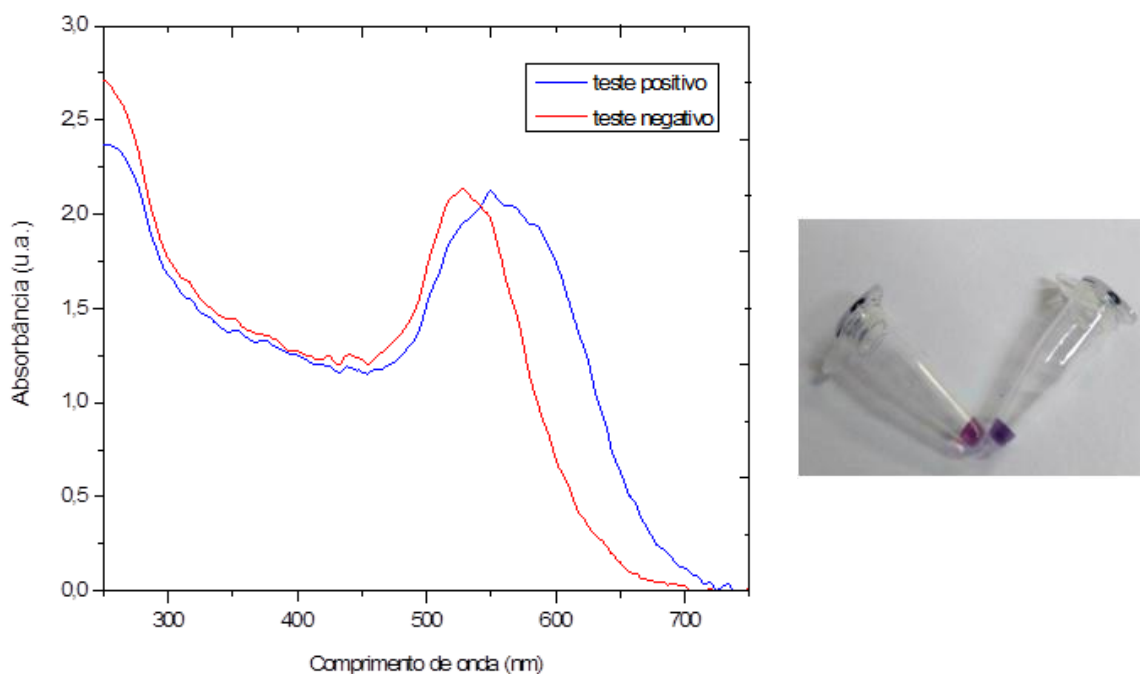
Este tipo de estudo entre as espécies destacadas ainda não havia sido feito, apenas estudos proteômicos e genômicos (FEITOSA *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007). A espectroscopia de massa, que também pode fornecer informações moleculares, para este tipo de análise não é tão vantajosa se considerarmos a preparação das amostras, o tempo do processo e o risco de decomposição das mesmas por aquecimento elevado (RABE *et al.*, 2018].

Estudos futuros convergem para a identificação, deste tipo de patógeno, através de amostras de sangue. Isto fornecerá a base para o desenvolvimento de testes de diagnóstico. Material sanguíneo, se comparado com tecidos, não sofre variação de espessura e pode fornecer informações sobre o corpo inteiro, sem necessidade de isolar o tecido afetado. No entanto, ainda não estão descartadas mais pesquisas para que FT-IR com fluido sanguíneo seja clinicamente aceitável (HUGHES *et al.*, 2014).

7.4 Análise estatística dos testes colorimétricos *label-free*

A Figura 29 apresenta os resultados de espectros no UV-Visível de um par de testes, positivo (em azul) e negativo (em vermelho), assim como os resultados colorimétricos de ambos os testes, que podem ser visivelmente identificados e diferenciados.

Figura 29– Espectros de absorção e soluções colorimétricas de um dos pares dos testes realizados.



Fonte: Laboratório de nanossensores – IP&D

Esta mudança visível na cor de uma solução resultante de um teste de diagnóstico é causada pela aglomeração de nanopartículas de ouro e consequência do encontro de sensores biológicos com sequências de DNA alvo. Neste caso, isto significa que houve uma identificação molecular do fungo causador da paracoccidioidomicose. Em termos práticos, significa um diagnóstico positivo para a infecção, obtido com o material biológico analisado do paciente. Esta percepção óptica é o resultado da ressonância plasmônica de superfície, influenciada pelo espaçamento, tamanho, organização e oscilação

dessas partículas. Formas de diagnóstico como esta, apresentam vantagens como praticidade, redução de custos, melhor sensibilidade e especificidade.

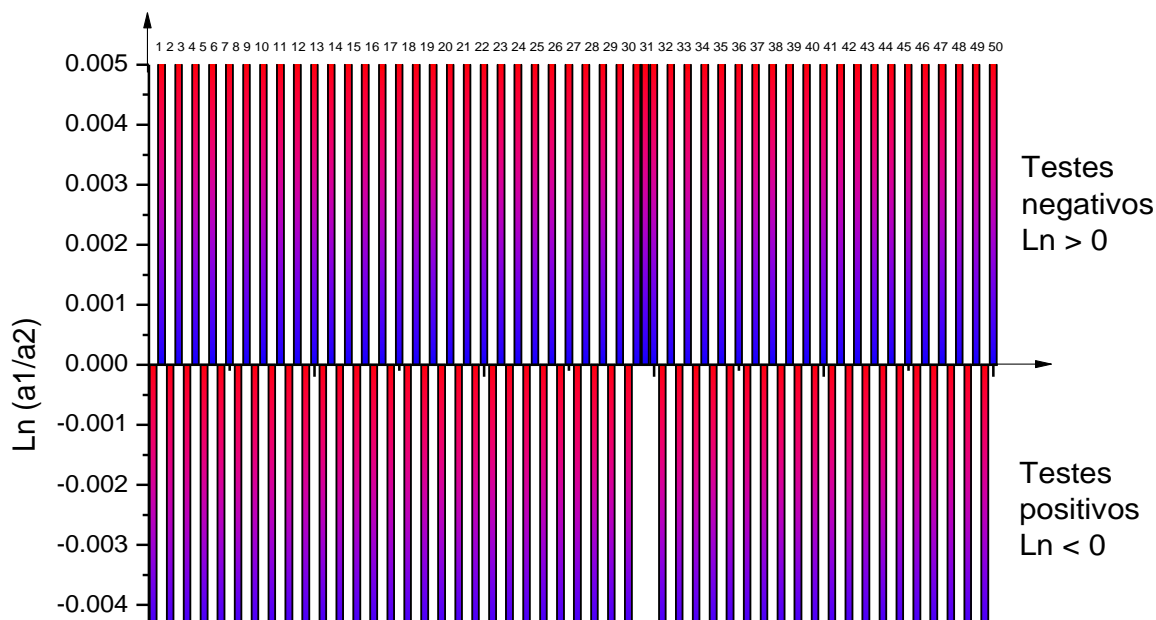
Verificam-se pelos espectros apresentados, tanto para um teste positivo quanto para um teste negativo, as regiões das bandas onde ocorrem as absorções máximas. Observa-se um deslocamento de banda, de uma região mais energética para uma menos energética, do comportamento de um teste negativo para um teste positivo. Isso ocorre devido ao fato de nos testes positivos as nanopartículas estarem maiores, consequência da aglomeração, o que acarreta a diminuição de suas frequências de movimento e provocando o deslocamento da banda de absorção máxima.

Identificadas essas bandas, determinam-se as áreas a_1 e a_2 . Cada teste negativo realizado, tem o seu espectro obtido e os seus valores de a_1 e a_2 determinados; assim como, cada teste positivo também. Consequentemente, cada teste, individualmente, tem o seu valor de logaritmo calculado. Nos testes negativos, espera-se uma razão entre a_1 e a_2 maior do que 1, o que determina um \ln dessa razão ter valor positivo. Nos testes positivos, espera-se uma razão entre a_1 e a_2 menor do que 1, o que determina um \ln dessa razão ter valor negativo. Se houvesse um resultado em que ambas as áreas fossem iguais, significaria que a banda de absorção máxima não fora considerada, tanto para um teste negativo quanto para um positivo. Na prática, o resultado colorimétrico não entraria na estatística, o que implicaria no descarte do teste. Em termos de cálculo, o valor de \ln seria nulo.

Os valores calculados dos logaritmos, das razões entre as áreas, dos testes negativos e dos testes positivos, foram utilizados para a elaboração de um gráfico de barras. O resultado exato da razão entre as áreas não é essencial. O importante é identificar se o valor do logaritmo é positivo ou negativo. Esse gráfico nos informa se os espectros tiveram um comportamento esperado para todos os testes realizados, ou seja, deslocamento do ponto de absorção máxima de uma banda mais energética para uma menos energética, pouca ou nenhuma variação no valor da absorção máxima, elevação evidente de absorção nas bandas menos energéticas do espectro dos testes negativos para os positivos e alargamento da meia altura da curva total do espectro delimitando uma maior área abaixo da mesma. Sendo satisfeitas todas estas condições, pode-se concluir também que o resultado colorimétrico foi

satisfatório e revelou mudança de cor, de um teste negativo para um teste positivo. Na Figura 30 é apresentado o resultado da estatística utilizando logaritmos, com os cinquenta pares de testes *label-free*.

Figura 30– Gráfico da estatística logarítmica (\ln) referente aos testes realizados com a sonda do *P. lutzii*, utilizando a metodologia *label-free*



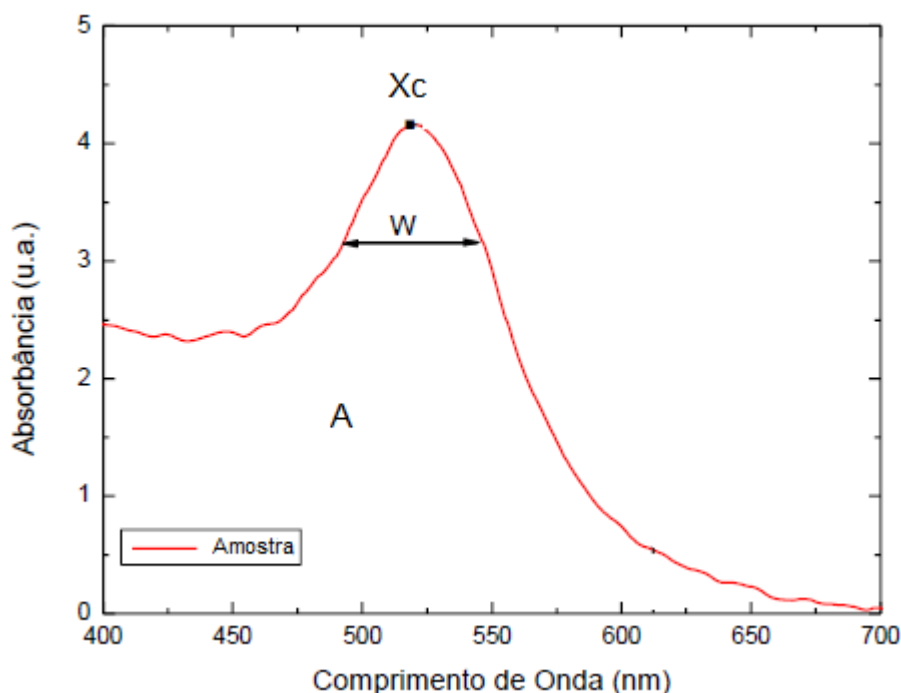
Fonte: Laboratório de nanossensores – IP&D

Observa-se no gráfico de barras que, para os testes negativos, como a razão entre $a1$ e $a2$ é maior do que 1, o valor de \ln é positivo, portanto, barra voltada para cima. Para os testes positivos, a razão entre $a1$ e $a2$ é menor do que 1, o valor de \ln é negativo, portanto, barra voltada para baixo. Verifica-se também, que houve um dos testes realizados em que se esperava um resultado positivo, ou seja, razão entre $a1$ e $a2$ menor do que 1, valor de \ln negativo e, portanto, barra voltada para baixo; porém isso não ocorreu. Houve uma inversão. Um teste que deveria ter um resultado colorimétrico azul, apresentou um resultado colorimétrico vermelho. O espectro não apresentou as características de um espectro de um teste positivo. Isto pode ter ocorrido por vários motivos, dentre eles a homogeneização deficiente da amostra, a utilização de uma ponteira contaminada, o tempo necessário para a obtenção dos espectros fora dos padrões, o armazenamento inadequado da amostra e falha humana na realização do protocolo. Vale ressaltar que foi uma inversão

em cinquenta testes realizados, o que proporciona um índice de testes satisfatórios de 98%. Este tipo de análise é adequada para este tipo de teste, no qual espectros apresentam essas curvas características, nas quais é possível se determinar essas áreas de integração. A diferença entre um teste positivo e um negativo está na presença ou não de uma sequência de DNA existente no genoma do fungo. Em análises *in vivo* significaria dizer que o agente causador da doença está no organismo do paciente ou não. Os resultados do gráfico de barras nos mostram que, dos 25 testes de diagnóstico negativo para a doença, todos foram bem-sucedidos; dos 25 testes de diagnóstico positivo para a doença, apenas 1 resultou em falso negativo.

A segunda análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o ajuste dos espectros, resultantes dos testes, com curvas Gaussianas. A adaptação foi executada por meio do programa *OriginPro 8.5*. A região espectral estudada foi de 450-650 nm, pois nesse intervalo, as curvas espectrais se ajustam com maior perfeição às curvas Gaussianas. As observações extraídas dos registros dos espectros foram interpretadas e convertidas em dados que pudessem ser ilustrados por diagramas do tipo *box plots*. Essa ferramenta possibilita verificar a dispersão dos dados, disponibilizados por intervalos interquartis e por valores médios (KRZYWINSKI; ALTMAN, 2014). Em um espectro característico de absorção, conforme os obtidos das amostras dos testes realizados, identificamos as grandezas relevantes para este tipo de estudo. São elas: a largura a meia altura (w), as áreas abaixo das curvas (A) e comprimento de onda relativo à absorção máxima (X_c); conforme exemplificado na Figura 31.

Figura 31– Exemplo de um espectro de absorção com as indicações de grandezas relevantes de uma Gaussiana.



Fonte: IP&D – Laboratório de Nanossensores

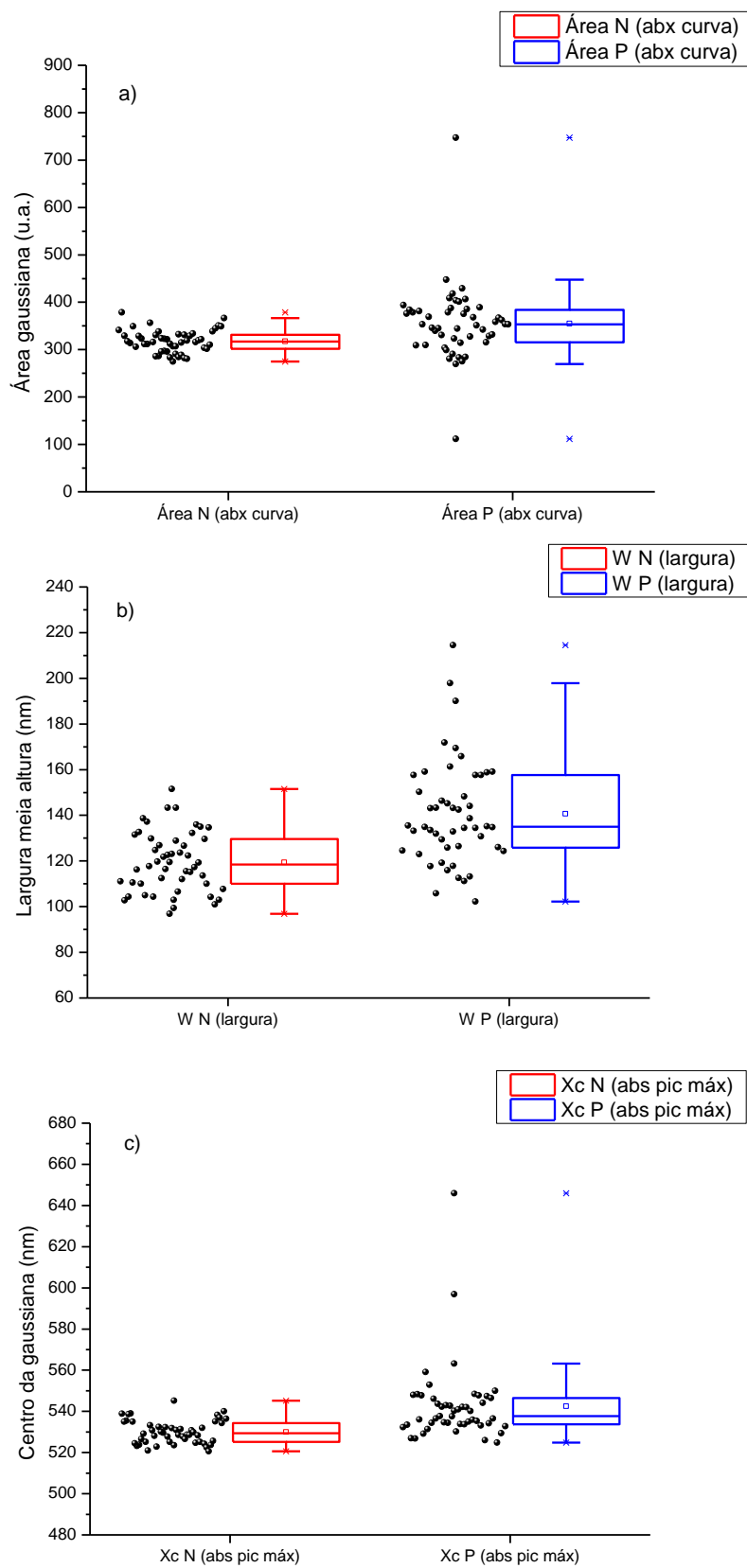
O comportamento dessas grandezas foi observado para cada conjunto de espectros obtidos, dos pares de teste. De um resultado negativo para um positivo, espera-se um aumento no valor de X_c , ou seja, um deslocamento de bandas mais energéticas para bandas menos energéticas; um aumento no valor de W , devido a absorbância ser maior, no resultado positivo, considerando-se as bandas menos energéticas e os maiores diâmetros das partículas; e aumento nos valores de A , pelos mesmos motivos. Nos diagramas são apresentados todos esses valores, para todas as curvas, de todos os testes. São destacados os valores médios de cada um, tanto para os testes negativos quanto para os positivos. A posição dos blocos, considerando-se o eixo vertical dos gráficos, permite verificar se houve aumento ou diminuição desses valores, na média. O esperado era que, na média, houvesse aumento nos valores e os blocos sofressem um pequeno deslocamento vertical para cima. O resultado foi satisfatório para as três grandezas. Isso significa que, este tipo de estatística, colabora para a classificação da qualidade dos testes

executados. Esta segunda análise juntamente com a primeira, comprovaram até aqui, a eficiência dos experimentos.

Na Figura 32, são apresentados os resultados da análise, por *box plots*, nos quais verificam-se as dispersões dos dados, a identificação do quartil inferior, superior, mediana, valores máximos e mínimos. No primeiro gráfico a), observa-se o resultado dos cálculos de áreas das curvas. No b), o resultado dos cálculos da largura a meia altura. No c), a abscissa correspondente a absorção máxima. Observa-se que a o valor da banda de absorção máxima sofre um aumento, dos testes negativos para os testes positivos. Isto ocorre pois devido ao aglomeramento das partículas e conseqüente mudança de cor da solução, a região plasmônica se altera também. A largura à meia altura das curvas também sofre um aumento, dos testes negativos para os positivos. Conseqüentemente, o valor da área abaixo da curva também aumenta. Isso ocorre, pois no processo de aglomeração das nanopartículas, ou seja, nos espectros obtidos para os testes positivos; devido ao raio hidrodinâmico aumentar, a absorção nas bandas menos energéticas, são maiores, se comparadas banda a banda com os espectros dos testes negativos.

Pode-se observar pelos blocos azuis, que contemplam os resultados dos testes positivos, que os dados estão mais dispersos, se comparados com os negativos. Verifica-se, portanto, um desvio padrão e uma diferença de quartis maiores, neste mesmo grupo. Curiosamente, no gráfico das áreas, podemos observar um ponto bem disperso e abaixo dos valores de área dos testes negativos. Esse ponto representa aquela inversão de barras que apareceu na primeira análise (In), o que gerou um teste falso negativo.

Figura 32– Análise estatística curvas Gaussianas em *box plots*: a) áreas abaixo das curvas, b) largura à meia altura e c) posição da banda de absorção máxima.



Fonte: Laboratório de nanossensores – IP&D

A terceira e última análise foi feita utilizando-se a curva ROC. Essa técnica permite calcular o valor, em porcentagem, da sensibilidade (probabilidade de resultados positivos em um doente) e especificidade (probabilidade de resultados negativos em um saudável) de testes relacionados a diagnóstico de doenças. O resultado pode ser observado em um plano cartesiano, com os valores das ordenadas indicando a sensibilidade e o eixo das abscissas indicando a especificidade. Os valores dos eixos variam de 0 a 1, que representam 0% ou 100%, respectivamente (CERDA; CIFUENTES 2012). Para os cálculos devem ser considerados, em uma coleta de amostras de doentes e saudáveis, a quantidade de testes resultantes verdadeiros positivos (VP), a quantidade de testes resultantes falsos negativos (FN), a quantidade de testes resultantes falsos positivos (FP) e a quantidade de testes resultantes verdadeiros negativos. A sensibilidade (Se) e a especificidade (Ef) são calculadas de acordo com as Equações 26 e 27 (McGEE, 2012):

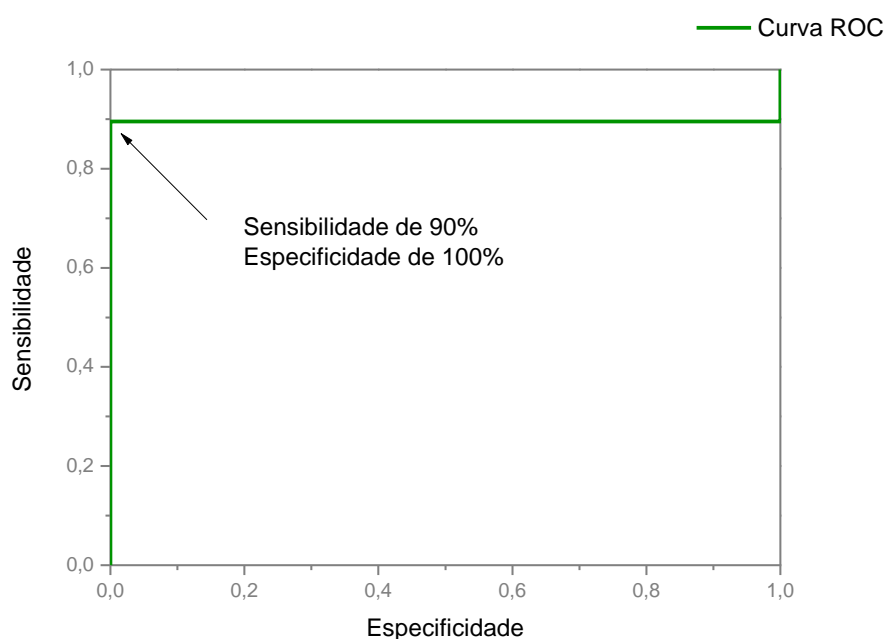
$$Se = \frac{VP}{(VP+FN)} \text{ e } Ef = \frac{VN}{(FP+VN)} \quad [26] \text{ e } [27]$$

A análise da curva ROC foi feita por meio do programa próprio. Os intervalos selecionados para o cálculo dos testes negativos e positivos foram entre as bandas 490-530 nm e 535-575 nm, respectivamente. Os resultados estão ilustrados conforme Figura 33. A ordenada relaciona-se com a sensibilidade (%) e a abscissa com a especificidade (%). A acurácia dos testes pode ser relacionada com a área abaixo da curva. No caso dos experimentos realizados, foi de 0,89552 considerada excelente (SERPA *et al.*, 2011).

O resultado da sensibilidade dos testes está relacionado com os diagnósticos positivos. Novamente, como seria esperado, o valor da mesma não atingiu 100%. Isso ocorreu devido aquela inversão, de um dos testes, já identificada anteriormente. O valor da sensibilidade poderia ter apresentado uma pequena diferença, caso o intervalo entre as bandas escolhido fosse poucos nanômetros superior ou inferior. Isso pode ser atribuído a uma falha de seleção do intervalo. Porém o resultado geral desta análise, e pelo valor da

acurácia, muito próximo de 1; podemos considerar o método satisfatório para classificação do teste colorimétrico *label-free* realizado. As três propostas de estatística para qualificação dos testes, forneceram resultados semelhantes, ou seja, que o teste colorimétrico foi eficiente, tanto para um diagnóstico positivo quanto negativo; todos registraram uma deficiência em um dos testes positivos; por metodologias diferentes, foi garantida a qualidade dos testes.

Figura 33– Curva ROC dos testes colorimétricos *label-free*.



Fonte: Laboratório de nanossensores – IP&D.

Os resultados dos testes colorimétricos mostraram um grande potencial de aplicabilidade, demonstrando coloração coerente com a presença ou ausência do DNA do fungo. Fatores positivos como redução de custos de reagentes, tempo de preparo de soluções, fácil interpretação dos resultados e possibilidade de utilização em ambientes remotos e com poucos recursos, tornam a sua implementação atrativa. Considerando-se a compra de reagentes, desde a síntese das nanopartículas até a realização dos experimentos e a disponibilidade de equipamentos necessários em laboratório, estima-se que o custo para a realização de um par de testes é inferior a R\$1,00.

Os resultados sugerem a metodologia colorimétrica *label-free* para testes diagnósticos da PCM, causadas pelo *P. lutzii*, uma alternativa. A eficácia foi confirmada por análise estatísticas envolvendo: logaritmos, curvas Gaussianas e curva ROC.

8 CONCLUSÃO

A técnica de espectroscopia utilizada permitiu identificar diferenças entre as duas espécies nas regiões das bandas de absorção características de proteínas, lipídios e DNA. Essa percepção foi possível na observação dos espectros médios, comparados dois a dois; e em detalhes no resultado espectral da subtração de um espectro médio de uma das espécies pelo outro espectro médio da outra espécie. Nesta operação, observou-se mais lipídios/DNA e menos proteínas no Pb03 comparado ao Pb01; mais lipídios/DNA no Pb01 comparado ao Pb18.

Com o auxílio de ferramentas estatísticas foi possível verificar o intervalo em que os espectros representavam as maiores diferenças bioquímicas entre as espécies. A utilização da deconvolução de bandas associada a segunda derivada foi estudada no intervalo 1200 e 1438 cm^{-1} . As principais diferenças apareceram nos modos vibracionais de polissacarídeos e proteínas. As diferenças mostradas nos resultados, permitiram identificar, caracterizar e diferenciar as espécies, pelos modos vibracionais dos grupos funcionais envolvidos, conforme registrado na Tabela 4.

Os resultados demonstraram que o FT-IR permitiu uma descrição qualitativa e quantitativa das moléculas presentes nas espécies, mostrando-se um procedimento eficaz de diferenciação, das mesmas por meio da PC-LDA.

Os testes colorimétricos realizados pela tecnologia *label-free* proporcionaram a identificação do *P. lutzii* de maneira rápida por meio da mudança de coloração. Análises estatísticas: do logaritmo natural, de curvas Gaussianas e curva ROC comprovaram a eficiência do método. Com esses resultados foi possível considerar a tecnologia *label-free* como um método de diagnóstico molecular alternativo e eficiente para a detecção da PCM, causada pelo *P. lutzii*.

9 TRABALHOS FUTUROS

A experiência da mobilidade internacional realizada em parceria com a Universidade do Porto permitiu a continuidade de estudos e pesquisas relacionadas com testes de diagnóstico da paracoccidiodomicose utilizando sensores eletroquímicos.

Inicialmente, o grupo de pesquisas da Prof.^a Dra. Maria do Carmo apresentou projetos desenvolvidos no Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE). A utilização de nanotecnologia e técnicas modernas de laboratório permitem a realização de experimentos e a busca por resultados satisfatórios, principalmente na área da saúde e relacionadas com doenças importantes como Parkinson e Alzheimer.

Uma das linhas de pesquisa, em parceria com um laboratório de eletroquímica do Instituto Superior de Engenharia do Porto, o REQUIMTE, orientada pela Prof.^a Dra. Simone Moraes, desenvolve sensores para diagnóstico de doenças com a utilização de antígenos e anticorpos. Artigos sobre o diagnóstico de Alzheimer já foram publicados. Experimentos sobre o diagnóstico de Parkinson estão sendo realizados.

Este segmento de pesquisa nos permitiu a migração do LEPABE para o REQUIMTE tendo em vista o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a identificação dos fungos das espécies *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.

Realizamos outra parceria promissora, que pode gerar trabalhos futuros, com pesquisadores da Universidade do Minho, o Prof. Dr. Fernando Rodrigues e o Prof. Dr. Relber Gonçalves, pesquisadores envolvidos com o *Paracoccidioides*, que forneceram o material biológico dos fungos. Recebemos DNA de dez espécies do fungo, entre *brasiliensis* e *lutzii*. Duas espécies foram escolhidas inicialmente, uma de cada.

A pesquisadora Patrícia Reis, outra parceria importante que pode gerar trabalhos futuros, do laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, colaborou com a amplificação, purificação e quantificação das amostras. As sequências simples de DNA necessárias para a fixação no sensor foram adquiridas da empresa *Sigma Aldrich*.

Conseguimos inicializar nossos experimentos com o sensor eletroquímico e concluir as etapas anteriores à fixação das sondas (sequências simples de DNA) nos eletrodos. Este trabalho gerou um resumo em parceria para o Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da UNIVAP em 2020. Foram apresentados gráficos com os resultados obtidos experimentalmente e curvas características geradas pelas técnicas de Voltametria de Onda Quadrada e Voltametria de Onda Cíclica.

A continuidade dos experimentos deste trabalho deve ser desenvolvida pelo grupo de pesquisas da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e do Instituto Superior de Engenharia do Porto, uma vez que todo o material biológico, equipamentos, programas e dispositivos necessários se encontram nestas instituições.

Do nosso laboratório de Nanossensores, em São José dos Campos, São Paulo, no Brasil, nós acompanharemos os avanços e daremos a nossa contribuição, sempre que solicitada, para que os objetivos do projeto sejam atingidos. Ao término dos trabalhos, existe a pretensão de publicação de um artigo científico em uma revista indexada científica especializada.

A parceria inicializada, o nosso bom relacionamento e a confiança adquirida por parte dos nossos colegas portugueses permitiu que três trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório brasileiro fossem submetidos e aceitos para um congresso internacional de nanomateriais que ocorreria, inicialmente, em julho de 2020. Em função da pandemia mundial deste ano, foi postergada para novembro de 2020. As conclusões não satisfatórias das organizações de saúde, sobre a pandemia até o momento, forçaram mais um adiamento do evento para abril de 2021, previsto para ocorrer em Aveiro, Portugal.

O principal legado deste intercâmbio foi a consolidação e o interesse de ambas as instituições nesta parceria. Todos os imprevistos iniciados em 2020 e que perduram até o momento contribuíram, e muito, para que o projeto não pudesse ser concluído no período. Porém, há interesse na sua continuidade e conclusão por parte dos pesquisadores estrangeiros. A ideia inicial é que a sequência do trabalho seja proposta a um aluno de Mestrado, orientado pelas professoras locais.

De qualquer forma, a parceria já rendeu resumos para um congresso latino americano e um internacional. Existe o comprometimento da finalização

do projeto do sensor da paracoccidiodomicose. Em mensagens finais de agradecimentos e despedidas, ao término do período, as professoras demonstraram o desejo de continuidade da parceria e de realização de trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

ADAM, H.; YOUSSEF, A. Economic Impacts of Nanotechnology Industry: case study on Egypt. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DIGITAL STRATEGIES FOR ORGANIZATIONAL SUCCESS*, 10., 2019.

Proceedings..., [s.l:s.n], 2019.

AGUIAR, J. C. **Caracterização das espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier**. 2016.

Tese (Doutorado em Física e Astronomia) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2016.

ALMEIDA, A. *et al.* Genome size and ploidy of *Paracoccidioides brasiliensis* reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis, **Fungal genetics and biology.**, v. 44, n. 1, p. 25-31, 2007.

doi: 10.1016/j.fgb.2006.06.003.

ALMEIDA, A. J. *et al.* New insights into the cell cycle profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology.**, v. 43, n. 6, p. 401-409, 2006.

ALPEN, E. L. **Radiation Biophysics**. 2nd. ed. California: Academic press, 1998.

ANASTÁCIO, V. M. *et al.* Paracoccidioidomicose: Correlação entre achados clínicos e laboratoriais na região de São José do Rio Preto. **Arq. Ciênc. Saúde.**, v. 14, n. 3, p. 181-185, 2007.

ANIKEEVA, P.; DEISSEROTH, K. Photothermal Genetic Engineering. **ACS Nano.**, v. 6, n. 9, p. 7548-7552, 2012.

ARANTES, T. D. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*, a secret love affair. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.**, v. 57, suppl. 19, p. 25-30, 2015.

ARAÚJO, D. S. *et al.* Employing proteomic analysis to compare *Paracoccidioides lutzii* yeast and mycelium cell wall proteins. **BBA-Proteins and Proteomics.**, v. 1865, p. 1304-1314, 2017. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.08.016.

ARAÚJO, D. S. *et al.* Metabolic Peculiarities of *Paracoccidioides brasiliensis* Dimorphism as Demonstrated by iTRAQ Labeling Proteomics. **Frontiers in Microbiology**, 2019.

AVILA-CAMPOS, M. J. *et al.* In vitro activity of two beta-lactam antibiotics against strains of the *Bacteroides fragilis* group isolated from humans and from *Callithrix penicillata* marmosets. **Revista latinoamericana de microbiologia**, v. 36, n. 3, p. 159-162, 1994.

BAETSEN-YOUNG, A. M. *et al.* Direct colorimetric detection of unamplified pathogen DNA by dextrin-capped gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 101, p. 29-36, 2018.

BAGAGLI, E. *et al.* Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p. 344-351, 2006.

BAGAGLI, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 197-207, 2008.

BALAKRISHNAMA, S.; GANAPATHIRAJU, A. **Linear Discriminant Analysis – A brief tutorial**. Institute for Signal and Computer Engineering Mississippi State University. 1998.

BAPTISTA, P. *et al.* Colorimetric detection of eukaryotic gene expression. With DNA-derivatized gold nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 2, p. 111-117, 2005.

BAPTISTA, P. V. *et al.* Gold-Nanoparticle-Probe-Based Assay for Rapid and Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in Clinical Samples. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 7, 2006.

BARBOSA, A. L. **Dicionário de Química**. 4. ed. Goiânia: AB Editora, 2007.

BARROSO, A. F. A. A. **Nanobiossensores**: conceito e aplicações na avaliação de parâmetros bioquímicos e diagnóstico precoce de patologias. 2014. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Algarve, Algarve, 2014.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1767, p. 1073-1101, 2007. doi: 10.1016/j.bbabbio.2007.06.004.

BATISTA JUNIOR, J. *et al.* Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycosis.**, v. 53, p. 176-180, 2010.

BECK, E. T.; HENRICKSON, K. J. Molecular diagnosis of respiratory viruses. **Future Microbiol.**, v. 5, p.901-916, 2010.

BEEKES, M. *et al.* Analytical applications of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Vet. Microbiol.**, v. 123, p. 305-319, 2007.

BORGES-WALMSLEY, M. I. *et al.* The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

BOSETTI, R.; JONES, S. L. Cost-effectiveness of nanomedicine: estimating the real size of nano-costs. **Nanomedicine (Lond.)**, v. 14, n. 11, p. 1367-1370, 2019.

BOULAIZ, H. *et al.* Nanomedicine: Application Areas and Development Prospects. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, p. 3303-3321, 2011.

BRUMMER, E. *et al.* Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

BULAWA, C. E.; OSMOND, B. C. Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, p. 7424-7428, 1990.

BUSTAMANTE-SIMON, B. *et al.* Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology.**, v. 23, p. 407-414, 1985.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v. 111, p. 121-133, 1993.

CAETANO JÚNIOR, P. C. *et al.* Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. **Research on Biomedical Engineering.**, v. 31, n. 2, p. 116-124, 2015.

CÂNDIDO, M. A. *et al.* The comparison between label-free and non-cross-linking methods with gold nanoparticles for colorimetric detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Research on Biomedical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 39-44, 2019.

CARUSO, F. *et al.* Nanomedicine. **Chemistry Society Rev.**, v. 41, 2012.

CASTILHO, M. L. **Nanossondas bifuncionais fotossensibilizadoras para o tratamento do câncer de mama.** 2017. (Doutorado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2017.

CASTILHO, M. L. *et al.* The efficiency analysis of gold nanoparticle by FT-IR spectroscopy applied to the *non-cross-linking* colorimetric detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sensors and Actuators B: Chemical.**, v. 215, p. 258-265, 2015.

CAWLEY, G. C.; TALBOT, N. L. C. Efficient leave-one-out cross-validation of kernel fisher discriminant classifiers. **Pattern Recognition.**, v. 36, n. 11, p. 2585-2592, 2003. doi: 10.1016/S0031-3203(03)00136-5.

CERDA, J.; CIFUENTES, L. Uso de curvas ROC em investigação clínica: Aspectos teórico-práticos. **Revista chilena de infectologia**, v. 29, n. 2, p. 138-141, 2012. doi: 10.4067/S0716-10182012000200003.

- CHANG, W. *et al.* Radiative and Nonradiative Properties of Single Plasmonic Nanoparticles and Their Assemblies. **Accounts of chemical research.**, v. 45, n.11, p. 1936-1945, 2012.
- CHIRIBOGA, L. *et al.* Infrared spectroscopy of human tissue. I. Differentiation and maturation of epithelial cells in the human cervix. **Biospectroscopy.**, v. 4, p. 47-53, 1998. doi: 10.1002/(SICI)1520-6343.
- COIMBRA, A. B. **Nanotecnologia na Saúde: Aplicações e Perspectivas.** 2013. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.
- COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of endemic system fungal infections in Latin America, **Med. Mycol.**, v. 49, n. 8, p. 785-798, 2011.
- COLTHUP, N. B. D. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy.** 3th. ed. [s.l]: Academic Press, 1997.
- COMPARATO FILHO, O. O. *et al.* Influência da concentração de oligonucleotídeos no efeito de aglomeração de nanopartículas na presença de solução salina. **Revista Univap**, v. 22, n. 39, 2016.
- COMPARATO FILHO, O. O. **Deteção molecular, a baixo custo, do *Paracoccidioides brasiliensis* pelo método colorimétrico label-free.** 2017. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2017.
- COMPARATO FILHO, O. O. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* Molecular Detection by Label-Free Colorimetric Method Using Gold Nanoparticles. **Brazilian Journal of Physics**, v. 49, p. 55-61, 2019.
- COMPARATO FILHO, O. O. *et al.* Rapid identification of *Paracoccidioides lutzii* and *P. brasiliensis* using Fourier Transform Infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 1177, p. 152-159, 2019. doi: 10.1016/j.molstruc.2018.09.016.
- COUTINHO, Z. F. **Morbimortalidade por paracoccidioidomicose no Brasil (1988-2006).** 2011. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2011.
- CUSHIOM, M. T. Comparative genomics of *Pneumocystis carinii* with other protists: implications for lifestyle. **J. Eukariot Microbiol.**, v. 51, n. 1, p. 30-37, 2004.
- DASARY, S. S. *et al.* Highly Sensitive and Selective Dynamic Light-Scattering Assay for TNT Detection Using p-ATP Attached Gold Nanoparticle. **Applied Materials & Interface.**, v. 2, n. 12, p. 3455-3460, 2010.

- DAVIS, R.; MAUER, L. J. Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. **Formatex Research Center**. 2010.
- DE GROOT, P. W. J. *et al.* Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 8, p. 657-675, 2005.
- DESJARDINS, C. A. *et al.* Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. **PLOS Genet.**, v. 7, n. 10, 2011.
- DIAZ, M. M. *et al.* Salivary nitric oxide and alpha-amylase as indexes of training intensity and load. **International Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 1, p. 8-13, 2013.
- DISNER, G. R.; CESTARI, M. M. Nanociência e Nanotecnologia. **Evidência – Ciência e Biotecnologia**, v. 16, p. 71-76, 2016.
- DORIA, G. *et al.* Nanodiagnosics: fast colorimetric method for single nucleotide polymorphism/mutation detection. **Nanobiothechnology**, v. 1, n. 4, p. 53-57, 2007.
- DOVBESHKO, G. I. *et al.* FT-IR spectroscopy studies of nucleic acid damage. **Talanta**, v. 53, p. 233-246, 1997. doi: 10.1016/S0039-9140(00)00462-8.
- DUKOR, R. K.; STORY, G. M.; MARCOTT, C. A method for analysis of clinical tissue samples using FT-IR microspectroscopic imaging. *In*: GREVE, J.; PUPPELS, G. J.; OTTO, C. **Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions**. [s.l]: Springer, p. 471-472, 1999.
- ECKEL, R. *et al.* Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue. **Vibrational Spectroscopy**, v. 27, p. 165-173, 2001. doi: 10.1016/S0924-2031(01)00134-5.
- ERGIN, Ç. *et al.* ATR-FT-IR spectroscopy highlights the problem of distinguishing between exophiala dermatitis and e. Phaeoumuriformis using MALDI-TOF MS, **Microb. Ecol.**, v. 71, n. 2, p. 339-346, 2016.
- FABIAN, H. *et al.* A comparative infrared spectroscopic study of human breast tumors and breast tumor cell xenografts. **Biospectroscopy**, v. 1, n. 1, p. 37-45, 1995. doi: 10.1002/bspy.350010106.
- FAGUNDES, J. *et al.* Ribosomal DNA nanoprobe studied by Fourier transform infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 28-35, 2014.
- FEITOSA, L. S. *et al.* Chromosomal polymorphism, syntenic relationships and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol.**, v. 39, p. 60-69, 2003.

FERREIRA, I. *et al.* Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 152, p. 397-403. 2015.

FIGUEIRA, C. S.; SANTOS, R. P. Biossíntese de nanopartículas de ouro utilizando vegetais. **Nanocell News**, v. 4, n. 14, 2017.

FIGUEIRA, J. S. Movimento browniano: uma proposta do uso das novas tecnologias no ensino de Física. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 33, n. 4, 2011.

FIRON, A. *et al.* Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 617-623, 2004. doi: 10.1016/j.mib.2004.10.015.

FORTES, M. R. *et al.* Imunologia da *paracoccidioidomicose*, **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 3, p. 516–525, 2011.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, p. 20-22, 1973. doi: 10.1038/phyci241020a0.

FRITZ, S. *et al.* **Understanding nanotechnology**. 1 ed. Nova York: Warner Books, 2002.

FUJIOKA, N. *et al.* Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cancer Detection & Prevention**, v. 28, p. 32-36, 2004. doi: 10.1016/j.cdp.2003.11.004.

GAO, Y. *et al.* Fourier transform infrared microspectroscopy monitoring of 5-fluorouracil-induced apoptosis in SW620 colon cancer cells. **Mol. Med. Rep.**, v. 11, n. 1, p. 2585-2589, 2015.

GEGEMBAUER, G. *et al.* Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **Plos Neglected Tropical Disease.**, v. 8, n. 7, 2014.

GEOGRAFIA OPINATIVA. **Região Centro-Oeste – Características gerais, Clima, Relevo, Vegetação e Hidrografia**. Disponível em: <http://www.geografiaopinativa.com.br/2013/07/regiao-centro-oeste-caracteristicas.html>. Acesso em: 16 de set. 2019.

GEOGRAFIA OPINATIVA. **Região Sudeste: Características gerais, Clima, Relevo, Vegetação e Hidrografia**, 2013. Disponível em: <http://www.geografiaopinativa.com.br/2013/07/regiao-sudeste-caracteristicas.html>. Acesso em: 16 de set. 2019.

GONSALVES, A. M. *et al.* **Espectroscopias vibracional e electrónica**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, 2005.

GONZALEZ, A.; HERNANDEZ, O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. **Yeast.**, v. 33, p. 113-128, 2016. doi: 10.1002/yea.3147.

GUIMARÃES, P. P. *et al.* Análise dos impactos ambientais de um incêndio florestal. **Agrarian Academy.**, v. 1, n. 1, p. 1-23, 2014.

HAMEED, A. *et al.* Scope of Nanotechnology in Cosmetics: Dermatology and Skin Care Products. **Journal of Medicinal and Chemical Sciences**, v. 2, p. 9-16, 2019.

HARTWELL, L. H. *et al.* Genetic control of the cell division cycle in yeast. **Science.**, v. 183, n. 4120, p. 46-51, 1974.

HEATH, J. *et al.* Nanomedicina no tratamento do Câncer. **Scientific American Brasil.**, p. 42-49, 2009.

HEILMANN, C. J. *et al.* Hyphal induction in the human fungal pathogen *Candida albicans* reveals a characteristic wall protein profile. **Microbiology.**, v. 157, 2011.

HELM, D. *et al.* Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of General Microbiology.**, v.137, p. 69-79. 1991.

HOLLAS, J. M. **Modern Spectroscopy.** 4 ed. John Wiley & Sons Ltd, 2004.

HOOKE, R. **Lectures of Spring.** 1678.

HORTON, M. A.; KHAN, A. Medical nanotechnology in the UK: a perspective from the London Centre for Nanotechnology. **Nanomed-Nanotechnol.**, v. 2, n. 1, p. 42-48, 2006.

HUANG, X. *et al.* Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. **Journal of the American Chemical Society.**, v. 128, n. 6, p. 2115-2120, 2006.

HUGHES, C. *et al.* Assessing the challenges of Fourier transform infrared spectroscopic analysis of blood serum. **Journal of biophotonics.**, v. 7, n. 3-4, p. 180-188, 2014. doi: 10.1002/jbio.201300167.

HUIXIANG, L; ROTHBERG, L. J. Label-free Colorimetric Detection of Specific Sequences in Genomic DNA Amplified by the Polymerase Chain Reaction; **Journal of The American Chemical Society**, v. 126, p. 10958-10961, 2004.

HULEIHEL, M. *et al.* Novel optical method for study of viral carcinogenesis in vitro. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 50, p. 111-121, 2002.

HUNTER, R. J. **Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications**, Academic Press, 2013.

IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.

JAIN, K. K. The Handbook of Nanomedicine. **Basel: Humana Press.**, v. 1-4, n. 9-12, p. 91-109, 2008.

JAIN, P. K. *et al.* Au nanoparticles target cancer. **Nanotoday.**, v. 2, p. 18-19, 2007.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Phil. Trans. R. Soc. A.**, v. 374, 2015. doi: 10.1098/rsta.2015.0202.

JULIANO, V. F. Introdução aos métodos espectroanalíticos. **SlidePlayer**. Disponível em: <http://www.slideplayer.com.br/slide/1271247/>. Acesso em: 03 jan 2020.

KANETSUNA, F. *et al.* Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology.**, v. 97, p. 1036-1041, 1969.

KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology.**, v. 101, p. 675-680, 1970.

KANETSUNA, F. *et al.* Biochemical Studies on the Thermal Dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology.**, v. 110, p. 208-218, 1972.

KHANYLLE, N. *et al.* Un-functionalized Gold Nanoparticles as a Simple Colorimetric Probe for Sensitive and Selective Detection of Dopamine. **South African Journal Chem.**, v. 72, p. 207-214, 2019.

KHLEBTSOV, B. N.; KHLEBTSOV, N. G. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. **Colloid Journal.**, v. 73, n. 1, p. 118-127, 2011.

KIEKENS, P. Textiles/Clothing and nanotechnology: Where are we now? *In*: AUTEX 2019 – WORLD TEXTILE CONFERENCE ON TEXTILES AT THE CROSSROADS, 19., 2019. Ghent. **Proceedings....**, Ghent, 2019.

KRALCHEVSKY, P. A. *et al.* Chemical Physics of Colloid Systems and Interfaces. BIRDI, K. S. **Handbook of Surface and Colloid Chemistry**. [s.l.]: CRC Press, 2008. p. 197-377.

KREIBIG, U.; VOLLMER, M. **Optical Properties of Metal Cluster**. Berlin: Springer, 1995.

- KRENN, J. R. *et al.* Squeezing the Optical Near-Field Zone by Plasmon Coupling of Metallic Nanoparticles. **Physical Review Letters**, v. 82, n. 12, p. 2590-2593, 1999.
- KRZYWINSKI, M.; ALTMAN, N. Points of significance: visualizing samples with box plots. **Nature methods**, v. 11, n. 2, p. 119-120, 2014. doi: 10.1038/nmeth.2813.
- LEE, P.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **J. Phys. Chem.**, v. 86, p. 3391-3395, 1982. doi: 10.1021/j100214a025.
- LEITE, M. M. **Impacto dos incêndios nas propriedades dos solos em áreas de montanha sob coberto de matos.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Instituto Politécnico, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2011.
- LIN, H. *et al.* Postmortem diagnosis of fatal hypothermia/hyperthermia by spectrochemical analysis of plasma. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, v. 15, p. 332-341, 2019. doi: 10.1007/s12024-019-00111-8.
- LIU, X. *et al.* Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 58, p. 3-7, 2007.
- LIZ-MARZÁN, L. M. Nanometals: formation and color. **Materials today.**, v. 26, 2004.
- LOUSADA-FERNANDEZ, F. *et al.* Liquid biopsy in oral cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 6, 2018.
- MAIER, S. A. **Guiding of Electromagnetic Energy in Subwavelength Periodic Metal Structures.** (Thesis) - California Institute of Technology, Pasadena, 2003.
- MAITY, J. P. *et al.* Identification and discrimination of bacteria using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Spectrochim Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.**, v. 116, p. 478-484, 2013.
- MANDOLESI, A. R. **Busca dos genes de *Paracoccidioides brasiliensis* relacionados às funções da mitocôndria.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.
- MANOCHA, M. S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison between the yeast and mycelial forms. **Saboraudia.**, v. 18, p. 281-286, 1980.

- MAQUELIN, K. *et al.* Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. **J. Microb. Method.**, v. 51, p. 255-559, 2002. doi: 10.1016/S0167-7012(02)00127-6.
- MARQUES, S. A. *et al.* Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **Na. Bras. Dermat.**, v. 82, n. 4, p. 411-417, 2007.
- MARQUES, S. A. *et al.* Paracoccidioidomycosis: infiltrated, sarcoid-like cutaneous lesions misinterpreted as tuberculoid leprosy. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 50, p. 47-50, 2008.
- MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **An. Bras. Dermatol.**, v. 88, n. 5, p. 700-711, 2013.
- MARTIN, M. *et al.* The effect of common anticoagulants in detection and quantification of malaria parasitemia in human red blood cells by ATR-FT-IR spectroscopy, **Analyst.**, v. 142, n. 8, p. 1192-1199, 2017.
- MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi.**, v. 3, n. 1, 2017.
- MARTINS, J. F. S. *et al.* Identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by gold nanopores. **SPIE. Digital library.**, v. 8219, 2012.
- MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química nova**, v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 2012.
- MAXIEDUCA. Do Oiapoque ao Chuí: Conheça as principais características das regiões brasileiras e se dê bem na Geografia do Brasil em vestibulares e concursos. **Max Educa**, 2018. Disponível em: <https://blog.maxieduca.com.br/regioes-brasileiras-geografia/>. Acesso em: 16 de set. 2019.
- MAYERHOFER, T. G.; POPP, J. Beer's law derived from electromagnetic theory. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 215, p. 345 – 347, 2019.
- McGEE, S. **Evidence-Based Physical Diagnosis**. 3rd. ed. Philadelphia. Elsevier/Saunders, 2012.
- MÉLO, A. S. *et al.* Suscetibilidade do ambiente à ocorrência de queimadas sob condições climáticas atuais e de futuro aquecimento global. **Revista Brasileira de Meteorologia.**, v. 26, n. 3, p. 401-418, 2011.
- MILLER, F. P. *et al.* Dynamic Light Scattering, **VDM Publishing**. 2010.
- MIRKIN, C. A. *et al.* A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. **Nature**, v. 382, 1996.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, 1998.
doi: 10.1590/S0100-40421998000400016.

MOLINARI-MADLUM, E. E. W. I. *et al.* Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 269-276, 1999.

MONTAZER, M.; HARIFI, T. **Nanofinishing of Textile Materials**. Woodhead Publishing: Elsevier Ltd. UK, 2018.

MORAN, G. P. *et al.* Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. **Eukaryot. Cell.**, v. 10, p. 34-42. 2011.

MOREIRA, A. P. V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 5, n. 51, 2008.

MOREIRA, L. S. Universo de possibilidades e riscos. **Cipa**, n. 468, p. 46-50, 2018.

MOVASAGHI, Z. *et al.* Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews.**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008. doi: 10.1080/05704920701829043.

MUFAMADI, M. S. From lab to market: Strategies to nanotechnology commercialization in Africa. **MRS Bulletin.**, v. 44, n. 6, p. 421-422, 2019.

MULLEN, A. Expectations from nano in agriculture. **Nature Nanotechnology. Insight/Q&A**, v. 14, p. 515-516, 2019.

NASEER, K. *et al.* FT-IR spectroscopy of freeze-dried human sera as a novel approach for dengue diagnosis. **Infrared Physics and Technology**, v. 102, 2019.

NAUMANN, D. I. S. I. M. **Infrared spectroscopy in microbiology**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000.

NAVARRO, J. R.; WERTS, M. H. Resonant light scattering spectroscopy of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles and optical detection in microfluidic channels. **Analyst.**, v. 138, n. 2, p. 583-592, 2013.

NEMECEK, J. C. *et al.* Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi. **Science.**, v. 312, 2006.

NGHIEM, T. H. L. *et al.* Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 2010.

- NOGUEIRA, A. C. *et al.* Fístula traqueoesofágica associada a paracoccidiodomicose. **Autopsy Case Rep.**, v. 1, p. 31-38, 2011.
- NOSKIN, V. A. **Doctoral** Dissertation (Phys.-Math.) - Leningrad Inst. of Nuclear Physics, Gatchina, 1983.
- ODDS, F. C. Candida albicans Proteinase as a Virulence Factor in the Pathogenesis of Candida Infections. **Zbl. Bakt. Hyg.**, v. A 260, p. 539-542, 1985.
- OJEA-JIMÉNEZ, I.; PUNTES, V. Instability of Cationic Gold Nanoparticle Bioconjugates: The Role of Citrate Ions. **Journal of American Chemical Society**, v. 131, n. 37, p. 13320-13327, 2009.
- OLIVEIRA, A. R. *et al.* Characterization of extracellular proteins in members of the *Paracoccidioides* complex. **Fungal Biology.**, v. 122, p. 738-751, 2018. doi: 10.1016/j.funbio.2018.04.001.
- PACHECO, L. H. **Desenvolvimento de um sistema contendo nanopartículas de ouro dispersas em material graxo e sua aplicação em espectroscopia Raman intensificada por superfícies (SERS) para avaliação de moléculas orgânicas sulfuradas.** 2017. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.
- PAIVA, D. L. *et al.*, **Introdução à Espectroscopia.** São Paulo: Cengage Learning, 2013.
- PASQUINI, C. Espectroscopia no infravermelho próximo: fundamentos, aspectos práticos e aplicações analíticas. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**, v. 14, n. 2, 2003.
- PATWEKAR, S. *et al.* Review on nanoparticles used in cosmetics and dermal products. **World J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 3, 2014.
- PEREIRA, D. A. **Síntese e funcionalização de nanopartículas de ouro para a formação de bioconjugados para o desenvolvimento de biossensores.** 2014. Dissertação (Mestrado em Química e Bioquímica) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2014.
- PERKINS, W. D. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. **Topics in Chemical Instrumentation**, v. 63, n. 1, 1986.
- PETIBOIS, C.; DÉLÉRIS, G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 10, 2006.
- PETIBOIS, C. *et al.* Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. **Anal Bioanal Chem.**, v. 386, p. 1961-1966, 2006.

PIGOSSO, L. L. *et al.* Comparative proteomics in the genus *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 87-100, 2013.

PLANCK, M. On the Law of Distribution of Energy in the Normal Spectrum. **Annalen der Physik**, v. 4, 1901.

POTOCKI, L. *et al.* FTIR and Raman Spectroscopy-Based Biochemical Profiling Reflects Genomic Diversity of Clinical *Candida* Isolates That May Be Useful for Diagnosis and Targeted Therapy of Candidiasis. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 4, 2019.

PRINCE, S. J. D.; ELDER, J. H. Probabilistic linear discriminant analysis for inferences about identity. *In: IEEE*, 11., 2007. **Proceedings...**, Rio de Janeiro: IEEE, 2007. doi: 10.1109/ICCV.2007.440.9052.

QUEIRÓZ-TELES, F. *Paracoccidioides brasiliensis* ultrastructural findings. *In: FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, London, 1994. p. 27-44.

RABE, J. H. *et al.* Fourier transform infrared microscopy enables guidance of automated mass spectrometry imaging to predefined tissue morphologies. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, 2018. doi: 10.1038/s41598-017-18477-6.

RESTREPO, A. *et al.* Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. **Medical Mycology**, v. 38, p. 67-77, 2000.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal Infection: Diagnosis and Management**. Oxford: Blackwell Science, 1997. p. 280-287.

RICHTER, T. *et al.* Identification of tumor tissue by FT-IR spectroscopy in combination with positron emission tomography. **Vibrational Spectroscopy**, v. 28, p. 103-110, 2002. doi: 10.1016/S0924-2031(01)00149-7.

RODRIGUES, R. P. C. B. *et al.* Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. **Brazilian Dental Journal**, v. 30, n. 5, p. 437-445, 2019.

ROSELINO, A. M. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 3, p. 187-203, 2008.

RUDALL, K. M.; KENCHINGTON, W. The Chitin System. **Biol. Rev.**, v. 49, p. 597-636, 1973. doi: .org/10.1111/j.1469-185X.1973.tb01570.x.

SALA, O. **Fundamentos de espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. São Paulo: Unesp. 2008.

SAN-BLAS, G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationships. **Mycopathologia**, v. 79, p. 159-184. 1982.

SAN-BLAS, G. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SANCHEZ, F., SOBOLEV, K. Nanotechnology in concrete – A review. **Construction and Building Materials**, v. 24, p. 2060-2071, 2010.

SANDALOW, D. B. **Plug-In Electric Vehicles**: what a role for Washington? [s.l]: The Brookings Institution, 2009. p. 2-5.

SANTOS, J. F. L. *et al.* Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1098-1111, 2016.

SANTOS, P. M. *et al.* Utilização da microespectroscopia infravermelha (FT-IR) para testes de algoritmos estatísticos na diferenciação dos micro-organismos *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis*. **Rev. Bras. Eng. Bioméd.**, v. 28, n. 4, p. 398-409, 2012. doi: 10.4322/rbeb.2012.037.

SARAVIA, N. G. *et al.* The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 159, p. 725-735, 1989. doi: 10.1093/infdis/159.4.725.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and qualification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, p. 13-25, 2007. doi: 10.1016/j.vibspec.2006.06.001.

SERPA, L. F. *et al.* Predictive validity of the Braden scale for pressure ulcer risk in critical care patients. **Rev. Lat. Am. Enfermagem**, v. 19, n. 1, p. 50-57, 2011. doi: 10.1590/S0104-11692011000100008.

SHAFIEI, M. *et al.* Gold nanoparticle-based colorimetric platform technology as rapid and efficient bacterial pathogens detection method from various sources. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 30, p. 128-132, 2019.

SHARMA, Shurbi; SARANGDEVOT, Kumkum. Nanoemulsions for cosmetics. **IJARPB**, v. 1, n. 3, p. 408-15, 2012.

SHI, W. *et al.* Gold nanoparticles surface-terminated with bifunctional ligands. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 246, n. 1-3, p. 109-113, 2004.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 715-740, 2017.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 297-310, 2006. id: lil-433401.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis treatment. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 57, suppl. 19, p. 31-37, 2015.

SHIMADZU. Excellence in Science News. Disponível em: <https://www.shimadzu.com/>. Acesso em: 16 fev. 2020.

SILVA, S. H. M. *et al.* Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon Region: Description of Two Cases. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 87, n. 4, p. 710-714, 2012.

SILVA, A. C. C. **Nanotecnologia em diagnóstico e terapia no Brasil.** 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – IPEN, São Paulo, 2015.

SILVA, S. P. *et al.* Phase Transition and Stage-Specific Protein Synthesis in the Dimorphic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Experimental Mycology**, v. 18, p. 294-299, 1994. doi: 10.1016/S0147-5975(06)80002-2.

SILVERSTEIN, R. M. *et al.* **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGH, P.; GUPTA, S. Photovoltaic surface in Plug-in Electric Vehicle (PEV) using Nanotechnology. **International Journal of Scientific and Technical Advancements.**, v. 5, n. 1, p. 33-38, 2019.

SMITH, L. I. **A tutorial on Principal Components Analysis.** Technical Report OUCS-2002-12. New Zealand: Department of Computer Science, University of Otago, 2002.

STORHOFF, J. J. *et al.* One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, n. 9, p. 1959-1964, 1998.

SUKUTA, S.; BRUNCH, R. Factor analysis of cancer Fourier transform infrared evanescent wave fiberoptical (FTIR-FEW) spectra. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 24, p. 382-388, 1999. doi: 10.1002/(SICI)1096-9101.

TAYLOR, B. **Methodus incrementorum directa et inversa.** [s.l]: Nabu Press, 1717.

TEIXEIRA, M. M. *et al.* *Paracoccidioides lutzii*, biological and clinical implications, **Med. Mycol.**, v. 52, n. 1, p.19-28, 2014.

TEIXEIRA, M. M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 52, p. 273-283, 2009.

TERRA, R. F. *et al.* **Introdução à Nanociência e Nanotecnologia.** São Paulo: SENAI-SP, 2014.

THEODORO, R. C. *et al.* Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **Plos One.**, v. 7, n. 5, 2012.

THEOPHANIDES, T. *et al.* **Spectroscopic and Structural Studies of Biomaterials.** Wilmslow: Sigma, 1988.

TOMA, H. E.; ARAKI, K. Nanotecnologia Molecular. **Ciência Hoje USP**, v. 48, n. 284, 2011.

TOMAZETT, P. K. *et al.* 1,3- β -D Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. **Fungal biology**, v. 114, p. 809-816, 2010. doi: 10.1016/j.funbio.2010.07.007.

TRAINOTTI, A. P. *et al.* Perfil dos pacientes com paracoccidioidomicose diagnosticados na disciplina de diagnóstico bucal do curso de odontologia da Unipar – Umuarama, Paraná, Brasil. **Revista Uningá.**, v. 48, p. 90-93, 2016.

TURISSINI, D. A. *et al.* Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology.**, v. 106, p. 9-25, 2017.

TURKEVICH, J. *et al.* A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society.**, v. 11, p. 55-75, 1951.

UNTEREINER, W. A. *et al.* The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Journal Mycologia.**, v. 96, n. 4, 2004.

VARGAS, T. Brasil detêm 80% dos casos de paracoccidioidomicose. **Informe da Escola Nacional de Saúde Pública**, 2013. Disponível em: <http://informe.ensp.fiocruz.br/noticias/34214>. Acesso em: 23 fev. 2016.

VIEIRA, L. S. **Síntese e caracterização de fotossensibilizadores nanoestruturados de terceira geração para terapia fotodinâmica.** 2015. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. 2015.

WANG, H. *et al.* Phenotypic characterization of *Shewanella oneidensis* MR-1 under aerobic and anaerobic growth conditions by using Fourier transform infrared spectroscopy and high-performance liquid chromatography analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 6266-6276, 2010. doi: 10.1128/AEM.00912-10.

WANG, L. *et al.* Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers. **Chemical Communications**, p. 3780-3782, 2006.

WARTEWIG, S. **IR and Raman Spectroscopy: Fundamental Processing.** Wiley-Vch GmbH & Co. KGaA, 2003.

WONG, D. T.; NONAKA, T. Liquid biopsy in head and neck cancer: promises and challenges. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 97, p. 701-708, 2018.

WOOD, B. R. *et al.* FT-IR microspectroscopic study of cell types and potential confounding variables in screening for cervical malignancies. **Biospectroscopy**, v. 4, p. 75-91, 1998. doi: 10.1002/(SICI)1520-6343.

WU, H. *et al.* In situ ATR-FT-IR study on the adhesion of *Pseudomonas putida* to Red soil colloids, **J. Soils Sediments.**, v. 14, n. 3, p. 504-514, 2014.

XIE, X.; LIPKE, P. N. On the evolution of fungal and yeast cell walls. **Yeast.**, v. 27, p. 479-488, 2010.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, p. 112-115, 2008.

YASUDA, M. A. S. *et al.* Consenso em paracoccidiodomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

YE, J.; JANARDAN, R; LI, Q. Two-Dimensional Linear Discriminant Analysis. **Experts@Minnesota**, 2005.

YOUSEFI, S.; SARAJI, M. Optical aptasensor based on silver nanoparticles for the colorimetric detection of adenosine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 213, p. 1-5, 2019.

ZHANG, J.; WANG, S. A fast leave-one-out cross-validation for SVM-like family. **Neural Computing and Applications.**, v. 27, n. 6, p. 1717-1730, 2016. doi: 10.1007/s00521-015-1970-4.

ZHANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano. Today**, v. 4, p. 66-80, 2009.

ZHOU, J. *et al.* Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. **Journal of colloid and interface science**, v. 331, n. 2, p. 251-262, 2009.

ZLOTOGORSKI-HURVITZ, A. *et al.* FTIR-based spectrum of salivary exosomes coupled with computational-aided discriminating analysis in the diagnosis of oral cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, p. 685-694, 2019.

ZWEIBEL, K. Thin film PV manufacturing: materials costs and their optimization. **Sol Energy Mater Sol Cells**, v. 63, p. 375-386, 2000.

ANEXO 1 – PUBLICAÇÕES

Resumo do trabalho de participação no V Simpósio de Física e Astronomia do Vale do Paraíba 2017.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DE TESTES COLORIMÉTRICOS *LABEL-FREE*, PARA DETECÇÃO MOLECULAR

Comparato Filho, O. O.; Cândido, M. A.; Lemes, G. M.; Raniero, L.

Filiações: ¹ Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D), Laboratório de Nanossensores (LNS)

E-mail dos autores: ocfilho69@hotmail.com, marcela.aparecida.candido@gmail.com, gui.lemes.10@gmail.com, Iraniero@univap.br

Resumo do Trabalho: Nanopartículas de ouro são utilizadas em diagnóstico de doenças devido a propriedades óticas importantes. Ao serem sintetizadas em meio aquoso, permanecem dispersas e estabilizadas. Possuem coloração vinho, com banda de Ressonância Plasmônica de Superfície centrada na região dos 523 nm. No processo de desestabilização, que pode ocorrer pela interferência de cargas, são caracterizadas pela cor azul e o centro da banda *SPR* deslocado para comprimentos de onda menos energéticos. Um dos métodos de detecção colorimétrico de DNA baseado em AuNPs é o *Label-free*, que possibilita a detecção de ácidos nucleicos sem a necessidade de funcionalizar as nanopartículas. O teste colorimétrico por essa metodologia é estudado como uma alternativa aos de diagnóstico de doenças tradicionais já existentes, que apresentam, em certos casos, baixa sensibilidade, ou seja, maior probabilidade a fornecer resultados chamados de falso-negativos e baixa especificidade, ou seja, mais propensos a dar resultados falso-positivos. Portanto, métodos moleculares desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da doença e identificação, são de extrema utilidade. O teste positivo é feito utilizando uma mistura composta de nanopartículas de ouro, fita simples de DNA (ssDNA) e uma fita dupla de DNA complementar à fita simples. No teste negativo, a ssDNA não é complementar à fita dupla de DNA. Ambas as amostras são submetidas a um ciclo de temperatura para a desnaturação e o anelamento, possibilitando a estabilização das nanopartículas. Uma análise estatística pode comparar os resultados dos testes revelados pelas soluções salinas. Um recurso matemático envolvendo logaritmos permite a análise da qualidade dos testes positivos, negativos e dos espectros de absorção. Representa-se por a_1 e a_2 os valores de área calculados por meio da integração de duas regiões espectrais. A primeira em torno da banda de 523 nm e a segunda em torno da banda de 650 nm, respectivamente. No caso de $a_1 = a_2$, a razão será igual a 1, logo $\ln 1 = 0$; se $a_1 > a_2$, a razão será maior que 1, logo $\ln (a_1/a_2)$ será positivo; se $a_1 < a_2$, a razão será menor que 1, logo $\ln (a_1/a_2)$ será negativo. Portanto esta equação matemática permite verificar testes positivos e negativos, quando a_1 e a_2 são determinados em regiões coerentes, onde observa-se, para testes positivos, uma diminuição de absorção das regiões mais energéticas em relação às menos energéticas. Para os negativos, existe uma conservação da banda de 523 nm e uma diminuição de absorção das regiões menos energéticas, logo os valores de a_1/a_2 serão maiores que 1. Esse estudo estatístico relaciona no eixo das ordenadas, o logaritmo das razões entre as áreas dos testes negativos e dos positivos, nas determinadas bandas. Um bom resultado, mostra valores positivos para os resultados negativos dos testes e valores negativos para os resultados positivos dos testes. Resultados muito próximos ou iguais a zero, indicam pouca diminuição ou ganho de absorbância, em uma mesma região ou banda, de um teste negativo e positivo, o que não mostra um bom resultado.

TESTES COLORIMÉTRICOS PELO MÉTODO NON-CROSS-LINKING PARA O DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

M.A. Cândido¹, O.C. Filho¹, T.S. Veriato¹, M.L. Castilho², L. Raniero¹.

¹Laboratório de Nanossensores, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil.

²Laboratório de Bionanotecnologia, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil.

marcela.aparecida.candido@gmail.com

Resumo: A nanotecnologia vem desenvolvendo novas técnicas e dispositivos de diagnósticos utilizando nanopartículas. As nanopartículas de ouro têm sido estudadas em virtude de suas características químicas e ópticas que são dependentes de seu tamanho e forma, e podem ser aplicadas em testes colorimétricos para detecção de doenças, como a paracoccidiodomicose (PCM). Atualmente, o diagnóstico da PCM tem baixa precisão devido a reações cruzadas com outras doenças, como a tuberculose, leishmaniose e histoplasiose. Assim, este estudo tem como objetivo desenvolver testes colorimétricos com base na metodologia non-cross-linking para detecção da PCM e analisar estatisticamente as regiões espectrais de 100 testes. Os resultados sugeriram que os testes positivos e negativos apresentam uma banda centrada em 528 nm e 593 nm, respectivamente. A integração das áreas dos espectros de UV-Visível centrados em 515-555 nm e 585-625 nm confirmaram a diferença desses testes. Portanto, este método de detecção é uma ferramenta promissora para diagnóstico preciso da PCM.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Nanopartículas de Ouro, non-cross-linking, paracoccidiodomicose.

Área do Conhecimento: Engenharias.

EXTRAÇÃO DE DNA DO FUNGO *PARACOCCIDIOIDES LUTZII* E AMPLIFICAÇÃO DO GENE *GP43*

T. S. Veriato¹, M. A. Cândido¹, O. C. Filho¹, F. V. Morais³, M. L. Castilho², L. Raniero¹.

¹Laboratório de Nanossensores, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos -SP, Brasil.

²Laboratório de Bionanotecnologia, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos -SP, Brasil.

³Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil.

thaisveriato@hotmail.com

Resumo: As espécies *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*) e *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) são fungos termodimórficos e são causadores da paracoccidioidomicose (PCM). Atualmente, o teste mais utilizado para o diagnóstico da PCM, é o de imunodifusão dupla que utiliza o principal antígeno da PCM, a glicoproteína Gp43, habitualmente produzida a partir de um isolado de *P. brasiliensis*. Os soros de pacientes infectados com *P. lutzii* contêm anticorpos anti-Gp43, que não são reativos à Gp43 produzida, por causa de diferenças conformacionais dessas proteínas entre as espécies, resultando em resultados falso-negativos. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo extrair o DNA do *P. lutzii* pelo método convencional e amplificar uma fração do gene *GP43* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase. A extração do DNA do *P. lutzii* foi bem sucedida e foi possível se amplificar um fragmento de 231 pb do gene da Gp43 com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, *GP43*, diagnóstico molecular.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica

LABEL-FREE COLORIMETRIC TEST FOR *PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS* DIAGNOSIS

M. A. Cândido, O.O. Comparato Filho, G. M. Lemes, V. P. S. Jesus, M. L. Castilho, L. Raniero

*Laboratory of Nanosensors, Research and Development Institute, University of Vale do Paraíba, 2911 Av. Shishima Hifumi, São José dos Campos, São Paulo, Brazil, 12244-000.
E-mail address: marcela.aparecida.candido@gmail.com*

Abstract: The current diagnostic tests for paracoccidiodomycosis (PCM) have low accuracy owing to cross reactions with other diseases. In this study, we develop and evaluate a label-free method to diagnose PCM with high accuracy without cross reactions. Gold nanoparticles and cDNA sequences of target ribosomal DNA were synthesized and tested by adding PCR amplified sample DNA. Results suggest diagnosis with 97% sensitivity and specificity. Thus, gold nanoparticle based label-free method is a promising tool for accurate PCM diagnosis.

1. Introduction

Paracoccidiodomycosis (PCM) is a systemic fungal disease, predominantly occurring in South American countries [1]. The etiological agent is thermos-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and it causes infection in both men and animals. A great challenge in the diagnosis of PCM is the inaccuracy of currently available techniques; which is primarily cross-reactions with diseases such as tuberculosis [2], leishmaniosis and histoplasmosis [3]. Techniques where cross-reaction can be avoided are hence the focus of intense research. Use of gold nanoparticles coupled with specific probes can prevent cross-reactions and has been studied extensively. Dependence of its chemical, optical property, size and shape makes their manipulation easy and amenable to clinical diagnosis.

2. Methods

Gold nanoparticles were prepared by the citrate reduction method described by Lee and Meisel in 1982. The concentration was determined by the Lambert-Beer law assuming an extinction coefficient for the plasmon resonance band maximum (523 nm) of $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ and the synthesized colloidal gold nanoparticle have an average size of 22 nm. Two types of tests were performed using these nanoparticles - a positive test with 50 samples using cDNA sequence of target rRNA, and negative test using the non-cDNA with 50 samples. The samples were mixed with gold nanoparticle, simple ribbon of DNA, cDNA sequence for the negative test (color red) and non-cDNA sequence for the positive test (color blue). The concentrations of amplified DNA sequence, gold nanoparticles, and primers used were $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 2.22 nM, and 164.16 nM, respectively.

MOLECULAR DIAGNOSE BY NANODETECTION

***O. O. Comparato Filho¹, M. A. Cândido¹, G. M. Lemes¹, M. L. Castilho², L. Raniero¹.**

¹ *Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil, Iraniero@univap.br*

² *Laboratório de Bionanotecnologia, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil, mcastilho@univap.br*

Abstract: The paracoccidioidomycosis is caused by inhalation of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*, Pb03 and Pb18) or *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*, Pb01).

Currently, diagnosis involves microscopic identification of pathogen in sputum or detection of specific antibodies in serum. However, these techniques present problems such as cross-reactivity, high false negatives or false positives. The highly sensitive, non-cross-reactive methods require many reagents and expensive equipment, such as Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Nanotechnology may provide cheaper, sensitive and specific alternative method of medical diagnosis. Among other applications, gold nanoparticles were successfully conjugated with Deoxyribonucleic acid (DNA) probes for complementary DNA sequence detection with promisor results. For diagnostic purpose, the color change from red to blue is determinant, which helps identify the positive and negative tests. The current study aims to detect the presence of *P. brasiliensis* using gold nanoparticles (22 nm diameters) combined to pathogen specific GP43 DNA sequences. We evaluated around 200 samples, composed by 50% of positive and 50% of negative samples, and the tests results achieved 100% sensitivity and 96% specificity using this technique. This comparatively less-time consuming and cost-effective label-free gold nanoparticles based colorimetric methodology may have great impact on *P. brasiliensis* molecular identification and diagnosis in remote endemic areas.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; gold nanoparticles; molecular detection; label-free colorimetric tests.

**BIOCHEMICAL DIFFERENTIATION OF *Paracoccidioides brasiliensis* and
Paracoccidioides lutzii BY FOURIER TRANSFORM INFRARED
SPECTROSCOPY**

***O. O. Comparato Filho¹, T. T. Bhattacharjee¹, T. S. Veriato¹, F. V. Morais²,
M. L. Castilho³, L. Raniero¹.**

¹Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil, Iraniero@univap.br

²Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil, flavia@univap.br

³Laboratório de Bionanotecnologia, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil, mcastilho@univap.br

Abstract: In South America, the chronic infectious disease called paracoccidioidomycosis is the third largest cause of death. The inhalation of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*, Pb03 and Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*, Pb01) causes the infection. The 43kDa glycoprotein (gp43) has been using to diagnose this disease, but patients exposed to *Paracoccidioides lutzii* showed irregular reactivity with this antigen, which increases the clinical uncertainty. The clinical manifestation and treatment differ based on the causative agent, making it important to identify them correctly. Therefore, the aim of this study was distinguishing *P. brasiliensis* from *P. lutzii* by Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy - a rapid, highly specific and sensitive technique that can identify biochemical composition with minimal sample preparation. We acquired thirty spectra each from pure cultures of *P. lutzii*, and *P. brasiliensis*, nearly ten spectra per sample in triplicates. The FT-IR spectra showed the difference in biochemical composition, the major differences being in the polysaccharide and proteins vibrations. Principal Component Linear Discriminant Analysis (PC-LDA) could distinguish Pb01 (*P. lutzii*) with 96% efficiency and Pb03/Pb18 (*P. brasiliensis*) with 100% efficiency. The multivariate analysis is important to identify the spectral differences in specific chosen spectra regions where we can take biological or vibrations information. Thus, FT-IR may contribute to clinical diagnosis of this highly prevalent Latin American disease.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*; *Paracoccidioides lutzii*; Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy.

CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO PELO ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (DLS)

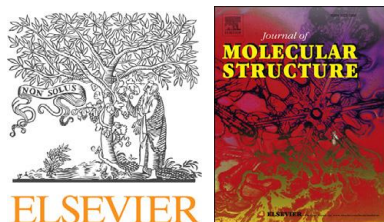
Comparato Filho, O. O.; Rost, N. V.; Veriato, T. S.; Castilho, M. L.; Raniero, L.

Filiações: ¹ Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento (IP&D), Laboratório de Nanossensores (LNS)

E-mail dos autores: comparatofilho@gmail.com, nathannerost@gmail.com, thaisveriato@hotmail.com, mcastilho@univap.br, lraniero@univap.br

Resumo do Trabalho: O avanço da nanotecnologia e o grande interesse nessa área é devido ao fato dos nanomateriais possuírem propriedades distintas das propriedades das moléculas e dos sólidos cristalinos. Em escalas dessa natureza de grandeza, entre 1 nm e 100 nm, a relação entre área superficial e volume das partículas é de extrema importância. Em escalas manométricas, o metal ouro transforma-se em fragmentos permanentes suspensos, ou partículas dispersas e estabilizadas, em uma solução chamada coloidal possuindo alta biocompatibilidade. Nanopartículas de ouro (AuNPs) são utilizadas em diagnóstico de doenças devido a propriedades óticas importantes. A mudança de coloração, do vermelho para o azul, originada por um processo de aglomeração de partículas e que altera a Ressonância Plasmônica de Superfície, possibilita um teste colorimétrico preciso nesse tipo de aplicação. Este fenômeno pode ser explicado pelas equações de Maxwell, que envolvem cálculos de campo e ondas eletromagnéticas. Ao serem sintetizadas em meio aquoso, possuem coloração avermelhada, com banda de Ressonância Plasmônica de Superfície centrada na região dos 523 nm. A síntese das AuNPs foi feita com base na metodologia de *Lee e Meisel*, sendo obtidas partículas com diâmetro em torno de 22 nm. Adicionou-se 25 mL da solução de cloreto de ouro (HAuCl_4) na concentração de 1,41 mM, à 450 mL de água ultrapura; aquecendo até 95°C e agitando constantemente a uma velocidade de rotação de 1000 rpm. A finalização do processo ocorre com a adição de 50 mL de uma solução de citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) na concentração de 5,65 mM. Mantem-se a solução por uma hora em aquecimento e permanecendo em agitação até o resfriamento a 45°C. Após o processo de purificação da amostra, a análise de caracterização foi feita por espectroscopia na região do UV-Vis (padronizada com absorbância de 4,0 u.a. na região de 523 nm) e pelo espalhamento dinâmico da luz (DLS). Foi utilizado o equipamento Zeta Sizer nano – ZS90 da Malvern, no modo “Size”, sendo as cubetas utilizadas de poliestireno. Essa técnica permite determinar o coeficiente de difusão para soluções coloidais de nanopartículas. Utiliza-se um laser como fonte de luz monocromática, dessa forma, é possível detectar flutuações na intensidade de luz dispersa devido ao movimento Browniano dessas partículas. Com o coeficiente e a análise das flutuações é possível calcular o chamado raio hidrodinâmico, através da equação de Stokes-Einstein ($D_h = K_B T / 6\pi\eta D$).

Artigo publicado em revista especializada: Journal of Molecular Structure. 2018.



Journal of Molecular Structure 1177 (2019) 152e159

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/molstruc>

Rapid identification of *Paracoccidioides lutzii* and *P. Brasiliensis* using Fourier Transform Infrared spectroscopy

Olavo O. Comparato Filho ^a, Flavia V. Morais ^b, Tanmoy Bhattacharjee ^a,
Maiara L. Castilho ^c, Leandro Raniero ^{a,*}

^a Laboratório de Nanossensores, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

^b Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

^c Laboratório de Bionanotecnologia, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Article history:

Received 22 May 2018

Received in revised form

20 August 2018

Accepted 11 September 2018

Available online 21 September 2018

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paracoccidioides lutzii*, FT-IR

abstract

The inhalation of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*, Pb03 and Pb18) causes the Paracoccidioidomycosis. Initially, only *P. brasiliensis* was thought to be responsible for it. Later the researchers found out that another pathogen: *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*, Pb01) may also cause the disease. Clinical manifestation and treatment differ based on the causative agent, making it important to identify them correctly. Therefore, this study focusses on distinguishing *P. brasiliensis* from *P. lutzii* using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy - a rapid, highly specific and sensitive technique that can identify biochemical composition with minimal sample preparation. We acquired thirty spectra each from pure cultures of *P. lutzii*, and *P. brasiliensis*. The FT-IR spectra showed the difference in biochemical composition, the major differences being in the polysaccharide and proteins vibrations. Principal Component Linear Discriminant Analysis (PC-LDA) could distinguish the species. We acquired nearly 10 spectra per sample in triplicates, resulting around 30 spectra per group. The analysis of spectra indicates biochemical difference. Multivariate analysis is important to identify spectral differences in specific chosen spectra regions where we can take biological or vibration information. PC-LDA could distinguish Pb01 (*P. lutzii*) with 96% efficiency and Pb03/Pb18 (*P. brasiliensis*) with 100% efficiency. Thus, FT-IR may contribute to clinical diagnosis of this highly prevalent Latin American disease.

Artigo publicado em revista especializada: Brazilian Journal of Physics. 2018.



February 2019, Volume 49, Issue 1, pp 55–61

Paracoccidioides brasiliensis Molecular Detection by the Label-Free Colorimetric Method Using Gold Nanoparticles

Olavo O. Comparato Filho

Marcela A. Cândido

Thaís S. Veriato

Guilherme M. Lemes

Maiara L. Castilho

Leandro Raniero

Condensed Matter

First Online: 18 December 2018

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis (*P. brasiliensis*) is a thermo-dependent dimorphic fungus found in the environment as mycelia ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) also as yeast cells ($\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) in humans. This species is the etiologic agent of Paracoccidioidomycosis (PCM), a chronic granulomatous progressive disease that attacks skin, lungs, and other internal organs. The epidemiological data shows predominance of PCM in South American countries. Brazil itself has 80.0% of cases. This infection is responsible for 52.0% of deaths from Brazilian mycosis. Diagnosis can fail by cross-reaction with other diseases, high costs, and time-consuming procedures. The aim of this study is to identify the presence of *P. brasiliensis* using gold nanoparticles combined to pathogen specific *GP43* or *GP27* DNA sequences added to develop a rapid, low-cost label-free colorimetric diagnostic tool. The label-free colorimetric test was evaluated with 192 samples (96 positive and 96 negative). The receiver operating characteristic results suggest that the technique can identify *P. brasiliensis* effectively. The *GP43* DNA sequences showed 100.0% sensitivity plus 96.0% specificity; *GP27* showed 92.0% sensitivity plus 95.6% specificity. Development of such low-cost diagnostic methods will have great impact in remote endemic areas.

Keywords *Paracoccidioides brasiliensis*, Gold Nanoparticles, Molecular detection, Label-free colorimetric tests



Research on Biomedical Engineering
<https://doi.org/10.1007/s42600-019-00007-0>

ORIGINAL ARTICLE

The comparison between label-free and non-cross-linking methods with gold nanoparticles for colorimetric detection of *Paracoccidioides brasiliensis*

M. A. Cândido¹ & O. O. Comparato-Filho¹ & I. R. Oliveira² & M. L. Castilho³ & L. Raniero¹

Received: 8 August 2018 / Accepted: 4 February 2019
Sociedade Brasileira de Engenharia Biomedica 2019

Abstract

Introduction Paracoccidioidomycosis is a systemic fungal disease caused by thermos-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). Gold nanoparticles (AuNPs) are used in diagnosis because of its versatility and biocompatibility, optical properties influenced by surface plasmon resonance, and the size and geometry.

Methods The colorimetric detection of the fungus *P. brasiliensis* was performed by AuNPs and specific 5.8S ribosomal complementary DNA sequence probe. The label-free methodologies had a final concentration of 2.22 nM, 155.95 nM, and 433.33 μ M for AuNPs, primers, and MgCl₂·6H₂O solution, respectively. For the non-cross-linking method, the final concentration of the thiolate oligonucleotides and MgCl₂·6H₂O solution were 291.54 mM and 0.39 mM, respectively.

Results The Gaussian curve analyses provided Gaussian center, full width at half maximum value, and Gaussian area, which are complementary colorimetric results. The test accuracy calculated using ROC curve analyses for the label-free and non-crosslinking methods were found to be 0.994 and 0.976, respectively. The sensitivity and specificity were 92% and 98.1%, respectively for label free, and 92% and 80%, respectively, for non-cross-linking test.

Conclusion The alternative methodologies can be used in colorimetric detection of fungus *P. brasiliensis*, which the rRNA sequence could be differentiated by alteration in their staining and confirmed by the Gaussian curve and ROC curve analyses.

Keywords *Paracoccidioides brasiliensis* . rRNA . Gold nanoparticle . Label free . Box plots . ROC curve

Encontro de Outono da SBF 2019 / ID: 451-1 1

DIFFERENTIATION BETWEEN *Paracoccidioides brasiliensis* AND *Paracoccidioides lutzii* VIA COLORIMETRIC TESTS

**T. S. Veriato, O. O. Comparato Filho, M. A. Cândido, M. L. Castilho, L. Raniero.
Laboratório de Nanossensores, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento,
Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos,
São Paulo, Brasil, 12244-000**

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a disease caused by thermo-dimorphic fungi that are the *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*) or *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*). The infection occurs through inhalation of conidia by the host in contaminated soil areas. After inhaled, the conidia become yeast causing pulmonary infection and can also spread to other organs. Currently, the serological tests for the PCM diagnosis are not very effective due to cross-reactions with other diseases, leading to false-negative results. In this context, the gold nanoparticles (AuNPs) colloidal solution has the Surface Plasmon Resonance band in the UV-visible range of electromagnetic spectrum, giving a wine color. However, this solution can easily turn it blue, depending on its colloidal stability. This change in the solution color can be controlled through DNA addition and used as a molecular colorimetric test, called Label-Free. The Label-Free is a simple, efficient and low cost diagnostic method, using AuNPs and biological material, which is possible to differentiate a positive molecular detection test from a negative one. The aims of this work were to carry out colorimetric tests for molecular detection of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* fungi, correlating the influence of the cytosine and guanine bases percentages in the DNA sequences. Tests were carried out and the results showed colorimetric differences that were observed in the color intensities and confirmed in the UV-Visible spectra.

Resumo do trabalho de participação no XXIII INIC / XIX EPG UNIVAP 2019: O local frente ao global: pesquisa, ciência e os povos indígenas do Brasil.

DETECÇÃO MOLECULAR VIA NANOTECNOLOGIA

**Thaís da Silva Veriato¹, Marcela Aparecida Cândido¹, Olavo de Osti Comparato Filho¹,
Maiara Lima Castilho¹, Leandro Raniero¹.**

¹Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, thaisveriato@gmail.com, marcela.aparecida.candido@gmail.com, ocfilho69@hotmail.com, mcastilho@univap.br, lraniero@univap.br

Resumo - A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica causada pelas espécies *Paracoccidioides lutzii* (*P.lutzii*) ou *Paracoccidioides brasiliensis* (*P.brasiliensis*). Atualmente, no diagnóstico da PCM, a detecção do agente causador da infecção não é fácil, visto que os testes sorológicos, muitas vezes não são eficazes por apresentarem resultados falsos negativos. Neste âmbito, a propriedade ótica das nanopartículas de ouro (AuNPs), que permite a mudança de coloração da solução coloidal, proporciona o desenvolvimento de diferentes métodos colorimétricos, como a tecnologia *Label Free*, de baixo custo e de fácil execução. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo utilizar as AuNPs como um sensor na detecção molecular do *P. Lutzii* por meio da tecnologia *Label Free*. Os resultados analisados estatisticamente dos 70 testes apresentaram uma sensibilidade e especificidade de 89%, sugerindo a tecnologia *Label Free* como um possível método de diagnóstico molecular para a detecção da PCM.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides lutzii*, diagnóstico molecular, nanopartículas de ouro.

Área do conhecimento: Engenharias.

Resumo do 1º trabalho de participação no 17th International Conference on Advanced Nano Material 2020, Aveiro, Portugal:

Characterization of IONPs stabilized by sodium citrate

M. A. (Cândido)¹, N. C. V. (Rost)¹, O. O. (Comparato Filho)¹, P. M. S. C. M. (Leite)², P. (Carneiro)⁴, M. L. (Castilho)³, M. C. S. (Pereira)⁴ and L. (Raniero)*¹

¹Laboratório de Nanossensores, IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, Brazil (Iraniero@univap.br)

²Central de Laboratórios Multiusuários, IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, Brazil

³Laboratório de Bionanotecnologia, IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, Brazil

⁴LEPABE, Dep. Eng. Química, Fac. Eng. Uni. Porto, R. Dr. Roberto Frias, 42, 4200-072 Porto - Portugal

INTRODUCTION

Iron oxide nanoparticles (IONPs), owing to superparamagnetic properties, had been of interest for Magnetic Resonance Imaging and Magnetic Particle Imaging, magnetic fluid hyperthermia and controlled drug release¹. Among the chemical routes to produce IONPs, coprecipitation in alkaline media, first proposed by Massart (1981), enables high nanoparticles production in a simple, easy and quick way². In this work, IONPs were synthesized by coprecipitation and the effects of the stabilizer sodium citrate on hydrodynamic and physical diameter and Zeta Potential were investigated.

EXPERIMENTAL STUDY

The synthesis protocol of IONPs was adapted from Mérida and collaborators (2015)³. A mixture containing iron (II) and iron (III) was prepared in deionized water, in molar ratio 1:2, and the processes were made under inert atmosphere, 250 rpm and 85 °C. The precipitation of the iron oxides occurred through addition of 35 mL of ammonium hydroxide 28% v/v and the pH was maintained between 8 and 9 during the reaction. Then, the magnetic solution was centrifuged at 1,500 rpm for 10 min, the supernatant was discarded and a solution of sodium citrate (1 mol L⁻¹) was added. The final product was ultrasonicated until achieve a total energy of 70 kJ, centrifuged at 1,800 rpm for 10 min and the black paste dried in air overnight.

RESULTS AND DISCUSSION

The hydrodynamic diameters measured by Dynamic Light Scattering (DLS) of the IONPs (without stabilizer) and IONPs@cit (with stabilizer) are presented in Fig. 1.

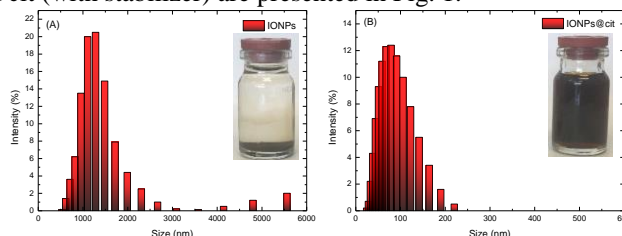


Fig. 1: Size distribution of (A) IONPs and (B) IONPs@cit

DLS indicated a size of 1,283 nm with polydispersity index (PdI) 0.151 for IONPs, which demonstrates the presence of aggregates and a broad size distribution. On the other hand, IONPs@cit had shown a diameter of 69.70 nm and PdI 0.170, confirming that citrate ions improve the size distribution and dimensions at nanoscale range. Moreover, whilst the Zeta Potential of IONPs was found to be -35.5 mV, sedimentation of this sample was observed as shown in Fig. 1(A). IONPs@cit presented a value of -48 mV at pH 8, which is highly stable. The micrograph obtained by SEM-FEG, illustrated in Fig. 2, shows the spheres-like nanoparticles morphology of IONPs@cit. The physical size distribution was obtained by using ImageJ version 1.48 (NIH). Therefore, at least 500 nanoparticles were considered in this analysis, with aspect ratio ≤ 1.6 and the average size was found to be 13.5 ± 0.25 nm. Once DLS is sensitive to aggregates, whereas SEM-FEG images individual particles, a difference between the hydrodynamic and physical diameters of the nanoparticles was observed.

Resumo do 2º trabalho de participação no 17th International Conference on Advanced Nano Material 2020, Aveiro, Portugal:

The influence of photodynamic therapy associated with nanoprobes in the type of cell death

V. P. S. (Jesus)¹, O. O. (Comparato Filho)¹, P. F. A. (Vieira)¹, P. (Carneiro)³, M. L. (Castilho)², M. C. S. (Pereira)³ and L. (Raniero)^{1*}

¹Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Brazil, corresponding author (Iraniero@univap.br)

²Laboratório de Bionanotecnologia, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Brazil

³LEPABE, Dep. Eng. Química, Fac. Eng. Uni. Porto, R. Dr. Roberto Frias, 42, 4200-072 Porto - Portugal

INTRODUCTION

Photodynamic Therapy (PDT) is an effective method for treating several types of cancer by irradiation of photosensitive agents (drugs) in presence of molecular oxygen, which has fewer side effects than chemotherapy and radiotherapy¹. Moreover, this therapy has no cumulative toxicity and can also be applied for immunocompromised patients². In order to enhance therapies targeting mammary adenocarcinoma cells, the present work investigated the apoptotic action of bifunctional nanoprobes (BNP) on MDA-MB-468 cell line. The nanoprobes were composed by gold nanoparticles functionalized with Epidermal Growth Factor (EGF) protein for targeting the specific receptors family and photosensitizer chlorin e6 (Ce6), activated by PDT. The type of cell death was determined by Tali apoptotic test.

EXPERIMENTAL

The preparation of bifunctional nanoprobes was based on the methodology described by CASTILHO et al. (2017)³.

For the PDT assay, MDA-MB-468 (human breast carcinoma) cells were seeded into 96 well plates at a concentration of 1×10^5 cells per well, in 0.2 ml of complete culture medium L-15 (Leibovitz, Sigma Life Science, and L4386-10x 1L). After cell adhesion, the medium was replaced by bifunctional nanoprobes (0.2 and 1.2 $\mu\text{g/ml}$) and incubated for 2 h, under culture conditions. The irradiation was performed using the LED Irrad-Led5 660 (Biopdi) at 660 nm, 25 mW, at a dose of 25 J/cm². The type of cell death in the experiments was determined by Tali® Apoptosis kit (Life Technologies, A10788), using Image-Based Cytometer, IBC (Life Technologies™).

RESULTS AND DISCUSSION

The effectiveness of BNP combined to PDT in MDA-MB-468 cells is shown in Fig. 1.

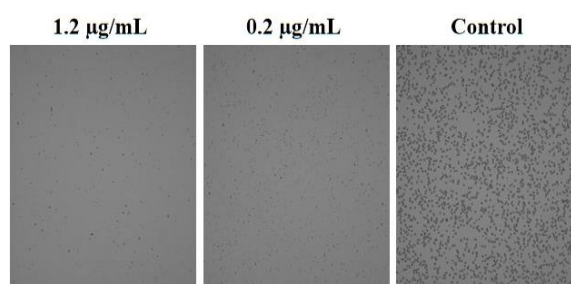


Fig. 1 – Image-Based Cytometer of BNP action.

Resumo do 3º trabalho de participação no 17th International Conference on Advanced Nano Material 2020, Aveiro, Portugal:

The efficiency of silver nanoparticles as a broad-spectrum antibacterial drug

A. C. (Lima)¹, I. F. (Silva)¹, O. O. (Comparato Filho)², P. (Carneiro)³, M. C. S. (Pereira)³,
L. (Raniero)² and M. L. (Castilho)^{1*}

¹Laboratório de Bionanotecnologia, IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, Brazil
(mcastilho@univap.br)

²Laboratório de Nanossensores, IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, Brazil

³LEPABE, Dep. Eng. Química, Fac. Eng. Uni. Porto, R. Dr. Roberto Frias, 42, 4200-072 Porto - Portugal

INTRODUCTION

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*, Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, Gram-positive) bacteria are commonly found in the human organism of healthy individuals. These microorganisms have become clinically relevant due to multidrug resistant strains that have hindered the empirical treatment in intensive care unit¹. In the health area, silver nanoparticles (AgNPs) have been explore for presenting characteristics such as good conductivity, bactericidal action, etc. The action mechanisms of AgNPs present effective levels against resistant strains, as they adhere to bacterial membrane and penetrate the cytoplasm leading to microorganism death². In this work, AgNPs were tested as a broad-spectrum bactericidal agent with the objective of decreasing the mortality and morbidity of infections caused by these microorganisms.

EXPERIMENTAL

The colloidal AgNPs were synthesized using citrate reduction method with a diameter of 54 nm³. The concentration was determined by the Lambert-Beer law assuming an extinction coefficient ($10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) for the plasmon resonance band at 413 nm. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the AgNPs towards of *K. pneumoniae* (ATCC 700603) and *S. aureus* (ATCC 25923) were determined by a broth micro-dilution method. The inocula of 10^5 CFU/mL were added to 96-well microplate Mueller Hinton broth and different concentrations of the AgNPs, followed by incubation at 35 °C for 24 h. Then, 10 µL from each well were added to the Brain Heart Infusion Agar to determine the MBC. The analysis of the AgNPs efficiency was measured using optical density at 660 nm (OD_{660}).

RESULTS AND DISCUSSION

MIC is a gold standard method to determine the lowest concentration of antimicrobial necessary to inhibit the microorganism growth. The *K. pneumoniae* and *S. aureus* were exposed to different AgNPs concentrations as a broad-spectrum bactericidal agent. Table 1 shows the MIC and MBC values towards colloidal AgNPs. The *K. pneumoniae* has grown at concentrations of 200 ppm and 400 ppm exhibiting 25 % and 11 % of the viability, respectively, but concentrations above 800 ppm were able to inhibit all metabolic activities of the bacterium.

Resumo do trabalho de participação no XX EPG UNIVAP 2020: Sociedade em rede: educação, pesquisa e desafios nos tempos atuais.

INFLUÊNCIA NO SINAL DE ELETRODOS DE CARBONO MODIFICADOS COM NANOMATERIAIS.

***Olavo de Osti Comparato Filho¹, Pedro Jorge da Silva Carneiro^{2,3},
Simone Moraes², Leandro José Raniero¹, Maria do Carmo Pereira³.***

¹Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, comparatofilho@gmail.com, Iraniero@univap.br.

²REQUIMTE-LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4249-015 Porto, Portugal, pedro.carneiro@graq.isep.ipp.pt, sbm@isep.ipp.pt.

³LEPABE. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, R. Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal, mcsp@fe.up.pt

Resumo – O objetivo deste trabalho é estudar, por análise eletroquímica, a influência da fixação de nanotubos (parede simples) de carbono e de nanopartículas de ouro no sinal elétrico de resposta de eletrodos impressos descartáveis de carbono. A metodologia adotada envolveu a utilização de soluções do indicador eletroquímico $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ nas concentrações 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10,0 mM. As técnicas de voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica foram selecionadas para a quantificação das espécies em solução. As análises mostraram valores de pico de corrente elétrica resultantes do processo de oxidação-redução que ocorre durante o experimento. A partir da concentração 5,0 mM a resposta em valores de pico de corrente, pela voltametria de onda quadrada, permaneceram estáveis. Na voltametria cíclica, o aumento da concentração implica no crescimento linear da resposta. A fixação de uma camada de nanotubos de carbono, nos eletrodos, promove um aumento médio de 31% nos valores de pico de corrente e, uma sobre camada de nanopartículas de ouro 58%. Concluímos que a fixação de nanomateriais influenciam significativamente o sinal elétrico.

Palavras-chave: Biossensor, eletrodo impresso descartável de carbono, nanotubos de carbono, voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra – Física/Química.

ACS NANO

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

RECOGNIZES

Marcela A. Cândido, O.O. Comparato Filho, V. P. S. Jesus, M. L. Castilho, L. Raniero
Laboratory of Nanosensors, Research and Development Institute, University of Vale do Paraíba

"Label-free colorimetric test for Paracoccidioidomycosis diagnosis"

FOR BEST POSTER

ICNP: 10th International Conference on
Nanophotonics

Recife, PE, Brazil
July 2017



XXI INIC XVI EPG XX INIC XV INID
CIÊNCIA | CIÊNCIA
QUE QUE
APROXIMA | LIBERTA

Dias 26 e 27
de outubro
de 2017

www.inicepg.univap.br

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "TESTES COLORIMÉTRICOS PELO MÉTODO NON-CROSS-LINKING PARA O DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE", foi premiado na área Engenharias no XXI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica (XXI INIC), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 26 e 27 de outubro de 2017.

São José dos Campos, 27 de outubro de 2017.

Profa. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação Stricto-Sensu

Realização:



Apoio:



ANEXO 3 – CARTA E DECLARAÇÃO MOBILIDADE UP



ANUÊNCIA INSTITUCIONAL DA FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Para os devidos efeitos, a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP) declara que **Olavo de Osti Comparato Filho**, estudante do Programa de Pós-Graduação em Física, área Física da Matéria Condensada, da Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, será aceite, após cumprimento de todos os procedimentos de candidatura à mobilidade na U.Porto/FEUP, para realizar trabalho de investigação nesta Faculdade, no período entre setembro de 2019 e agosto de 2020, sendo a sua orientadora, a Professora Maria do Carmo Pereira, do Departamento de Engenharia Química da FEUP.

Mais se acrescenta que os meios necessários para o desenvolvimento das atividades constantes da mobilidade proposta, serão disponibilizados pelo Departamento de Engenharia Química desta Faculdade.

Declara-se ainda que, no âmbito do acordo de cooperação em vigor entre a U.Porto/FEUP e a Universidade do Vale do Paraíba (Brasil), o estudante estará isento do pagamento de taxas de bancada (bench fees) durante o período de realização do intercâmbio.

PORTO e FEUP, 18 de março de 2019.

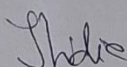
A Subdiretora da FEUP

Ana Maria Mendonça
Professora Associada

DECLARAÇÃO

Para os devidos efeitos, declaramos que **Olavo Filho**, estudante da Universidade do Vale do Paraíba (Brasil), foi estudante na *Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto*, tendo realizado um período de estágio/investigação programado entre 06/09/2019 e 26/08/2020, isentado do pagamento de taxas académicas ao abrigo de Acordo de Cooperação.

Porto, FEUP, 27 de agosto de 2020



Ilídia Maia

Cooperation Unit, Incoming Mobility Officer

