



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FÁRMACIA



MARIELLA APARECIDA DINIZ SOARES

**DETECÇÃO DA GLICOPROTEÍNA gp43 POR RESSONÂNCIA
PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA (LSPR) E AGREGAÇÃO DE
NANOBASTÕES DE OURO**

OURO PRETO

2019

MARIELLA APARECIDA DINIZ SOARES

**DETECÇÃO DA GLICOPROTEÍNA gp43 POR RESSONÂNCIA
PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA (LSPR) E AGREGAÇÃO DE
NANOBASTÕES DE OURO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade de Ouro Preto,
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva.

Coorientadora: Dr^a Cyntia Silva Ferreira.

Ouro Preto

2019

S676d Soares, Mariella Aparecida Diniz.
Detecção da glicoproteína GP43 por ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) e a agregação de nanobastões de ouro [manuscrito] / Mariella Aparecida Diniz Soares. - 2019.

55f.: il.: color; grafs; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva.

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

1. Nanotecnologia. 2. Nanopartículas. 3. Ouro. 4. Glicoproteínas. I. Silva, Breno de Mello. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 620.3

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

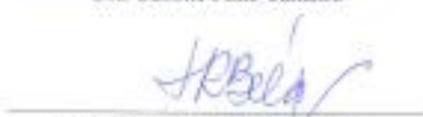
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 475ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 11 dias do mês de dezembro de dois mil e dezanove, quarta-feira, realizou-se, a partir das 09 horas, no Auditório do NUPEB, do Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Mariella Aparecida Diniz Soares**, matrícula 15.1.2127, intitulada **"Detecção da glicoproteína gp43 por ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) e agregação de nanobastões de ouro"**. A banca examinadora foi constituída pela Profa. Dra. Samantha Ribeiro Bela (NUPEB/UFOP), pela Dra. Simone Pinto Carneiro (BIOTEC/UFOP) e pelo orientador Prof. Dr. Breno de Mello Silva (DECBI/UFOP). De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua APROVADA, com a NOTA 9. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da banca examinadora e pela presidente do colegiado. Ouro Preto, 11 de dezembro de 2019.


Prof. Dr. Breno de Mello Silva


Dra. Simone Pinto Carneiro


Profa. Dra. Samantha Ribeiro Bela


Profa. Dra. Glenda Nacioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

Dedico esse trabalho a minha família e a todas as pessoas que me incentivou e apoiou nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e discernimento para enfrentar todos os obstáculos e conseguir chegar até aqui.

A minha família, especialmente meu pai e minha mãe pelo apoio, confiança e por não medirem esforço para que eu pudesse estudar. Aos meus irmãos Júlia e Osmar que sempre estiveram ao meu lado. Ao meu sobrinho Victor por ser meu ponto de amor e paz. Ao meu avô por me acolher e pelo carinho. A família Soares por sempre estar presente e torcerem por mim. Amo vocês.

Ao professor Breno pela oportunidade e orientação. A Cyntia, pela orientação, paciência, compreensão e carinho, sem você nada disso seria possível.

Agradeço a todos os professores e funcionários da EFAR pelo apoio e por todo ensinamento que levarei por toda vida.

Aos meus amigos da Farmácia, principalmente 15.1 que fizeram essa jornada ser mais leve.

A todos os amigos de Ouro Branco, que apesar da distância sempre estiveram presente e torcendo por mim, principalmente a Mohara pela irmandade de sempre.

Agradeço a República Atena, por ser minha família em Ouro Preto, por todo carinho e me aguentarem todos esses anos. Especialmente a Julia pelo companheirismo sempre.

Muito obrigada!

RESUMO

Nas últimas décadas, as nanopartículas de ouro têm demonstrado uma eficiência notável em diversas aplicações biológicas, tais como em sistemas de administração de medicamentos, detecção de analitos, abordagens de diagnóstico e terapias fototérmicas. Entre suas características físico-químicas peculiares, a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) é uma característica importante, porque fornece um espectro de absorção que permite a avaliação de eventos de ligação a moléculas. O efeito de LSPR ocorre quando uma frequência de fótons incidente se encontra em ressonância com a oscilação coletiva dos elétrons condutores da superfície do metal, levando a uma forte banda de absorção no espectro UV/visível. Portanto, as nanopartículas de ouro fornecem dois tipos de ensaios clássicos: avaliação espectroscópica da mudança do pico longitudinal de LSPR e visualização a olho nu dos fenômenos de agregação, que alteram a cor da solução (ambos indicam a detecção de biomoléculas). Atualmente, o sensor colorimétrico tem atraído muita atenção por seu baixo custo, simplicidade, praticidade, além de não demandar instrumentação sofisticada. Nesse sentido, foi desenvolvido um biossensor colorimétrico de nanobastões de ouro (AuNBs) funcionalizados com anticorpos anti-gp43 para atender às demandas do diagnóstico de Paracoccidioidomicose (PCM). Pois o diagnóstico dessa doença, ainda não existe um que seja rápido e preciso. No entanto, são utilizados como diagnóstico o isolamento e crescimento do patógeno, ELISA, Imunodifusão dupla (DID), aglutinação de partículas de látex, entre outros. Entretanto, considerando a situação econômica das áreas endêmicas, esses ensaios demandam capacitação técnica e alto custo de execução. A PCM é uma micose granulomatosa sistêmica endêmica na América Latina, cujo diagnóstico ainda é muitas vezes confundido com tuberculose, afetando significativamente o tratamento. A glicoproteína gp43 é o principal componente antigênico do agente etiológico da doença, *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo comumente empregada para diagnóstico. Os resultados demonstraram uma detecção colorimétrica rápida (a olho nu, dentro de 1 minuto) com AuNBs reduzidos com ácido ascórbico, nas concentrações de 14, 7, 3,5, 1,5 e 0,7 µg/ml de gp43 (razão 1:1 de AC:PEI - anticorpo para agente ligante), e de 50, 24, 10, 5 e 2,4 µg/ml nos AuNBs com hidroquinona (razão 7,4:1 - dentro de 30 minutos). Nestas razões, o nanossensor não apresentou alteração colorimétrica quando incubado com a proteína BSA nas mesmas concentrações. No entanto, por outro lado, os deslocamentos de LSPR observados antes e após incubação com a glicoproteína gp43 e com o controle negativo BSA permitiram determinar que, para atuar apenas como biossensor plasmônico o sistema ainda precisa de aprimoramentos. De maneira geral, o nanossensor mostrou uma detecção simples da proteína

antigênica gp43, sendo promissor, após aprimoramento e testes com soros, para diagnóstico da PCM.

Palavras chave: nanobastões de ouro; nanossensor plasmônico; nanossensor colorimétrico.

ABSTRACT

Over the past decades, gold nanoparticles have shown remarkable efficiency in a variety of biological applications, such as drug delivery systems, analyte detection, diagnostic approaches, and photothermal therapies. Among its peculiar physicochemical characteristics, localized surface plasmon resonance (LSPR) is important because it provides an absorption spectrum that allows the evaluation of molecule binding events. The LSPR effect occurs when an incident photon frequency resonates with the collective oscillation of conductive electrons on the metal surface, leading to a strong absorption band in the UV/visible spectrum. Therefore, gold nanoparticles provide two types of classic assays: spectroscopic evaluation of LSPR longitudinal peak change and naked eye visualization of aggregation phenomena, which change the color of the solution (both indicate the detection of biomolecules). Currently, the colorimetric sensor has attracted a lot of attention for its low cost, simplicity, practicality, and does not require sophisticated instrumentation. In this sense, a color nanobiosensor of gold nanorods (AuNRs) functionalized with anti-gp43 antibodies was developed to meet the demands of the diagnosis of Paracoccidioidomycosis (PCM). PCM is a systemic granulomatous mycosis endemic in Latin America, whose diagnosis is still often confused with tuberculosis, significantly affecting the patient treatment. Gp43 glycoprotein is the main antigenic component of the etiological agent of the disease, *Paracoccidioides brasiliensis*, and is commonly used for diagnosis. Results demonstrated rapid colorimetric detection (with the naked eye within 1 minute) with reduced ascorbic acid AuNBs at gp43 concentrations of 14, 7, 3.5, 1.5 and 0.7 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (ratio 1: 1 of AC: PEI - antibody to binding agent), and 50, 24, 10, 5 and 2.4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ in AuNBs with hydroquinone (7.4: 1 ratio - within 30 minutes). In these ratios, the nanosensor showed no colorimetric alteration when incubated with BSA protein at the same concentrations. However, the LSPR shifts observed before and after incubation with gp43 glycoprotein and BSA negative control allowed us to determine that, to act only as a plasmonic biosensor, the system still needs improvement. In general, the nanosensor showed a simple detection of gp43 antigenic protein, and it is promising, after improvement and sera tests, for PCM diagnosis.

Keywords: gold nanorods; plasmonic nanosensor; colorimetric nanosensor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Propagação de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. Imagem obtida de Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017.....20
- Figura 2:** Esquema de reação de “crosslinking” entre PEI e anticorpo, utilizando os reagentes EDAC e NHS. 1: Reação de adição eletrofílica do EDAC ao anticorpo. 2: Substituição nucleofílica do EDAC por NHS, formando um éster de NHS. 3: Reação entre o anticorpo contendo o éster de NHS e a amina primária do PEI para formação da ligação amida. AuNB: Nanobastões de ouro. Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2017.....26
- Figura 3:** Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de nanobastões de ouro. (A) Picos de absorção plasmônica longitudinal (777nm). (B) picos de absorção plasmônica longitudinal (878nm).....28
- Figura 4:** Absorção plasmônica dos biosensores construídos com AuNBs reduzidos com ácido ascórbico. Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (A) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 777nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 751nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 1:7,4 (pico máximo em 741nm – linha azul). (B) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 777nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 754nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 1:1 (pico máximo em 736nm – linha azul).....30
- Figura 5:** Absorção plasmônica dos biosensores construídos com AuNBs reduzidos com hidroquinona. Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (A) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 878nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 843 nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 1:7,4 (pico máximo em 841nm – linha azul). (B) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 878nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 867 nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 1:1 (pico máximo em 859nm – linha azul). (C) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 878nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 868 nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 7,4:1 (pico máximo em 863nm – linha azul).31

Figura 6: Espectros de absorção plasmônica durante a detecção da proteína gp43, com variações da concentração em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com ácido ascórbico 1:7,4(AC:PEI) + Gp43. Valores dados em microgramas de proteína aplicada. Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:7,4(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com Gp43.....	32
Figura 7: Espectros de absorção plasmônica durante a detecção da proteína gp43, com variações da concentração em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI) + Gp43. Valores dados em microgramas de proteína aplicada. Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com Gp43.....	33
Figura 8: Espectros de absorção plasmônica durante a detecção da proteína gp43, com variações da concentração em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona 1:1(AC:PEI) + Gp43. Valores dados em microgramas de proteína aplicada. Linha preta: AuNBs reduzido com hidroquinona 1:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com Gp43.....	35
Figura 9: Espectros de absorção plasmônica durante biofuncionalização com variações da concentração de paracoccidioidina em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona 7,4:1(AC:PEI) + Gp43. Valores dados em microgramas de proteína aplicada. Linha preta: AuNBs reduzido com hidroquinona 7,49:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com Gp43.....	36
Figura 10: Aspecto visual do biossensor construído com AuNBs reduzidos com ácido ascórbico. Tempo zero.....	37
Figura 11: Alteração colorimétrica do biossensor construído com AuNBs reduzidos com ácido ascórbico, com variações de concentração de gp 43 e BSA, após 10 minutos.....	37
Figura 12: Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona na proporção 7,4:1(AC:PEI). Comparando a alteração na coloração visual quando ligado com o antígeno e com a proteína albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações.....	38
Figura 13: Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona na proporção 1:1(AC:PEI). Comparando a alteração na coloração visual quando ligado com o antígeno e com a proteína albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações.....	38
Figura 14: Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona na proporção 1:7,4(AC:PEI). (A) AuNB+Antígeno (B) AuNB+BSA.....	39

Figura 15: Espectros de absorção plasmônica durante detecção de BSA, com variações da concentração de BSA em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzidos com ácido ascórbico 1:7,4(AC:PEI). Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:7,4(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com BSA.....	40
Figura 16: Espectros de absorção plasmônica durante detecção de BSA, com variações da concentração de BSA em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI). Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com BSA.....	41
Figura 17: Espectros de absorção plasmônica durante detecção de BSA, com variações da concentração de BSA em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona 1:1(AC:PEI). Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com BSA.....	42
Figura 18: Espectros de absorção plasmônica durante detecção de BSA, com variações da concentração de BSA em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona 7,4:1(AC:PEI). Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 7,4:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com BSA.....	43
Figura 19: Comparação deslocamento do Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com ácido ascórbico quando ligado a pacoccidioidina ou BSA.....	44
Figura 20: Comparação deslocamento do Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona quando ligado a pacoccidioidina ou BSA.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de antígeno (paracoccidioidina - solução proteica enriquecida de glicoproteína gp43) testadas.....	27
Tabela 2: Deslocamento observado na funcionalização com PEI.....	29
Tabela 3: Deslocamento observado com a construção do biossensor (AuNB + PEI + AC)...	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Anticorpo

AG - Antígeno

AgNO₃ – Nitrato de prata

AuNB – Nanobastões de ouro

AuNPs – Nanopartículas de ouro

BSA - Soro Fetal Bovino

CIE - Contra-imunoelektroforese

CTAB – Brometo de cetrimônio

DID - Imunodifusão dupla

EDAC – N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida

HAuCl₄ - Ácido cloroáurico

LAT – látex

M – Concentração Molar

MCT - Ministério da Ciência e Tecnologia

NaBH₄ – Borohidreto de sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NHS – N-hidroxisuccinimida

PCM - Paracoccidiodomicose

PEI - Polietilenoimina

LSPR - Ressonância de Plasmônica de Superfície Localizada

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Nanotecnologia	15
2.2 Nanopartículas de ouro	15
2.3 Propriedades ópticas de nanopartículas de ouro	16
2.4 Funcionalização	17
2.5 Biossensoriamento	17
2.6 Paracoccidiodomicose	18
2.7 Aspectos Clínicos	19
2.8 Proteína gp43	20
2.9 Diagnóstico PCM.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral:	23
3.2 Objetivos específicos:	23
4. METODOLOGIA	24
4.1 Síntese de nanobastões de ouro	24
4.1.1 Síntese com hidroquinona	24
4.1.2 Síntese com ácido ascórbico.....	24
4.2 Funcionalização das nanobastões de ouro	25
4.3 Biossensoriamento	27
4.4 Instrumentação.....	27
4.5 Análise estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

O interesse pelo uso da nanotecnologia em sistemas biotecnológicos vem aumentando, devido sua semelhança com biomoléculas. Nesse sentido, nanopartículas de ouro (AuNPs) têm sido amplamente estudadas e utilizadas, pela sua ampla aplicação biológica devido as suas propriedades: ópticas, estruturais, magnéticas e eletrônicas. Por tudo isto, a utilização destas nanopartículas tem atraído atenção dos pesquisadores, sendo promissoras para o desenvolvimento de biossensores e bioensaios.

Dentre as aplicações das nanopartículas de ouro (AuNPs), destacamos sua utilização para diagnóstico, pois possuem características físico-químicas únicas. Um fenômeno observado nas AuNPs é uma forte absorção característica no espectro visível (Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada - LSPR) que pode ser vista pela espectrofotometria através de bandas específicas. A LSPR é a oscilação dos elétrons livres causada pela radiação eletromagnética. O deslocamento ou alteração do padrão de absorção da banda observada na região UV-visível pode ser percebida quando há ligação de biomoléculas às nanopartículas de ouro por afetarem as densidades de cargas de elétrons na superfície. Portanto, quando biofuncionalizadas com anticorpos específicos, por exemplo, tornam-se um ótimo biossensor, pois permitem a identificação da interação com o antígeno de interesse, ocasionando modificações na absorbância e/ou alteração na sua cor a “olho nu”.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose causada por duas espécies do fungo *Paracoccidioides*: *Paracoccidioides brasiliensis* ou *Paracoccidioides lutzii*. É uma micose prevalente na América Latina, com 80% dos casos relatados no Brasil, acometendo principalmente homens, sobretudo trabalhadores rurais. É uma patologia que atinge acima de tudo uma população mais pobre, sendo considerada uma doença negligenciada. O contágio da PCM normalmente é através da inalação dos conídios, essa infecção pode ser curada ou estagna e se tornar latente sem apresentar sinais e sintomas por anos. Podendo ocorrer uma infecção severa e progressiva acometendo os pulmões e outros órgãos. Em relação ao diagnóstico dessa doença, ainda não existe um que seja rápido e preciso. No entanto, são utilizados como diagnóstico o isolamento e crescimento do patógeno, ELISA, Imunodifusão dupla (DID), aglutinação de partículas de látex, entre outros. Entretanto, considerando a situação econômica das áreas endêmicas, esses ensaios demandam capacitação técnica e alto custo de execução.

Perante o que foi evidenciado, ainda existe a necessidade de novas pesquisas e estudos para aprimoramento do diagnóstico da paracoccidiodomicose, a fim de buscar testes mais rápidos, sensíveis, baratos e melhores do que os já conhecidos. Através desse trabalho com nanobastões de ouro (AuNBs), foi possível identificar a proteína gp43, antígeno encontrado com maior frequência nos pacientes, por meio de uma simples alteração colorimétrica a olho nu, ou ainda, por visualização do deslocamento da banda de absorção plasmônica. Com estes resultados, esperamos aprimorar o biossensor para que ele seja capaz de proporcionar uma detecção rápida, específica e de alta qualidade do *Paracoccidioides brasiliensis* também em soro de pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é definida como a manipulação de materiais em escala de 0,1-100 nm (NIOSI; REID, 2007). De acordo com o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), a nanotecnologia é a tecnologia que trabalha com materiais de escalas nanométricas em ações na pesquisa, desenvolvimento e inovação (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA (MCT), DESENVOLVIMENTO DA NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA PPA 2004-2007).

Um grande interesse tem surgido no uso de nanotecnologia em sistemas biotecnológicos, já que as nanopartículas se tornam semelhantes a biomoléculas através do controle de seu tamanho durante a síntese. Além disso, é possível produzir nanopartículas em diferentes formatos, tais como nanobastões, nanoconchas, nanoesferas e nanocristais, e com diferentes modificações na superfície, o que pode contribuir para melhorar sua biocompatibilidade (WEST; HALAS, 2000). Sendo assim, a nanobiotecnologia possui aplicações em várias áreas como a farmacêutica, na medicina, na agricultura, no diagnóstico, em processos industriais e na indústria de alimentos (HULLMANN, 2017).

2.2 Nanopartículas de ouro

Sabe-se que as nanopartículas de ouro (AuNPs) tem ampla aplicação biológica devido suas propriedades, sendo elas: ópticas, estruturais, magnéticas e eletrônicas (PISSUWAN; VALENZUELA; CORTIE, 2008). Além disso, são as nanopartículas metálicas mais estáveis que se conhece hoje (DANIEL; ASTRUC, 2004). Por tudo isto, a utilização destas nanopartículas tem atraído atenção dos pesquisadores, sendo promissoras para o desenvolvimento de biossensores e bioensaios (LE *et al.*, 2018).

As partículas com forma esférica (nanoesferas) e em forma de bastão (nanobastões ou “nanorods”) são as mais estudadas para aplicações biológicas (WU *et al.*, 2016). Os nanobastões de ouro (AuNBs) são alongados e com diâmetro de 10 nm e comprimento que varia de 30 a 100 nm (YANG; CUI, 2008).

As nanopartículas abrangem uma funcionalidade enorme com vários tipos de moléculas e biomoléculas, pois depois de sintetizadas são estáveis, possuindo uma longa

duração e, embora quando em contato com diversos solventes as partículas se agreguem, elas conseguem retornar para um estado homogêneo (DANIEL; ASTRUC, 2004).

2.3 Propriedades ópticas de nanopartículas de ouro

O material em escala nanométrica apresenta propriedades diferentes daquelas apresentadas pela macrométrica, pelo fato de que materiais nanométricos apresentam redução do movimento de elétrons, definindo características físicas e químicas diferenciadas.

As nanopartículas de ouro e prata são diferentes umas das outras, suas propriedades ópticas são facilmente detectadas por um aumento na amplitude de onda de luz (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009) e pelas bandas específicas que apresentam em regiões do visível. Esses fenômenos acontecem devido à ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) mais intensa (HUANG; EL-SAYED, 2010).

A LSPR é oscilação dos elétrons de condução das partículas metálicas estimulada pela exposição a luz (JENSEN *et al.*, 2000). Essa oscilação estimulada pela absorção de luz corresponde a absorção máxima da ressonância de plasmônica de superfície gerando uma banda de absorção na região UV-Visível, podendo ser detectada pelo espectrofotômetro (HULTEEN *et al.*, 1999). O efeito da LSRP depende de características das nanopartículas metálicas como o tamanho e a forma (JENSEN *et al.*, 2000).

As partículas com formato esférico apresentam apenas uma banda de absorção forte em torno de 520 nm. (CREIGHTON; EADON, 1991). Para nanopartículas em formato de bastão, devido ao seu formato, a oscilação ocorre em dois sentidos, longitudinal e transversal onde se observa duas bandas de absorção na região do visível. A banda de oscilação transversal será exibida em torno de 520 nm e a outra banda da oscilação longitudinal em torno de 755 nm (HUANG; EL-SAYED, 2010).

A banda longitudinal dos nanobastões de ouro é sensível à ligações de partículas que circulam em seu meio; assim, quando há uma ligação de moléculas no nanobastão, a densidade de cargas dos elétrons da sua superfície é afetada causando deslocamento da sua banda de absorção plasmônica (TIWARI *et al.*, 2011). A modificação de tamanho da nanopartícula ou a ligação de moléculas na sua superfície pode aumentar a relação de aspecto, modificando assim a cor do ouro que em solução é azul, passando a ser vermelho, além de que o comprimento de onda é deslocado (HUANG; EL-SAYED, 2010).

As AuNPs em forma de bastões exibem qualidade melhores que as nanoesferas para detecção devido as suas características (JAIN *et al.*, 2006): possui uma sensibilidade própria

em relação ao ambiente que está inserida com comparação as nanoesferas com o mesmo tamanho (LIAO; HAFNER, 2005), além de uma maior absorção de luz na sua ressonância de plasmon longitudinal quando comparado a outros nanomateriais conhecidos (JAIN; EL-SAYED, 2008).

2.4 Funcionalização

As AuNPs podem apresentar picos deslocados na região do infravermelho quando sua superfície é substituída ou coberta por partículas conhecidas (WILSON, 2008). Essa funcionalização deve acontecer com materiais propícios para gerar maior estabilidade e novas funcionalidades, materiais esses como agentes biológicos, antígenos, peptídeos, anticorpos para melhorar as suas propriedades possibilitando a formação de bioconjugados (ZUCOLOTTO, *et al.*, 2014; FALLEIROS, *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2011).

Com a superfície funcionalizada, por meio de ligantes como polietilenoglicol (PEG) ou polietilenoimina (PEI), as nanopartículas adquirem uma vasta aplicação como diagnóstico, tratamentos de doenças, e uso na cosmética entre outros (THOMPSON, 2007).

2.5 Biossensoriamento

Com a necessidade de diagnóstico rápido, foi preciso um aperfeiçoamento de técnicas para que pudessem ser implantados na rotina dos laboratórios. Vários métodos de detecção por biossensoriamento já foram desenvolvidos, sendo os mais utilizados aqueles baseados em marcadores de fluorescência, quimiluminescência e radioativos. No entanto, estas metodologias ainda possuem um alto custo e necessitam de treinamento especializado. Tudo isto aumenta o interesse em estudar e utilizar as AuNPs por serem de fácil manipulação, e possuírem maior estabilidade e maior sensibilidade (SANG *et al.*, 2015).

As AuNPs, quando em solução, apresentam uma cor avermelhada, e quando aglomeradas, apresentam uma cor azulada (LIU *et al.*, 2013). E ainda, se a camada de ânions for removida por adição de biomoléculas, por exemplo, as nanoesferas começam a se aproximar e se aglomerar. O efeito da aglomeração, produzindo a mudança de cor foi usado para detectar um determinado alvo, e usados como biossensores para detectar: antígeno de Hepatite B (LE *et al.*, 20018), doença de Alzheimer (Cao *et al.*, 2011), vírus da gripe (LI *et al.*, 2007), vírus da dengue (BASSO *et al.*, 2018), entre outros. 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, permitindo uma detecção colorimétrica. E isso ocorre pelo fato de nanopartículas de ouro terem cores diferentes dependendo do ambiente que os circunda (VERMA *et al.*, 2008).

Além disso, as nanopartículas são facilmente funcionalizadas com moléculas de reconhecimento (como anticorpos, antígenos, oligonucleotídeos, etc.) por métodos que levam a conjugados altamente estáveis (WILSON, 2008). Uma das várias aplicações de biossensores é baseada na mudança de cor da solução devido a mudanças nas propriedades dielétricas das partículas resultante da ligação de moléculas biológicas, tais como anticorpos, à nanopartículas de ouro (NATH; CHILKOTI, 2004).

Portanto, uma tecnologia de biossensor acoplada com o uso de nanopartículas metálicas oferece benefícios comparados aos métodos tradicionais com relação ao tempo de análise, sensibilidade e simplicidade de manipulação (FERREIRA *et al.*, 2016).

2.6 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por duas espécies do fungo *Paracoccidioides*: *Paracoccidioides brasiliensis* ou *Paracoccidioides lutzii* (MATUTE *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Essa patologia foi relatada pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908, que isolou o microorganismo através de lesões orais de pessoas infectadas (LACAZ, 1994). Na natureza ele é encontrado na forma filamentosa apresentando propágulos infectantes chamados de conídios, e quando inalados os conídios se transformam na forma leveduriformes que é sua forma parasita no hospedeiro (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

É uma importante doença endêmica que ocorre no continente americano estendendo do México até a Argentina (VAN DAMME *et al.*, 2006). O perfil epidemiológico de PCM no Brasil varia de 3360 a 5600 casos registrado por ano da doença, portanto é o país com maior número de pacientes que adquire a doença, com 80% dos casos (MARTINEZ, 2017). Sendo as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste com maior prevalência, em destaque os estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso (COUTINHO *et al.*, 2002). A região Amazônica a partir da segunda metade do século 20 se tornou uma região endêmica aumentando os números de relatos de paracoccidioidomicose, aparentemente relacionados ao aumento de atividade agrícola na região (MATOS *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2014).

A PCM acomete principalmente homens com menor ocorrência entre as mulheres devido à proteção hormonal, pois o hormônio estrógeno retarda a transformação dos conídios

que é a forma patogênica do fungo, dificultando a sua infecção. Afeta, sobretudo trabalhadores rurais que estão em contato direto com o solo, devido à presença do fungo no mesmo. E predomina na população entre 30 a 59 anos e de raças mistas (CAMPOS *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2017).

É uma patologia que atinge acima de tudo uma população mais pobre onde geralmente não se tem recursos para controle, medicação e pesquisas relacionadas a ela, sendo considerada uma doença negligenciada (Academia Brasileira de Ciências, 2010). Mas isso vem mudando já que ela foi incluída como prioridade em pesquisa na América Latina e faz parte de doenças com notificação obrigatória em alguns estados no Brasil (DUJARDIN *et al.*, 2010).

2.7 Aspectos Clínicos

O contágio da PCM normalmente é através da inalação dos conídios do *Paracoccidioides*, que se depositam nos alvéolos e brônquios dos pulmões e apresenta a forma levedura patogênica, podendo causar lesões pulmonares primeiramente (SILVA NETO *et al.*, 2014). A infecção pode ser curada ou estagna e se tornar latente sem apresentar sinais e sintomas por anos (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Mas em qualquer momento a infecção pode progredir e acometer vários locais além dos pulmões, como o fígado, pele, linfonodos, rim, adrenais e mucosas (FRANCO *et al.*, 1987).

De maneira geral, as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes envolvem tosse seca ou com muco, seguida de dispneia. A maioria manifesta múltiplas lesões orais além de aparecimento de úlceras com presença de hemorragia. Também é comum o aparecimento de lesões na pele na área do nariz e boca (MARQUES, 2012; MARQUES, 2013). Pode haver acometimento dos pulmões, causadas pelas lesões que levam a reações granulomatosas e fibrose. Se não tratada a fibrose pode progredir e ser letal (MARCHIORI *et al.*, 2011). E muitas vezes a doença se assemelha a tuberculose, sendo geralmente confundida no diagnóstico (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

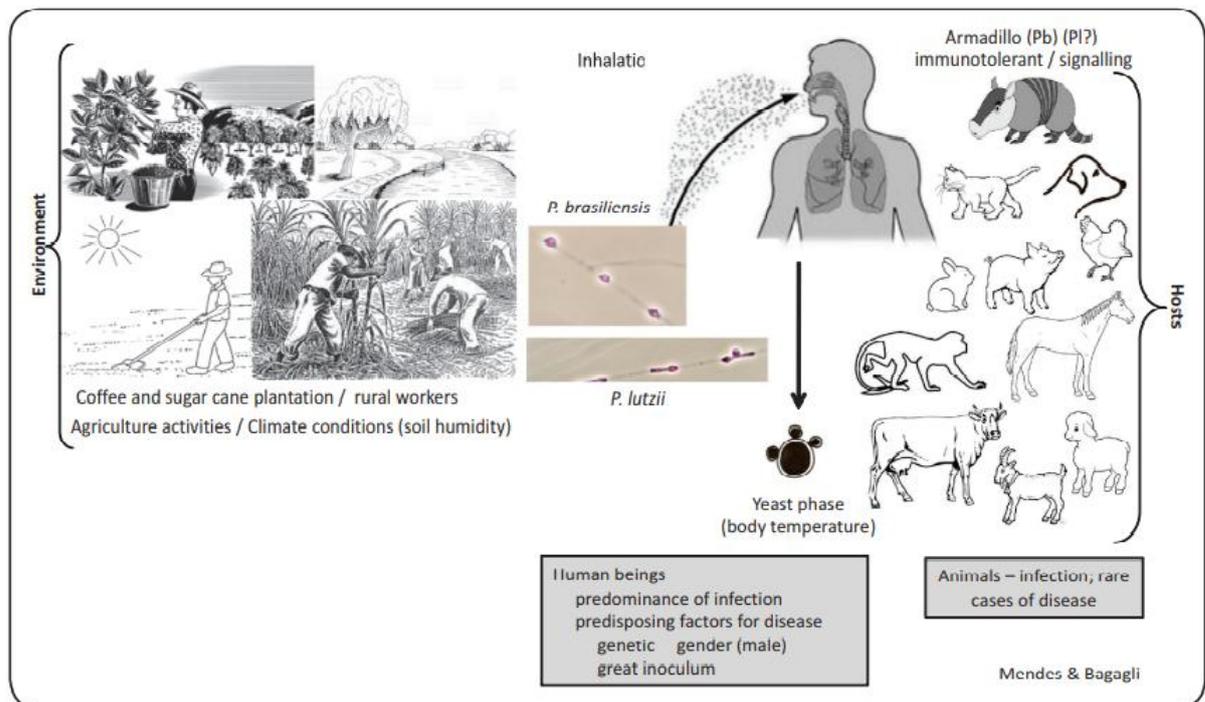


Figura1: Propagação de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*. Imagem obtida de Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017.

2.8 Proteína gp43

A gp43 é o antígeno conhecido e encontrado com maior frequência nos pacientes com a PCM (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989; CAMARGO *et al.*, 1991; DA SILVA *et al.*, 2004). A glicoproteína de 43KDa chamada de gp43 é a proteína secretada mais estudada na PCM. É sintetizada no citoplasma da *P. brasiliensis*, armazenada em vesículas, levada até a parede celular e posteriormente liberada no meio extracelular (SANDOVAL *et al.*, 1996). Foi o primeiro componente antigênico do fungo a ter sua estrutura sequenciada e clonada, expresso como proteína de fusão em bactéria, foi purificado e identificado em 1986 (PUCCIA *et al.*, 1986; TABA *et al.*, 1989; CISALPINO *et al.*, 1996).

A gp43 é uma proteína importante na virulência do fungo favorecendo a adesão e instalação fúngica nos tecidos. Em experimento no ano de 1994 Vicentini e colaboradores inocularam nos testículos de hamster a gp43 purificada através do revestimento da *P. brasiliensis* com a laminina obtendo uma doença granulomatosa mais rápida e mais grave (VICENTINI *et al.*, 1994). Em outros estudos experimentais foi relatada que a glicoproteína é capaz de inibir consideravelmente a fagocitose do fungo pelos macrófagos e a liberação de óxido nítrico como consequência mostrou-se um importante mecanismo para instalação da

infecção primária do fungo nos seus hospedeiros (POPI; LOPES; MARIANO, 2002). Também apresenta efeito proteolítico na elastina, caseína e colágeno que facilita a adesão do fungo às células do epitélio no vetor (MENDES-GIANNINI *et al.*, 2007). Foi reconhecido dois peptídeos na superfície da gp43, P4 e P23, que são capazes de modular uma resposta anti-inflamatória local e sistêmica, liberando IL-10, um fator imunomodulatório importante para evitar a inflamação e inibir a função dos macrófagos sendo responsável por garantir a sua sobrevivência no hospedeiro (KONNO *et al.*, 2012).

Apesar da estrutura complexa do *P. brasilienses* a glicoproteína 43kDa foi identificada em 100% do pacientes com PCM, se tornando um importante marcador para imunodiagnóstico da doença, havendo poucos casos relatados de anticorpo indetectável (SOUZA *et al.* 1997; TRAVASSOS *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2005). Porém não é recomendado para diagnósticos em paciente com PCM infectados com *P. lutzii*, pois há relatos de resultados falso-negativos quando se usa antígenos de *P. brasiliensis* (LEITÃO *et al.*, 2014).

2.9 Diagnóstico PCM

É importante um diagnóstico rápido e específico para essa micose para um início de terapia adequada e assim evitar complicações nos pulmões e disseminação dos fungos para outros órgãos. O diagnóstico inicial da doença é feito através de identificação de sinais e sintomas presentes nos pacientes em seguida por métodos de identificação do agente etiológico, através de métodos como: imunológico, microbiológico, moleculares e histopatológicos.

No entanto, determinar precisamente os parâmetros clínicos para diagnóstico da PCM é um grande desafio, visto que as características da doença podem ser confundidas com outras. Em caso de comprometimento pulmonar a PCM deve ser diferenciada com a tuberculose, coccidioidomicose, histoplasmoses, sarcoidose, pneumoconiose e pneumonite intersticial. Em lesões cutânea-mucosa as condições a serem consideradas no diagnóstico diferencial são leishmaniose cutânea ou mucosa, tuberculose, cromoblastomicose, hanseníase, sarcoidose, lues, neoplasia. Na PCM digestiva deve ser diferenciada da tuberculose e doença de Chron, enquanto nas formas de PCM que afetam o sistema nervoso central, as condições são tuberculose, criptococose, cisticercose e neoplasias (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017).

O “padrão ouro” para diagnóstico da doença é a identificação direta da *Parracoccidioides spp* em exames a frescos de escarro, biopsia de lesões, aspiração de

linfonodos (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2017). Os fungos são observados como células arredondadas de 2 a 40µm, com paredes birrefringentes e esverdeadas, além da presença de brotamentos único ou múltiplos chamada de “aspecto em roda de leme” (MOREIRA, 2008). Entretanto, apesar dessa metodologia ser considerada padrão ouro, pode haver dificuldade para a coleta de material biológico devido ao estado do paciente e também se tratar de uma técnica não sensível e demorada (CAMARGO, 2008). Assim, testes sorológicos se tornam alternativas mais eficazes, rápidas e simples para diagnóstico.

A Imunodifusão dupla (DID) é a metodologia mais utilizada para diagnóstico da PCM atualmente devido a sua simplicidade, baixo custo e alta especificidade. No entanto sua sensibilidade pode variar de 65 a 100% dependendo do antígeno que é utilizado (CANO; RESTREPO, 1987; SHIKANAIYASUDA *et al.*, 2006).

A Contra-imunoeletroforese (CIE) também é empregada para diagnóstico de PCM de rápida execução com sensibilidade de 77% a 97% e especificidade de 95%. Mas trata-se de um método mais caro e não é usado na rotina laboratorial apenas para monitoramento de pacientes em tratamento (NEGRO *et al.*, 2000; CAMARGO, 2008).

A técnica Elisa tem sido utilizada para diagnóstico da doença pelo grande número de amostras que podem ser analisadas ao mesmo tempo (TELES; MARTINS, 2011). Sua sensibilidade varia de 95% a 100% e especificidade de 85%. Mas essa técnica ainda apresenta reações cruzadas com outras micoses e pessoas saudáveis que vivem em áreas endêmicas de PCM (ALBUQUERQUE; SILVA; CAMARGO, 2005; MALUF *et al.*, 2003).

O teste de aglutinação de partículas de látex (LAT) é um método rápido e de fácil aplicação. Mas em teste descrito em 1978 com partículas de látex sensibilizadas com exoantígeno preparado a partir de pool de três isolados de *P. brasiliensis* apresentou sensibilidade baixa de 65% (CANO; RESTREPO, 1987). Em 2015, Dos Santos e colaboradores desenvolveram um imunoenensaio utilizando látex sensibilizado com a gp43 ou com o anticorpo monoclonal mAb17c (anti-gp43) e o teste apresentou sensibilidade de 98,46% e especificidade de 93,94% na detecção de anticorpos e 96,92% de sensibilidade e 88,89% de especificidade na detecção da gp43 circulante. Entretanto apresentou reações cruzadas de pacientes com histoplasmose, aspergilose e candidíase (SANTOS *et al.*, 2015).

Embora apresentem uma boa sensibilidade e especificidade para diagnóstico de PCM, muitos destes testes possuem baixa sensibilidade e especificidade adequada, além de produzir reações falso-positivas e reações cruzadas. Então novos métodos têm sido estudados para pesquisa de micoses, através da utilização de nanotecnologia para um diagnóstico mais eficaz, rápido, barato e de fácil manejo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Desenvolver e analisar um biossensor plasmônico e colorimétrico para detecção simples e rápida da glicoproteína gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* utilizando nanobastões de ouro.

3.2 Objetivos específicos:

- Funcionalizar nanobastões de ouro com o anticorpo anti-gp43 e avaliar todas as etapas de desenvolvimento do biossensor;
- Analisar deslocamentos na ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) antes e após incubação com a glicoproteína gp43;
- Analisar alterações colorimétricas (a olho nu) após incubação com a glicoproteína gp43.
- Verificar quais as melhores concentrações da glicoproteína que podem ser detectadas pelo biossensor proposto.

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese de nanobastões de ouro

4.1.1 Síntese com hidroquinona

Os nanobastões de ouro foram sintetizados pelo método mediado por sementes. 460 µL de uma solução recém-preparada de boro-hidreto de sódio 0,01M dissolvido em hidróxido de sódio 0,01M foi rapidamente adicionada em 10 mL de solução de H_{AuCl}₄ 0,5 mM contendo CTAB 0,1M sob agitação. Uma mudança de cor de amarelo intenso para marrom claro indicou a formação bem-sucedida das sementes de nanopartículas de ouro. Essa solução semente foi reservada e mantida a 25°C. Para sintetizar nanobastões de ouro com ressonância plasmônica longitudinal de aproximadamente 800 nm, foram adicionados 11,5 µL de solução de nitrato de prata 0,1 M a 10 mL de solução de H_{AuCl}₄ 0,5 mM contendo CTAB 0,1M. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de solução aquosa de hidroquinona 0,1 M e a mistura foi agitada delicadamente até que ficasse transparente. Em seguida, 160 µL da solução semente foram adicionados sob agitação constante, até adquirir coloração arroxeada (aproximadamente 20 minutos). Todo o processo foi realizado com temperatura controlada a 27°C. Posteriormente, a solução resultante foi incubada *overnight* em estufa a 30°C (NAZARI *et al.*, 2017).

4.1.2 Síntese com ácido ascórbico

Para preparo da solução semente, uma solução de CTAB (5 mL, 0,20 M) foi misturada com 5 mL de H_{AuCl}₄ (0,00050 M), sob agitação constante e temperatura controlada a 27°C. À solução agitada, foram adicionados 0,60 mL de NaBH₄ 0,010 M gelado, resultando na formação de uma solução marrom clara. A agitação vigorosa da solução foi mantida por 2 minutos e, em seguida, a solução foi reservada e mantida a 25°C. Para a etapa de crescimento dos nanobastões de ouro, foi adicionado CTAB (5 mL, 0,20 M) a 70 µL de solução 0,0040 M de AgNO₃ a 25°C. A esta mistura, foram adicionados 5 mL de H_{AuCl}₄ 0,0010 M, e, após uma leve agitação manual da solução, foram adicionados 70 µL de ácido ascórbico 0,0788 M, resultando em uma solução transparente. Por último, foram adicionados 12 µL da solução semente à solução de crescimento a 27-30°C, e a cor da solução mudou gradualmente para

roxo intenso dentro de 15 minutos. Posteriormente, a solução resultante foi incubada *overnight* em estufa a 30°C (NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003).

4.2 Funcionalização das nanobastões de ouro

Os nanobastões de ouro foram funcionalizados com anticorpo anti-gp43 através do reagente ligante polietilenoimina (PEI). Essa ligação ocorre através do grupo NH₃ presente em uma das extremidades do PEI que se liga ao ouro, enquanto a sua outra extremidade com o grupo amina se liga covalentemente ao grupo carboxílico (-COOH), o qual está presente no anticorpo. Para que ocorra a ligação entre os radicais carboxilas com as aminas é necessário uma reação de amidação mediada por diimida. Para tanto, é utilizado cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDAC) como agente acoplante e o N-hidroxisuccinimida (NHS) como agente estabilizante, assim convertendo os ácidos carboxílicos em ésteres ativos, que em seguida interagem com os grupos amina dos reagentes ligantes (Figura 2).

Para que fosse possível a funcionalização dos nanobastões com os anticorpos anti-gp43 através da ligação do PEI, 1,5 mL da solução de nanobastões foram centrifugados a 6100g por 15 minutos (para remoção do excesso de CTAB remanescente da síntese). Em seguida, os nanobastões foram ressuspensos em água ultrapura e adicionados depois a polietilenoimina (0,3%), então, incubados a temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida, a solução foi centrifugada 6 vezes a 2000g e 1 vez a 5000 g por 5 minutos e os nanobastões foram ressuspensos em água ultrapura para diferentes proporções de AC:PEI. Sendo as proporções 1:7,4(AC:PEI), 1:1(AC:PEI) e 7,4(AC:PEI). Após esta etapa foi realizada uma leitura no espectrofotômetro na região UV-Visível. Depois, foram adicionados anticorpo anti-gp43, previamente preparado com EDAC/NHS, como descrito a seguir:

A solução do anticorpo foi antecipadamente preparada misturando-se 70µL de anticorpo e 0,2 µL de EDAC/HNS (0,4M:0,1M) com uma proporção na concentração de 1:1, para um volume final de 70,2 µL na concentração 1:1(AC:PEI). E na proporção 1:7,4(AC:PEI) solução do anticorpo foi antecipadamente preparada misturando-se 140 µL de anticorpo e 0,4 µL de EDAC/HNS (0,4M:0,1M) com uma proporção na concentração de 1:1, para um volume final de 144 µL e depois, incubadas por 30 minutos a 4°C.

Após adição dos anticorpos, os nanobastões foram novamente incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, e, após este período, centrifugados 3 vezes a 2000g e 1 vez

a 5000g por 5 minutos cada, além de ressuspensos em 531,5μL de água utrapura. Posteriormente, foi feita a leitura no espectrofotômetro para verificar a eficiência da ligação.

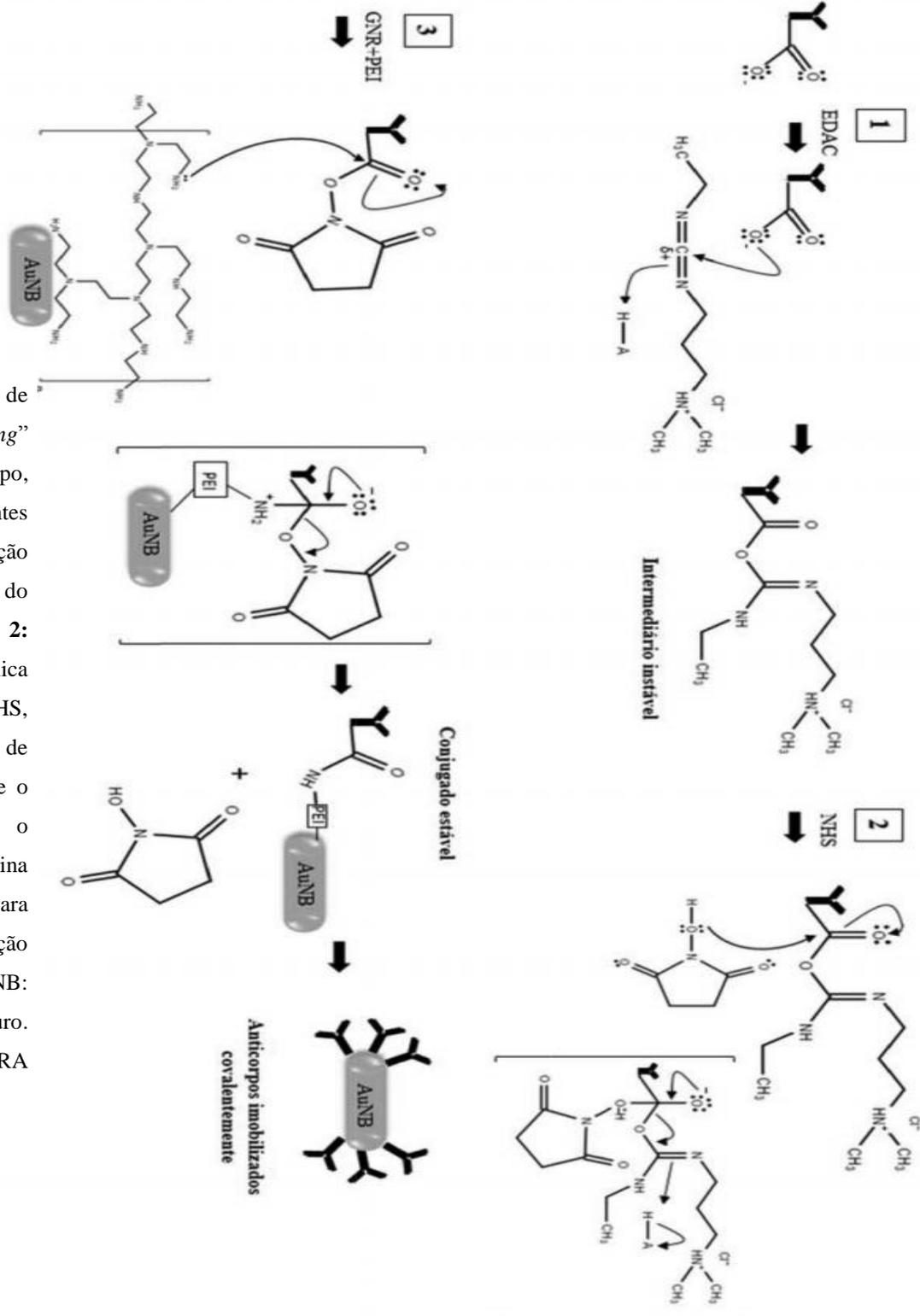


Figura 2: Esquema de reação de “crosslinking” entre PEI e anticorpo, utilizando os reagentes EDAC e NHS. **1:** Reação de adição eletrofílica do EDAC ao anticorpo. **2:** Substituição nucleofílica do EDAC por NHS, formando um éster de NHS. **3:** Reação entre o anticorpo contendo o éster de NHS e a amina primária do PEI para formação da ligação amida. AuNB: Nanobastões de ouro. Adaptado de FERREIRA et al., 2017.

4.3 Biossensoriamento

Para detecção do antígeno, o sistema nanobastão de ouro + anticorpo (biossensor) foi dividido em 5 tubos com diferentes volumes da solução de paracoccidioidina (solução proteica enriquecida na glicoproteína gp43), obtendo diferentes concentrações (tabela1), com o volume final de 110µL. Cada mistura foi então incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, foram centrifugadas 2 vezes a 2000g por 5 minutos, ressuspensas em 100µL de água ultra-pura e lidas em espectrofotômetro. As mesmas concentrações e volumes finais foram utilizados com BSA como controle negativo.

Concentração final antígeno	
50 µg/mL	14 µg/mL
24 µg/mL	7 µg/mL
10 µg/mL	3 µg/mL
5 µg/mL	1,5 µg/mL
2,4 µg/mL	0,7 µg/mL

Tabela 1: Concentrações de antígeno (paracoccidioidina - solução proteica enriquecida na glicoproteína gp43) testadas.

4.4 Instrumentação

Para a análise das reações, os espectros foram medidos em espectrômetro UV-Vis (UV-1800, SHIMADZU), no qual é possível detectar as alterações dos elétrons de superfície resultantes da ligação anticorpos-antígenos, por deslocamento do espectro gerado (de acordo com a propriedade de ressonância plasmônica de superfície localizada - LSPR).⁷

4.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o *software Graph Pad Prism* (Versão 5.0), empregando-se o teste ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Adotou-se o nível de significância $p < 0,05$ para todas as análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente a utilização de nanopartículas de ouro vem aumentando como biossensores plasmônicos ou por simples detecção colorimétrica a olho nu através da agregação. Entretanto, a maioria dos trabalhos utilizam nanoesferas, cuja agregação resulta em solução azulada (FENG *et al.*, 2018; CHANG *et al.*, 2017), sendo poucos os trabalhos que utilizam nanobastões para agregação (MA *et al.*, 2010), especialmente para alteração colorimétrica (SHAMS *et al.*, 2019). Nesse sentido, os nanobastões de ouro representam uma alternativa interessante para o desenvolvimento de um teste rápido como diagnóstico da paracoccidiodomicose. Para verificar se um nanossensor seria promissor para tanto, iniciamos investigando se uma construção com nanobastões de ouro seria capaz de detectar a proteína gp43. Isso porque esta proteína é o antígeno mais prevalente no soro de indivíduos infectados com o agente patogênico da PCM (CAMARGO *et al.*, 1991).

Pelas suas propriedades ópticas e eletrônicas, os nanobastões de ouro permitem a visualização do deslocamento da banda de absorção plasmônica longitudinal, quando há ligação de biomoléculas na sua superfície (TIWARI *et al.*, 2011). Além disso, caso a interação seja intensa, pode ocorrer agregação dos AuNBs, o que resulta em uma alteração colorimétrica que pode ser vista a olho nu (SHAMS *et al.*, 2019). Primeiramente, os nanobastões de ouro foram sintetizados por dois tipos de métodos de redução de semente como descrito anteriormente, onde em um se utiliza ácido ascórbico e o outro hidroquinona com agente redutor. Esses métodos permitiram a obtenção de uma solução coloidal de cor arroxeada de nanobastões de ouro com picos de absorção bem definidos (Figura 3).

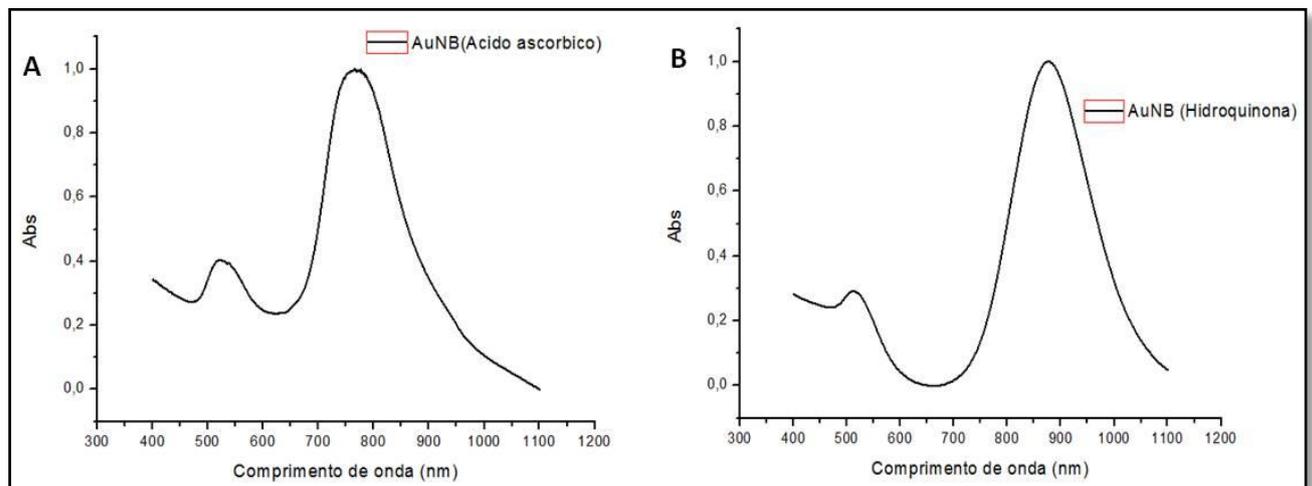


Figura 3: Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) de nanobastões de ouro. (A) Picos de absorção plasmônica longitudinal (777nm). (B) Picos de absorção plasmônica longitudinal (878nm).

Foi calculada a concentração dos nanobastões através da lei de Beer-Lambert ($Abs = \epsilon \cdot l \cdot c$). E para isso foi utilizada os valores do coeficiente de extinção encontrado no estudo de Vigdeman e Zubarev (2013). Obtendo a concentração de $7,22 \times 10^{-7}$ mM para o AuNB sintetizado com ácido ascórbico e $3,02 \times 10^{-7}$ mM para AuNB sintetizado com hidroquinona.

Os nanobastões foram sintetizados pelo mesmo método de síntese mediado por sementes e reduzidos por diferentes substâncias, sendo elas o ácido ascórbico e hidroquinona. E foi observado que a síntese com hidroquinona mostrou a banda com maior comprimento de onda (Figura 3). E Peixoto em 2015 menciona que banda em maior comprimento de onda é mais sensível às modificações do índice de refração do meio (PEIXOTO, 2015).

Após a síntese dos nanobastões de ouro, foram funcionalizados com polietilenoimina a 0,3% conforme outros trabalhos (PYSHNAYA *et al.*, 2014). A funcionalização foi satisfatória para os nanobastões conforme a figura 4 e 5 devido aos deslocamentos observados (tabela 2).

Para os nanobastões sintetizados com ácido ascórbico, foram utilizadas apenas as proporções de 1:7,4 e de 1:1 de AC:PEI pois a razão de 7,4:1 não foi satisfatória. Deslocamentos de 3nm são considerados como o valor de zero, pois esse intervalo corresponde ao erro e desvio do equipamento (espectrofotômetro).

AuNB	Relação AC:PEI	Deslocamento
AuNB ácido ascórbico	1:7,4	26
AuNB ácido ascórbico	1:1	23
AuNB hidroquinona	1:7,4	35
AuNB hidroquinona	1:1	11
AuNB hidroquinona	7,4:1	10

Tabela 2: Deslocamento observado na funcionalização com PEI em comparação ao AuNB.

Após a funcionalização com PEI, os AuNBs foram bioconjugados ao anticorpo anti-gp43, para a detecção desta proteína, quando presente. Como mostrado nas figuras 4 e 5. Assim a partir desse momento foi construído um biossensor.

AuNB	Relação AC:PEI	Deslocamento
AuNB ácido ascórbico	1:7,4	10
AuNB ácido ascórbico	1:1	18
AuNB hidroquinona	1:7,4	2
AuNB hidroquinona	1:1	8
AuNB hidroquinona	7,4:1	5

Tabela 3: Deslocamento observado com a construção do biossensor (AuNB + PEI + AC) em comparação AuNB+PEI.

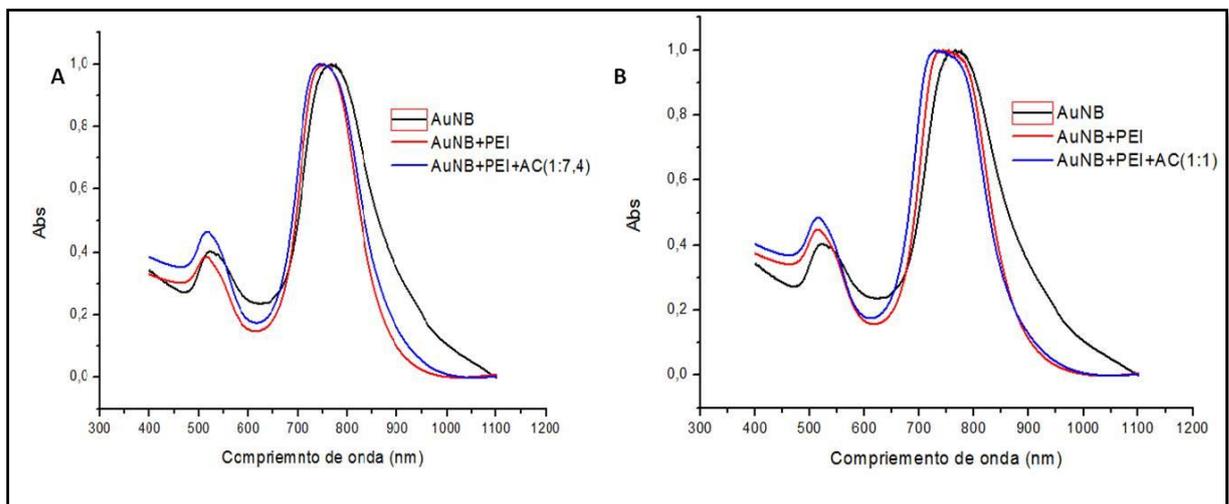


Figura 4: Absorção plasmônica dos biossensores construídos com AuNBs reduzidos com ácido ascórbico. Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (A) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 777nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 751nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 1:7,4 (pico máximo em 741nm – linha azul). (B) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 777nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 754nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 1:1 (pico máximo em 736nm – linha azul).

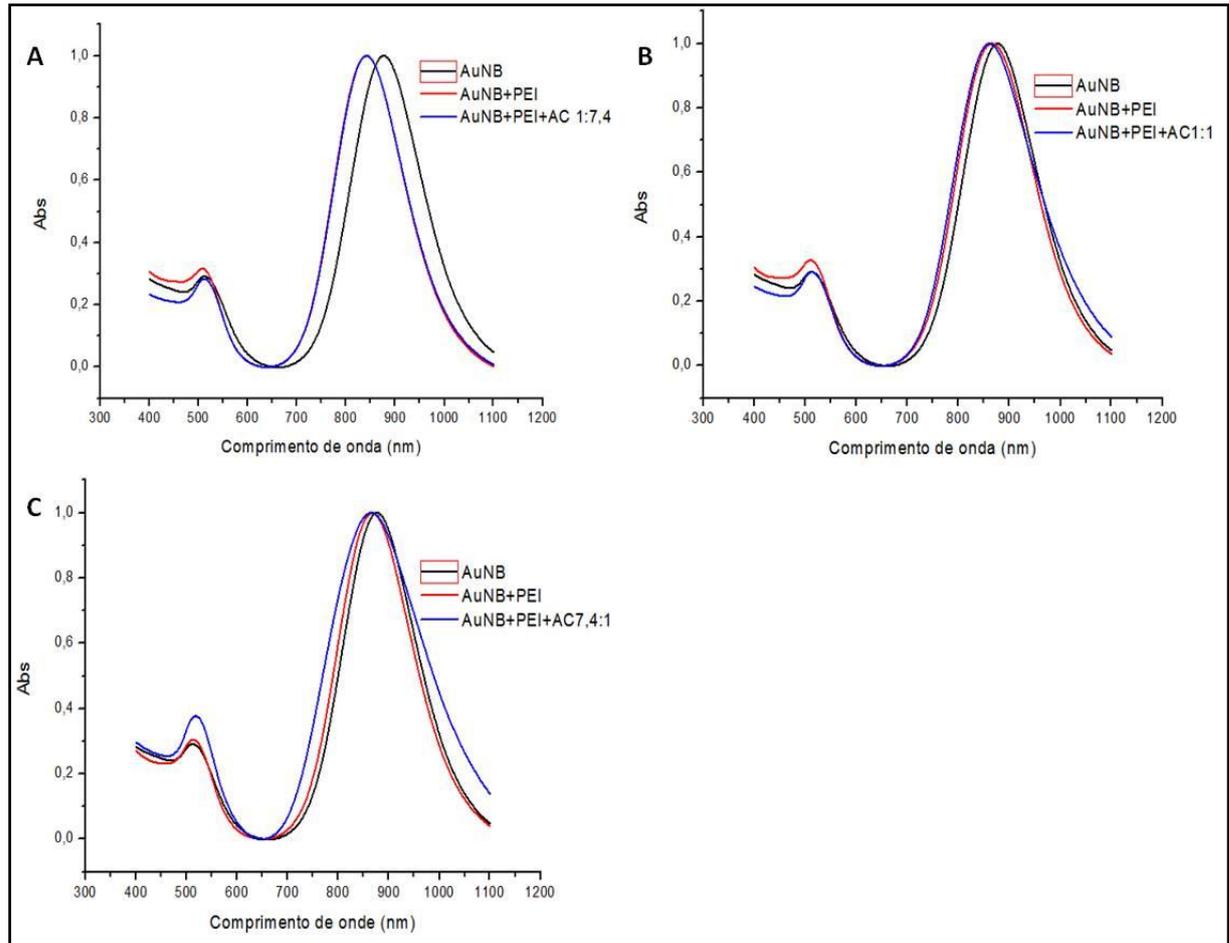


Figura 5: Absorção plasmônica dos biosensores construídos com AuNBs reduzidos com hidroquinona. Espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) (A) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 878nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 843 nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 1:7,4 (pico máximo em 841nm – linha azul). (B) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 878nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 867 nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 1:1 (pico máximo em 859nm – linha azul). (C) AuNB de ouro com pico de absorção plasmônica longitudinal máximo em 878nm (linha preta), AuNB funcionalizada com o reagente PEI (pico máximo de absorção 868 nm – linha vermelha) e AuNB bioconjugada com anticorpo anti-gp43 7,4:1 (pico máximo em 863nm – linha azul).

Em seguida, foi testada a detecção do antígeno pelo biossensor. Foram testadas diferentes concentrações de paracoccidioidina (solução enriquecida na glicoproteína gp43) e de proteína albumina sérica bovina (BSA), a qual foi usada como controle negativo. Com os

AuNBs reduzidos com ácido ascórbico foram utilizadas as concentrações de paracoccidioidina de 14 μ g/ml, 7 μ g/ml, 3 μ g/ml, 1,5 μ g/ml e 0,7 μ g/ml (Figuras 6 e 7). Por outro lado, estas concentrações não forneceram resultados satisfatórios para os AuNBs reduzidos com hidroquinona; dessa forma, para estes nanobastões foram utilizadas as concentrações de 50 μ g/ml, 24 μ g/ml, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 2,4 μ g/ml (Figuras 8 e 9).

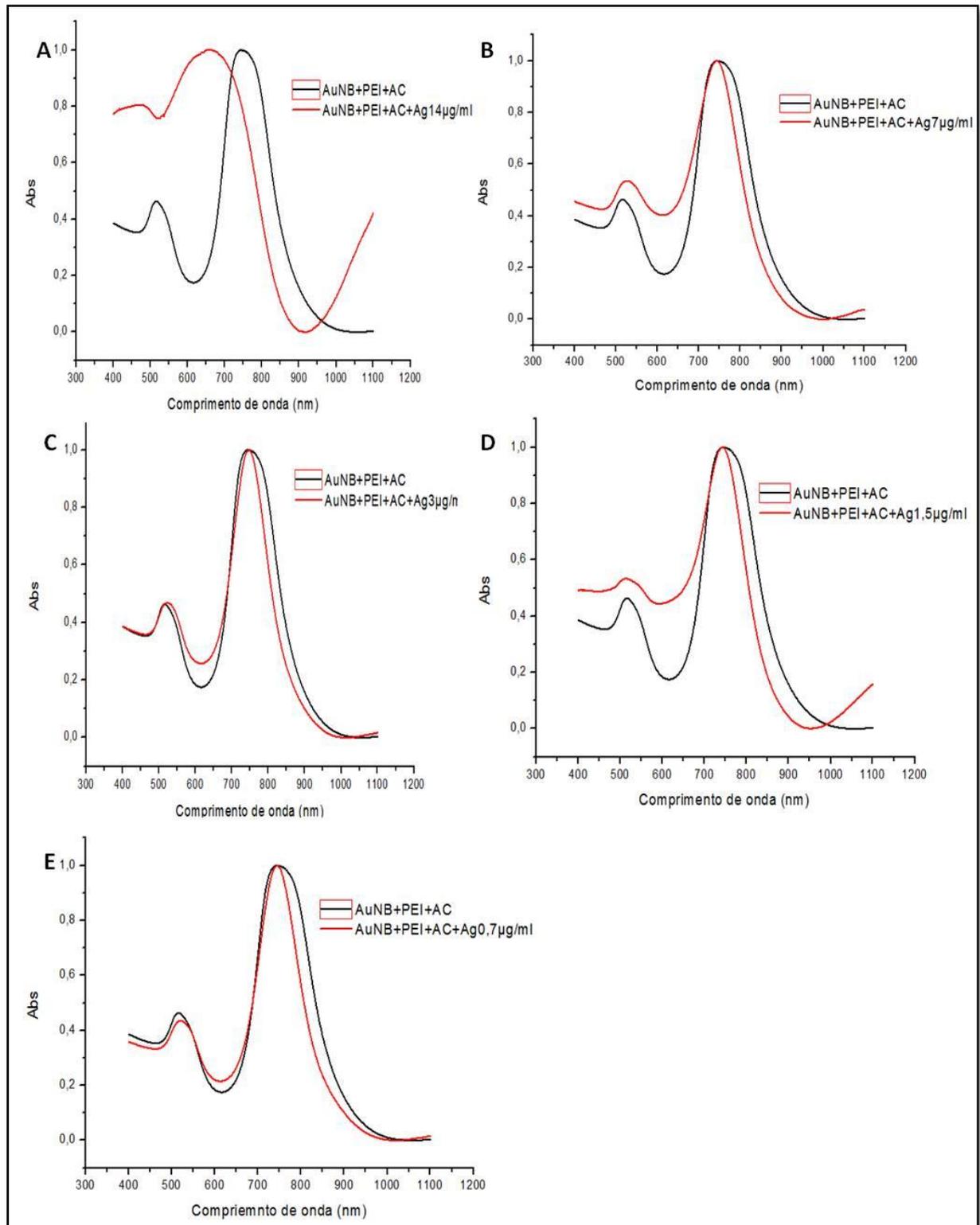


Figura 6: Espectros de absorção plasmônica durante a detecção da proteína gp43, com variações da concentração em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com ácido ascórbico 1:7,4(AC:PEI) + Gp43. Valores dados em microgramas de proteína aplicada. Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:7,4(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com Gp43.

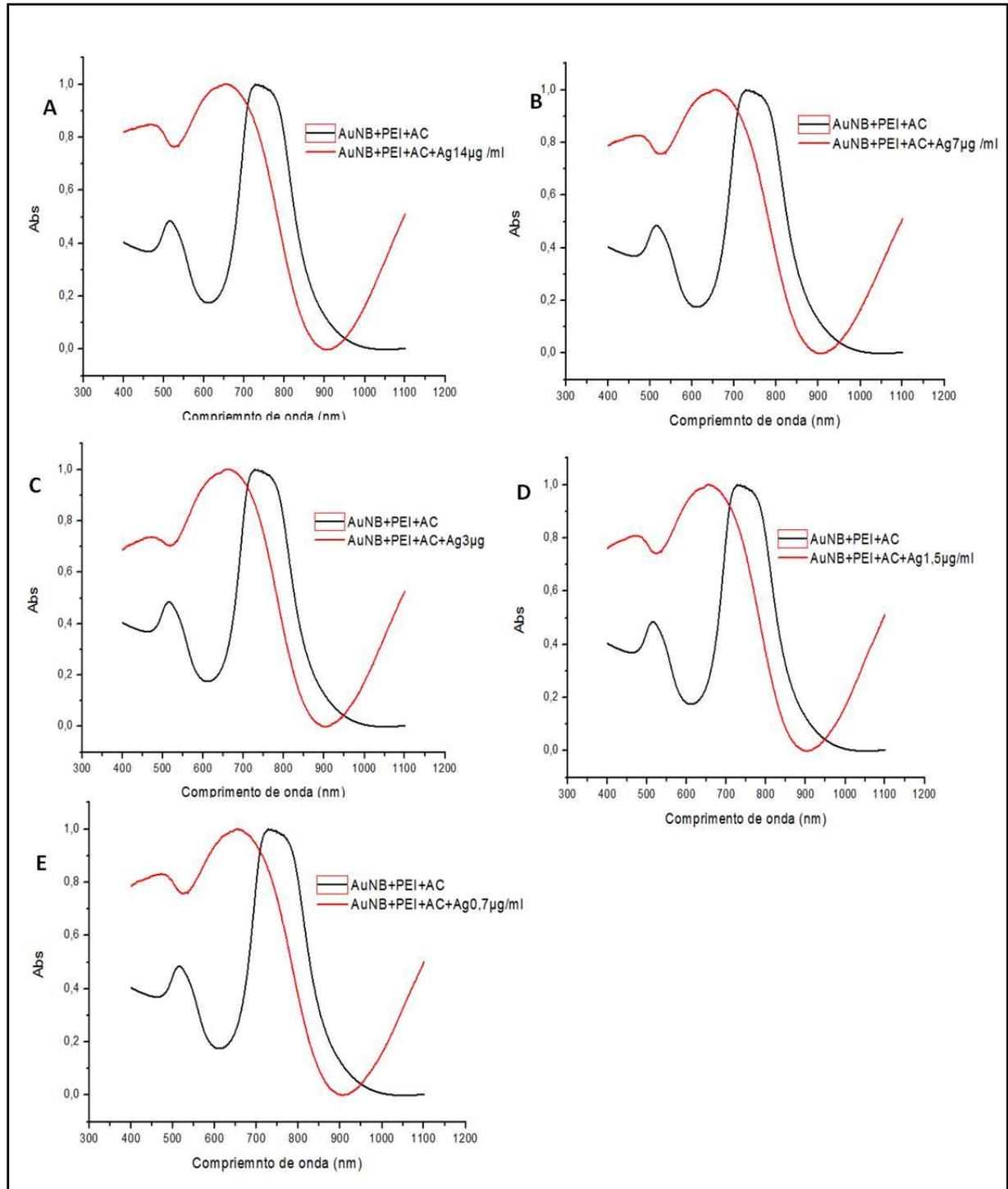


Figura 7: Espectros de absorção plasmônica durante a detecção da proteína gp43, com variações da concentração em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com

ácido ascórbico 1:1(AC:PEI) + Gp43. Valores dados em microgramas de proteína aplicada. Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com Gp43.

Como pode ser observado pelas figuras 6 e 7, a razão de 1:1 (AC:PEI) forneceu os melhores resultados, com deslocamentos visivelmente acentuados para a esquerda, o que demonstra a detecção da proteína gp43. Além disso, na razão de 1:1, todas as concentrações testadas foram identificadas, enquanto na razão 1:7,4 apenas na concentração de 14µg/ml o deslocamento foi acentuado. Isso demonstra que estes nanobastões se mostraram um bom sensor plasmônico, permitindo a detecção da proteína pela avaliação do deslocamento do pico de absorção máximo longitudinal.

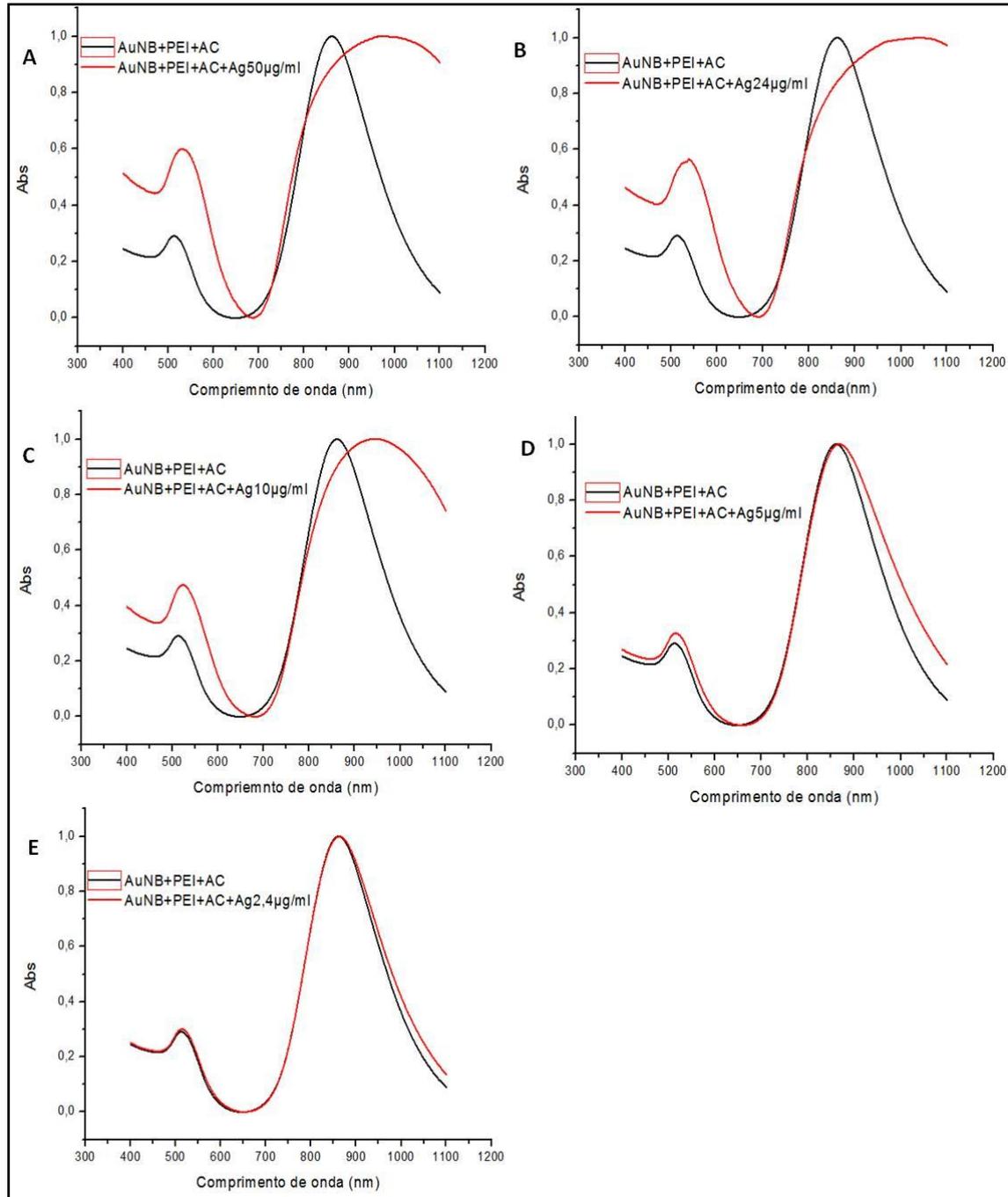


Figura 8: Espectros de absorção plasmônica durante a detecção da proteína gp43, com variações da concentração em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona 1:1(AC:PEI) + Gp43. Valores dados em microgramas de proteína aplicada. Linha preta: AuNBs reduzido com hidroquinona 1:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com Gp43.

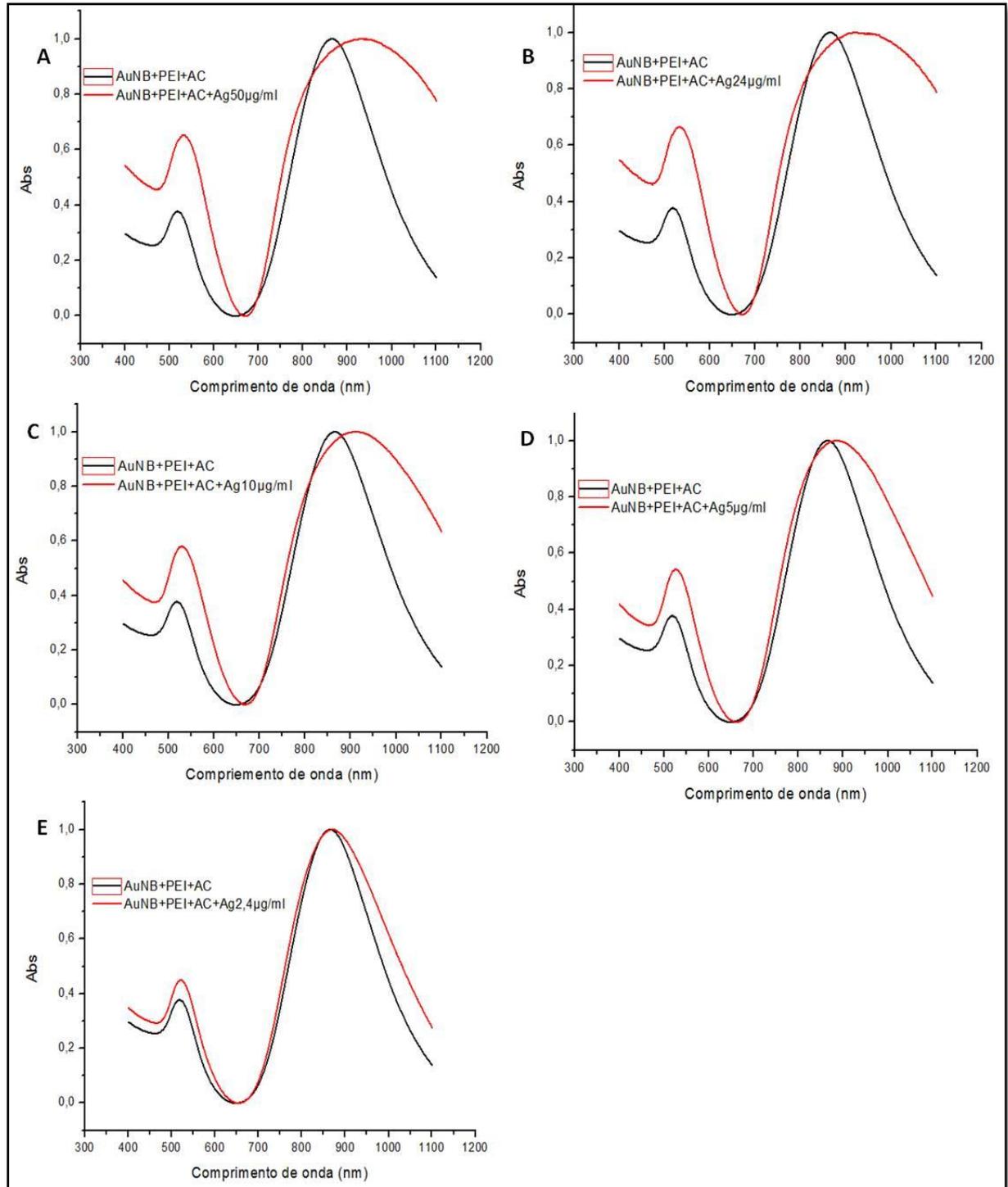


Figura 9: Espectros de absorção plasmônica durante biofuncionalização com variações da concentração de paracoccidioidina em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona 7,4:1(AC:PEI) + Gp43. Valores dados em microgramas de proteína aplicada. Linha preta: AuNBs reduzido com hidroquinona7,49:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com Gp43.

Por outro lado, as figuras 8 (razão 1:1) e 9 (razão 7,4:1) mostram a detecção pelo biossensor construído com nanobastões reduzidos com hidroquinona. Como pode ser visto nas figuras, neste caso a razão de 7,4:1 forneceu os melhores resultados, com deslocamentos até a concentração de 5 μ g/ml. Assim, estes nanobastões também se mostram promissores como sensores plasmônicos.

Além de gerar deslocamentos quando lidos em espectrofotômetro, nos nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI) também foi observado alteração visual em sua coloração mudando de rosa para roxo instantaneamente, como pode ser visto para a concentração de 7 μ g/ml (Figura10), seguida de intensa aglomeração que tornou a solução transparente com pellet arroxado, após 10 minutos (Figura 11).

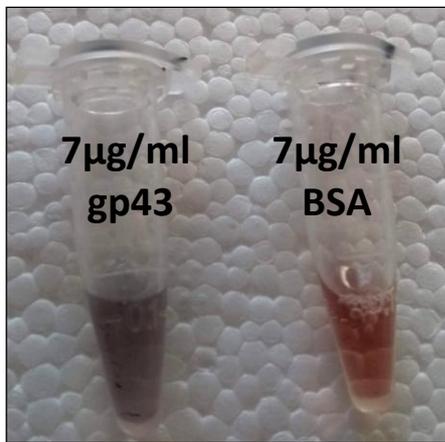


Figura 10: Aspecto visual do biossensor construído com AuNBs reduzidos com ácido ascórbico. Tempo zero.

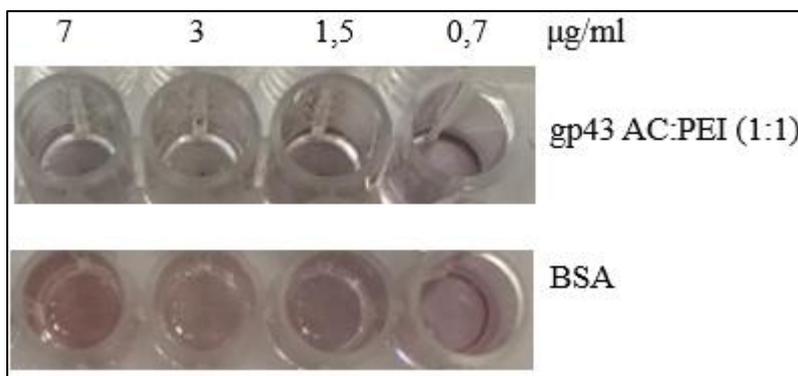


Figura 11: Alteração colorimétrica do biossensor construído com AuNBs reduzidos com ácido ascórbico, com variações de concentração de gp 43 e BSA, após 10 minutos.

Com os nanobastões de ouro (AuNBs) reduzidos com hidroquinona na razão 7,4:1(AC:PEI), obtivemos alteração visual na coloração de rosa para roxo em todas as concentrações de paracoccidioidina (Figura 12). Entretanto, o AuNB com razão 1:1(AC:PEI) houve alteração na coloração visualmente apenas nas concentrações 50 μ g/ml, 24 μ g/ml e 10 μ g/ml (Figura 13). Destacamos aqui que para estes nanobastões, esta alteração colorimétrica ocorreu apenas após 30 minutos de incubação.

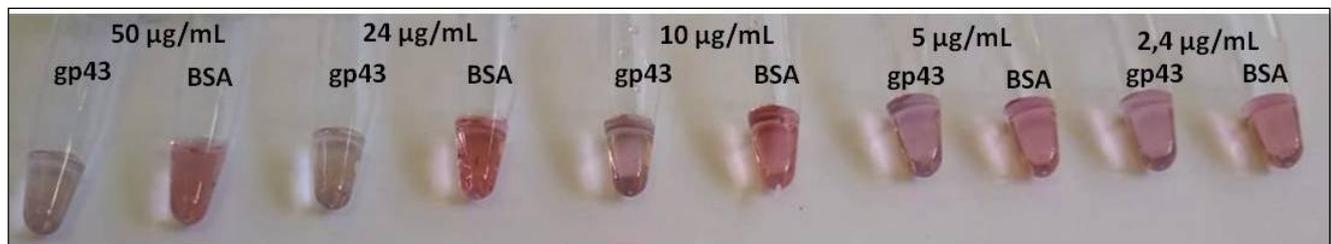


Figura 12: Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona na proporção 7,4:1(AC:PEI). Comparando a alteração na coloração visual quando ligado com o antígeno e com a proteína albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações.



Figura 13: Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona na proporção 1:1(AC:PEI). Comparando a alteração na coloração visual quando ligado com o antígeno e com a proteína albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações.

A relação de 1:7,4(AC:PEI) nos nanobastões reduzidos com hidroquinona não forneceram deslocamentos na banda de absorção plasmônica, como pode ser observado na figura 14. Esta foi a razão pela qual os gráficos mostrados nas figuras 8 e 9 representam apenas as demais razões. Assim, não houve deslocamento significativo nem com o antígeno e nem com o controle negativo (BSA), e a razão de 1:7,4 se mostrou um biossensor ineficiente (Figura 14).

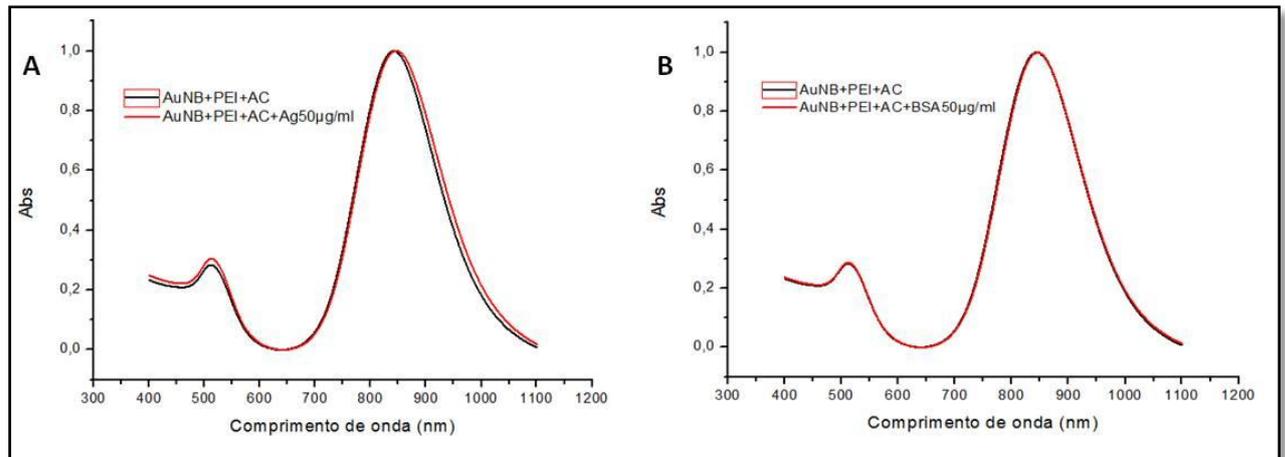


Figura 14: Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona na proporção 1:7,4(AC:PEI). (A) AuNB+Antígeno (B) AuNB+BSA.

Foi usado a proteína albumina sérica bovina (BSA) como controle negativo em diferentes concentrações, sendo que para os AuNBs reduzidos com ácido ascórbico foram utilizadas as concentrações de BSA 14µg/ml, 7µg/ml, 3µg/ml, 1,5µg/ml e 0,7µg/ml (Figuras 15 e 16) enquanto que, para os AuNBs reduzidos com hidroquinona foram utilizadas as concentrações de 50µg/ml, 24µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml, 2,4µg/ml, para que fossem iguais as concentrações de antígeno utilizadas (Figura 14, 17 e 18).

Após incubação com BSA, houve um ligeiro deslocamento do pico de absorção máximo, com estreitamento do pico, nos AuNBs com ácido ascórbico (Figuras 15 e 16). Por outro lado, com os AuNBs reduzidos com hidroquinona, os picos referentes à incubação com BSA foram idênticos aos picos do biossensor em algumas concentrações, demonstrando a não detecção dessa proteína. No entanto, neste caso, para a concentração de 50µg/ml e 24µg/ml de BSA (razão 1:1) houve um pequeno deslocamento, mas, como mostrado na figura 13, houve uma significativa alteração de cor na detecção da gp43, enquanto a cor do biossensor se manteve com a coloração rósea na não-deteção da BSA. Para a razão de 7,4:1 com hidroquinona (figura 18) esse leve deslocamento após incubação com BSA também ocorreu até a concentração de 10µg/ml, mas também se mostrando bom na alteração colorimétrica. Isso significa que, nestas razões e para detectar essas concentrações de forma plasmônica no espectrofotômetro, esse biossensor ainda precisaria ser aprimorado.

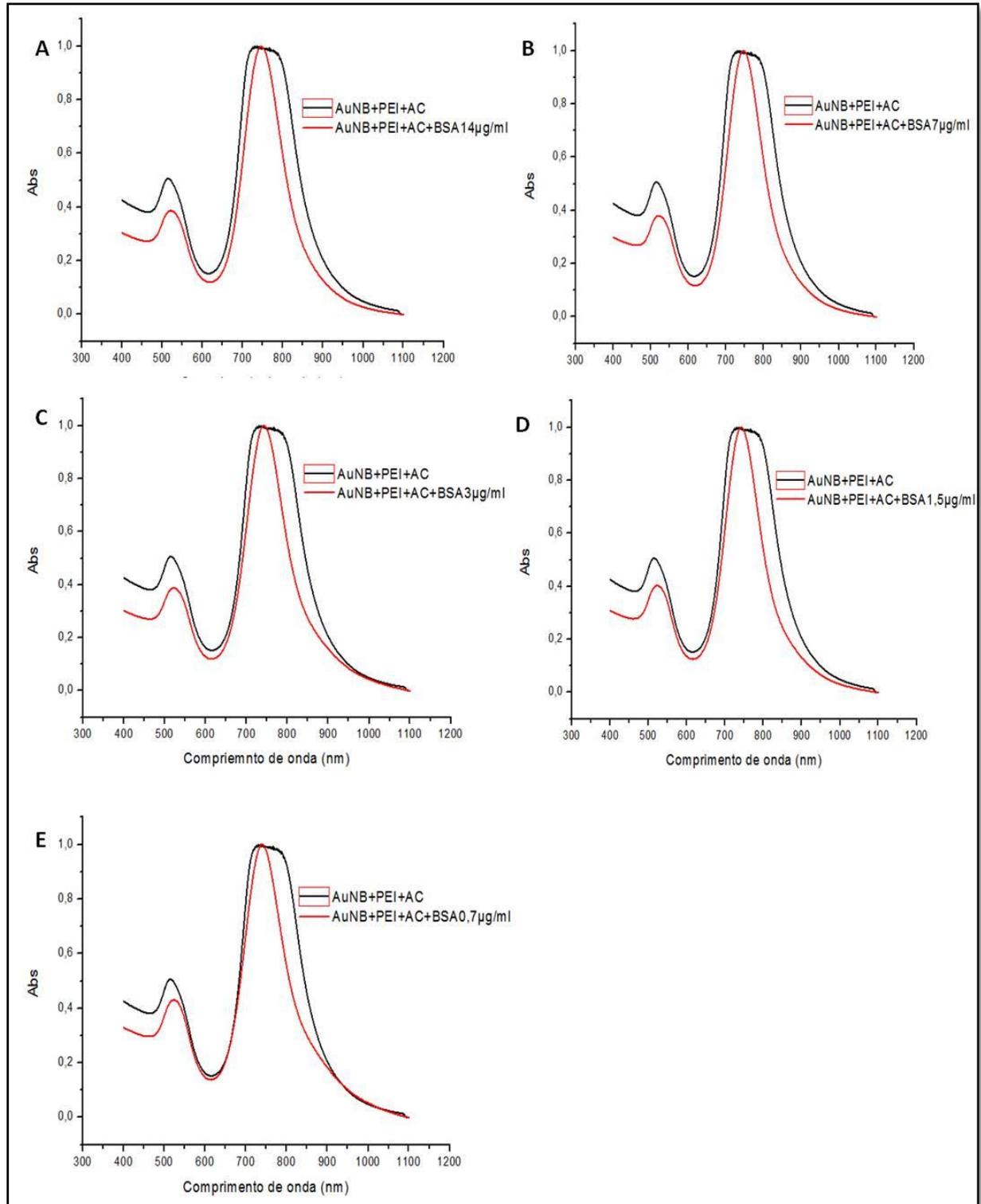


Figura 15: Espectros de absorção plasmônica durante detecção de BSA, com variações da concentração de BSA em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzidos com ácido ascórbico 1:7,4(AC:PEI). Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:7,4(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com BSA.

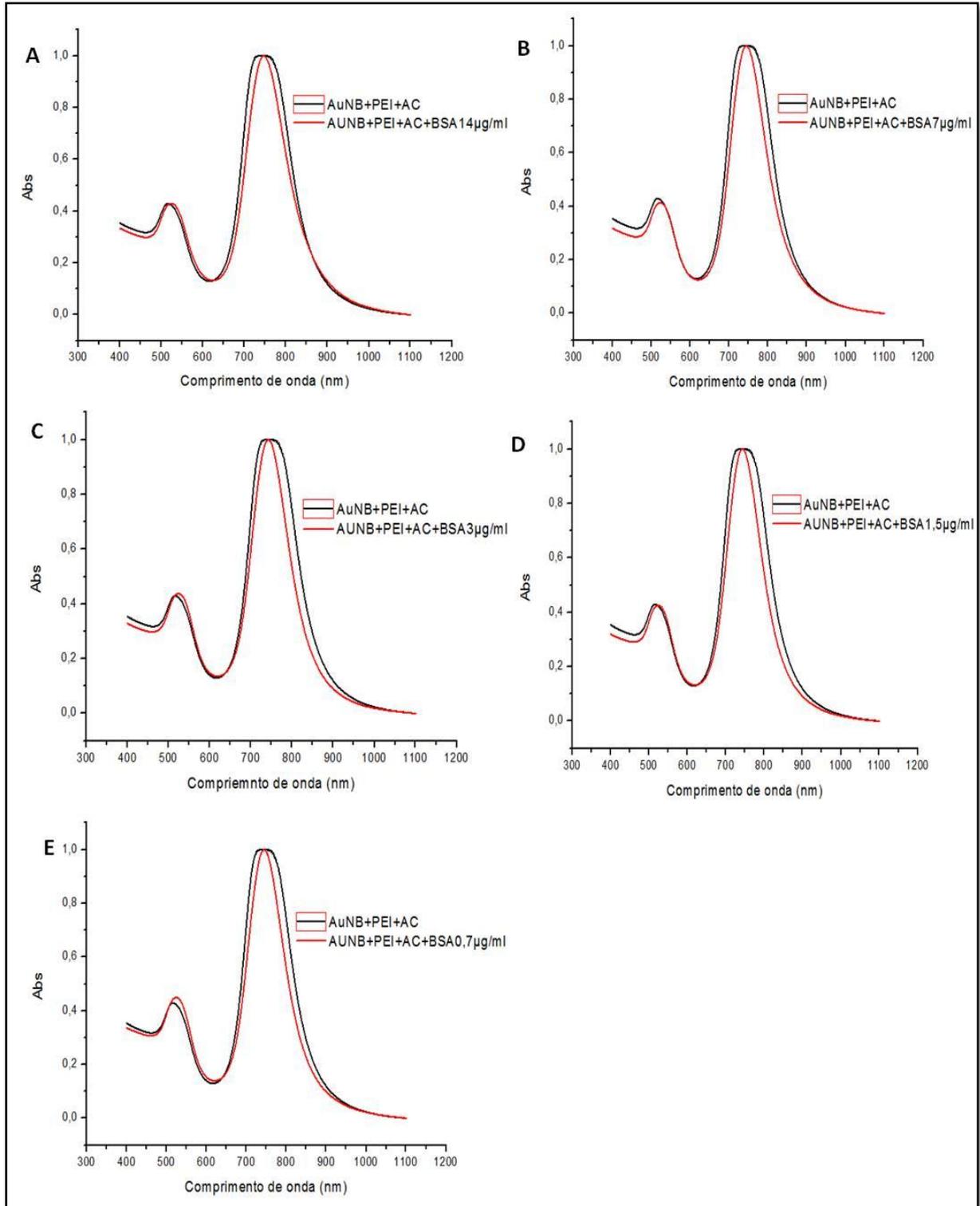


Figura 16: Espectros de absorção plasmônica durante detecção de BSA, com variações da concentração de BSA em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI). Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:1 (AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com BSA.

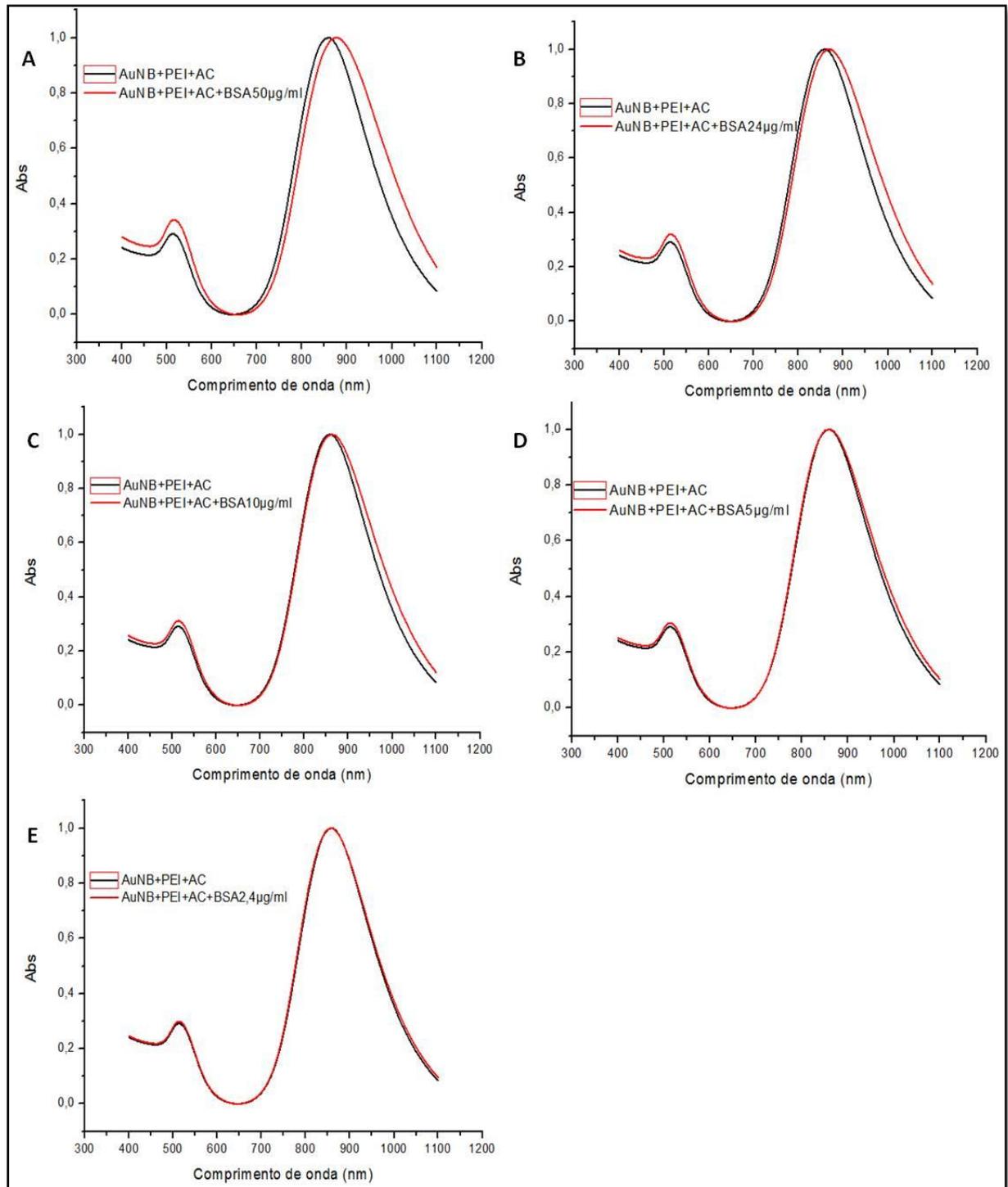


Figura 17: Espectros de absorção plasmônica durante detecção de BSA, com variações da concentração de BSA em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona 1:1(AC:PEI). Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 1:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com BSA.

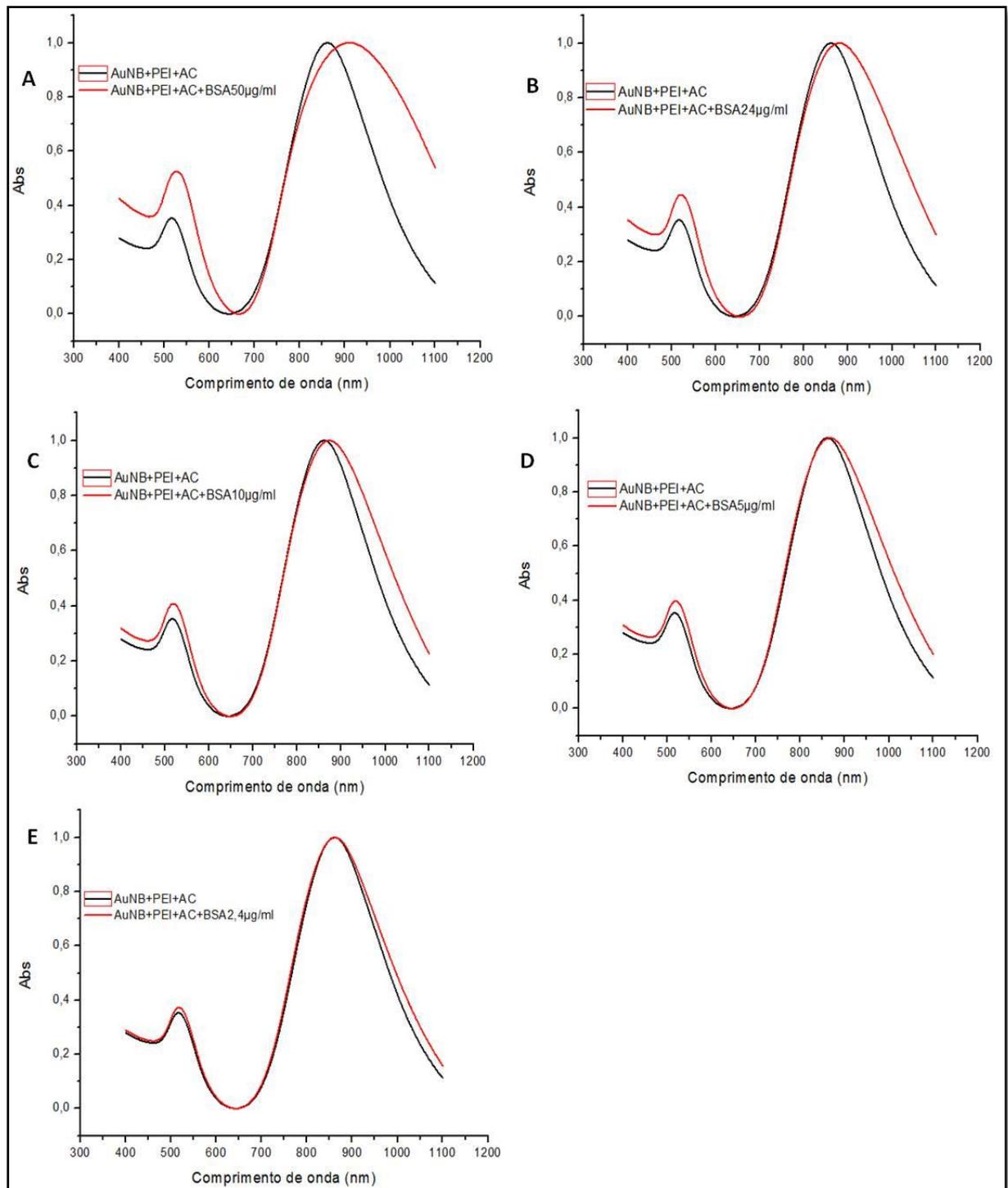


Figura 18: Espectros de absorção plasmônica durante detecção de BSA, com variações da concentração de BSA em comparação com nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com hidroquinona 7,4:1(AC:PEI). Linha preta: AuNBs reduzido com ácido ascórbico 7,4:1(AC:PEI). Linha vermelha: AuNBs com BSA.

As figuras 19 e 20 demonstram os valores dos deslocamentos encontrados do controle negativo quando comparado com as ligações á paracoccidioidina, para melhor visualização. Na figura 19 (A) observamos um maior deslocamento do AuNB quando ligado ao controle negativo nas concentrações 7µg/ml, 3µg/ml, 1,5µg/ml e 0,7µg/ml do que ao próprio antígeno, mostrando que as condições desse biossensor não são adequadas para diagnóstico plasmônico da PCM. Por outro lado, a razão de 1:1 (figura 19 -B) mostrou-se eficiente, embora ainda exija um aprimoramento para que o deslocamento com BSA seja de zero ou de até 3nm. Vemos na figura 20 que o mesmo aprimoramento é necessário para os nanobastões reduzidos com hidroquinona.

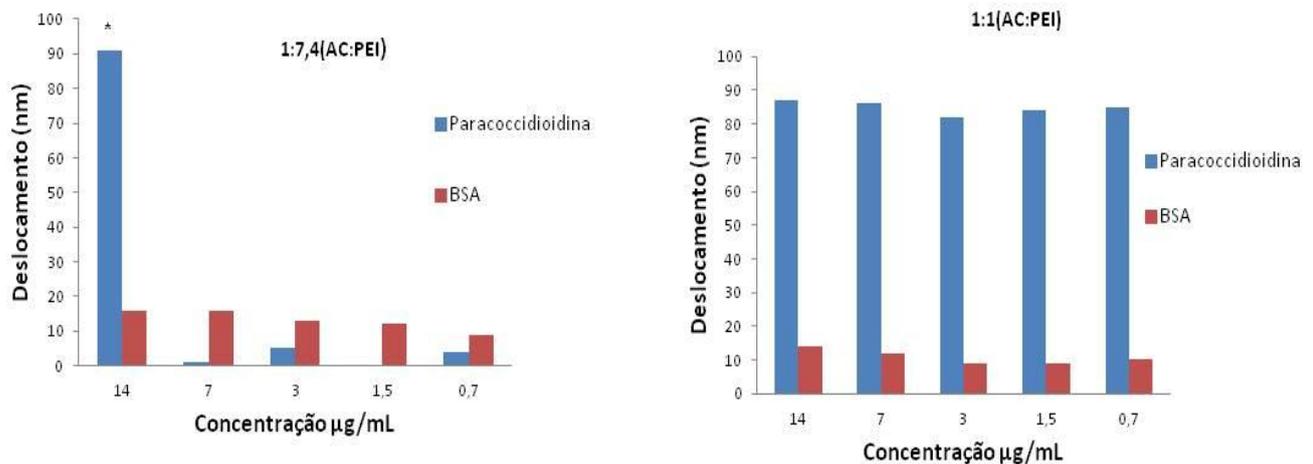


Figura 19: Comparação deslocamento do Nanobastões de ouro (AuNBs) reduzido com ácido ascórbico quando ligado a pacoccidioidina ou BSA.* deslocamento significativamente diferente em relação ao controle negativo (BSA) ($p \leq 0,05$). $n = 9$.

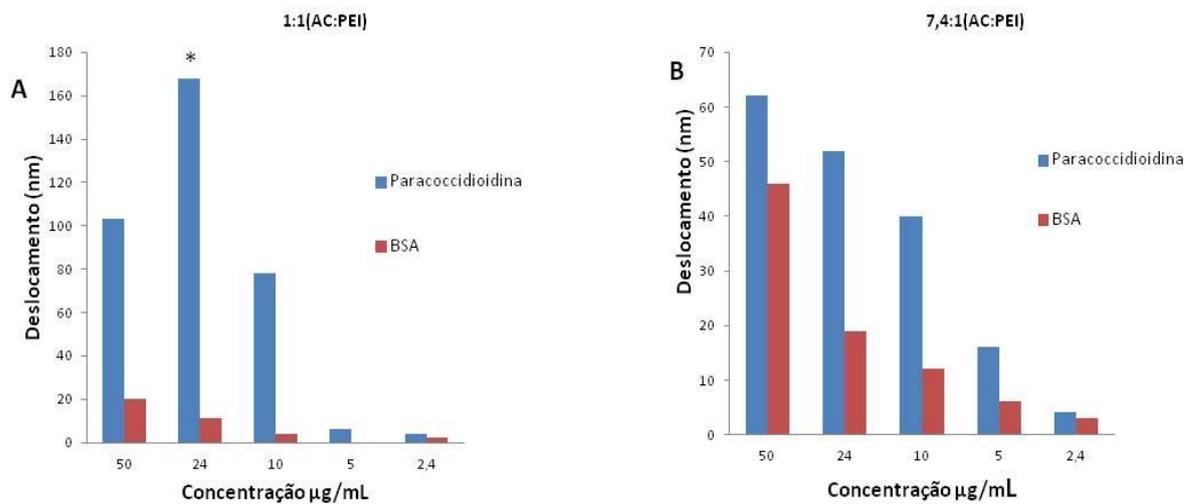


Figura 20: Comparação deslocamento do Nanobastões de ouro (AuNRs) reduzido com hidroquinona quando ligado a pacoccidioidina ou BSA. .* deslocamento significativamente diferente em relação ao controle negativo (BSA) ($p \leq 0,05$). $n = 9$.

O sistema tem que ser aprimorado, pois apesar de apresentar uma diferença de deslocamento como mostra nos gráficos (figura 19 e 20) apenas as concentrações 24 µg/ml dos nanobastões sintetizado com hidroquinona proporção 1:1(AC:PEI) e a concentração 14 µg/ml dos nanobastões sintetizado com acido ascórbico proporção 1:7,4(AC:PEI) mostrou diferença estatística.

Em síntese, os nanobastões forneceram uma melhor detecção colorimétrica, considerando que, mesmo para as concentrações em que foram encontrados deslocamentos plasmônicos após incubação com BSA, não houve nenhuma alteração da cor a olho nu.

Santos e colaboradores, em 2015, detectaram a gp43 circulante em pacientes, por meio de um ensaio de agregação de partículas de látex. Os autores encontraram 95% de sensibilidade e 88,89% de especificidade, no entanto, com ocorrência de reação cruzada em alguns pacientes portadores de outras micoses (SANTOS *et al.*, 2015). Isso demonstra que ainda existe a necessidade da busca por testes melhores.

Em 2003, Marques-da-Silva e colaboradores utilizaram ELISA para detectar a gp43 circulante em pacientes com diferentes formas da doença, com uma média de concentração da proteína de 9.87µg/ml. Foram encontrados os seguintes resultados: 18.23µg/ml em pacientes com a forma aguda doença, 8.55µg/ml em portadores da forma crônica; entre os pacientes crônicos, 8.64µg/ml foi encontrado em indivíduos com a doença multifocal e 7.64µg/ml na forma unifocal da doença (esses valores representam as médias encontradas) (MARQUES-

DA-SILVA et al., 2003). Esses valores estão de acordo com os valores de gp43 detectados pelo biossensor proposto neste trabalho, que variaram na detecção colorimétrica a olho nu de 14µg/ml até 0,7µg/ml (AuNBs reduzidos com ácido ascórbico e razão 1:1) e de 50µg/ml a 2,4µg/ml nos AuNBs com hidroquinona, razão 7,4:1.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que os nanobastões de ouro se mostraram eficientes para detecção da proteína gp43, e, portanto, promissores para um diagnóstico rápido da Paracoccidioidomicose, após devidos aprimoramentos e testes com soro de pacientes. Foi possível funcionalizar os nanobastões de ouro com o anticorpo anti-gp43, avaliando todas as etapas de desenvolvimento do biossensor pela LSPR. Os deslocamentos de LSPR antes e após incubação com a glicoproteína gp43 e com o controle negativo BSA permitiram determinar que, para atuar apenas como biossensor plasmônico o sistema ainda precisa de aprimoramentos. Por outro lado, as análises das alterações colorimétricas (a olho nu) após incubação com a glicoproteína gp43 foram satisfatórias, sendo possível a detecção das seguintes concentrações pelo biossensor proposto: 14, 7, 3,5, 1,5 e 0,7 µg/ml nos AuNBs com ácido ascórbico (razão 1:1) e 50, 24, 10, 5 e 2,4 µg/ml nos AuNBs com hidroquinona (razão 7,4:1).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, C. F.; SILVA, S. H. M. D.; CAMARGO, Z. P.. Improvement of the Specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.1944-1946, 1 abr. 2005.
- BASSO, Caroline R. et al. An easy way to detect dengue virus using nanoparticle-antibody conjugates. **Virology**, [s.l.], v. 513, p.85-90, jan. 2018.
- BORGES-WALMSLEY, M.ines et al. The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.80-87, fev. 2002.
- CAMARGO, Z.p. et al. The use of cell-free antigens of Paracoccidioides brasiliensis in serological tests. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.31-38, jan. 1991.
- CAMARGO, Zoilo Pires de. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, [s.l.], v. 165, n. 4-5, p.289-302, abr. 2008.
- CAMPOS, Maria Vitoria Silva et al. Paracoccidioidomycose no Hospital Universitário de Brasília. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.169-172, abr. 2008.
- CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTO, Valtencir. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns.. **Química Nova**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.521-526, 2014.
- CANO, Luz Elena; RESTREPO, Angela. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.276-283, out. 1987.
- CANO, Luz Elena; RESTREPO, Angela. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.276-283, out. 1987.
- CAO, Xiao-hong et al. ROS-Ca²⁺ is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 190, n. 1, p.16-27, mar. 2011.
- CISALPINO, Patrícia S. et al. Cloning, Characterization, and Epitope Expression of the Major Diagnostic Antigen of Paracoccidioides brasiliensis. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 271, n. 8, p.4553-4560, 23 fev. 1996.
- COUTINHO, Ziadir Francisco et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.1441-1454, out. 2002.
- CREIGHTON, J. Alan; EADON, Desmond G.. Ultraviolet-visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. **J. Chem. Soc., Faraday Trans.**, [s.l.], v. 87, n. 24, p.3881-3891, 1991.

DA SILVA SHM, QUEIROZ-TELLES F, COLOMBO AL, BLOTTA MHSL, LOPES JD, DE CAMARGO ZP. Monitoring gp43 Antigenemia in Paracoccidioidomycosis Patients during Therapy. *J Clin Microbiol.* v. 42, n.6, p.2419–2424, 2004.

DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, [s.l.], v.104, n.1, p.293–346, dez. 2004.

DUJARDIN, Jean-claude et al. Research Priorities for Neglected Infectious Diseases in Latin America and the Caribbean Region. ***Plos Neglected Tropical Diseases***, [s.l.], v. 4, n. 10, p.780-780, 26 out. 2010.

FALLEIROS, J. P. B.; BRANDI, A. L.; FONSECA, A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. *Nucleus*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.151-169, abr. 2011.

FENG, Junli et al. Naked-eyes detection of *Shigella flexneri* in food samples based on a novel gold nanoparticle-based colorimetric aptasensor. ***Food Control***, [s.l.], v. 98, p.333-341, abr. 2019.

FERREIRA, Cyntia Silva et al. Current strategies for diagnosis of paracoccidioidomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. ***Future Microbiology***, [s.l.], v. 11, n. 7, p.973-985, jul. 2016.

FERREIRA, C.S., et al. Uso de nanobastões de ouro para o desenvolvimento de aulas práticas de nanotecnologia. ***Química Nova***, v. 40, p. 594-601, 2017.

FRANCO, M.. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. ***Medical Mycology***, [s.l.], v. 25, n. 1, p.5-18, jan. 1987.

HUANG, Xiaohua; EL-SAYED, Mostafa A.. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. ***Journal Of Advanced Research***, [s.l.], v. 1, n. 1, p.13-28, jan. 2010.

HUANG, Xiaohua; NERETINA, Svetlana; EL-SAYED, Mostafa A.. Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. ***Advanced Materials***, [s.l.], v. 21, n. 48, p.4880-4910, 24 jul. 2009.

HULLMANN, Angela. Measuring and assessing the development of nanotechnology. *Scientometrics*, [s.l.], v. 70, n. 3, p.739-758, mar. 2007.

HULTEEN, John C. et al. Nanosphere Lithography: Size-Tunable Silver Nanoparticle and Surface Cluster Arrays. ***The Journal Of Physical Chemistry B***, [s.l.], v. 103, n. 19, p.3854-3863, maio 1999.

JAIN, Prashant K.; EL-SAYED, Ivan H.; EL-SAYED, Mostafa A.. Au nanoparticles target cancer. ***Nano Today***, [s.l.], v. 2, n. 1, p.18-29, fev. 2007.

JAIN, Prashant K.; EL-SAYED, Mostafa 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 C**, [s.l.], v. 112, n. 13, p.4954-4960, 12 mar. 2008.

JENSEN, Traci R. et al. Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 104, n. 45, p.10549-10556, nov. 2000.

KONNO, Fabiana T.c. et al. Paracoccidioides brasiliensis GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response. **Microbes And Infection**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.517-527, jun. 2012.

LACAZ, C.S. Historical Evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In *Paracoccidioidomycosis*, 1st ed.; Franco, M., da Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1994; pp. 1–11.

LE, Dinh-vu et al. Immunoreaction-Mediated Aggregation of Gold Nanoparticles for Sensitive and Selective Assay of Hepatitis B Surface Antigen. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.1083-1088, 1 fev. 2018.

LE, Dinh-vu et al. Immunoreaction-Mediated Aggregation of Gold Nanoparticles for Sensitive and Selective Assay of Hepatitis B Surface Antigen. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.1083-1088, 1 fev. 2018.

LEITÃO, Natanael P. et al. Paracoccidioides lutzii Plp43 Is an Active Glucanase with Partial Antigenic Identity with P. brasiliensis gp43. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.3111-3111, 28 ago. 2014.

LIAO, Hongwei; HAFNER, Jason H.. Gold Nanorod Bioconjugates. **Chemistry Of Materials**, [s.l.], v. 17, n. 18, p.4636-4641, set. 2005.

LIU, Yang et al. Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay. **Biosensors And Bioelectronics**, [s.l.], v. 24, n. 9, p.2853-2857, maio 2009.

MA, Zhanfang et al. Optical DNA detection based on gold nanorods aggregation. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 673, n. 2, p.179-184, jul. 2010.

MALUF, Márcia Luzia Ferrarezi et al. Prevalência de paracoccidioidomicose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região Noroeste do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.11-16, jan. 2003.

MARCHIORI, Edson et al. Paracoccidioidomycosis: High-resolution computed tomography–pathologic correlation. **European Journal Of Radiology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.80-84, jan. 2011.

MARTINEZ, Roberto. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal Of Fungi**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-13, 3 jan. 2017.

MATOS, Wilma Batista de et al. Paracoccidiodomycosis in the state of Maranhão, Brazil: geographical and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 45, n. 3, p.385-389, jun. 2012.

MATUTE, Daniel R. et al. Cryptic Speciation and Recombination in the Fungus *Paracoccidoides brasiliensis* as Revealed by Gene Genealogies. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.65-73, 8 set. 2005.

MENDES-GIANNINI MJ, BUENO JP, SHIKANAI-YASUDA MA, FERREIRA AW, MASUDA A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidiodomycosis. *J Clin Microbiol*. v. 27, n.12, p.2842–2845, 1989.

MENDES-GIANNINI, Maria José Soares et al. Interactions of *Paracoccidoides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia**, [s.l.], v. 165, n. 4-5, p.237-248, 17 out. 2007.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA (MCT), **Desenvolvimento da nanociência e nanotecnologia**. Proposta do grupo de trabalho criado pela portaria MCTn° 252, como subsidio ao programa de nanociência e nanotecnologia do PPA 2004-2007. Brasília, 2004.

MOREIRA, Adriana Pardini Vicentini. Paracoccidiodomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. BEPA, Bol. epidemiol. paul. São Paulo, v. 5, n. 51, mar. 2008 .

NATH, Nidhi; CHILKOTI, Ashutosh. Label Free Colorimetric Biosensing Using Nanoparticles. **Journal Of Fluorescence**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.377-389, jul. 2004.

NAZARI, Mina et al. Plasmonic Enhancement of Selective Photonic Virus Inactivation. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-10, 20 set. 2017.

NEGRO, Gilda M. B. del et al. Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidiodomycosis. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.37-46, 1 jan. 2000.

NIKOBAKHT, Babak; EL-SAYED, Mostafa A.. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. **Chemistry Of Materials**, [s.l.], v. 15, n. 10, p.1957-1962, maio 2003.

NIOSI, Jorge; REID, Susan E.. Biotechnology and Nanotechnology: Science-based Enabling Technologies as Windows of Opportunity for LDCs?. **World Development**, [s.l.], v. 35, n. 3, p.426-438, mar. 2007.

OLIVEIRA, N. M. P. Biossensor para detecção do antígeno específico da próstata. 2011. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular. Santiago, 2011.

PEIXOTO, Linus Pauling de Faria. **Síntese e caracterização de nanobastões e nanobipirâmides de Au para aplicação em biossensores plasmogônicos**. 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

PISSUWAN, Dakrong; VALENZUELA, Stella M.; CORTIE, Michael B.. Prospects for Gold Nanorod Particles in Diagnostic and Therapeutic Applications. *Biotechnology And Genetic Engineering Reviews*, [s.l.], v. 25, n. 1, p.93-112, jan. 2008.

POPI, Ana Flavia; LOPES, José Daniel; MARIANO, Mario. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**, [s.l.], v. 218, n. 1-2, p.87-94, jul. 2002.

PUCCIA R, SCHENKMAN S, GORIN PA, TRAVASSOS LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.*; v. 53, n.1, p.199–206, 1986.

PYSHNAYA, Inna A. 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**, [s.l.], v. 2014, p.1-13, 2014.

SAN-BLAS, Gioconda; NIÑO-VEGA, Gustavo; ITURRIAGA, Teresa. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.225-242, jan. 2002.

SANDOVAL, M. P. et al. Distribution of exoantigens and a 43-kDa glycoprotein (gp43) in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal de Mycologie Medicale*, v. 6, n. 1, p. 1-6, 1996

SANG, Shengbo et al. Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. **Critical Reviews In Biotechnology**, [s.l.], p.1-17, 22 jan. 2015.

SANTOS, Priscila Oliveira dos et al. Immunodiagnosis of Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* Using a Latex Test: Detection of Specific Antibody Anti-gp43 and Specific Antigen gp43. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.1-16, 13 fev. 2015.

SANTOS, Priscila Oliveira dos et al. Immunodiagnosis of Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* Using a Latex Test: Detection of Specific Antibody Anti-gp43 and Specific Antigen gp43. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.3516-3516, 13 fev. 2015.

SHAMS, Saeed et al. A sensitive gold-nanorods-based nanobiosensor for specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.1-13, 26 mar. 2019.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 50, n. 5, p.715-740, 12 jul. 2017.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 50, n. 5, p.715-740, 12 jul. 2017.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.297-310, jun. 2006.

SILVA NETO, Benedito Rodrigues da et al. Transcriptional profile of *Paracoccidioides* spp. in response to itraconazole. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.254-254, 2014.

SILVA, S. H. Marques da et al. Detection of Circulating gp43 Antigen in Serum, Cerebrospinal Fluid, and Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Paracoccidioidomycosis. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 41, n. 8, p.3675-3680, 1 ago. 2003.

SOUZA, M.c. et al. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.13-18, jan. 1997.

TABA, Maria Rita M. et al. Expression in *Escherichia coli* of a gene coding for epitopes of a diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Experimental Mycology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.223-230, set. 1989.

TANSIL, Natalia C.; GAO, Zhiqiang. Nanoparticles in biomolecular detection. **Nano Today**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.28-37, fev. 2006.

TEIXEIRA, Marcus de Melo et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, [s.l.], p.1-10, 14 jun. 2013. Oxford University Press (OUP).

THOMPSON, David T.. Using gold nanoparticles for catalysis. **Nano Today**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.40-43, ago. 2007.

TIWARI, Pooja et al. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.31-63, 14 jun. 2011.

TRAVASSOS, Luiz R. et al. The gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis*: A Major Diagnostic Antigen and Vaccine Candidate. **Human Fungal Pathogens**, [s.l.], p.279-296, 2004.

VAN DAMME, Ph.a. et al. A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in the Netherlands. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.13-18, jan. 2006. Oxford University Press (OUP).

VERMA, Ayush et al. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. **Nature Materials**, [s.l.], v. 7, n. 7, p.588-595, 25 maio 2008.

VICENTINI Ap, GESZTESI JI, FRANCO Mf, DE SOUZA W, DE MORAES Jz, TRAVASSOS Lr, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 62(4): p.1465–1469, 1994.

VIDAL, M. S. M. et al. Atypical Serological Response Marked by a Lack of Detectable Anti-gp43 Antibodies in a Patient with Disseminated Paracoccidioidomycosis. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.3014-3016, 1 jun. 2005.

VIEIRA, Gabriel de Deus et al. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.63-68, jan. 2014.

VIGDERMAN, Leonid; ZUBAREV, Eugene R.. High-Yield Synthesis of Gold Nanorods with Longitudinal SPR Peak Greater than 1200 nm Using Hydroquinone as a Reducing Agent. **Chemistry Of Materials**, [s.l.], v. 25, n. 8, p.1450-1457, 29 jan. 2013.

WEST, Jennifer L; HALAS, Naomi J. Applications of nanotechnology to biotechnology. *Current Opinion In Biotechnology*, [s.l.], v. 11, n. 2, p.215-217, abr. 2000.

WILSON, Robert. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 37, n. 9, p.2028-2046, 2008.

WU, Qiong et al. Magnetic field-assisted SPR biosensor based on carboxyl-functionalized graphene oxide sensing film and Fe₃O₄-hollow gold nanohybrids probe. **Biosensors And Bioelectronics**, [s.l.], v. 86, p.95-101, dez. 2016.

YANG, Da-peng; CUI, Da-xiang. Advances and Prospects of Gold Nanorods. **Chemistry - An Asian Journal**, [s.l.], v. 3, n. 12, p.2010-2022, 1 dez. 2008.