

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

PAULA PERDIGÃO ROCHA

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOESFERAS DE OURO PARA DETECÇÃO
DO ANTÍGENO gp43 DE *Paracoccidioides brasiliensis***

OURO PRETO

2017

PAULA PERDIGÃO ROCHA

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOESFERAS DE OURO PARA DETECÇÃO
DO ANTÍGENO gp43 DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Projeto de pesquisa apresentado à disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso II na Escola de
Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva
Coorientadora: Doutora Cyntia Silva Ferreira

Ouro Preto

2017

R672f

Rocha, Paula Perdigão.

Funcionalização de nanoesferas de ouro para detecção do antígeno gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* [manuscrito] / Paula Perdigão Rocha. - 2017.

33f.: il.: color; grafs.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Cyntia Silva Ferreira.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Nanoesferas de Ouro. 3. Biossensor Plasmônico. I. Silva, Breno de Mello. II. Ferreira, Cyntia Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 579.887

Catálogo: ficha@sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

TERMO DE APROVAÇÃO

FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOESFERAS DE OURO PARA DETECÇÃO DO ANTÍGENO GP-43 DE *Paracoccidioides brasiliensis*

Trabalho de conclusão de Curso defendido por **PAULA PERDIGÃO ROCHA**, matrícula 11.1.2066 em 18 de agosto de 2017, e aprovado pela comissão examinadora:

Breno de Mello Silva

Prof. Dr. Breno de Mello Silva
DECBI-ICEB-UFOP, orientador

Cyntia Silva Ferreira

Dra. Cyntia Silva Ferreira

Tatiane Roquete Amparo

Profa. MSc. Tatiane Roquete Amparo
CIPHARMA/EF-UFOP

Giani Martins Garcia

Dra. Giani Martins Garcia
CIPHARMA-UFOP

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família e a todos que amo, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, pela graça da vida e por me guiarem em meus caminhos;

Ao professor Breno, agradeço pela oportunidade de orientação e pelo apoio;

À Cyntia, por toda paciência, atenção, cuidado, carinho e por seu precioso tempo dedicado a mim;

Aos meus pais Paulo e Fátima, por todo amor, incentivo e confiança;

Às minhas irmãs Isadora e Gabriela, minhas confidentes e amigas;

Ao Eduardo, pelo amor, cuidado e compreensão e toda sua família;

À República Damas de Ouro, ex-alunas e moradoras, por serem minha família em Ouro Preto, especialmente Ana Luíza pela imensa ajuda;

Ao Centro Acadêmico de Farmácia José Badini, especialmente aos amigos da chapa Equilíbrio Acadêmico (2016-2017), que tanto me ensinou e acrescentou como profissional e pessoa;

Ao Projeto Âmbar, colegas e professores, singularmente Vanja, pelo aprendizado e oportunidade concedida;

A todos os amigos que contribuíram para minha formação e torceram por mim, especialmente João (sem palavras para você), Camps, Batom, Mari, Fer, Lígia, Gabi, Rachel, Paulinha, Tamires, Amaia, Gagá, Rúbia, Larys.

Muito obrigada!

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por duas espécies de um fungo termodimórfico: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. A doença está associada a fatores sociais e econômicos e é muito prevalente na América Latina. Uma vez no interior do hospedeiro, o patógeno pode permanecer em estado de latência ou se disseminar sistemicamente, atingindo inclusive o sistema nervoso central. No caso de infecções mais graves e progressivas, o quadro acaba evoluindo ao óbito. Assim, deve haver uma intervenção terapêutica de forma correta e um rápido diagnóstico. As nanoesferas de ouro representam uma maneira de diagnosticar a doença, detectando antígenos específicos por meio de uma absorção característica no espectro visível, a ressonância de plasmon, que pode ser monitorada por espectrofotometria. Dessa forma esse trabalho utilizou nanoesferas de ouro como possíveis biossensores, funcionalizadas com o reagente ligante polietilenoimina (PEI) e bioconjugadas ao anticorpo anti-gp43, específico para o antígeno mais abundante do patógeno *P. brasiliensis*. Após a construção desse biossensor o sistema foi testado para a detecção da glicoproteína gp43 presente na solução denominada paracoccidioidina e apresentou uma aglomeração que indica a detecção satisfatória. Esse fato foi corroborado após interação com a proteína BSA, em que não houve aglomeração. O sistema foi testado ainda com soro de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados com PCM, não apresentando diferenças nas aglomerações. Embora esses resultados indiquem que o sistema precisa ser aprimorado para o diagnóstico da doença em humanos, foi demonstrada sua funcionalidade para a detecção do alvo purificado, apontando êxito em tais análises preliminares.

Palavras chave: Paracoccidioidomicose; nanoesferas de ouro; biossensor plasmônico.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by two species of a thermodynamorphic fungus: *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. The disease is associated with social and economic factors and is very prevalent in Latin America. Once inside the host body, the pathogen can remain in a state of latency or be spread systemically, reaching even the central nervous system. In the case of more serious and progressive infections, the clinical state can lead to death. Thus, there must be a correct therapeutic intervention and a rapid diagnosis. Golden nanospheres represents a way of diagnosing the disease by detecting specific antigens by means of a characteristic absorption in the visible spectrum - the plasmon resonance - which can be monitored by spectrophotometry. Hence, this paper utilized gold nanospheres as possible biosensors, functionalized with the polyethyleneimine (PEI) binding reagent and bioconjugated to the anti-gp43 antibody, specific for the most abundant antigen of the *P. brasiliensis* pathogen. After the construction of this biosensor, the system was tested for the detection of the glycoprotein gp43 present in the solution called paracoccidioidina and had shown an agglomeration that indicates a satisfactory detection. This fact was corroborated after interaction with the BSA protein, in which there was no agglomeration. The system was also tested with serum from healthy individuals and patients diagnosed with PCM, showing no differences in agglomerations. Although these results indicate that the system needs to be improved for the diagnosis of the disease in humans, its functionality for detection of the purified target has been demonstrated, pointing out success in such preliminary analyzes.

Key words: Paracoccidioidomycosis; golden nanospheres; biosensor plasmid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fungo de <i>Paracoccidioides Brasiliensis</i> em seu aspecto “roda de leme”. Presença de célula mãe rodeada por brotamentos.....	7
Figura 2: Diferentes tipos de liga com o elemento ouro.....	12
Figura 3: Ilustração da excitação do dipolo formado em função do efeito de plásmon de superfície para partículas esféricas.....	14
Figura 4: Ilustração da síntese de nanoesferas de ouro.....	17
Figura 5: Ilustração da bioconjugação de anticorpos.....	20
Figura 6: Ilustração referente ao teste para a capacidade de detecção de nanoesferas de ouro.	
Figura 7: Estrutura tridimensional básica de um anticorpo.....	20
Figura 8: Ilustração da confirmação da ligação efetiva dos anticorpos às nanoesferas de ouro, em um sistema incubado à gp43 e BSA.....	21
Figura 9: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de nanoesferas de ouro.....	23
Figura 10: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de nanoesferas de ouro e de nanoesferas funcionalizadas com o reagente PEI.....	24
Figura 11: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de nanoesferas de ouro, nanoesferas funcionalizadas com o reagente PEI e nanoesferas bioconjugadas ao anticorpo anti-gp43.....	25
Figura 12: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do biossensor após interação com paracoccidioidina e após interação com BSA.....	26
Figura 13: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do biossensor após interação com soro de pacientes saudáveis e após interação com soro de pacientes diagnosticados com PCM.....	27

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AuNPs – Nanopartículas de Ouro

M – Concentração Molar

NaCl – Cloreto de Sódio

PCM – Paracoccidiodomicose

SPR - Ressonância de Plasmon de Superfície

BSA- Soro Fetal Bovino

PEI- Polietilenoimina

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

PCR – Proteína C Reativa

CIE – Contra-imunoeletoforese

EDAC - Cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida

NHS - N-hidroxisuccinimida

DID – Imunodifusão dupla

Sumário

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Paracoccidiodomicose	7
2.2 Aspectos Clínicos da doença	8
2.3 A proteína gp43	8
2.4. Disgnóstico clínico e microbiológico.....	8
2.5 Nanotecnologia	11
2.6 Nanopartículas	11
2.7 Propriedades ópticas e Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR).....	13
2.8 Sensor plasmônico colorimétrico de ouro coloidal.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. METODOLOGIA	17
4.1 Síntese de nanoesferas de ouro	17
4.2 Funcionalização das nanoesferas de ouro	18
4.3. Biossensoriamento: Ligação à paracoccidiodina e BSA	21
4.4. Teste com soro de pacientes infectados e indivíduos saudáveis.....	22
4.5 Instrumentação.....	22
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença pulmonar causada por duas espécies de um fungo: *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. É uma micose granulomatosa sistêmica altamente prevalente na América Latina, com aproximadamente 80% dos casos relatados no Brasil (Coutinho *et al.*, 2015). Além disso, está associada a fatores sociais e econômicos e ainda é negligenciada no contexto da saúde pública.

As infecções podem ser severas e progressivas, envolvendo o tecido pulmonar e até mesmo o sistema nervoso central. Desse modo, sem uma intervenção terapêutica específica, o quadro da maioria dos pacientes acaba evoluindo para o óbito. No âmbito do diagnóstico clínico, não existe ainda um diagnóstico rápido e preciso da infecção, o qual ainda é realizado através de isolamento e crescimento do patógeno. Alguns centros de referência clínica realizam o diagnóstico através de exames sorológicos, como ELISA, ou testes moleculares, como PCR. No entanto, considerando a situação econômica das áreas endêmicas, esses ensaios demandam capacitação técnica e alto custo de execução.

Nesse sentido, as nanopartículas de ouro (AuNPs) representam uma alternativa para o diagnóstico da PCM, pois possuem uma forte absorção característica no espectro visível (Ressonância de Plasmon de Superfície - SPR) que pode ser monitorada facilmente por espectrofotometria. Esse fenômeno é criado quando a radiação eletromagnética excita elétrons livres nas nanopartículas de metal, causando polarização das partículas. O meio circundante é alterado pela ligação entre as biomoléculas e as nanopartículas de ouro, causando deslocamentos ou alterações de padrão na banda de absorção plasmônica, afetando a densidade de cargas de elétrons na superfície. Além disso, as nanoesferas de ouro sofrem um processo de aglomeração que pode ser facilmente visualizado por meio da espectrofotometria ou inclusive visualmente, causando alteração da cor da solução. Ao funcionalizar a superfície das nanopartículas de ouro com o anticorpo anti-gp43 obtem-se um biossensor que sofrerá modificações após interação com o antígeno complementar, reconhecendo-se assim a molécula de interesse.

Por meio da nanotecnologia, empregando-se nanopartículas de ouro, esse trabalho estabeleceu a funcionalização de nanoesferas para uma possível construção de um biossensor plasmônico e colorimétrico empregando o anticorpo anti-gp43 de *P.brasiliensis*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose está incluída no rol de doenças negligenciadas, as quais pela própria natureza de acometimento em regiões geralmente habitadas por populações de baixa renda, possuem investimentos reduzidos no controle, na produção de medicamentos e nas pesquisas relacionadas a ela. É uma doença pulmonar causada por duas espécies do fungo *Paracoccidioides*: o *Paracoccidioides brasiliensis* ou *Paracoccidioides lutzii*. A doença é prevalente na América Latina, com altas taxas de incidência relatadas no Brasil (Coutinho *et al.*, 2015). Podem apresentar brotamentos únicos ou múltiplos que são os blastoconídios dispostos em torno da levedura mãe, à qual se unem por estreitas pontes celulares. Sua imagem microscópica lembra a roda de leme de navio (figura 1) (LACAZ, 1994).

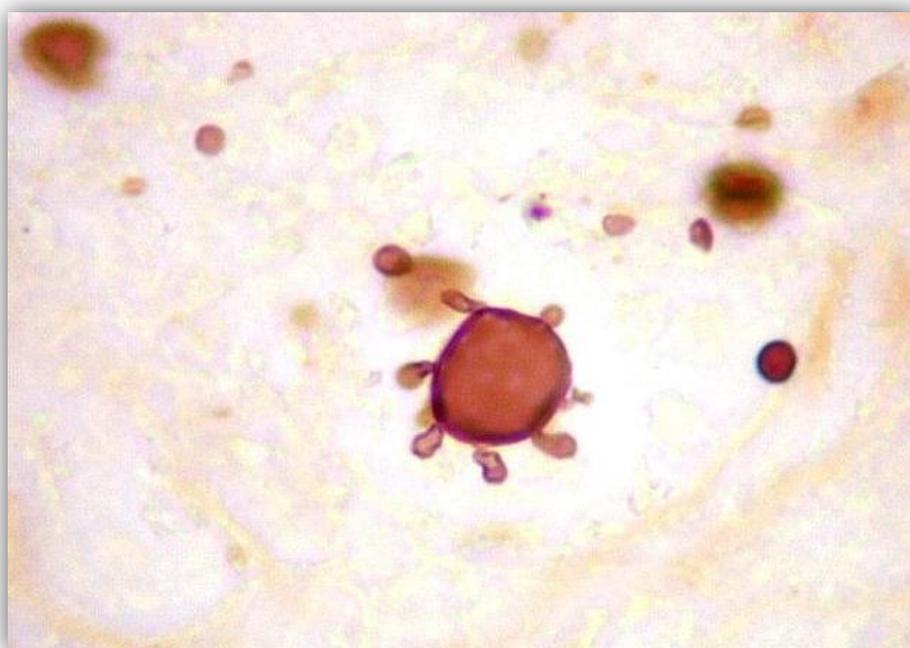


Figura 1: Fungo de *Paracoccidioides Brasiliensis* em seu aspecto “roda de leme”. Presença de célula mãe rodeada por brotamentos.

Os maiores números de casos concentram-se no Brasil, na Colômbia e na Venezuela, sendo que aproximadamente 80% ocorrem somente no Brasil, principalmente nos estados de

São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso, ao passo que 27% dos casos se concentram no Norte do Brasil, ao longo da fronteira sul da região amazônica (Coutinho *et al.*, 2015).

Por ser uma doença negligenciada, a PCM ainda não está incluída como objeto de vigilância epidemiológica nacional (Martinez, 2010). No entanto, alguns avanços podem ser notados, já que a PCM já foi incluída na relação de doenças identificadas como prioridade para pesquisa na América Latina e em alguns estados brasileiros passou a integrar o rol das doenças de notificação obrigatória (Dujardin *et al.*, 2010).

2.2 Aspectos Clínicos da doença

As pessoas afetadas pela doença apresentam indisposição, mal-estar generalizado, anorexia, e emagrecimento por vezes tão intenso que podem levar à caquexia, sendo essas as características gerais. A febre, muitas vezes, não se encontra presente e pode ser considerada um sinal de gravidade, visto que, pela imunossupressão causada pela doença pode precipitar quadros infecciosos causados por doenças oportunistas, ou agudizar as que estejam presentes. O pulmão, embora seja o órgão mais frequentemente acometido, apresenta muitas vezes um quadro inicial silencioso, com sintomatologia inespecífica com tosse, dispnéia e expectoração purulenta. A tríade lesional mais frequente da paracoccidiodomicose é constituída pelas lesões orofaríngeas, ganglionares e pulmonares (Tommasi, 1977).

2.3 A proteína gp43

O primeiro antígeno do patógeno a ser clonado, inteiramente sequenciado e expresso como proteína de fusão em bactéria, foi identificado e purificado em 1986, consistindo de uma glicoproteína extracelular de 43-kDa denominada gp43. Trata-se de um componente da superfície celular, secretada pelo fungo como aglomerados através de regiões definidas na parede celular em sua fase exponencial de crescimento (Straus *et al.*, 1996). A gp43 extracelular processada contém um único sítio de N-glicosilação ocupado por 14 resíduos de manose não-fosforilados e um terminal de β -D-galactofuranose (Almeida *et al.*, 1996).

A proteína é considerada um fator de virulência envolvido nos mecanismos iniciais da infecção. É capaz de inibir a fagocitose e a morte intracelular dos fungos, estimular a formação de granulomas *in vitro* e ainda apresenta epítomos de células T que induzem resposta protetora contra o fungo (Vigna *et al.*, 2006). Além disso, apresenta efeito

proteolítico sobre o colágeno, elastina, caseína e facilita a adesão do patógeno às células epiteliais do hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 2008).

Desde sua descrição, a gp43 tem sido amplamente empregada no imunodiagnóstico da doença, com alta especificidade e sensibilidade, uma vez que somente ela é reconhecida em 100% dos pacientes com PCM, havendo poucos casos atípicos relatados com ausência desse anticorpo detectável (Puccia *et al.*, 1986; Vidal *et al.*, 2005). No entanto, a gp43 não é uma molécula totalmente específica, uma vez que sua composição de carboidratos contém epitopos reconhecidos por soros heterólogos, principalmente por histoplasmose (de Camargo, 2008).

2.4 Diagnóstico clínico e microbiológico

O diagnóstico clínico da paracoccidiodomicose ainda é um desafio visto que alguns parâmetros analisados podem imitar características de outros tipos de doenças respiratórias, além de fornecer resultados variáveis (Teles & Martins, 2011). Nas formas mais graves da doença, as lesões mucosas devem ser diferenciadas da leishmaniose tegumentar, histoplasmose e de lesões neoplásicas. Entre as doenças respiratórias, a diferenciação deve ser feita principalmente com a tuberculose e histoplasmose. Por sua vez, as manifestações cutâneas podem confundir-se com formas linfocutâneas e verruciformes da esporotricose, lobomicose (doença de Jorge Lobo), hanseníase, ou com neoplasias de pele (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). A PCM-infecção, definida como infecção assintomática causada por *P. brasiliensis* em indivíduos que vivem em área endêmica e reativos ao teste cutâneo da paracoccidiodina, pode ser diagnosticada por pequenas quantidades de gp43 no soro (de Camargo, 2008).

A importância de um diagnóstico rápido e preciso da PCM reside na possibilidade do início da terapia específica a fim de evitar o aumento dos danos ao pulmão, além da disseminação do fungo para outros órgãos e o desenvolvimento de fibrose (Fernandes *et al.*, 2011). Manifestações orais da doença, como a presença de ulcerações de aspecto moriforme, geralmente acompanhada de sialorréia, sangramento, não devem ser desconsideradas, pois podem facilitar o diagnóstico precoce e a terapêutica medicamentosa rápida (Soares *et al.*, 2013).

O exame microscópico direto caracteriza-se pela presença do agente etiológico a partir de exame a fresco, biópsia ou pelo isolamento e identificação do fungo em cultivo do material clínico (Nucci *et al.*, 2009). Também pode ser realizado pela presença de leveduras em

brotamento no escarro através de exame direto com KOH 30% (de Camargo, 2008). Os fungos podem ser visualizados como células arredondadas de diâmetro entre 2 a 40µm, com presença de célula mãe cercada de “brotos” comumente chamada de “aspecto em roda de leme”, além de paredes birrefringentes e esverdeadas. Espécimes de biópsia tecidual apresentam formação granulomatosa com células gigantes, multinucleadas e infiltrados polimorfonucleares (Moreira, 2008; Nucci *et al.*, 2009). O diagnóstico deve ser considerado apenas quando as leveduras são variáveis em tamanho e são observados tais brotamentos tubulares advindos de uma célula mãe.

Embora o diagnóstico microbiológico seja considerado o padrão ouro para confirmação da doença, trata-se de uma técnica não-sensível e bastante demorada, além da dificuldade na obtenção de materiais clínicos (Brummer *et al.*, 1993; de Camargo, 2008).

A contra-imunoeletroforese (CIE) também pode ser empregada para diagnóstico precoce da PCM, e assim como em outros testes, os antígenos utilizados variam entre laboratórios. Geralmente se constituem de extratos sonicados de suspensões celulares de levedura, antígenos exocelulares de culturas de micélio e antígenos livres de células (CFAg) obtidos a partir de leveduras (de Camargo, 2008). Já foram relatadas sensibilidade entre 77% e 97% e especificidade de 95% nesses testes. No entanto, por se tratar de um método mais caro, não é empregado rotineiramente no diagnóstico, sendo mais comumente empregado para monitorar pacientes durante o tratamento (Del-Negro *et al.*, 1991).

A imunodifusão dupla (DID) é o exame mais utilizado no imunodiagnóstico da PCM. Além de possuir baixo custo e simplicidade, o teste apresenta elevada especificidade. No entanto, sua sensibilidade pode variar de 65 a 100% dependendo do tipo de antígeno utilizado (Cano & Restrepo, 1987; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

Embora amplamente empregado, o diagnóstico sorológico com base na detecção de anticorpos apresenta algumas limitações. No início da doença o sistema imune do paciente pode estar deprimido, não havendo anticorpos suficientes para precipitar no teste de imunodifusão. O teste cutâneo da paracoccidioidina geralmente também é negativo, e a única forma de diagnóstico é o exame microbiológico (de Camargo, 2008).

Porém, esse método analisado possui vantagem sobre outras técnicas devido a velocidade de obtenção dos resultados, sendo necessárias somente três horas para a identificação do organismo e diagnóstico da doença (Endo *et al.*, 2004).

2.5 Nanotecnologia

Nanotecnologia é a habilidade de manipular átomos e moléculas individualmente para produzir materiais nano-estruturados e micro-objetos com aplicação no mundo real (Miller, 2005). Compreende-se seu uso em sistemas físicos, químicos e biológicos, em uma escala desde um átomo individual a uma molécula de 100 nanômetros (nm). Um nanômetro equivale a 10^{-9} metro (m). Várias são as aplicações da nanotecnologia. Dois grandes exemplos na área industrial são os acelerômetros, aparelhos utilizados na linha de montagem de alta tecnologia como sensores. Em 2002, cerca de 85 milhões de unidades foram comercializadas (Bushan, 2004). Outro exemplo são micro espelhos que projetam imagens com até 35 trilhões de cores, cuja venda atingiu \$400 milhões em 2001 (Bushan, 2004). Por fim, na esfera biológica, tem-se a nanopartícula de ouro, utilizada como diagnóstico em estudos médicos.

No âmbito biológico, através do uso de nanopartículas magnéticas, combinadas a um sensor em miniatura de ressonância, os médicos são capazes de detectar câncer de forma precoce, aumentando a chance de sobrevivência do paciente, por exemplo. Os cientistas começaram a usar a nanotecnologia para desenvolver um método altamente específico que tem a função de matar as células cancerígenas.

A nanotecnologia tem o potencial de revolucionar a forma como recolher dados médicos de maneira geral. Médicos e cientistas são capazes de distribuir aparelhos de diagnóstico nano-estruturados por todo o corpo, a fim de detectar mudanças químicas no local, possibilitando o acompanhamento em tempo real do estado de saúde dos pacientes.

Técnicas de diagnóstico baseados em nanotecnologia também oferecem várias outras vantagens, incluindo o diagnóstico completo e tratamento com apenas uma visita ao médico, ao invés de precisar várias visitas de acompanhamento. Outro benefício é a detecção precisa e antecipada de doenças, que permite aos médicos potencialmente frear esses distúrbios antes que possam causar mais danos aos pacientes, entre diversos outros benefícios.

2.6 Nanopartículas

Devido à facilidade de preparo das soluções coloidais de metais como ouro e prata, percebe-se que são sistemas muito interessantes, visto que são utilizadas em épocas anteriores à ciência moderna. As nanopartículas metálicas eram utilizadas para produzir efeitos coloridos a vidros e cerâmicas. Um exemplo é a combinação de nanopartículas de ouro e prata

que conferem ao vidro do Cálice de Licurgo, confeccionado em Roma no século IV A.C., conferindo cor esverdeada quando visualizado por reflexão e avermelhada quando ocorria a transmissão da luz. (Melo JR *et al.*, 2012).

O ouro (Au, número atômico 79), é o metal mais maleável e dúctil de todos, ele pode ser batido em folhas muito finas de material e enrolado ou dobrado como desejado. O ouro cria ligas com muitos metais. A cor do ouro puro é amarelo metálico ("ouro"), mas outras cores podem ser conferidos nas ligas de ouro com metais como cobre e prata (Figura 2) (Perez-Juste et al, 2005). Por exemplo, "ouro rosa" ou "ouro vermelho" é uma liga de ouro e cobre em percentuais elevados de massa.

AMARELO	VERDE	BRANCO	VERMELHO	ROSA	NEGRO
					
75% Au 12,5% Ag 12,5% Cu	75% Au 15% Ag 6% Cu 4% Cd	75% Au 12,5% Ag 12,5% Pd	75% Au 25% Cu	75% Au 22,5% Cu 2,5% Ag	75% Au 25% Co
Au = ouro Ag = prata Cu = cobre Cd = cádmio Pd = paládio Co = cobalto					

Figura 2: Diferentes tipos de liga com o elemento ouro. Fonte: <http://labriola.tumblr.com/post/102744890729/o-ouro-e-suas-cores>

Algumas ligas de ouro tem uma cor diferente do amarelo metálico do ouro puro, mas isto é devido à presença de dois metais na liga. Colóides de nanopartículas de ouro podem ter cores como vermelho, roxo ou azul, mas são feitas apenas com o ouro (Liao, 2005).

O colóide de nanopartículas de ouro em água é sintetizado à partir de uma solução de hidrato de cloreto de ouro e uma solução de citrato de sódio. Esta é a reação mais simples para sintetizar nanopartículas de ouro, que foi descrita por J. Turkevich et al. em 1951 e refinada por G. Frens na década de 1970. Nesta reação, o citrato age como um agente redutor fraco (reduzindo $AuCl_4^-$ para Au). Atua também como agente estabilizador, já que uma camada de ânions de citrato se absorve em torno de cada nanopartícula, impedindo que estas se agreguem devido à repulsão eletrostática dos ânions, que mantém as nanopartículas separadas (Turkevich et al, 1951; Faraday, 1857). Neste estado, a solução possui coloração vermelho-

rubi, devido à absorção de luz pelas oscilações de elétrons livres (o plasmon de superfície). A posição do comprimento de onda máximo (λ_{max}) do plasmon de superfície para o ouro coloidal é entre 500 e 600nm, dependendo do tamanho e forma das partículas, bem como do índice de refração do solvente e a distância inter-partículas (Huang et al, 2009).

Se a camada de ânions for removida, as nanopartículas começam a se aproximar e se aglomerar. Este efeito pode ser usado para detectar um determinado alvo. Se um eletrólito forte é adicionado, tal como NaCl, os íons do sal protegem as cargas negativas das partículas, permitindo que elas se aproximem e agreguem. A formação de aglomerados reflete-se numa alteração do espectro óptico e do aparecimento de um segundo pico de absorção cerca de 650-750nm, fazendo com que a solução se torne azul (Bakthavathsalam et al, 2012; Verma et al., 2015).

2.7 Propriedades ópticas e Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR)

Uma das propriedades distintivas de nanopartículas metálicas em geral é a sua propriedade óptica, que são diferentes das dos seus homólogos em grandes quantidades. Isto é devido a um efeito chamado Ressonância de Plasmon de Superfície localizada (SPR) (Huang et al, 2009).

As nanopartículas de metal exibem um desaparecimento óptico devido a um fenômeno denominado de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR). Esse é criado quando a radiação eletromagnética excita elétrons livres nas nanopartículas de metal, causando polarização das partículas. Isso dá origem a uma intensa extinção óptica, dependendo do número total de elétrons livres, da função dielétrica e do coeficiente dielétrico do meio local. Essa extinção óptica pode ser descrita como uma combinação de absorção e dispersão, onde a absorção aumenta proporcionalmente em relação ao volume das partículas e ao quadrado do volume dessas partículas (Rotello, 2004). Para partículas não esféricas, como nanobastões, ocorrem diferentes tipos de oscilações de ressonância, que irão depender do campo elétrico do meio (Figura 3). Eles tem orientações transversais e longitudinais (Da Silva, 2009).

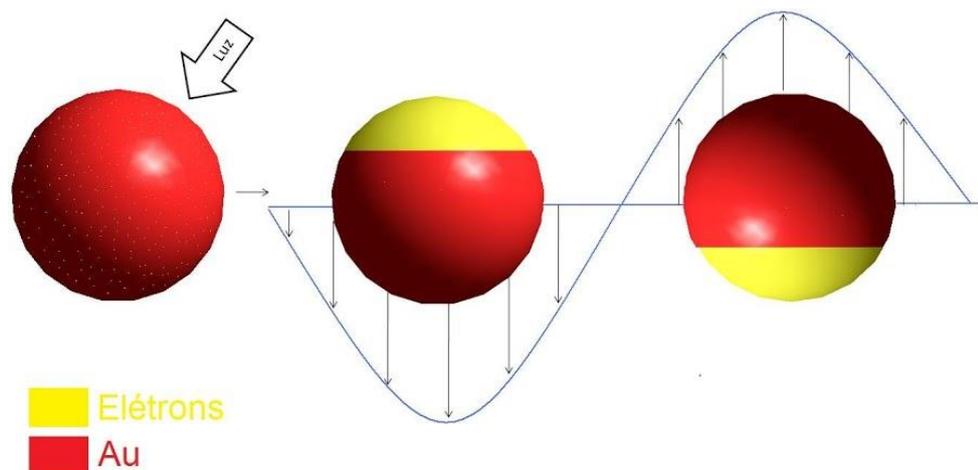


Figura 3: Ilustração da excitação do dipolo formado em função do efeito de plásmon de superfície para partículas esféricas.

Fonte: <http://www.olharnano.com/artigos/4001/21001/Resson%C3%A2nciaplasm%C3%B4nica-e-as-cores-das-nanopart%C3%ADculas>

Uma das consequências do efeito SPR em nanopartículas metálicas é que elas têm uma absorção visível muito forte devido à oscilação ressonante coerente dos plasmons. Como resultado, colóides de nanopartículas metálicas tais como o ouro ou a prata podem exibir cores que não são encontrados na sua forma a granel, como o vermelho, púrpura ou cor de laranja, dependendo das formas das nanopartículas, do seu tamanho e do ambiente circundante (Huang et al, 2009). A energia de SPRs é sensível à função dielétrica do material e ao ambiente circundante, e à forma e tamanho das nanopartículas. Isto significa que, se um ligante, tal como uma proteína, se liga à superfície das nanopartículas de metal, sua energia SPR muda. De modo semelhante o efeito SPR é sensível a outras variações, tais como a distância entre as nanopartículas, que pode ser alterada pela presença de surfactantes ou íons. O fato da SPR depender do ambiente dielétrico significa que o índice de refração pode ser utilizado como o parâmetro de detecção: alterações no ambiente dielétrico local, induzidas por processos de sensoriamento, são utilizadas para detectar a ligação de moléculas no ambiente de nano-partículas (Jain, 2008).

2.8 Sensor plasmônico colorimétrico de ouro coloidal

Em um biossensor plasmônico as nanopartículas podem ser dispersas num meio (caso em que o biossensor é um biossensor plasmônico coloidal) ou apoiadas sobre uma superfície (biossensor de superfície plasmônica). Ambos os tipos de sensores exploram o fato de que o evento de detecção muda a SPR das nanopartículas metálicas (Yu, 2007).

Em um biossensor plasmônico coloidal de nanopartículas de ouro, o evento de detecção resulta em uma mudança de agregação entre as nanopartículas que formam o colóide, a qual pode determinar uma mudança de cor do colóide. A espectroscopia de absorção é usada para quantificar o evento de biossensoriamento. No caso do ouro coloidal, que é normalmente vermelho, o evento de detecção pode tornar o colóide azul. Assim, colóides metálicos podem ser utilizados como biossensores plasmônicos colorimétricos. Uma vez que o colóide muda de cor como resultado do evento de detecção, isto é chamado de detecção colorimétrica. Colóides de ouro podem ser utilizados para detecção colorimétrica especificamente porque eles têm cores diferentes dependendo do ambiente que os circunda (Verma et al, 2015).

Dessa forma, esse trabalho tem como meta estabelecer a funcionalização de nanoesferas de ouro com anticorpos anti-gp43, para que possam ser utilizadas para detecção dessa glicoproteína antigênica do patógeno *P. brasiliensis*. Um vez desenvolvido um biossensor com essa finalidade, o mesmo poderá ser aprimorado para diagnóstico clínico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um biossensor plasmônico e colorimétrico empregando anticorpos anti-gp43 específicos para a glicoproteína gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* bioconjugados em nanoesferas de ouro.

3.2 Objetivos específicos

- Funcionalizar nanoesferas de ouro com o anticorpo anti-gp43;
- Avaliar a ressonância plasmônica das nanoesferas antes e após a funcionalização com o anticorpo anti-gp43 para verificação do sucesso da funcionalização;
- Avaliar a ressonância plasmônica das nanoesferas funcionalizadas antes e após a incubação com a glicoproteína gp43;
- Avaliar a ressonância plasmônica das nanoesferas funcionalizadas antes e após a incubação com soro de pacientes com PCM e soro de indivíduos saudáveis;

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese de nanoesferas de ouro

Foi aquecida até a ebulição 100 mL de uma solução $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido cloroáurico (HAuCl₄) em um Erlenmeyer, com agitação. Em seguida, foi adicionada rapidamente 5,0 mL de solução 1% de citrato de sódio e a solução mantida em ebulição, tampada com um vidro de relógio, por 10 min, mantendo-se a agitação. Decorrido esse tempo, o aquecimento do sistema foi suspenso e a agitação mantida por mais 15 min em outra placa de agitação. A barra magnética foi então, removida e a solução resfriada à temperatura ambiente sem a utilização de banho de gelo (Figura 4).

Em seguida foi obtido o espectro na região UV-Visível da suspensão resultante.

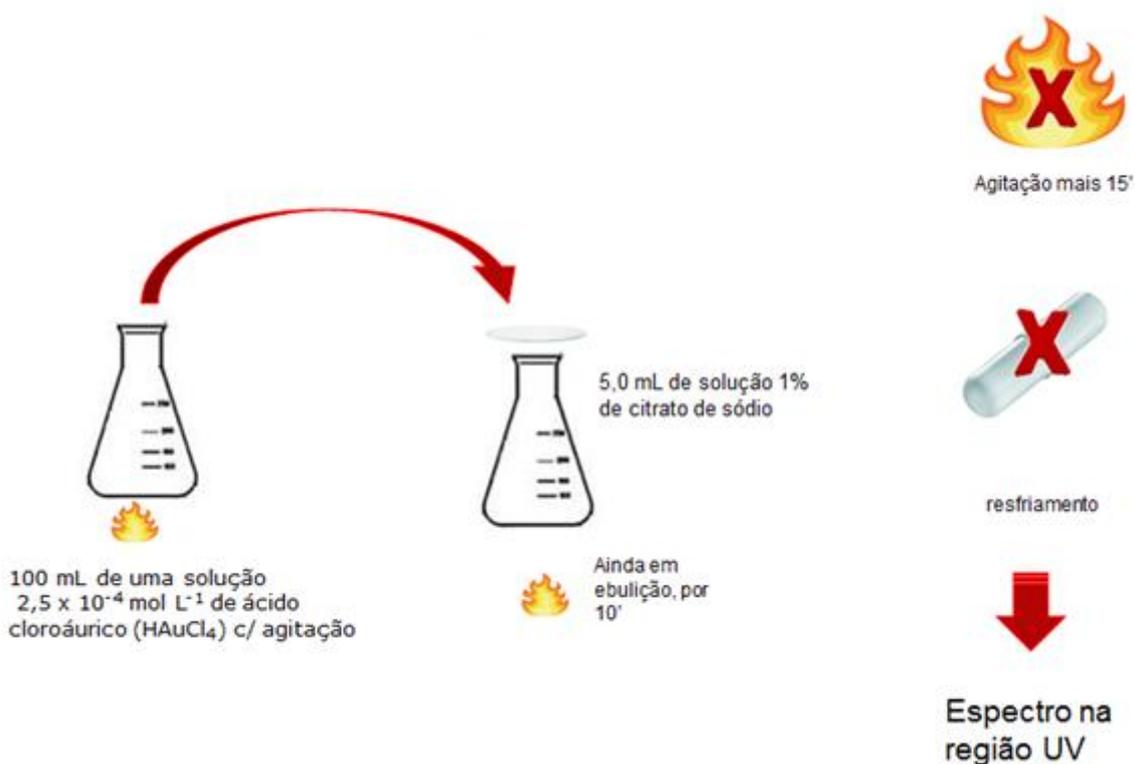


Figura 4: Ilustração da síntese de nanoesferas de ouro.

4.2 Funcionalização das nanoesferas de ouro

O anticorpo (Figura 7) anti-gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* foi funcionalizado nas nanoesferas de ouro por intermédio do reagente ligante polietilenoimina (PEI). Isso deve ser realizado para que um grupo NH_3 presente em uma das extremidades do reagente se ligue ao ouro e outro grupo amina da outra extremidade se ligue covalentemente ao grupo carboxílico (-COOH) presente no anticorpo (Figura 3). Para que ocorra a ligação dos radicais carboxilas com as aminas é necessário uma reação de amidação por diimida. Por isso, é utilizado o cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDAC) como agente acoplante e o N-hidroxisuccinimida (NHS) como agente estabilizante, o qual converte os ácidos carboxílicos em ésteres ativos, que em seguida interagem com os grupos amina, estabelecendo a ligação.

Sendo assim, para que fosse possível a bioconjugação dos anticorpos foi realizada a ligação de polietilenoimina ($(\text{C}_2\text{H}_5\text{N})_n$), capaz de mediar a ligação nanoesfera-anticorpo devido aos vários grupos amina reativos. Para isso, 100 μL de solução de nanoesferas foram centrifugados a 4000g por 10 minutos, ressuspensos em 100 μL de polietilenoimina (0,3% em água ultra pura) e incubados a temperatura ambiente por ultrasonicação por 30 minutos. Em seguida, a solução foi novamente centrifugada a 4000g por 10 minutos e ressuspensa em 250 μL do anticorpo anti-gp43 previamente preparado com EDAC/NHS (como será descrito adiante) (Figura 5).

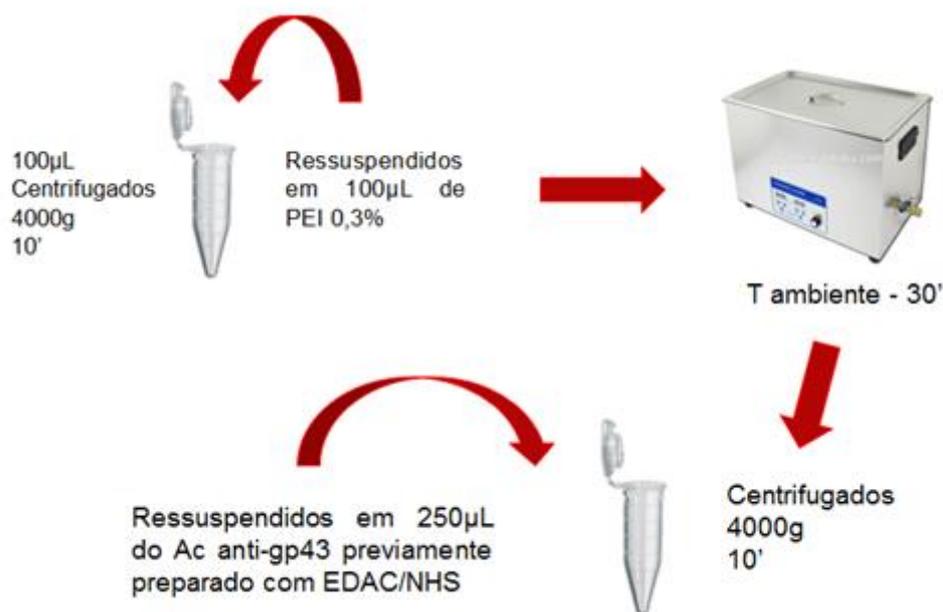


Figura 5: Ilustração da bioconjugação dos anticorpos.

Para testar a capacidade de detecção das nanoesferas de ouro, estas foram incubadas com 0,4 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-gp43. A solução de imunoglobulina foi previamente preparada de modo que à concentração correspondente de anticorpo foi adicionado 30mM EDAC/HNS (0,4M:0,1M) e Tampão fosfato (PBS1X, pH 7,4, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ em água ultra pura) para um volume final de 100µL e depois, incubada por 30 minutos a 4°C.

Por fim, a reação das nanoesferas funcionalizadas com polietilenoimina e anticorpos foi realizada por uma hora a temperatura ambiente em banho ultrassônico. Ao final deste tempo foram novamente centrifugadas a 4000 g por 10 minutos e ressuspensas em 100µL de PBS, para leitura em espectrofotômetro a fim de verificar a eficiência da ligação.

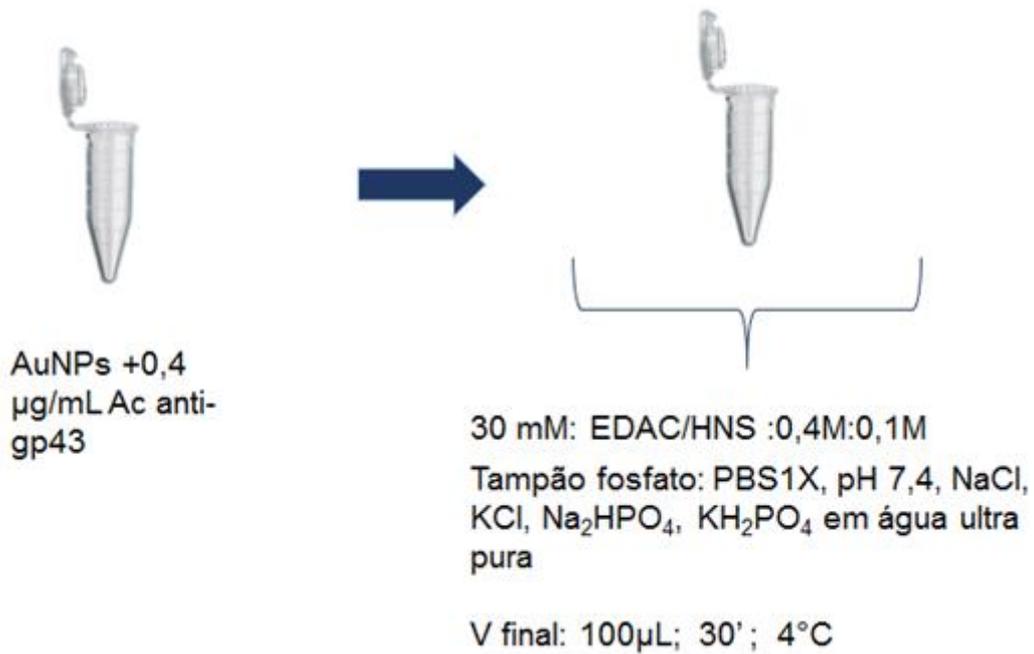


Figura 6: Ilustração referente ao teste para a capacidade de detecção de nanoesferas de ouro.

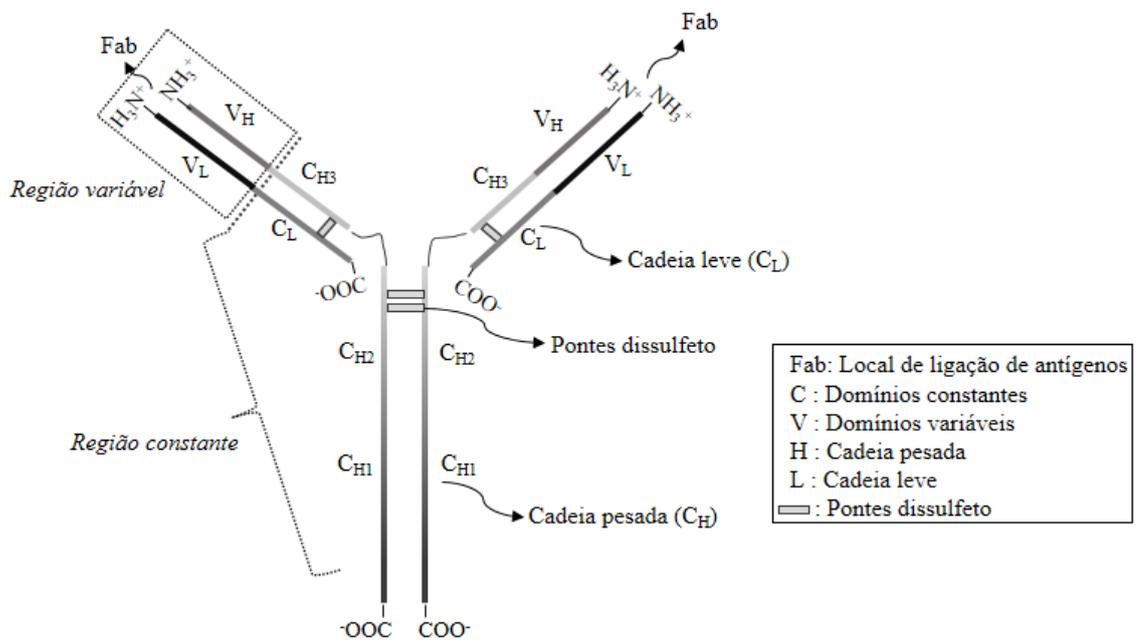


Figura 7: Estrutura tridimensional básica de um anticorpo. Cada cadeia pesada (H) e leve (L) possui uma região variável (V) e uma região constante (C). As duas cadeias pesadas são unidas entre si e entre uma cadeia leve por pontes dissulfeto. A porção C-terminal contendo grupos carboxila está localizada na região constante das cadeias

pesadas e a porção N-terminal contendo grupos amina situa-se na região variável que engloba ambas as cadeias leves e pesadas.

4.3. Biossensoriamento: Ligação à paracoccidioidina e BSA

Após confirmação da ligação efetiva dos anticorpos às nanoesferas de ouro, realizada através da visualização da diminuição do deslocamento do pico de absorção plasmônica, o sistema foi incubado à glicoproteína gp43 e à proteína BSA.

Para isso, o sistema nanoesfera-anticorpo foi centrifugado a 4000 g por 10 minutos, e ressuspensionado em 4 µg/mL de paracoccidioidina e BSA preparadas em PBS 1X pH 7,4 (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄). Em seguida, foram incubados por uma hora a temperatura ambiente em banho ultrassônico. Ao final deste tempo foram novamente centrifugados a 4000 g por 10 minutos e ressuspensionados em 100µL de PBS, para leitura em espectrofotômetro (Figura 8).

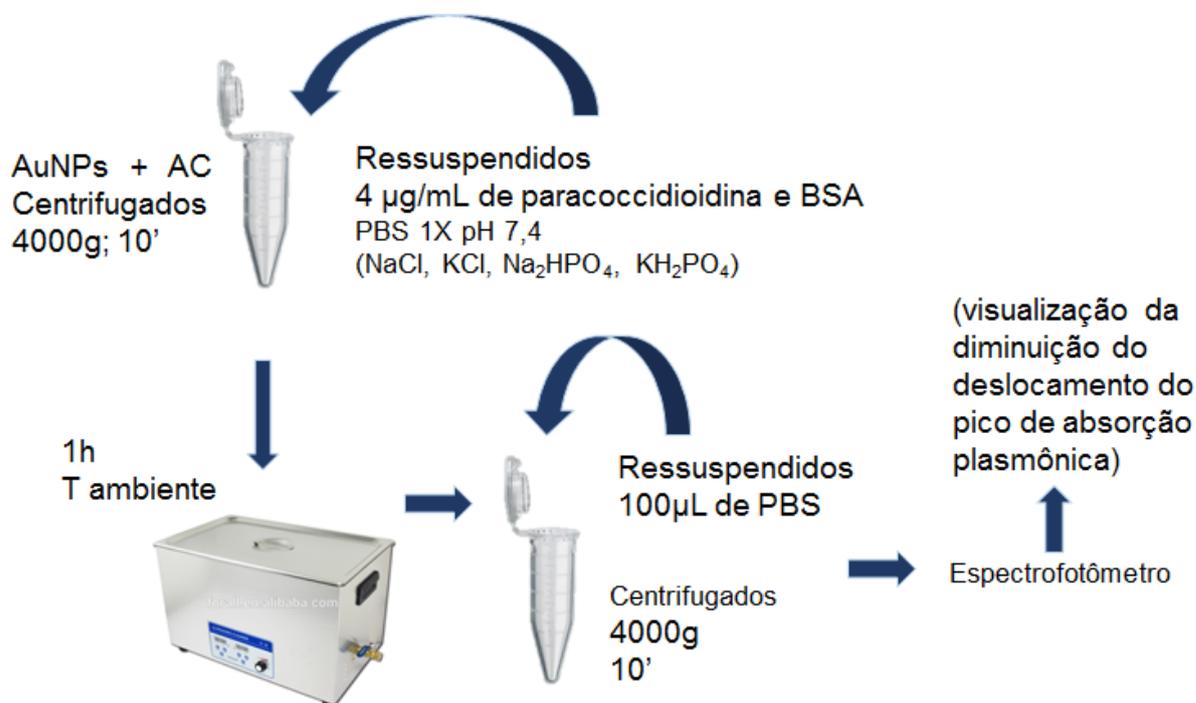


Figura 8: Ilustração da confirmação da ligação efetiva dos anticorpos às nanoesferas de ouro, em um sistema incubado à gp43 e BSA.

4.4. Teste com soro de pacientes infectados e indivíduos saudáveis

O emprego dos soros utilizados neste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP), catalogado sob o protocolo nº 923.973 e CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) nº 36851414.7.0000.5142.

O sistema nanoesfera de ouro/anticorpo, 100 µL, foi misturado às amostras de soro de pacientes com PCM ou soro de indivíduos saudáveis, diluídos numa proporção de volume de 1:256 em PBS 1X pH 7,4. Inicialmente, amostras de 15 pacientes foram coletadas, e desses, retirados 1 mL para preparo de um pool, do qual foi empregado 100 µL. A mistura foi incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente em banho ultrassônico e lida em espectrofotômetro.

4.5 Instrumentação

Os espectros eletrônicos das soluções (100 µL de cada amostra) foram obtidos em um espectrofotômetro na região UV-Visível, em varredura na faixa de 400 a 1100nm (UV-1800, SHIMADZU), utilizando-se celas de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Atualmente, nanoesferas de ouro vêm sendo empregadas em inúmeras abordagens de biossensoriamento, tanto em biossensores plasmônicos quanto naqueles construídos para simples detecção colorimétrica a olho nu através de ensaios de agregação. Considerando o desempenho já bem estabelecido das nanopartículas de ouro em sistemas de detecção de alvos biológicos, o presente trabalho espera estabelecer com êxito um sistema de detecção de da glicoproteína gp43.

Primeiramente, as nanoesferas de ouro foram sintetizadas por meio de redução com citrato de sódio. A solução de nanoesferas puras foi submetida à análise em espectrofotômetro e foi identificado o espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) com pico de absorção plasmônica máximo em 526nm. O aspecto visual da solução recém sintetizada pode ser observado na figura 9.

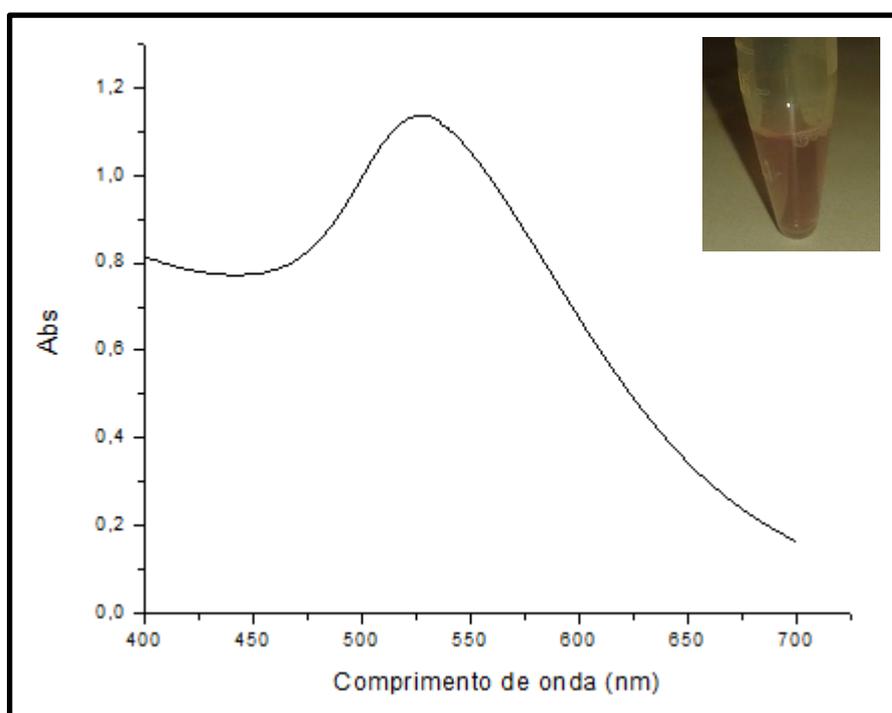


Figura 9: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de nanoesferas de ouro com pico de absorção plasmônica máximo em 526nm. Inserção: aspecto visual da solução recém sintetizada.

Após essa purificação, as nanoesferas de ouro foram funcionalizadas com polietilenoimina (PEI) a 0,3% conforme empregada em outros trabalhos (Pyshnaya *et al.*, 2014). A figura 5 mostra que a funcionalização foi satisfatória, em que o pico máximo de absorção plasmônica longitudinal dos nanoesferas situa-se a 526nm, enquanto o das nanoesferas funcionalizadas com PEI situa-se a 534nm. Além disso, o espectro de ressonância plasmônica mostra que após adição do PEI houve uma diminuição significativa do pico de absorção, com adição do seu alargamento. Essas características são típicas de eventos de agregação e sugerem que o reagente tenha se ligado à superfície das nanoesferas, como sugere a figura 10.

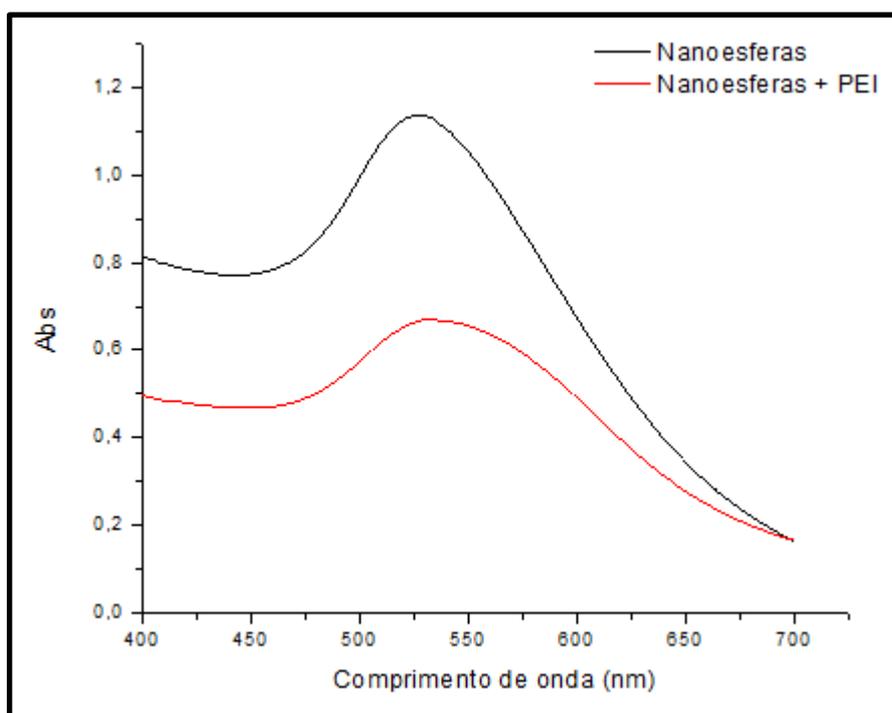


Figura 10: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de nanoesferas de ouro com pico de absorção plasmônica máximo em 526nm (linha preta) e de nanoesferas funcionalizadas com 0,3% do reagente PEI (pico máximo de absorção 534nm – linha vermelha).

Assim, após a funcionalização com PEI, as nanoesferas foram bioconjugadas ao anticorpo anti-gp43 para assim detectar a presença de gp43, como mostrado na figura 11, apresentando o pico máximo de absorção em 534nm. A partir desse momento, essa construção pode ser considerada um biossensor. Novamente, pode ser visualizada uma queda

na intensidade do pico seguido de alargamento. Vale ressaltar que devido à intensa aglomeração do sistema, a solução também sofre uma alteração visual em sua coloração, mudando de vermelho para roxo. Para o estabelecimento de um biossensor colorimétrico essa coloração deveria ser alterada novamente após detecção do alvo.

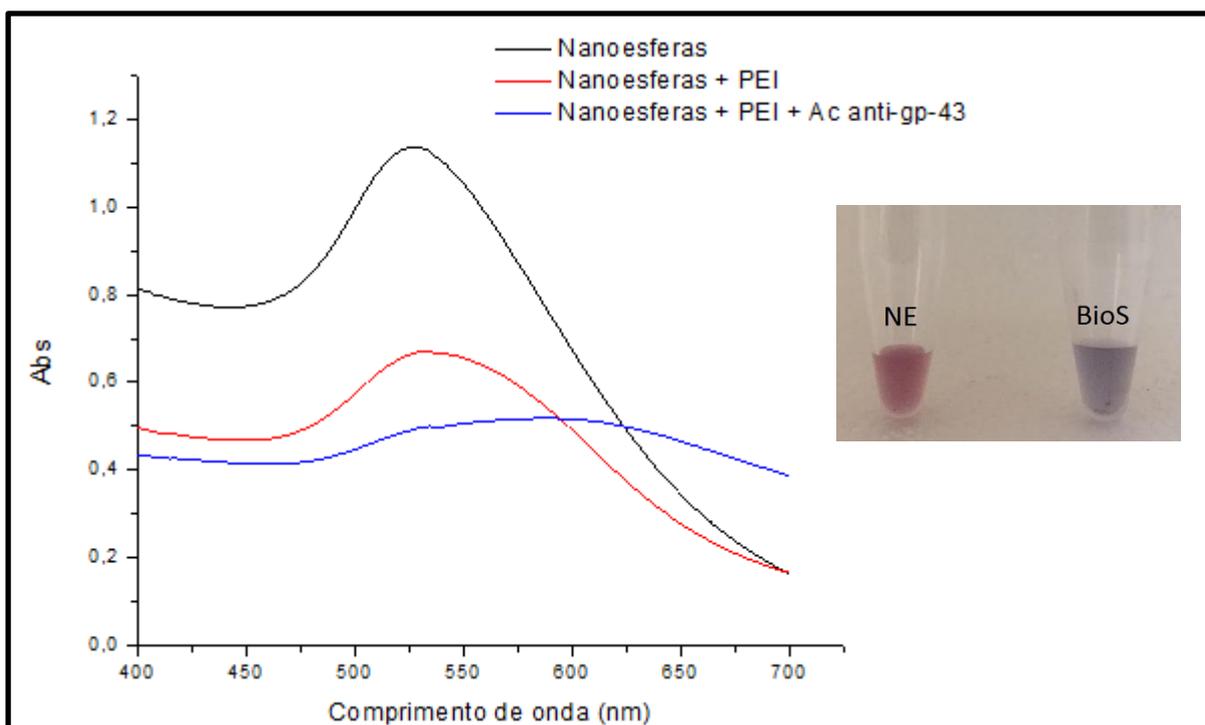


Figura 11: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de nanoesferas de ouro com pico de absorção plasmônica máximo em 526nm (linha preta), nanoesferas funcionalizadas com o reagente PEI (pico máximo de absorção 534nm – linha vermelha) e nanoesferas bioconjugadas à 0,4 µg/mL do anticorpo anti-gp43 (pico máximo em 582nm – linha azul). Inserção: aspecto visual do biossensor.

Em seguida, o biossensor foi incubado com 4 µg/mL de paracoccidioidina (solução enriquecida na glicoproteína gp43) e com 4 µg/mL da proteína albumina sérico bovina (BSA), a qual foi empregada como controle negativo. Como pode ser visualizado na figura 12, houve uma intensa redução da intensidade do pico de absorção plasmônica após interação com a proteína gp43. Esse fato mostra a ocorrência de aglomeração que possibilita inferir a detecção da proteína. No entanto essa aglomeração não ocorreu em intensidade capaz de alterar visualmente a cor da solução a olho nu, a qual manteve-se em tom arroxeadado. Sendo assim, o sistema ainda necessita ser aprimorado para permitir essa simples detecção colorimétrica. Por

outro lado, quando incubado com a mesma concentração de BSA, o sistema não sofreu aglomeração, mas, ao contrário, apresentou um pico de absorção plasmônica inclusive mais intenso do que aquele apresentado para o biossensor. Esse fato também não era esperado, já que o espectro de absorção plasmônica deveria ao menos ser mantido em relação ao biossensor.

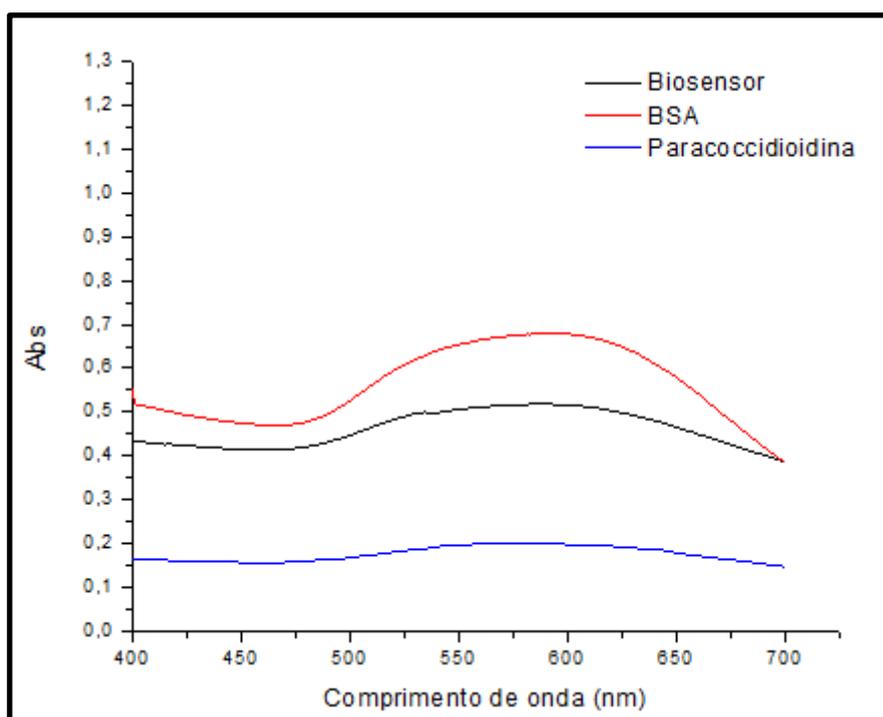


Figura 12: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do biossensor (linha preta - pico máximo em 582nm) após interação com 4 µg/mL de paracoccidioidina (linha azul – pico máximo em 563nm) e após interação com 4 µg/mL de BSA (linha vermelha - pico máximo em 589nm).

O sistema foi ainda testado na presença de soros de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados com paracoccidioidomicose por meio dos métodos clássicos de diagnóstico. Os picos máximos observados situam-se em 556nm e 592nm, respectivamente, ilustrado na figura 13. Novamente a cor da solução não foi alterada e o sistema colorimétrico não pôde ser estabelecido. Além disso, o perfil plasmônico encontrado foi altamente similar para ambos os soros (diluídos na proporção 1:256 em PBS). Embora o sistema aqui proposto não tenha mostrado êxito para detecção em soro de pacientes, na concentração de 100µL, foi satisfatório para detecção da proteína purificada (Figura 11). Ainda assim, precisa ser aprimorado para

permitir uma detecção colorimétrica também a olho nu, facilitando a aplicação do método para diagnóstico da PCM.

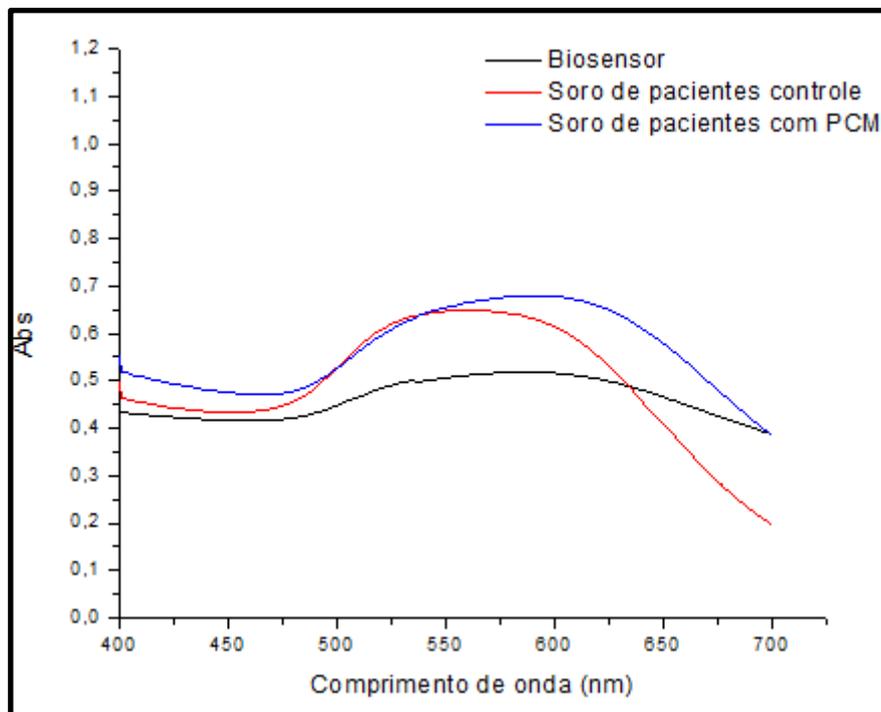


Figura 13: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) do biossensor (linha preta) após interação com soro de pacientes saudáveis (linha vermelha – pico máximo em 556nm) e após interação com soro de pacientes diagnosticados com PCM (linha azul – pico máximo em 592nm).

O primeiro trabalho empregando ferramentas nanotecnológicas para diagnóstico da PCM utilizou nanopartículas de ouro funcionalizadas com oligonucleotídeos tiolados para detecção colorimétrica. Na presença das sequências-alvo complementares, a agregação das nanosondas é impedida e a solução fica arroxeadada, enquanto na ausência das mesmas, as nanosondas se agregam e a cor se torna azulada, sempre após adição de sal (NaCl). Os espectros UV-Vis das soluções foram registrados dez minutos após a adição do sal, e exibiram a banda de absorção da nanosonda em torno de 524nm no teste positivo e a diminuição da intensidade dessa banda de absorção, bem como o aparecimento de uma banda de 653nm no teste negativo, perfis característicos de agregação. As nanosondas permitiram a detecção de uma sequência específica de DNA complementar (cDNA) para a proteína antigênica p27 e o

teste colorimétrico exibiu 84,4% de sensibilidade e 81,2% de especificidade, podendo ser implementado como diagnóstico clínico de execução simples e custo razoável para a detecção eficaz de *P. brasiliensis* (Castilho *et al.*, 2015).

A abordagem proposta no presente trabalho constitui nada menos do que um imunoensaio, o qual se vale da especificidade e sensibilidade da interação antígeno-anticorpo, a fim de se detectar ou quantificar a quantidade de um analito específico presente na amostra de interesse. Dessa forma, uma vez que o sistema for aprimorado, esperamos detectar a presença do antígeno no soro de pacientes. Uma vez estabelecida e padronizada esta nova técnica de detecção, ela poderá ser aprimorada para o desenvolvimento de um novo teste de diagnóstico da PCM.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que as nanopartículas de ouro representam uma alternativa vantajosa para abordagens de diagnóstico, e são relevantes estudos que utilizem diferentes formas dessas nanotecnologias. Além disso, as nanoesferas de ouro possuem uma sensibilidade de absorção óptica que muda de maneira mensurável o pico de absorção plasmônica e permite analisar de maneira simples a detecção de moléculas ligadas à sua superfície.

O deslocamento observado para as biomoléculas purificadas pode justificar o sucesso do sistema de detecção proposto. As nanoesferas de ouro foram sintetizadas com sucesso e funcionalizadas com o reagente acoplante. São, portanto, biossensores úteis para o estudo e desenvolvimento de novas abordagens de diagnóstico para a paracoccidiodomicose.

A partir da bioconjugação de anticorpos para construção de um biossensor, foi possível também detectar a proteína alvo, uma vez que a detecção não foi observada quando empregada outra proteína inespecífica.

Dessa forma, o sistema de detecção aqui proposto apresenta expectativas de sucesso se aprimorado.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I. C., NEVILLE, D. C. A., MEHLERT, A., *et al.* Structure of the N-linked oligosaccharide of the main diagnostic antigen of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Glycobiology*, 6(5), 507–515, 1996.
- BAKTHAVATHSALAMN, P.; RAJENDRAN, V. K.; MOHAMMED, J. A. B. A direct detection of *Escherichia coli* genomic DNA using gold nanoprobe. *Journal of nanobiotechnology*, 10(1), 8, 2012.
- BRUMMER, E., Castaneda, E., Restrepo, A., Microbiologia, G. De, and Bogota, S. *Paracoccidioidomycosis : an Update.* , 6(2), 89–117, 1993.
- BUSHAN, B. Springer Handbook of Nanotechnology, First Edition, New York, Springer Verlag, 2004.
- BLANCO G; MUÑOZ S.; TORREZ J. F.; POSADA Í; GOMÉZ S. Differential PbP27 expression in the yeast and mycelial forms of the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 48(12), 1087–95, 2011.
- De CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 165(4-5), 289–302, 2008.
- CANO, L. E. and RESTREPO, A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 29(5), 276–283, 1987.
- CASTILHO, M. L., VIEIRA, L. S., CAMPOS, a. P. C., ACHETE, C. a., CARDOSO, M. a. G., and RANIERO, L. (2015) The efficiency analysis of gold nanoprobe by FT-IR spectroscopy applied to the non-cross-linking colorimetric detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 215, 258–265.
- CORREA, M. M.; BEDOYA, A. M.; GUERRERO, M. P.; MÉNDEZ, J.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. *Mycoses*, 50, 41–47, 2006.
- COUTINHO, Z. F., WANKE, B., TRAVASSOS, C., OLIVEIRA, R. M., XAVIER D. R., and COIMBRA, C. E. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 20(5), 673–680, 2015.
- DA SILVA, EID CAVALCANTE. Sínteses e propriedades ópticas de sistemas coloidais contendo nanopartículas de ouro dispersas em óleo de mamona, Tese (Mestrado em Química), Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brasil, 2009.
- DEL-NEGRO, G. M. B., GARCIA, N. M., RODRIGUES, E. G., *et al.* The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(4), 277–280, 1991.

- DUJARDIN, J.-C., HERRERA, S., do Rosario, et al. Research priorities for neglected infectious diseases in Latin America and the Caribbean region. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(10), e780, 2010.
- DÍEZ, S.; GO, B. L.; MCEWEN, J. G.; RESTREPO, A.; HAY, R. J.; HAMILTON, A. J. Combined Use of *Paracoccidioides brasiliensis* Recombinant 27-Kilodalton and Purified 87-Kilodalton Antigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. , 41(4), 1536–1542, 2003.
- FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and other metals) to Light. *The Royal Society*, 147, 145–181, 1857.
- FERNANDES, V. C.; MARTINS, E. M. N.; BOELONI, J. N.; COITINHO, J. B.; SERAKIDES, R.; GOES, A. M. Additive effect of rPb27 immunization and chemotherapy in experimental paracoccidioidomycosis. *PloS one*, 6(3), e17885, 2011.
- HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M. A. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 21(48), 4880–4910, 2009.
- JAINS, P. K; EL-SAYED, M. A. Surface Plasmon Coupling and Its Universal Size Scaling in Metal Nanostructures of Complex Geometry: Elongated Particle Pairs and Nanosphere Trimers. *The Journal of Physical Chemistry*, 112(13), 4954–4960, 2008.
- LACAZ, C. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence; Taxonomy. In: Franco, M., Lacaz, C., Restrepo, A., Del Negro, G. (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón, 1-11, 1994.
- LIAO, H.; HAFNER, J. H. Gold Nanorod Bioconjugates, 5(19), 4636–4641, 2005.
- LIU, Y.; LIU, L.; MERNAUGH, R.; ZENG, X. Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2853-2857, 2009.
- MARTINEZ, R. Carta ao Editor / Letter to Editor *Paracoccidioidomycosis* : the dimension of the problem of a neglected disease *Paracoccidioidomycose* : a dimensão do problema de uma doença negligenciada. , 43(4), 2010.
- MCEWEN, J. G.; ORTIZ, B. L.; GARCÍA, A. M.; FLOREZ, A. M.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. Molecular Cloning , Nucleotide Sequencing , and Characterization of a 27-kDa Antigenic Protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology*, 20, 125–131, 1996.
- MELO JR., M.A.; SANTOS L.; GONÇALVES, MARIA DO CARMO; NOGUEIRA, A.F.. Preparation of silver nanoparticles: a simple method to introduce nanotechnology into teaching laboratories. *Quím. Nova*, vol.35, no. 9, São Paulo, Brasil, 2012.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S., Monteiro da Silva, J. L., de Fátima da Silva, J., Donofrio, F. C., Miranda, E. T., Andreotti, P. F., and Soares, C. P. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. *Mycopathologia*, 165(4-5), 237–48, 2008.

- MILLER, JOHN C., SERRATO, R., KUNDAHL, G., "The Handbook of Nanotechnology: Business, Polcy and Intelctual Property Law", First Edition, New Jersey, Wiley, 2005.
- MOREIRA, A. P. V., Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. *Bol Epidemiol Paul*, 5–51, 2008.
- NUCCI, M., COLOMBO, A. L., and QUEIROZ-TELLES, F. Paracoccidioidomycosis. *Current Fungal Infection Reports*, 3(1), 15–20, 2009.
- ORTIZ, B. L.; DÍEZ, S.; URÁN, M. E.; RIVAS, J. M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Use of the 27-Kilodalton Recombinant Protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in Serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(6), 826–830, 1998.
- ORTIZ, B. L.; GARCIA, A. M.; RESTREPO, A.; EWEN, J. G. M. C. Immunological Characterization of a Recombinant 27-Kilodalton Antigenic Protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 3(2), 239–241, 1996.
- PÉREZ-JUSTE, J.; PASTORIZA-SANTOS, I.; LIZ-MARZAN, L. M.; MULVANEY, P. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 249(17-18), 1870–1901, 2005.
- PUCCIA, R., SCHENKMAN, S., GORIN, P. A. J., *et al.* Exocellular Components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a Specific Antigen. *Infection and Immunity*, 53(1), 199–206, 1986.
- PYSHNAYA, I. a., RAZUM, K. V., POLETAVA, J. E., *et al.* Comparison of Behaviour in Different Liquids and in Cells of Gold Nanorods and Spherical Nanoparticles Modified by Linear Polyethyleneimine and Bovine Serum Albumin. *BioMed Research International*, 1–13, 2014.
- REIS, B. S.; FERNANDES, V. C.; MARTINS, E. M. N.; SEKARIDES, R.; GOES, A. M. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*, 26(43), 5461–9, 2008.
- ROTELLO, V. Nanoparticles - Building Blocks for Nanotechnology. New York : Springer Science+Buisiness Media, inc., 2004.
- SHIKANAY-YASUDA, M. A., QUEIROZ, F. De, FILHO, T., *et al.* Consenso em paracoccidioidomicose Guideliness in paracoccidioidomycosis. , 39(3), 297–310, 2006.
- SOARES, L. G., de SOUZA REZENDE, C. R., GOMES DA SILVA, *et al.* The importance of early diagnosis in oral manifestations of paracoccidioidomycosis. *Dental Cadmos*, 81(3), 146–152, 2013.
- STRAUS, A. H., FREYMULLER, E., TRAVESSOS, L. R., and TAKAHASHI, H. K. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 34, 181–186, 1996.

TELES, F. R. R. and MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta*, 85(5), 2254–64, 2011.

TOMMASI, MARIA HELENA MARTINS, Diagnóstico em Patologia Bucal, 3ª edição revista e ampliada, editora Pancast, 1977.

TORRES, I.; HERNANDEZ, O.; TAMAYO, D.; MUÑOZ, J. F.; GARCÍA, A. M.; GÓMEZ, B. L.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Paracoccidioides brasiliensis PbP27 gene: knockdown procedures and functional characterization. *FEMS yeast research*, 14(2), 270–80, 2014.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of gold colloidal. , 55(c), 1951.

VERMA, M. S.; ROGOWSKI, J. L.; JONES, L.; GU, F. X. Colorimetric biosensing of pathogens using gold nanoparticles. *Biotechnology advances*, 33(6 Pt 1), 666–80, 2015.

VIDAL, M. S. M., BENARD, G., DE BRITO, T., *et al* Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. *Journal of clinical microbiology*, 43(6), 3014–6, 2005.

VIGNA, A. F., ALMEIDA, S. R., XANDER, P., *et al*. Granuloma formation in vitro requires B-1 cells and is modulated by Paracoccidioides brasiliensis gp43 antigen. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 8(3), 589–97, 2006.

YU, C.; IRUDAYARAJ, J. Multiplex biosensor using gold nanorods. *Analytical chemistry*, 79(2), 572–9, 2007.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que o(a) Aluno(a) Paula Perdigão Rocha, matrícula 11.1.2066 defendeu o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado Funcionalização de nanopartículas de ouro para detecção dos antígenos gp43 de Paracoccidiodides, em 18 de Agosto de 2017 e **REALIZOU TODAS AS ^{BRASILEIRAS} CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.**

Ouro Preto, 24/08/2017

Bruno de Mello Lima
Assinatura do(a) orientador(a)