

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

JOSAFÁ CARVALHO AGUIAR

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E *TRYPANOSOMA* POR  
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE  
FOURIER**

São José dos Campos -SP

2016

**JOSAFÁ CARVALHO AGUIAR**

**CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E *TRYPANOSOMA* POR  
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE  
FOURIER**

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

São José dos Campos - SP

2016

Dedico esta tese ao mundo da ciência e ao meu esforço para fazê-la. Aos meus pais, Maria Francisca e João Martins, com os quais aprendi os valores da responsabilidade, do trabalho, do respeito e do amor. Sem eles eu não seria nada.

## AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus pela proteção nos momentos firmes e trêmulos ocorridos durante todo o curso e a minha família.

Agradeço especialmente ao meu orientador prof. Dr. José Leandro Raniero pela informação objetiva e detalhada, pelo seu comprometimento e pela confiança depositada em minha pesquisa. Esse apoio foi fundamental no desenvolvimento desta tese e de todos os artigos produzidos. Sou grato também pela sua parceria e por sempre me tratar como um amigo.

Agradeço à professora Dra. Josane Mittmann por me possibilitar a compreensão dos aspectos biológicos que envolvem esta pesquisa e por disponibilizar seu laboratório para que eu pudesse desenvolvê-la.

Aos alunos da pós-graduação Paulo Cesar Caetano Júnior, Maiara Lima Castilho, Lia Campos Lemes e Olavo O. Comparato Filho pelos momentos de descontração e pelas sugestões ao longo do deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Nathanne Cristina Vilela Rost e Guilherme Bueno Costa por terem me ajudado de forma incondicional nos preparos das soluções, utilização dos equipamentos e manuseios dos programas, o que foi essencial para compreender o passo a passo da pesquisa. Aos demais alunos de iniciação científica Guilherme Mosquim Lemes e Marcela Aparecida Cândido por pelos momentos de descontração pela espontaneidade / disponibilidade e por toda a ajuda que me prestou prestaram durante esse tempo.

Ao prof. Dr. Jomilson Moraes dos Santos por torcer, me ensinar, acompanhar, orientar, incentivar no decorrer de todos esses anos de minha vida /ao longo de todos esses anos de dedicação aos estudos, em suma: é um grande amigo. Gostaria ainda de externar minha gratidão dizendo-lhe: muito obrigado.

Agradeço imensamente ao prof. Dr. Lev Vertchenko pela amizade e pelo exemplo de respeito ao trabalho e às pessoas.

Aos colegas da UNIVAP em geral: as meninas da limpeza, da biblioteca, da portaria e aos demais alunos pela amizade, convivência agradável e troca de experiência.

Ao CNPQ (Projeto 470534 / 2012-5 e 302.132 / 2015-5) e FAPESP (Projeto 2009 / 09559-5 e 2013 / 17404-7) pelo apoio financeiro e à Fundação Vale Paraibana de Ensino (FVE) pela bolsa de estudo.

Enfim, de forma respeitosa e carinhosa, ratifico aqui minha gratidão e admiração a todos os supracitados.

## RESUMO

As espécies de *Trypanosoma* (*Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*) e as espécies de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis*) são protozoários parasitos que pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae que causam doenças ao homem. *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*) não é patogênico, mas o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas e as espécies de *Leishmania* causa a leishmaniose. Estas doenças estão presentes em todas as regiões brasileiras, com maiores incidências nas regiões Norte e Nordeste. O diagnóstico destas duas infecções tem apresentado limitações como a reação cruzada promovido pelos testes sorológicos (ELISA e IFA), morosidade, baixa sensibilidade, são caros e precisam de informações clínicas e epidemiológicas, que, normalmente, não são disponíveis. Neste contexto, apresentamos uma técnica diferente dos métodos tradicionais chamada de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - (FT - IR), a qual tem apresentado vantagem, como, por exemplo, pouca quantidade de amostra, a dispensa do uso de reagente, o que é menos oneroso e o que fornece resultados rápidos, podendo ser adaptada em testes clínicos com o propósito de obter uma alta sensibilidade e especificidade. Neste trabalho, a espectroscopia FT - IR foi utilizada como uma ferramenta para investigar a forma promastigota das espécies de *Leishmania* e a forma epimastigota das espécies de *Trypanosoma*. As culturas de *Trypanosoma* e *Leishmania* foram cultivadas no meio LIT e no meio 199 respectivamente. As subculturas foram lavadas com solução de NaCl, centrifugadas, liofilizadas e analisadas por FT - IR. Os espectros obtidos de cada amostra foram averiguados pelas análises de cluster e de ajuste de curva. O dendrograma é o resultado obtido pela análise de cluster que mostra claramente a heterogeneidade entre as espécies e especifica as regiões que as separam. A análise de ajuste de curva foi feito por meio da deconvolução de banda que tem como base de procedimento a segunda derivada da região espectral. Esta análise mostra a diferenciação quantitativa entre as espécies nas regiões de vibração de polissacarídeos, amida III, aminoácido, fosfolípidios, proteínas e ácidos nucleicos. É evidente que a técnica de espectroscopia FT - IR é uma ferramenta indispensável para discriminar estes parasitos. Tal técnica abre as possibilidades para futuros estudos sobre caracterização de outros micro-organismos.

**Palavras-Chave:** *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma rangeli*. *Leishmania*. Espectroscopia FT-IR. Análise de Cluster. Deconvolução de banda

## CHARACTERIZATION OF THE *LEISHMANIA* AND *TRYPANOSOMA* SPECIES BY FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY

### ABSTRACT

The *trypanosomes* species (*Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*) and the *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*) species are protozoan parasite that belong to the Kinetoplastida order and Trypanosomatidae family that cause diseases to man. *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*) is not pathogenic, but the *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is the etiological agent of Chagas disease and the *Leishmania* species causes the leishmaniasis. These diseases are present in all Brazilian regions, with highest incidences in the North and Northeast. The diagnostic of these two infections has presented limitations as crossed reaction promoted by the serological test (ELISA and IFA), time consuming, low sensitivity, expensive and need clinics and epidemiologic information that normally are not available. In this context, suggesting a different technique of the traditional methods called of Fourier Transform Infrared - (FT - IR) - Spectroscopy, which have presented advantages because need little quantity of sample, do not need reagent, it is not expensive, provides rapid results and may be adapted for a clinical test with the purpose to obtain a high sensitivity and specificity. In this work, FT - IR spectroscopy was used as a tool to investigate the promastigote form of the *Leishmania* species and the epimastigote form of the *Trypanosomes* species. Culture of *Trypanosomes* and *Leishmania* were grown in the LIT medium and in the 199 medium, respectively. The subcultures were washed with NaCl solution, centrifuged, lyophilized, and analyzed by FT - IR. The spectra obtained of each sample were examined by cluster and fitting curve analysis. The dendrogram is the result obtained by cluster analysis that shows clearly the heterogeneity among species and specifies the regions that separate them. The curve fitting analysis was done by mean of the band deconvolution that have, as base of procedure, the second derivatives of the spectral region. This analysis shows the differentiation quantitative among species in the vibrational regions of polysaccharides, amide III, amino acids phospholipids, proteins, and nucleic acids. It is evident that the FT - IR spectroscopy technique is an indispensable tool to discriminate these parasites. This technique opens up the possibilities for further studies about characterization of other microorganisms.

**Key -Words:** *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma rangeli*; *Leishmania*; FT - IR spectroscopy; Cluster Analysis; Band deconvolution.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação da ordem Kinetoplastida.....	188
Figura 2 - Taxonomia da Leishmania.....	20
Figura 3 - Organização das organelas presentes tanto na forma amastigota quanto na forma promastigota do gênero <i>Leishmania</i> .....	21
Figura 4 - O ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....	222
Figura 5 - Ilustração da membrana com os gliconjugados do estágio promastigota metacíclico das espécies de <i>Leishmania</i> .....	255
Figura 6 - Distribuição dos casos da LTA e LV que foram confirmados entre 2007 e 2011	
<b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Quadro 1 - Taxonomia do <i>Trypanosoma</i> .....	28
Figura 7 - Ilustração do flagelo, membrana e kinetoplasto presente na forma amastigota, epimastigota e trypomastigota do <i>Trypanosoma</i> .....	29
Figura 8 - Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> .....	30
Figura 9 - Ilustração da membrana do estágio trypomastigota metacíclico do <i>T. cruzi</i> .....	32
Figura 10 - Representação da propagação da onda eletromagnética.....	34
Figura 11 - Espectro eletromagnético de radiação.....	36
Figura 12 - Representação dos níveis de energia: rotacional, vibracional e eletrônico.....	38
Figura 13 - Os modos vibracionais molecular.....	39
Figura 14 - Variação do momento dipolar elétrico.....	40
Figura 15 - Representação da vibração de uma molécula diatômica pela Lei de Hooke.....	41
Figura 16 - Representação do modelo do oscilador a harmônico (A) e anarmônico (B).....	43
Figura 17 - Representação do interferômetro de Michelson.....	46
Figura 18 - Representação gráfica da somatória vetorial da amplitude de duas ondas do campo elétrico.....	477
Figura 19 - Interferência da radiação construtiva e destrutiva.....	488
Figura 20 - Espectro de interferência em função do retardamento do caminho ótico, interferograma.....	48
Figura 21 - Espectro de interferência em função da frequência ou número de onda.....	49
Figura 22 - Exemplo da análise de Cluster das espécies de <i>Leishmania</i> representadas pelo dendrograma.....	522
Figura 23 - Representação gráfica da deconvolução de bandas em ajuste gaussiano.....	533
Figura 24 - Ilustração do protocolo de preparação da amostra até a obtenção do espectro.....	56
Figura 25 - Dendrograma das espécies de <i>Leishmania</i> .....	58
Figura 26 - Espectros de FT-IR das espécies de <i>Leishmania</i> e respectivos desvios padrão.....	59
Figura 27 - Dendrograma entre as espécies <i>Trypanosoma cruzi</i> e as espécies de <i>Leishmania</i> .....	622
Figura 28 - Espectros de absorção representativos das espécies de <i>T. cruzi</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> e respectivos desvios padrão.....	633
Figura 29 - Gráfico da segunda derivada e os pontos de absorção dos espectros da região A das espécies de <i>T. cruzi</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> .....	644
Figura 30 - Análise de ajuste de curva dos espectros de FT - IR da região A.....	655
Figura 31 - Gráfico da segunda derivada e os pontos de absorção referentes à região B das espécies de <i>T. cruzi</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> .....	666
Figura 32 - Análise de ajuste de curva dos epectros do FT - IR da região B.....	67
Figura 33 - Dendrograma das espécies de <i>Trypanosoma rangeli</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i> .....	69
Figura 34 - Espectros de absorção representativos das espécies de <i>Trypanosoma rangeli</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i> e respectivos desvios padrão.....	700

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atribuições de bandas encontradas nos espectros da <i>Leishmania</i> em FT - IR.....	60
Tabela 2 - Atribuições das bandas espectral da região A dos espectros do FT - IR referente às espécies de <i>T. cruzi</i> , <i>L. chagasi</i> e <i>L. braziliensis</i> .....	65
Tabela 3 - Atribuições das bandas espectrais da região B dos espectros do FT - IR referente às espécies de <i>L. chagasi</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>T. cruzi</i> .....	68
Tabela 4 - Atribuições de bandas encontradas nos espectros das espécies de <i>L. chagasi</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> em FT - IR.....	70

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

A	Absorbância
$\bar{A}$	Amplitude da onda
a	Grau de liberdade
as	Antissimétrico
$B(\bar{\nu})$	Intensidade da fonte em função do número de onda
c	Velocidade da luz
C	Concentração
CR1	Receptor do fator 1 do sistema de complemento
CR3	Receptor do fator 3 do sistema de complemento
C3	Componente do sistema de complemento
C3b	Fragmento do componente C3
C3bi	Fragmento do componente C3
$D_e$	Energia de dissociação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Energia do fóton
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> , teste reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas
FT - IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
g	Grupamento dos elementos
GA	Valor da área da gaussiana
GIPLs	Glicoinositolfosfolípidios
GF	Ajuste por funções gaussianas
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GP63	Glicoproteína de superfície
$h$	Constante de Planck
i	Parte imaginária
IR	Infravermelho
$I_0$	Intensidade de luz incidente
$I_t$	Intensidade da luz transmitida
IFI	Teste de Imunofluorescência indireta
$I(\delta)$	Intensidade do sinal em função retardamento
K	Constante de força da ligação
k	Vetor onda
$\bar{k}$	Variáveis independentes
l	Caminho ótico
LC	Leishmaniose Cutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
M	Concentração molar
MS	Ministério da Saúde

M1	Massa do primeiro átomo
M2	Massa do segundo átomo
n	O número quântico vibracional
N	Número de átomo
<i>N</i>	Número de elementos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPG	Proteofosfoglicano
PSP	Proteína de superfície de promastigota
q	Coordenada interna
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
R	Deslocamento dos átomos
r	Posição do vetor
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
r <sub>e</sub>	Posição de equilíbrio
s	Simétrico
SC	Sistema de complemento
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T	Transmitância
t	Tempo
UF	Unidade Federativa
V	Potencial elétrico
V <sub>0</sub>	Potencial mínimo
v'	Velocidade
X <sub>i</sub>	Elemento do conjunto de dados
X <sup>2</sup>	Qui quadrado
2 <sup>o</sup> d	Segunda derivada
Δx	O deslocamento de átomos
β	Constante do grau de curvatura
Γ	Função gamma
δ̄	Vibração de flexão no plano
δ	Retardamento
ε	Coefficiente de extinção molar
λ	Comprimento de onda
v	Vibração de estiramento
ν̄	Frequência
ν̄	Número de onda
v <sub>as</sub>	Vibração de estiramento antissimétrico
v <sub>s</sub>	Vibração de estiramento simétrico
ν <sub>o</sub>	Frequência vibracional do estado fundamental da molécula
μ	Momento dipolar elétrico

$\bar{\mu}$       Massa reduzida  
 $\omega$       Frequência angular

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Objetivos.....	17
1.1.1 <i>Objetivo geral</i> .....	17
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Taxonomia dos parasitos.....	18
2.2 <i>Leishmania</i> .....	19
2.2.1 <i>Morfologia da Leishmania</i> .....	21
2.2.2 <i>Biologia da Leishmania</i> .....	22
2.2.3. As moléculas de membrana da <i>Leishmania</i> .....	24
2.2.5 <i>Epidemiologia</i> .....	26
2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i> .....	27
2.3.2 <i>Morfologia</i> .....	28
2.3.3 <i>Biologia</i> .....	29
2.3.4 Membrana do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	31
2.3.5 <i>Epidemiologia</i> .....	33
2.4 A radiação eletromagnética e o espectro eletromagnético.....	34
2.4.1 Espectroscopia vibracional.....	35
2.4.2 <i>Espectrômetros</i> .....	44
2.4.3 Fontes e detectores.....	50
2.4.4 Análise de dados.....	51
3 METODOLOGIA.....	55
3.1 <i>Leishmania</i> .....	55
3.2 <i>Trypanosoma</i> .....	55
3.3 A preparação da amostra.....	56
3.4 FT - IR espectroscopia e análise estatística.....	57
4 RESULTADOS.....	58
4.1 Resultados alusivos às espécies de <i>L. major</i> , <i>L. chagasi</i> e <i>L. amazonensis</i> .....	58
4.2 Resultados relacionados às espécies de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. chagasi</i> e <i>T. cruzi</i> .....	62
4.3 Resultados referentes às espécies de <i>T. rangeli</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>L. chagasi</i> .....	68
5 DISCUSSÃO.....	72
5.1 Diferenciação entre as espécies de <i>Leishmania</i> .....	72
5.2 Diferenciação das espécies de <i>T. cruzi</i> e das espécies de <i>Leishmania</i> .....	74
5.3 Diferenciação das espécies de <i>Leishmania</i> e das espécies de <i>Trypanosoma</i> .....	76
6 CONCLUSÃO.....	81
REFERENCIAS.....	82
ANEXO A: Artigo - Differentiation of <i>Leishmania</i> species by FT – IR spectroscopy.....	92
ANEXO B: Artigo - Differentiation between <i>Trypanosome</i> genus ( <i>T. cruzi</i> species) and <i>Leishmania</i> genus ( <i>L. chagasi</i> and <i>L. braziliensis</i> species) by FT-IR.....	93

ANEXO C: Artigo - Development of methodology for identification of the <i>T. cruzi</i> , <i>T. rangeli</i> , and the <i>L. chagasi</i> species by FT – IR spectroscopy .....	94
ANEXO D: Artigo - Amniotic membrane: An option for the treatment of induced injury of the Achilles tendon in rats .....	95
ANEXO E: Artigo - Analysis of serum by Fourier transform infrared Spectroscopy for diagnosis of stress in athletes.....	96
ANEXO F: Artigo – Isokinetic muscle performance and salivar immune-endocrine responses in handball players by Fourier transform infrared spectroscopy.....	97
ANEXO G: Resumo - Differentiation of Leishmania by FTIR .....	98
ANEXO H: Resumo - Biochemical differentiation between the trypanosoma cruzi and leishmania amazonensis by FT - IR .....	99
ANEXO I: Resumo - Band deconvolution analysis of infrared spectra of the saliva for monitoring physiological stress in athletes.....	100
ANEXO J: Resumo - Human amniotic membrane: An option to the treatment of Achilles tendon induced tendinopathy.....	101
ANEXO L: Resumo - Differentiation of saliva collected in resting and in stress by FT-IR spectroscopy .....	102
ANEXO M: Resumo - Differentiation of <i>Trypanosoma</i> species by FT - IR spectroscopy....	103
ANEXO N: Resumo - Parasites Characterization by FT - IR spectroscopy .....	104
ANEXO O: Resumo – Label – Free Detection of Paracoccidioides Brasiliensis by Gold Nanoparticles Using gp-43 Sequence.....	105
ANEXO P: Resumo – Influence of oligonucleotide on the stability of gold nanoparticles...	106

## 1 INTRODUÇÃO

Os parasitos são organismos que vivem em dependência de seus hospedeiros, por esta razão podem lhes causar algum tipo de infecção. Os parasitos que foram estudados nesta tese são *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*) bem como o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e as *Leishmania*. Estes parasitos são protozoários flagelados que pertencente à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae e são amplamente distribuídos nas Américas Central e do Sul (BARRAL; COSTA, 2011; MOLYNEUX, 1983).

As espécies de *T. cruzi* e *Leishmania* têm sido investigadas de forma incisiva por causa das características incomuns, tais como a variação antigênica, habilidade de sobreviverem e de se multiplicarem em células do sistema imune do homem, principalmente macrófagos e neutrófilos, provocando-lhe infecções. Em relação ao *T. rangeli*, este não se multiplica e pouco se sabe sobre o seu comportamento na presença do sistema imune. (BARRAL; COSTA, 2011; MOLYNEUX, 1983).

A espécie de *T. rangeli* não é patogênica para mamíferos (seres humanos), mas a espécie de *T. cruzi* apresenta essa natureza, sendo a causadora da doença de Chagas, também conhecida como a tripanossomíase americana (BRIGADA et al., 2010; CENTERS, 2015; TEIXEIRA et al., 2011). Ambos os parasitos são encontrados nas mesmas espécies de vetores de hábito hematófago e nas mesmas espécies de hospedeiros mamíferos, incluindo o homem. Apesar de o *T. rangeli* não ser patogênico, ele apresenta uma importância para os estudos clínicos devido a reações sorológicas cruzadas com o *T. cruzi*, o que dificulta o diagnóstico preciso da doença de Chagas (CENTERS, 2015; MONTGOMERY et al., 2014). As espécies de *Leishmania* são patogênicas e causam a doença em humano conhecida como leishmaniose (cutânea e visceral) (AGUIAR et al., 2015; LEVINE et al., 1980; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; SCARISBRICK et al., 2006).

Essas doenças afetam regiões localizadas na América Latina, África e Ásia. Elas são endêmicas na América Latina, em específico no Brasil (CENTERS, 2015; DESJEUX, 2001b; LAINSON; SHAW, 1987; WHO, 2013). Os dados epidemiológicos no Brasil apontam prevalência dessas infecções nas regiões Norte e Nordeste.

Os principais fatores associados com o aumento do número de casos de infecções parasitárias nessas regiões estão relacionados com a exploração das florestas, como as atividades agrícolas e o ecoturismo (AGUIAR et al., 2015; DESJEUX, P., 2001b; WERNECK, 2008; WHO, 2013).

O diagnóstico dessas infecções não é trivial, pois esses parasitos têm semelhança filogenética, morfológica e reações dependentes do meio. Além disso, os vetores de ambas as infecções são normalmente encontrados na mesma região epidemiológica e o movimento contínuo da população é um fator que dificulta a interpretação dos resultados, conduzindo muitas vezes o paciente ao tratamento inadequado (BRASIL, 2005; XAVIER et al., 2014; YANG; ROTHMAN, 2004).

O processo padrão de identificação desses parasitos inclui diferentes testes de diagnóstico e é bastante trabalhoso, pois depende do tempo de crescimento do parasito, do estágio da infecção, da característica genética e da resposta imunológica do hospedeiro ao parasito (MOLYNEUX, 1983).

Nesse sentido, os exames parasitológico, sorológico e molecular são métodos utilizados para diagnosticar a leishmaniose e a doença de Chagas. O teste parasitológico para leishmaniose apresenta uma sensibilidade em torno de 95% e uma especificidade de 100%, quando feito em um laboratório especializado e quando se tem um aparato técnico de alto nível para fazer tanto os procedimentos de extração do parasito no baço, na medula, quanto para fazer a biópsia hepática, entre outros. Já para a doença de Chagas, a sensibilidade é de 80% a 90% na fase aguda ou inicial da infecção, mas na fase crônica é de 20% a 50 %, e a especificidade está próxima de 100%. Este método é invasivo, complexo porque pode causar riscos de morte do paciente, para além do alto custo. Tais fatores contribuem para o desuso desse método (BRASIL, 2006b; GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; GONTIJO; DE CARVALHO MDE, 2003).

No Brasil, os testes sorológicos mais utilizados para identificar as infecções parasitárias são o Imunoenzimático - ELISA e o Imunofluorescência indireta - IFI, que consistem na verificação dos níveis de anticorpos circulantes no soro do indivíduo, podendo causar reação cruzada entre as leishmanioses e a doença de Chagas. No primeiro ano da leishmaniose, a sensibilidade e a especificidade desses testes atingem aproximadamente 70% e 80%, respectivamente. Para doença de Chagas, na fase crônica da infecção, a sensibilidade e a especificidade chegam a 97% e 96%, respectivamente (BRASIL, 2005; BRASIL, 2006b).

A sensibilidade desses métodos é associada com a informação clínica e epidemiológica, com a qualidade dos equipamentos, dos reagentes químicos, com o local da infecção no corpo humano, com o tempo em que foi adquirida e com a espécie envolvida e o grau de parasitismo que existe na amostra biológica coletada (APT B et al., 2008; NIETO et al., 2009; TRONCARELLI et al., 2009).

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica de diagnóstico molecular capaz de fazer uma identificação específica baseada no DNA do parasito, ou seja, tem boa sensibilidade quando comparada com os ensaios de ELISA e IFI. A sensibilidade da PCR para a leishmaniose é em torno de 80% a 98% e a especificidade é de 95%. Na fase crônica da doença de Chagas, a PCR mostrou sensibilidade de 50% a 90% e especificidade próxima de 100%, mas este teste, quando associado aos exames parasitológicos, pode aumentar a sensibilidade. A sensibilidade do teste depende como amostra foi coletada e armazenada, informações epidemiológicas e do DNA alvo utilizado no processo de amplificação gênica. Por outro lado, o PCR apresenta elevado custo operacional que desfavorece a sua utilização em regiões menos assistidas (FERREIRA et al., 2006; SHAHBAZI et al., 2008; SUNDAR; RAI, 2002; YANG; ROTHMAN, 2004).

Assim, esses métodos têm limitações, sejam operacional ou laboratorial, para identificar e caracterizar os micro-organismos. Neste contexto, utilizamos a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT - IR) para identificação e caracterização das espécies de *Leishmania* e de *Trypanosoma*. (HELM et al., 1991)

O princípio físico da espectroscopia FT - IR é baseado na interação da radiação infravermelha (IR) com a matéria (HELM et al., 1991). Nesta interação, a IR é absorvida quando a sua frequência está na mesma frequência de vibração das moléculas do material analisado. Estas vibrações moleculares são únicas e o espectro de absorção é uma impressão digital do composto. Logo, por meio dos espectros, podemos obter informações da composição química da matéria orgânica, como proteínas, ácidos graxos, carboidrato e ácidos nucleicos (DAVIS; MAUER, 2010). A técnica de espectroscopia de FT - IR é confiável, sensível, específica, reprodutível e rápida para análises microbiológicas (KIRSCHNER et al., 2001; NAUMANN, 2000).

Com o propósito de facilitar a compreensão da tese, foi feita uma divisão do conteúdo em introdução, fundamentação teórica, metodologia, resultados, discussão e conclusão. Os resultados e discussões foram divididos em três subtópicos. Os dados coletados que estão em cada subtópico foram analisados e submetidos a uma revista.

## 1.1 Objetivos

Nesta seção é apresentada o objetivo geral e o objetivo específico que norteará o estudo que foca essa pesquisa.

### 1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar por espectroscopia no Infravermelho as espécies de *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*) e a de *Leishmania* (*Leishmania chagasi*, *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*) e diferenciá-las por meio de ferramentas estatísticas.

### 1.1.2 Objetivos específicos

1. Mostrar a heterogeneidade entre os parasitos por meio do dendrograma utilizando a segunda derivada como parâmetro.
2. Expor as regiões espectrais de separação entre as espécies de *Leishmania major*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* utilizando a segunda derivada como parâmetro.
3. Apresentar as regiões espectrais de separação entre as espécies de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania chagasi* e o *Trypanosoma cruzi* utilizando a segunda derivada como parâmetro.
4. Apresentar as regiões espectrais de separação entre as espécies de *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* e a de *Leishmania chagasi* utilizando a segunda derivada como parâmetro.
5. Diferenciar as espécies de *Leishmania major*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* por meio da deconvolução de bandas das regiões espectrais de separação.
6. Exibir as diferenças quantitativas dos modos vibracionais nas regiões de polissacarídeos, lipídios e proteínas, aminoácido, ésteres lipídicos, ácidos graxos e amida III dos espectros dos parasitos
7. Distinguir as espécies de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania chagasi* da espécie *Trypanosoma cruzi* por meio da deconvolução de bandas das regiões espectrais de separação.
8. Diferenciar as espécies de *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* e a de *Leishmania chagasi* por meio da deconvolução de bandas das regiões espectrais de separação.

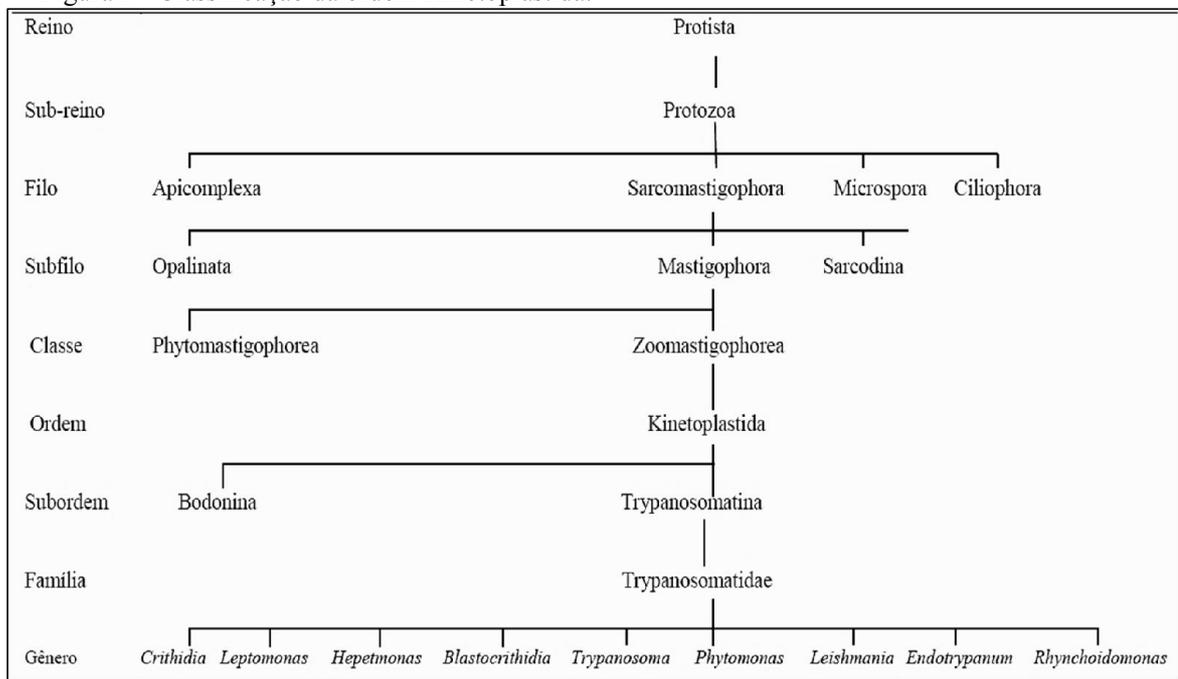
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo, será abordada uma visão geral dos parasitos no que tange à proximidade tanto filogenética quanto morfológica entre as espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* e uma fundamentação teórica da espectroscopia vibracional e aplicação da técnica de FT - IR em micro-organismo.

### 2.1 Taxonomia dos parasitos

Os organismos apresentados nesta tese são do gênero *Leishmania* e do gênero *Trypanosoma*, os quais se apresentam entre os mais primitivos e especializados do reino animal. Estes parasitos possuem a seguinte posição taxonômica, conforme a figura 1 (BARRAL; COSTA, 2011; MOLYNEUX, 1983).

Figura 1 - Classificação da ordem Kinetoplastida.



Fonte: Molyneux (1983).

Os parasitos da ordem Kinetoplastida são caracterizados por serem tipicamente flagelados, possuem uma única mitocôndria extensa próxima ao corpo basal flagelar, ausência de pseudópodes, único núcleo vesicular com predominância do endossoma, não contém plasto, o aparelho de Golgi localiza-se peculiarmente na região do bolso flagelar, mas não está conectado nem ao corpo basal nem ao flagelo, têm em regra vida parasitária, todavia uma

minoria vive de forma não parasitária (BARRAL; COSTA, 2011; BRASIL, 2006a; BRASIL, 2014; LAINSON; SHAW, 1987).

A ordem Kinetoplastida está subdividida em duas subordens: a Bodonina, que compreende os protozoários de água doce ou salgada, ou seja, de vida livre (não parasitária), e a Trypanosomatina, que é exclusivamente parasitária. Ressalve-se que somente os parasitos da subordem Trypanosomatina foram investigados nesta tese.

A subordem Trypanosomatina tem uma única família, a Trypanosomatidae, que é caracterizada por único flagelo locomotor livre ou atracado a uma membrana ondulante, e uma ultraestrutura kinetoplastida, que é relativamente pequena e compacta com fibrilas de DNA. Todos os protozoários pertencentes a esta família são parasitos de hospedeiro tanto vertebrado como invertebrado (BRASIL, 2014; MOLYNEUX, 1983; TEIXEIRA et al., 2011).

A família Trypanosomatidae está subdividida em 9 gêneros, mas somente o gênero *Leishmania* e o gênero *Trypanosoma* foram estudados. Os parasitos pertencente a esses dois gêneros sofrem mudanças na sua estrutura durante o ciclo de vida, ou seja, quando eles mudam de hospedeiro invertebrado para vertebrado ou vice versa. Nestes parasitos, as diferenças morfológicas externa servem para identificá-los (SACKS, 1992), mas, em uma nomenclatura mais moderna, a classificação e identificação se referem principalmente à posição do flagelo no corpo destes parasitos (BARRAL; COSTA, 2011; BRASIL, 2005; BRASIL, 2014).

Esses dois gêneros são bastante estudados em hospedeiro vertebrado, em especial no homem. A sua relação com hospedeiro, especificamente com o homem, está condicionada à interação da membrana do parasito com as células do sistema imune (TEIXEIRA et al., 2011).

## **2.2 Leishmania**

As leishmanias são protozoários, isto é, são seres que vivem em dependência metabólica de seus hospedeiros, causando-lhes algum tipo de dano (FERREIRA, 2012). O nome do gênero *Leishmania* foi dado em homenagem ao médico escocês William Boog Leishman (1865 – 1926) (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

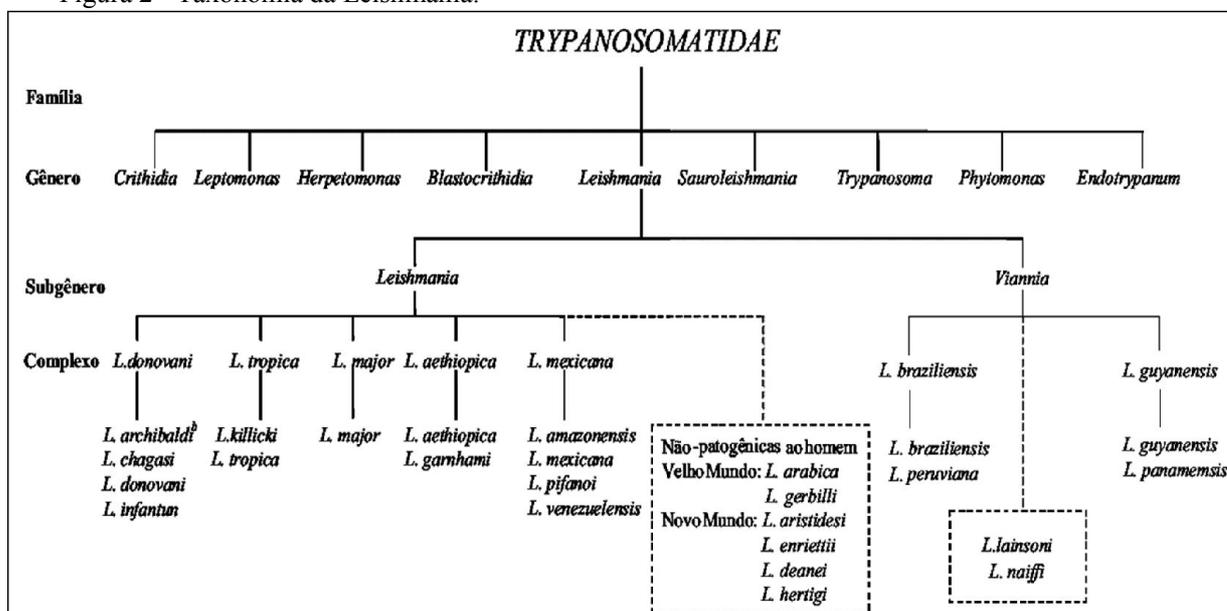
A taxonomia estava baseada em manifestação clínica de distintas doenças em diversas regiões geográficas dos diferentes parasitos existentes na localidade. O médico Piotr Fokich Borovsky foi o primeiro a reconhecer o protozoário como o responsável pela forma clínica da

infecção (leishmaniose cutânea), mas ele não chegou a atribuir nome ao protozoário (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003; BARRAL; COSTA, 2011; COSTA, 1992).

A grande variedade de formas clínicas das doenças causadas pelas diversas espécies de *Leishmania* possibilitou correlacionar o parasito com a infecção. Devemos ressaltar que as formas clínicas desta infecção estão associadas a relação do parasito com seu hospedeiro, o que dificulta identificar o parasito. (SARAVIA et al., 1989). Neste sentido, o comportamento do parasito está associado à sua morfologia dentro do inseto que pode nos auxiliar na taxonomia.

Em 1979, Phyllis T. Johnson & Marshall Hertig, baseados no estudo de LAINSON & SHAW, dividiram o gênero *Leishmania* em três seções de acordo com o desenvolvimento do parasito no intestino do vetor, quais sejam: Hipopilárico, Peripilárico e Suprapilárico. No Hipopilárico, o parasito tem seu desenvolvimento no intestino superior do vetor, tendo como hospedeiro os répteis. As espécies dessa seção são conhecidas como *Sauroleishmania*. No Peripilárico, o parasito migra para o intestino médio do vetor e se desenvolve. Estes parasitos são incluídos no subgênero *Vianna*. E, finalmente, no Suprapilárico, o parasito se desenvolve somente no intestino médio do vetor. Estes parasitos pertencem ao subgênero *Leishmania*, que inclui a grande maioria das espécies tanto do velho mundo (Europa, África e Ásia) como do novo mundo (As Américas). Nessa linha de análise, a figura 2 mostra de forma mais detalhada a nova classificação, incluindo os subgêneros *Leishmania* e *Vianna* ((LAINSON, 2010; LAINSON; SHAW, 1979).’

Figura 2 - Taxonomia da Leishmania.



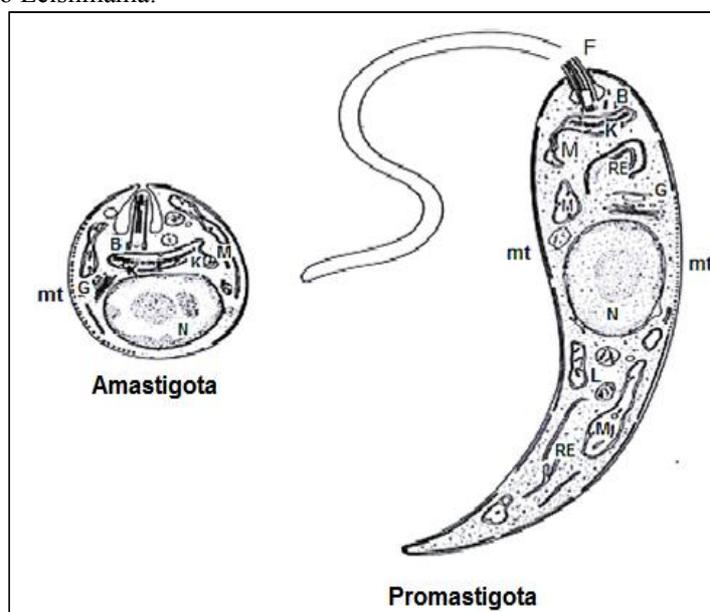
Fonte: Brasil (2006a)

No Brasil, atualmente, são conhecidas oito espécies de *Leishmania*, sendo sete espécies causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA), a qual é composta de uma do subgênero *Leishmania*, e seis do subgênero *Viannia*, que é responsável pela doença em humanos. Neste entendimento, as espécies responsáveis pela leishmaniose são: *L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiiffi*, *L.(V.) L.lindenberg* e *L. (V.) shawi* (BRASIL, 2006; LAINSON, R, 2010). E, por último, uma espécie de *L. (L.) chagasi*, a principal causadora da forma mais grave da doença, que é denominada de leishmaniose visceral (LV) (BRASIL, 2014; LAINSON, 2010).

### 2.2.1 Morfologia da Leishmania

O gênero *Leishmania* tem duas principais formas evolutivas, a amastigota e a promastigota. No hospedeiro vertebrado é encontrada a forma amastigota, a qual vive no meio intracelular de macrófago. Ela tem um flagelo ausente (imóvel) e uma forma ovoide medindo entre 2,1 e 3,2  $\mu\text{m}$ . Enquanto a forma promastigota é encontrada nos vetores invertebrados e vive no meio extracelular, especificamente no trato digestivo do inseto. Ele tem flagelo livre, que ajuda na locomoção, corpo alongado medindo entre 14 e 20  $\mu\text{m}$  e o kinetoplasto anterior ao núcleo (LAINSON; RANGEL, 2005; MOLYNEUX, 1983). A figura 3 apresenta a morfologia das formas amastigota e promastigota.

Figura 3 - Organização das organelas presentes tanto na forma amastigota quanto na forma promastigota do gênero *Leishmania*.



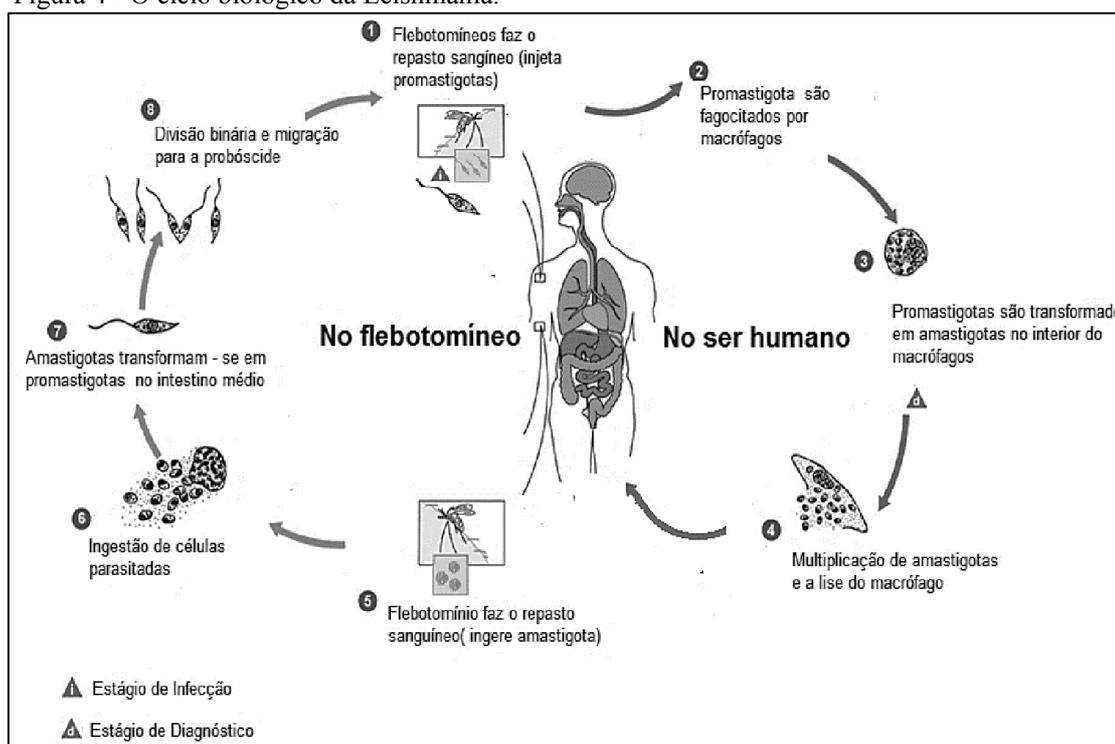
Fonte: Rey (2002).

O bolso flagelar (B) é onde se localiza o flagelo; os flagelos (F) são formados de actina, cuja função é mover o parasito como um todo; o complexo de Golgi (G) é responsável pela síntese de carboidratos e condensação da secreção proteica; o kinetoplasto (k) é uma região especializada da mitocôndria e rica em DNA; os lisossomos (L) são responsáveis pela digestão intracelular; a mitocôndria (m) é responsável pela produção de energia; a membrana (mt) é responsável pela proteção, nutrição, excreção e revestimento; e o retículo endoplasmático (RE) é responsável pela síntese de esteroides e proteínas (MOLYNEUX, 1983; NEVES, 1998; VANNIER-SANTOS; MARTINY; SOUZA, 2002)

### 2.2.2 Biologia da *Leishmania*

O ciclo biológico inicia quando o inseto vetor de protozoários parasito do gênero *Leishmania*, o flebotomíneos, está apto a se alimentar de sangue. Estes insetos pertencem à ordem Díptera, à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e a dois gêneros: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). (BARRAL; COSTA, 2011; MOLYNEUX, 1983; SANTOS et al., 1998). A figura 4 sintetiza o ciclo biológico da *Leishmania*.

Figura 4 - O ciclo biológico da *Leishmania*.



Fonte: WHO (2013).

Os vetores machos têm mandíbulas rudimentares, o que os impossibilitam de penetrar na pele dos invertebrados, por essa razão não se alimentam de sangue. Entretanto, a fêmea tem mandíbula desenvolvida capaz de rasgar a epiderme do hospedeiro, criando naquele local uma poça de sangue para se alimentar. Durante o repasto sanguíneo, poderá de forma acidental ingerir o protozoário, que pertence ao gênero *Leishmania*, ou transmiti-lo ao hospedeiro (BARATA et al., 2004; BARRAL; COSTA, 2011; NIEVES; PIMENTA, 2000).

Depois do repasto infectante, o sangue e as formas amastigotas vão para o intestino médio do inseto, iniciando-se o processo de diferenciação entre a forma amastigota e as outras fases, como promastigotas procíclicas, nectomonadas, leptomonadas, metacíclicas e haptomonadas (BARRAL; COSTA, 2011; LAINSON, 2010). Todas essas fases são caracterizadas pelas diferenças morfológicas e alterações bioquímicas que aumentam a resistência contra as proteases intestinais (como, por exemplo, a tripsina) do vetor flebotomíneo (KAMHAWI, 2006; PIMENTA et al., 1997).

As formas promastigotas metacíclicas são as formas que passaram pelo processo de transformação denominado metaciclogênese, ou seja, neste processo elas deixam de replicar, tornando-se infectantes. Nesta forma metacíclica, há uma grande modificação morfológica e bioquímica do parasito impossibilitando a sua ligação com o intestino do inseto, o que ocasiona o seu deslocamento para a faringe e cavidade bucal que, no momento da picada do inseto, ele passará para o hospedeiro (BARRAL; COSTA, 2011).

Com a picada ocorre a inoculação do promastigota metacíclicos, ou seja, a sua transmissão ao hospedeiro, mas a efetividade desta transmissão se dará mediante a ação conjunta da saliva com o proteofosfoglicano - PPG, que é um tipo de mucina secretada pelo parasito (MOLYNEUX, 1983).

A saliva do flebotomíneo é injetada na derme do hospedeiro por meio da picada, a qual causa uma reação inflamatória que atrai as células de defesa (o macrófago e neutrófilo) para o local da picada onde estão os parasitos. Assim, ativa o sistema de complemento (SC), que pode induzir a morte dos parasitos, sobretudo das espécies que causam a leishmaniose cutânea, as quais por esse sistema de complemento se tornam mais sensíveis à lise em comparação às espécies que causam leishmaniose visceral (TEIXEIRA et al., 2005).

Logo após a sua inoculação, os promastigotas metacíclicos infectantes são capazes de inativar enzimaticamente o fragmento C3b do complemento transformando-o em C3bi por meio da ação da glicoproteína de superfície (GP63), dando a ele condição de se ligar ao macrófago.

A ligação do promastigota metacíclico ao macrófago ocorre quando o fragmento inativo, C3bi, se liga ao promastigota gerando condição de ligação aos receptores de complemento, como o CR1 e/ou CR3, existentes em células fagocíticas (macrófago e neutrófilo), sem acionar o alerta de suas defesas (DOMINGUEZ; TORANO, 1999).

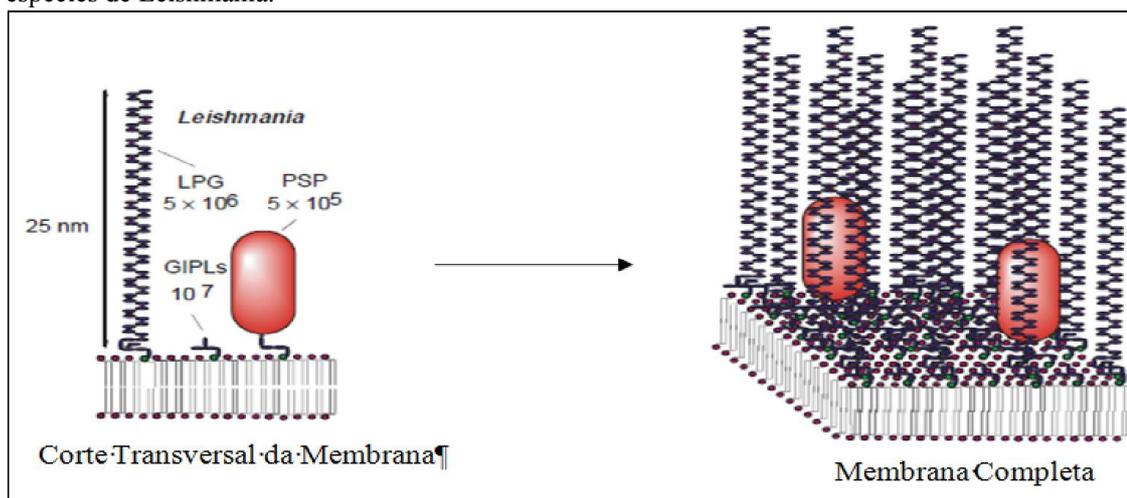
Uma vez ligado, os macrófagos reconhecem quimicamente na membrana do promastigota uma molécula de superfície denominada fosfatidil serina, específica em células que estão em fase de apoptose. Essa é a razão pela qual os macrófagos fagocitam os promastigotas sem ativar o processo oxidativo. Dessa forma, os promastigotas não sofrem os efeitos destrutivos da célula que os fagocitou, iniciando assim o processo de diferenciação (BALANCO et al., 2001).

No processo de fagocitose, o parasito passa para o meio intracelular, o qual fica dentro do fagossomo onde sofre rapidamente alterações tanto metabólicas como bioquímicas, ou seja, se diferencia de forma rápida para a forma amastigota. Desse modo, a saliva do inseto que está acoplada ao parasito induz a apoptose e inibe o processo oxidativo, assim garante a sobrevivência do parasito (DOMINGUEZ; TORANO, 1999). Os neutrófilos que fagocitaram os protozoários passarão para a fase de apoptose, que expressa em sua superfície uma elevada quantidade fosfatidil serina, para, em seguida, serem fagocitados pelos macrófagos. No interior da célula de defesa (do macrófago), o parasito se adapta com rapidez às novas condições fisiológicas antes desta célula desencadear reações oxidativas; capazes de eliminar o parasito (PRATES et al., 2011).

### **2.2.3. As moléculas de membrana da Leishmania**

A membrana da Leishmania é recoberta por várias moléculas que são extremamente importantes. Sendo elas responsáveis pela interação com as células do hospedeiro, pela multiplicação, patogênese do parasito e pela sobrevivência do mesmo (FERGUSON, 1997). A figura 5 mostra essas moléculas.

Figura 5 - Ilustração da membrana com os gliconjugados do estágio promastigota metacíclico das espécies de *Leishmania*.



Fonte: Ferguson, (1999).  $5 \times 10^6$  representa a quantidade de LPG,  $5 \times 10^5$ , a quantidade de PSP e  $10^7$ .

A molécula mais abundante na superfície do estágio promastigota da *Leishmania* é o Glicosilfosfatidilinositol (GPI), que funciona como “ponte” ou “âncora” para vários gliconjugados, como as glicoproteínas, chamadas de proteína de superfície de promastigota (PSP), a família de glycoinositol-fosfolípídeos (GIPLs) e o lipofosfoglicano (LPG). Esta molécula é composta por carboidrato, lipídios, fosfato e aminas, por essa razão tem atraído vários grupos químicos orgânicos (FERGUSON, 1999; MCCONVILLE et al., 1990).

O GPI é definido pela estrutura  $\text{Man}\alpha 1-4\text{GlcN}\alpha 1-6\text{PI}$  e pode ser de três tipos que variam de acordo com sua estrutura de glicano. O tipo 1 tem a estrutura  $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\alpha 1-4\text{GlcN}\alpha 1-6\text{PI}$ , que consiste em uma densa camada na superfície do estágio promastigota. GIPLs é muito similar a esse tipo de GPI. O tipo 2 de estrutura  $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\alpha 1-4\text{GlcN}\alpha 1-6\text{PI}$  e o tipo 3 são híbridos da estrutura  $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\alpha 1-4\text{GlcN}\alpha 1-6\text{PI}$  (FERGUSON, 1999).

A quantidade expressa na superfície do parasito do tipo de GPI varia entre as espécies de *Leishmania* e também entre estágios de mudança do parasito da mesma espécie (FERGUSON, 1997; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993).

A molécula de lipofosfoglicano (LPG) é um glicoconjugado do tipo 2 de GPI, que se liga a uma longa cadeia de fosfosacarídeo, o que forma uma densa camada de glicocálice na superfície do promastigota. De outro lado, o estágio amastigota tem pouca ou nenhuma quantidade dessa molécula (BAHR et al., 1993; MCCONVILLE et al., 1995).

As diferenças no LPG ocorrem ao longo das fases de diferenciação do parasito para garantir a este sobrevivência e o deslocamento dentro do vetor, interação com a célula do hospedeiro ocasionando a invasão do macrófago e a proteção contra os efeitos do sistema de

complemento (DESCOTEAUX; TURCO, 1999; ILGOUTZ; MCCONVILLE, 2001; MARR; MULLER, 1995).

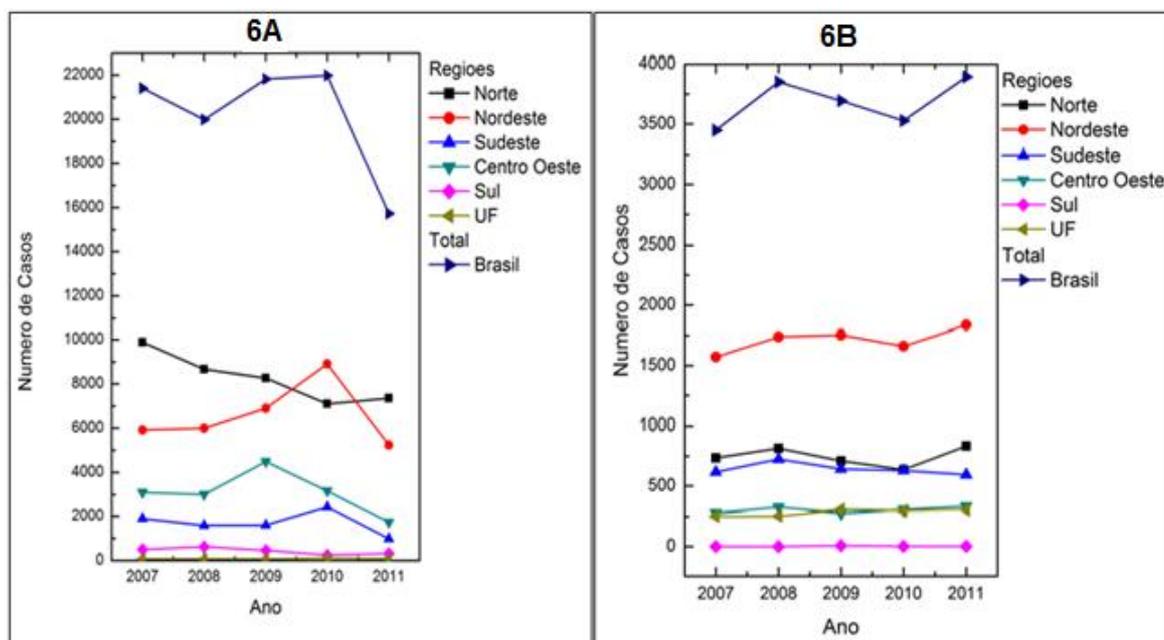
A glicoproteína ancorada pela molécula GPI que podemos destacar na superfície do parasito é GP63. Essa glicoproteína pode estar acoplada à membrana ou pode ser secretada pelo parasito, que tem mostrado uma atuação na resposta imune (ILGOUTZ; MCCONVILLE, 2001; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993).

## 2.2.5 Epidemiologia

No contexto atual, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose uma das seis doenças mais infecciosas do mundo. Ela está presente tanto no velho mundo quanto no novo mundo. No novo mundo, especificamente no Brasil, a doença está distribuída em todas as unidades federadas do País (BRASIL, 2007; BRASIL, 2014).

Para compreender melhor, observa-se, de modo geral, que nos últimos anos a doença teve uma expansão significativa nas áreas endêmicas e em novas áreas. Entre 2007 e 2011, constatou-se a sua distribuição em todas as unidades federadas do País. Sobre esse ponto, o Ministério da Saúde (MS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) registraram os casos de LTA e LV (BRASIL, 2007; BRASIL, 2014), como indica a figura 6 (6A, mostra os casos de LTA e 6B mostra os casos de LV).

Figura 6 - Distribuição dos casos da LTA e LV que foram confirmados entre 2007 e 2011.



Fonte: SINAN (2014)

A figura 6A nos mostra que, no período compreendido entre 2007 e 2011, a Região Norte apresentou os maiores índices de casos confirmados por LTA (são as formas mucosa e cutânea), com uma média de 8.262,4 casos. Ao mesmo tempo que a Região Sul apresentou os menores índices em relação às demais regiões brasileiras, ou seja, uma média de 437 casos.

O registro de casos indicados pela UF refere-se aos pacientes que residem nessas regiões, porém adquiriram a infecção em outra. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, a doença atinge quase 100 (cem) pessoas para cada 100 mil habitantes. A figura 6B mostra a distribuição dos casos LV por todo país.

Podemos observar na figura 6B que a maior incidência concentra-se na Região Nordeste e a menor, na Região Sul, com respectivas médias de 1.711,4 e 2,4. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, o número de indivíduos atingidos, anualmente, pela doença em todo o país é em torno de cinco a dez mil. Dessa estimativa, cerca de 10% não sobrevivem. Esses dados nos mostram que essa doença é, sem dúvida, um problema de saúde pública.

### **2.3 Trypanosoma cruzi e Trypanosoma rangeli**

As espécies de *Trypanosoma* são protozoários flagelados da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (TELLERIA et al., 2006). Esses protozoários por terem uma proximidade morfológica e bioquímica, o que dificulta a sua identificação, foi proposto primeiramente uma classificação com base na morfologia (MOLYNEUX, 1983; TEIXEIRA et al., 2011).

A morfologia é o principal critério que tem sido usado para identificar os parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida; no entanto, as espécies de *Trypanosoma*, por terem formas bastante variadas, dificultam a identificação dos parasitos por esse critério. Portanto, para uma melhor identificação das espécies de *Trypanosoma*, foi preciso criar uma nova taxonomia baseada em estudos biológicos associados ao comportamento do parasito no vetor, com a intenção de fortalecer a que já existe (MOLYNEUX, 1983). Neste sentido, a taxonomia do gênero *Trypanosoma* facilita a identificação desse parasito, conforme podemos verificar no quadro 1.

Quadro 1 - Taxonomia do *Trypanosoma*

Trypanosoma							
Seção	Stercoraria			Salivaria			
Subgênero	Megatrypanum	Herpetosoma	Schizotrypanum	Duttonella	Nanomonas	Trypanozoon	Pynomonas
Espécies representativas	T.(M.)theileri	T.(H.)lewisii T.(H.)musculi T.(H.)rangeli	T.(S.)cruzi cruzi T.(S.)cruzi marinkellei T.(S.)dionisii	T.(D.)uniforme T.(D.)vivax	T.(N.)congolense T.(N.)simiae	T.(T.)brucei T.(T.)b. brucei T.(T.)b. rhodesiense T.(T.)b. gambiense T.(T.)equiperdum T.(T.)evansi	T.(P.)suis

Fonte: Molyneux (1983).

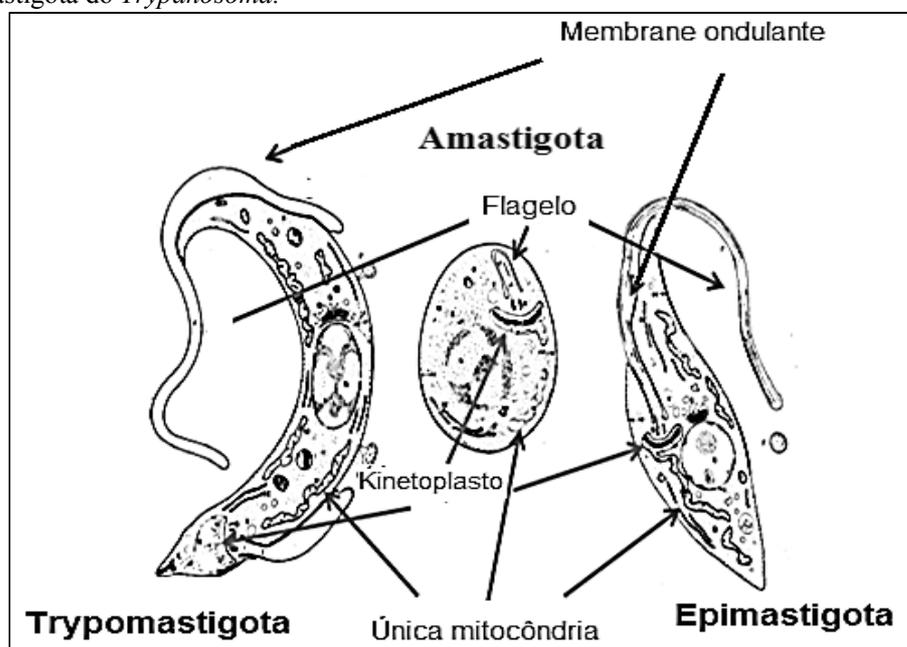
De acordo com o desenvolvimento do parasito no hospedeiro invertebrado, o gênero *Trypanosoma* está dividido em duas seções, a stercoraria e a salivaria, conforme o quadro 1. Os parasitos da seção stercoraria se desenvolvem no intestino posterior do inseto e é excretado por suas fezes durante o repasto sanguíneo sobre a pele do hospedeiro. O *T. cruzi* faz parte desta seção, o qual vive de forma parasitária no homem, causando-lhe a doença de Chagas. Essa infecção foi nomeada por Carlos Chagas, após descrever o agente causativo e alguns sintomas clínicos associados à doença. Os parasitos que pertencem ao subgênero *Schizotrypanum* são indistinguíveis morfologicamente, o que dificulta a identificação, gerando um problema público mundial (MOLYNEUX, 1983). Na seção salivaria, os parasitos se desenvolvem no intestino anterior do inseto e migram para a hemolinfa e glândulas salivares do vetor onde completarão o seu desenvolvimento, ou seja, chegarão à forma infectiva para serem inoculados no momento do repasto sanguíneo do vetor (BRIGADA et al., 2010; CENTERS., 2015; TEIXEIRA et al., 2011). O *T. rangeli* tem uma classificação complexa devido às características morfológicas e biológicas se apresentarem ora similar à seção stercoraria ora similar à seção salivares (AÑEZ, 1982; D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999).

### 2.3.2 Morfologia

Os protozoários do gênero *Trypanosoma* são parasitos de insetos que se adaptaram aos mamíferos. Eles são geralmente organismos fusiformes de tamanhos que variam de 15 a

100  $\mu\text{m}$ , dependendo da espécie e do subgênero, multiplica-se por divisão binária e apresentam três principais formas evolutivas: amastigota, epimastigota e trypomastigota, como mostra a figura 7 (FAUCHER; BALTZ; PETRY, 1995; MOLYNEUX, 1983; TEIXEIRA et al., 2011).

Figura 7 - Ilustração do flagelo, membrana e kinetoplasto presente na forma amastigota, epimastigota e trypomastigota do *Trypanosoma*.



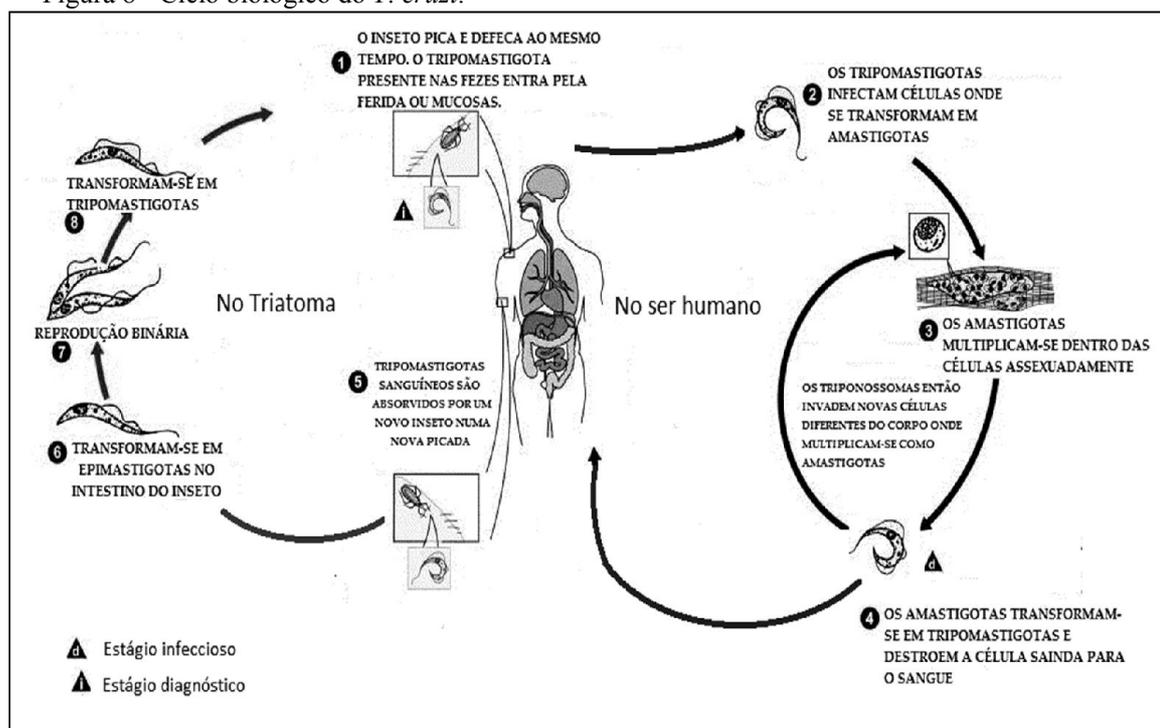
Fonte: Doença de Chagas (2014)

A forma amastigota é arredondada ou oval, possui um flagelo reduzido, o kinetoplasto está localizado entre o núcleo e o flagelo. É infectiva, multiplicativa e vive no interior da célula dos hospedeiros. As formas epimastigotas ou procíclicas são encontradas no hospedeiro invertebrado, particularmente no intestino do barbeiro, onde vivem e estão em processo de transformação. Apresentam-se de forma fusiforme, o kinetoplasto tem a aparência de bastão e está localizado próximo à bolsa flagelar, onde surge o flagelo. Nesta fase, elas não são infectivas, mas multiplicativas. As formas trypomastigotas ou metacíclicas do *T. cruzi* e do *T. rangeli* são encontradas no sangue dos hospedeiros, no intestino posterior do vetor e no meio intracelular dos hospedeiros quando se referem ao *T. cruzi*. Essa última forma apresenta um comprimento em torno de 20  $\mu\text{m}$  para a espécie de *T. cruzi* e de 13  $\mu\text{m}$  de comprimento para a espécie de *T. rangeli*, ambas têm uma membrana ondulante (DIAS; COURA, 1997).

### 2.3.3 Biologia

O *T. cruzi* e o *T. rangeli* foram encontrados nas mesmas espécies de vetores e nas mesmas espécies de hospedeiro vertebrados, ou seja, são mamíferos pertencentes a diferentes ordens e gêneros de animais, incluindo o homem. O ciclo biológico desses parasitos do gênero *Trypanosoma* inicia se após o repasto sanguíneo do inseto vetor deste protozoário, o triatomíneo. Esses insetos pertencem à ordem Hemiptera, a família Reduviidae e subfamília Triatominae. São denominados popularmente como barbeiro, chupão, bicudo, entre outros. (TEIXEIRA et al., 2011). A figura 8 sintetiza o ciclo biológico do *T. cruzi*.

Figura 8 - Ciclo biológico do *T. cruzi*.



Fonte: Teixeira (2011).

A transmissão do *T. cruzi*, o causador da doença de Chagas no homem, ocorre de duas formas: a primeira dá-se pela transmissão natural que ocorre quando o inseto fêmea, hematófaga da subfamília dos triatomíneos, elimina o *T. cruzi* pelas fezes ou urina na pele do homem, após alimentação sanguínea. Na pele, as fezes e/ou urina provocam irritação que leva o indivíduo a se coçar, causando-lhe pequenas fissuras, o que é suficiente para que o parasito penetre e inicie o processo de contaminação pela via sanguínea; e a segunda ocorre pela alimentação durante o período da amamentação da criança, a ingestão de açaí, suco de cana de açúcar, carne mal cozida, transfusão sanguínea, transplante e no decorrer da gravidez por meio da placenta (CENTERS, 2015; MONTGOMERY et al., 2014; SATOH et al., 2010).

Após o processo de transmissão, a forma trypomastigota inicia o processo de interação, quer dizer, a membrana do parasito possui moléculas que interagem bioquimicamente com a célula de defesa (o macrófago), até que seja fagocitada. Com o processo de fagocitose feito pelo macrófago, o parasito passa para o meio intracelular envolvido em uma bolsa chamada de vacúolo parasitóforo, o qual se funde com os lisossomos a fim de eliminar o parasito, porém a membrana dele dispõe de moléculas que o protegem da ação lítica dos lisossomos. Assim, ele sofre com rapidez alterações, tanto metabólicas, como bioquímicas, ou seja, se diferencia rapidamente para as formas amastigotas (BRENER; ANDRADE, 1979; CENTERS, 2015; MOLYNEUX, 1983).

O vacúolo parasitóforo se rompe e a forma amastigota vai para o citoplasma do macrófago, onde se inicia o processo de multiplicação até que ocorra a lise desta célula, assim liberando para o meio extracelular as formas trypomastigota, amastigota e epimastigota (BRENER; ANDRADE, 1979; TEIXEIRA et al., 2011).

Com o macrófago lisado, as formas amastigotas e epimastigotas se deslocam para o meio extracelular porque não houve tempo suficiente para que as duas se diferenciassem. Destaque-se, contudo, que a forma epimastigota, quando fagocitada, é eliminada pelo macrófago, sendo essa a razão pela qual não é encontrada na corrente sanguínea do hospedeiro (SERRANO et al., 1995; TEIXEIRA et al., 2011).

O ciclo biológico do parasito do subgênero *Herpetosoma*, o *T. rangeli*, constitui um ciclo similar à forma de transmissão natural do *T. cruzi* (MENEGUETTI et al., 2014; VALLEJO et al., 1999). O ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado não foi esclarecido por completo e os poucos dados existentes apresentam controvérsias. Esse parasito, por não ser patogênico ao homem, poderia esclarecer a baixa virulência e a sua baixa parasitemia, o que configuraria para muitos autores que o *T. rangeli* não se multiplica em hospedeiro vertebrado. O tempo de vida deste parasito no hospedeiro pode levar variar entorno de um ano. (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999; D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1992).

#### **2.3.4 Membrana do *Trypanosoma cruzi***

A membrana do *T. cruzi* é composta por gliconugados (GIPLs e GPI), os quais de forma conjunta corroboram a adaptação e sobrevivência desse parasito em seus vetores assim como em seus hospedeiros. O GIPLs é uma molécula de GPI do tipo 1, que se caracteriza por ser a mais abundante no que tange às formas epimastigota e trypomastigota. Diferentemente da membrana da espécie de *Leishmania* que tem como molécula mais abundante na sua

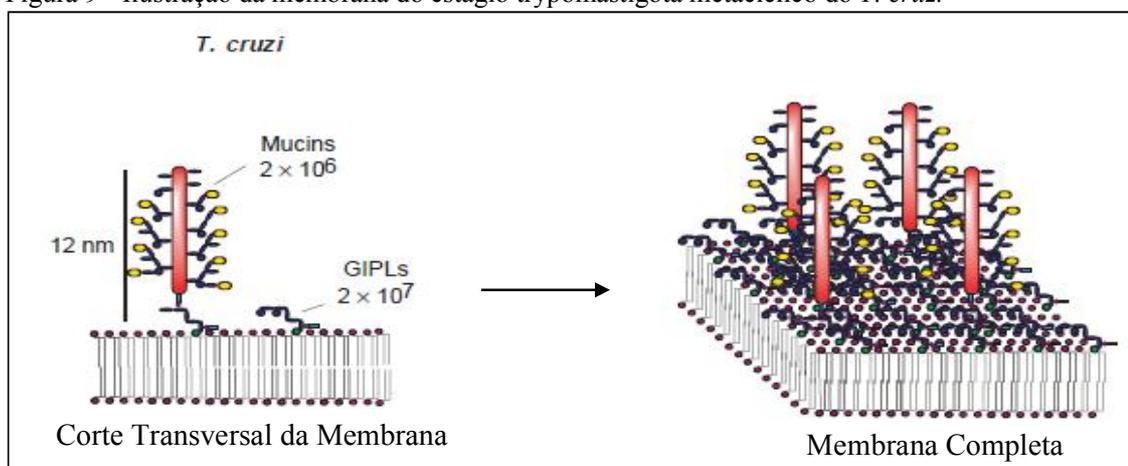
superfícies o GPI do tipo 2. O GIPLs é constituído pela molécula de GPI mais a estrutura de glicano (6Man $\alpha$ 1). Essa molécula forma na membrana uma densa camada juntamente com a mucina, que se localiza logo acima dela. A mucina sofre uma importante mudança na sua estrutura lipídica quando as formas epimastigota estão em processo de diferenciação para forma trypanmastigota (forma infectiva) (HEISE; ALMEIDA; FERGUSON, 1995).

A estrutura lipídica da membrana da forma epimastigota ancorada pelo GPI é de glicerídeo, já a estrutura lipídica da forma trypanmastigota ancorada no GPI é formada por mais de 70% de ceramida (SERRANO et al., 1995). Essa diferença de estrutura lipídica da forma trypanmastigota está relacionada com sua sobrevivência dentro do vetor e o aumento da resistência ao sistema de defesa do hospedeiro.

No estágio trypanmastigota o componente lipídico ancorado pelo GPI é a cadeia de ácidos graxos insaturada diferentemente dos demais estágios que predomina é a cadeia de ácidos graxos saturado. Essa diferença na estrutura lipídica desenvolve um importante papel imunológico por que induz a apoptose da célula do hospedeiro (o macrófago), ou seja, a morte celular (FERGUSON, 1997).

A mucina é o principal meio da interação química entre a membrana do parasito os gliconjugados presentes na membrana do macrófago. Ela continua ligada, a membrana do parasito mesmo após a interação permanece ligada através da glicoproteína ancorada pelo GPI chamada de antígeno 1G7. A interação da mucina do parasito no estágio trypanmastigota, ou seja, no estágio infectivo implica na virulência e a invasão da célula do hospedeiro, macrófago (FERGUSON, 1997; HEISE; ALMEIDA; FERGUSON, 1995). A figura 9 mostra a membrana do *T. cruzi* com o GIPLs e as mucinas.

Figura 9 - Ilustração da membrana do estágio trypanmastigota metacíclico do *T. cruzi*.



Fonte: Ferguson (1997). Os pontos amarelos ligados à mucina são ácido siálico.

Os polissacarídeos presentes na membrana da forma trypomastigota quando ligado ao oxigênio e termina na forma  $\beta$ -galactopyranose, ou seja, polissacarídeo na forma cíclica tem sítios de receptores de ácidos siálico específico que são responsáveis por desencadear um alto níveis de anticorpos (anti- $\alpha$ Gal) observado em pacientes com doença de Chagas (FERGUSON, 1997).

### 2.3.5 Epidemiologia

A doença de Chagas (também conhecida como tripanossomíase americana) é uma doença tropical que permanece negligenciada, causando problemas tanto social quanto econômico, principalmente em áreas endêmicas de 21 países da América Latina. Estima-se que em torno de 10 a 15 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina e 60 a 100 milhões estejam na área de risco (MARTINS-MELO et al., 2012a; WHO, 2013).

No Brasil, a prevalência dessa infecção ocorre na região Norte. Avalia-se que o número de pessoas infectadas se aproxima de 2 a 3 milhões. Dessas pessoas infectadas, cerca de 33% sofrem com a fase crônica da infecção, cardíaca e digestiva, causando a imobilidade ou mortalidade desses indivíduos, fato este que gera um percentual considerável nessas regiões endêmicas. A doença leva a morte desses indivíduos, o que chega por volta de 97% quando estão na fase crônica e 9% na fase digestiva, provocando aproximadamente 6000 mortes por ano. Com base nesses dados, é absolutamente necessária a busca de diagnósticos mais precisos (DESJEUX, P, 2001a; MARTINS-MELO et al., 2012a; MARTINS-MELO et al., 2012b; XAVIER et al., 2014).

*Trypanosoma rangeli* é a segunda espécie de tripanosoma mais comum que infecta os humanos nos países da América Latina. Para os hospedeiros vertebrados, ele não é um parasito patogênico, mas é patogênico ao seu hospedeiro invertebrado (MENEGUETTI et al., 2014; SOUSA, 1999; VALLEJO et al., 1999).

Além da distribuição geográfica do *T. rangeli* ser as mesmas regiões onde foi encontrado o *T. cruzi*, ele é também frequentemente encontrado no mesmo hospedeiro, inclusive no homem (AÑEZ, 1982). Apesar da similaridade morfológica e biológica do *T. rangeli* (Herpetosoma) e *T. cruzi* (Schizotrypanum), eles são geneticamente diferentes. Esses dois parasitos ainda têm em comum de maneira aproximada 60% de sua constituição antigênica solúvel, o que obscurece o diagnóstico parasitológico e imunológico de infecção por *T. cruzi* em áreas nas quais ambos os parasitas coexistem e partilham hospedeiro e vector.

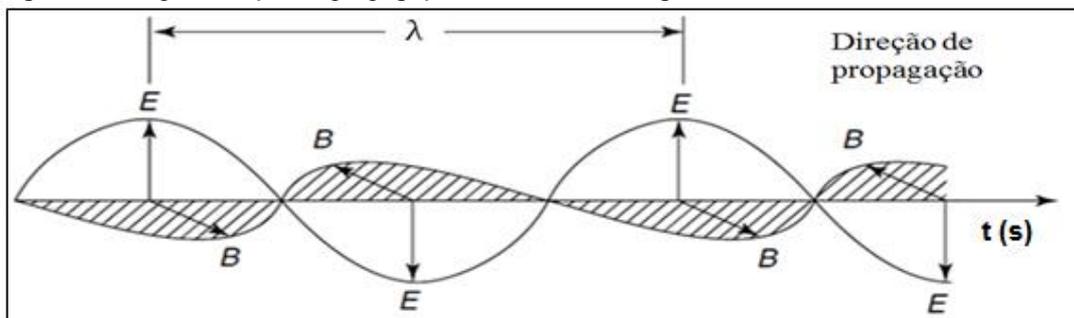
Em outras palavras, causam a reação cruzada nos testes sorológicos, dificultando um diagnóstico preciso da doença de Chagas (AFCHAIN et al., 1979; AÑEZ, 1982).

Na América do Sul, treze países registraram 2700 casos de contaminação pelo *T. rangeli*. No Brasil houve registros de ocorrência deste parasito em humanos nas regiões amazônica e baiana. Nas demais regiões foram registradas a presença do parasito somente em animais silvestres e no próprio vetor, o triatomíneo (GRISARD; STEINDEL, 2005).

## 2.4 A radiação eletromagnética e o espectro eletromagnético

A luz ou radiação eletromagnética visível é uma forma de energia que é transmitida no vácuo com velocidade constante de  $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ . Essa radiação tem um movimento ondulatório característico, que consiste em oscilações de campo elétrico e de campo magnético, sendo perpendiculares entre si e perpendiculares na direção da propagação da onda, conforme ilustrado na figura 10 (STUARTS, 2004).

Figura 10 - Representação da propagação da onda eletromagnética.



Fonte: Stuarts (2004). B representa o vetor campo magnético. E representa o vetor campo elétrico E.  $\lambda$  representa o comprimento da onda.

A relação entre a velocidade da onda eletromagnética ( $c$ ), da figura 12, e o seu comprimento de onda ( $\lambda$ ), obtém-se aí a frequência desta onda descrita pela equação 1. (MOHAN, 2000).

$$\bar{\nu} = \frac{c}{\lambda} \quad (01)$$

Sendo  $c$  a velocidade da luz no vácuo e  $\lambda$  (cm) é o comprimento de onda.

O inverso do comprimento de onda  $1/\lambda$  é chamado de número de onda  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) (MOHAN, 2000). Portanto, a equação 1 acima pode ser rescrita do seguinte modo:

$$\bar{\nu} = \bar{\nu} c \quad (02)$$

A radiação eletromagnética é descrita pela teoria da Mecânica Quântica que a define como pacotes quantizados de energia, sem massa, chamados de fótons ou quanta, viajando na direção da propagação com a velocidade da luz. Quando essa radiação é absorvida por espécies químicas, dizemos que este evento é quantizado ou discreto, ou seja, somente quantidades de energias específicas dos níveis energéticos das espécies químicas terão a probabilidade de serem registrada no espectro. A energia de um fóton ou quantum depende da frequência e é dada pela equação 3, de Bohr (STUARTS, 2004).

$$E = h\bar{\nu} \quad (03)$$

Sendo  $h$  a constante de Planck ( $h = 6.626 \times 10^{-34}$  J s). Escrevendo a frequência em característica angular temos  $\omega = 2\pi f$ , onde  $\omega$  é a frequência angular. Então podemos rescrever a equação 03 com base na definição da frequência angular.

$$E = h\bar{\nu} = h \frac{\omega}{2\pi} = \hbar\omega \quad (04)$$

#### 2.4.1 Espectroscopia vibracional

Em 1665, o termo “espectro” foi descrito pela primeira vez por Isaac Newton no campo da ótica, para explicar um famoso experimento: a imagem colorida formada por feixe de luz solar após atravessar um prisma triangular de vidro (BREBBIA; GREATED; COLLINS, 2014).

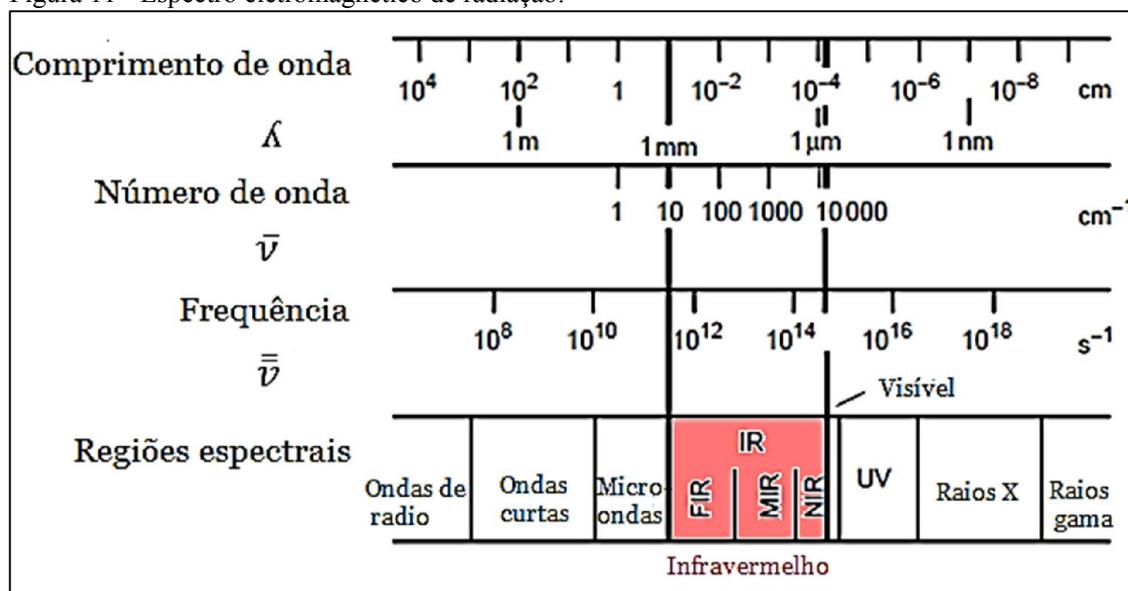
Newton foi o primeiro a chamar um conjunto de cores de espectro. A observação deste espectro levou-o a defender a ideia de que a luz era constituída por corpúsculos de vários tamanhos, ou seja, cada cor representada no espectro tem um corpúsculo de tamanho diferente. Esses corpúsculos não poderiam ser da mesma forma, porque a propriedade de polarização da luz implica alguma dissimetria (JENKINS; WHITE, 2001; WALDMAN, 2002).

A definição de espectro é toda faixa sobre a qual uma propriedade mensurável de um sistema físico ou fenômeno que possa variar, tal como a frequência no limite do som, o comprimento de onda da radiação eletromagnética ou uma massa de tipo específico de partícula. Em outras palavras, o espectro é a representação gráfica da interação (absorção, emissão ou espalhamento) da radiação com a matéria em função da frequência, energia ou comprimento de onda da radiação (JENKINS; WHITE, 2001).

A energia absorvida, espalhada ou emitida pelos átomos e moléculas da amostra, pode ser aferida pela técnica de espectroscopia, isto é, por meio do instrumento de análise conhecido como espectrofotômetro, o qual registra essas interações por meio dos espectros (LINNE, 2002).

A região espectral da radiação eletromagnética, em específico a região do infravermelho que está situada entre a região do visível e das micro-ondas, apresenta uma região de maior interesse para a química orgânica, que corresponde à faixa de  $4000\text{ cm}^{-1}$  até a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Nesta faixa os átomos de carbono e hidrogênio ligados a outros átomos estão presentes nos grupos funcionais estão ligados por meio de uma ligação covalente, a qual interagem com esta faixa da frequência da região do infravermelho médio. Compreendendo os grupos funcionais podemos entender ou denominar o composto orgânico. A figura 11 representa o espectro eletromagnético de radiação, dando ênfase na região do infravermelho médio. (NAUMANN, 2000; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; STUARTS, 2004).

Figura 11 - Espectro eletromagnético de radiação.



Fonte: Naumann (2000).

Os níveis energia vibracional das moléculas que interagem com a radiação infravermelha ocorrem por meio de um processo quantizado. Essa interação proporciona o aumento da amplitude das vibrações moleculares devido a absorção da radiação e é registrada por meio de um gráfico (MOHAN, 2000; SALA, 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; STUARTS, 2004).

A energia de vibração molecular é uma consequência da absorção da radiação infravermelha que permita transição entre os níveis de energia vibracionais  $E_0$  para  $E_1$ . De outra maneira, passa do estado menos excitado  $E_0$  para outro mais excitado  $E_1$ . Por conseguinte, podemos reescrever a equação 03 conforme a equação 5 (HOLLAS, 2004; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

$$\Delta E = \hbar\omega \quad (05)$$

A interação dessa radiação com uma molécula enseja a probabilidade de ocorrer vários eventos de transições. As transições eletrônicas normalmente estão localizadas na região do ultravioleta ou visível. Os eventos rotacionais estão situados na região das micro-ondas e os vibracionais estão situados na região do infravermelho, o que resulta no estiramento/deformação das ligações dos átomos que constituem a molécula.

A energia da molécula (energia potencial total da molécula) é a somatória da energia eletrônica, que está associada ao movimento dos elétrons, o qual se baseia na teoria de aproximação de Bohr – Oppenheimer. A energia rotacional da molécula, que se fundamenta no movimento da molécula como um todo e no movimento da energia vibracional, está associada com a vibração constituinte dos átomos de uma molécula, que estão relacionadas pela equação 6.

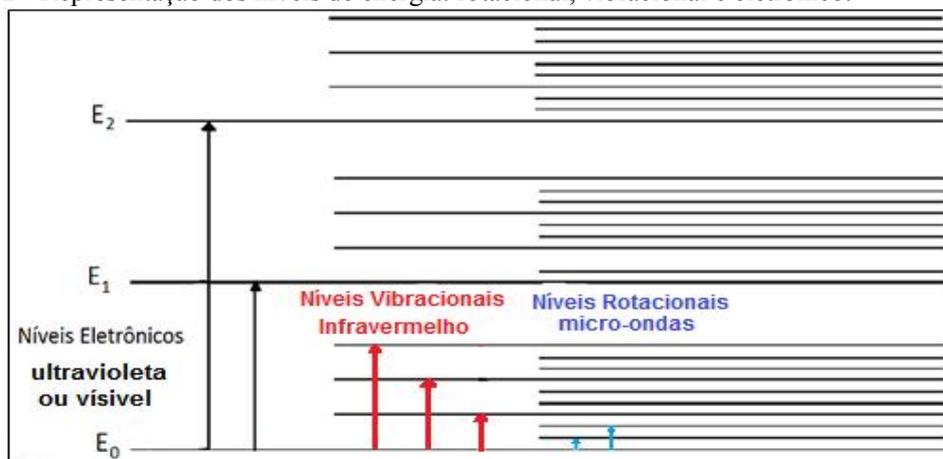
$$E_{total} = E_{elet} + E_{vib} + E_{rot} \quad (06)$$

Como se vê, a energia de translação não está inserida, pois não pertence à molécula (MOHAN, 2000; SALA, 2008).

A figura 12 mostra os níveis de energia eletrônica, vibracional e rotacional (MOHAN, 2000; SALA, 2008). Cada nível eletrônico dentro da molécula está associado ao número de níveis vibracionais e os níveis vibracionais estão associados ao conjunto de níveis rotacionais.

Essa ordem também indica que a energia eletrônica é maior que a vibracional e esta é maior que a rotacional:  $E_{\text{elet}} > E_{\text{vib}} > E_{\text{rot}}$ .

Figura 12 - Representação dos níveis de energia: rotacional, vibracional e eletrônico.



Fonte: Slideplayer (2016). Adaptada a parte da ideia da fonte citada. As setas de cor vermelha indicam os níveis vibracionais, as de cor azul representam os níveis rotacionais e a de cor preta representam os níveis eletrônicos.

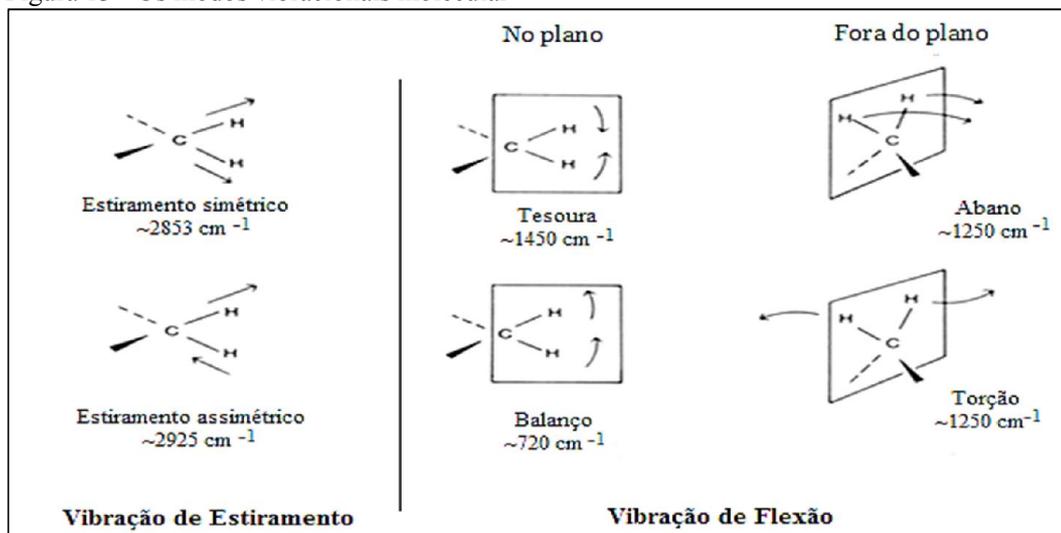
A energia da radiação infravermelha não motiva excitações dos níveis eletrônicos, e isso oferece maior probabilidade das transições entre os níveis de energia vibracional e a energia rotacional da molécula. Essas transições geram um espectro de absorção, que permite a correlação entre as posições de bandas do IR e as estruturas químicas na molécula (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1997; HELM et al., 1991; MAITY et al., 2013).

A radiação do infravermelho absorvida pela molécula diatômica provoca em sua ligação uma deformação decorrente das vibrações entre os átomos. Essas vibrações podem ser de estiramento ou de flexão. Na vibração de estiramento, as distâncias entre os átomos podem aumentar ou diminuir de duas formas - estiramento assimétrico ou simétrico. Os átomos em estiramento assimétrico ora se movem para dentro ora se movem para fora. De maneira diferente, no estiramento simétrico, os átomos se movem para fora ou para dentro simultaneamente, como está ilustrado na figura 13 (CHALMERS; GRIFFITHS, 2002; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A flexão ou deformação angular ocorre quando um átomo está entre dois outros. Este átomo permanece constante, mas os outros dois átomos têm a sua posição alterada do eixo que estavam ligados. Nessa lógica, podemos expor algumas deformações mais comuns, como a angular simétrica no plano (tesoura), a angular assimétrica no plano (balanço), a angular simétrica fora do plano (torção) e a angular assimétrica fora do plano (abano) (CHALMERS;

GRIFFITHS, 2002; HOLLAS, 2004; MOHAN, 2000; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE,2007). A figura 13 exhibe os dois tipos de vibrações mais comuns.

Figura 13 - Os modos vibracionais molecular



Fonte: Silverstein, Webster e Kiemle (2007). Adaptada a parte da idéia da fonte citada

Os graus de liberdade das moléculas correspondem ao grau de liberdade de seus átomos de forma individual, ou seja, ao se considerar o sistema cartesiano x, y, z para um átomo, este terá três graus de liberdade. Assim, a molécula com N átomos terá 3 vezes N grau de liberdade. No tocante às moléculas não lineares, devemos respeitar os movimentos de translação. A expressão matemática para esta situação é  $3N - 6$  graus de liberdade de vibração. Já para as moléculas lineares, a expressão é  $3N - 5$  graus de liberdade de vibração, pois, para descrever o movimento rotacional, é necessário somente dois graus de liberdade ou duas coordenadas (CHALMERS; GRIFFITHS, 2002; SALA, 2008; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A absorção da radiação infravermelha ocorre quando o momento dipolar elétrico oscilante ocasionado pela principal ligação entre os componentes orgânicos, a ligação covalente entre os átomos da molécula, esteja interagindo, predominantemente, com o campo elétrico da radiação (CHALMERS; GRIFFITHS, 2002). O momento de dipolo elétrico é definido como um movimento anarmônico elétrico da molécula, que é representado pela série de Taylor, conforme descrito na equação 07.

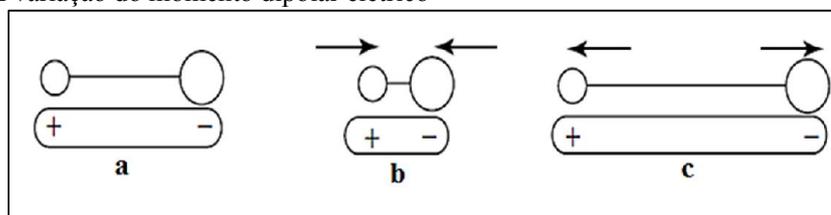
$$\mu(q) = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dq}\right)_0 q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d\mu^2}{dq^2}\right)_0 q^2 + \dots \quad (07)$$

Sendo  $q$  a coordenada interna,  $\mu_0$  é o vetor do momento do dipolo permanente e a derivada é a posição de equilíbrio.

A condição para que ocorra a interação da radiação IR com a molécula é que a derivada, que representa a posição de equilíbrio, seja diferente de zero  $[(d\mu/dq)_0 \neq 0]$ , ou melhor, na variação da posição de equilíbrio existirá movimento do momento dipolar elétrico. Os demais termos da série de Taylor podem ser desprezados (SALA, 2008).

Todo o processo da interação é quantizado. Se não ocorrer a variação do momento dipolar elétrico, não haverá absorção da radiação IR, conforme a figura 14. A figura (a) indica que não há variação do momento dipolar elétrico, uma vez que não há interação com a radiação infravermelha. Entretanto, (b) e (c) indicam a movimentação do momento dipolar elétrico, havendo dessa forma interação da radiação IR (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; STUARTS, 2004).

Figura 14 - A variação do momento dipolar elétrico

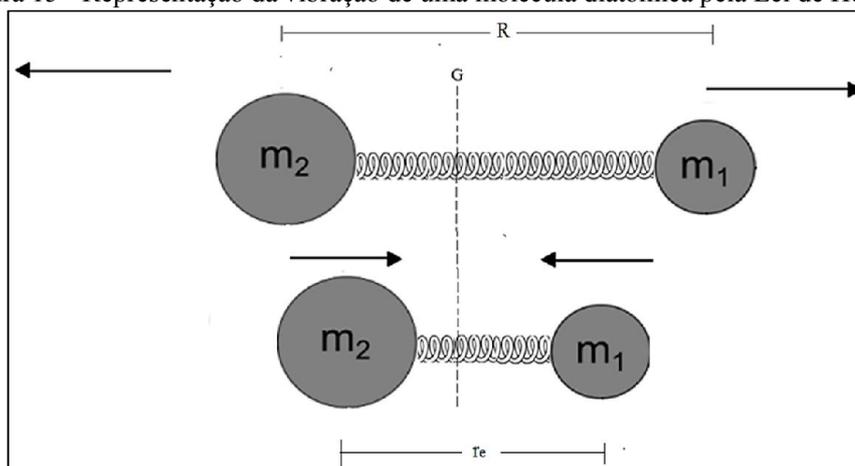


Fonte: Stuarts (2004).

A intensidade da absorção depende da diferença entre o momento dipolar elétrico no estado fundamental e o momento dipolar elétrico no estado excitado, quer dizer, as diferenças entre esses estados do momento dipolar elétrico aumentarão à medida que for maior a absorção (MOHAN, 2000; WARTEWIG, 2003).

Para os pequenos deslocamentos dos átomos da molécula diatômica, em relação a posição de equilíbrio em decorrência das vibrações, existirá uma força de restauração causando uma oscilação harmônica. Esta oscilação representa o modelo da equação de onda que é representado pela vibração da mola que obedece à lei de Hooke (CHALMERS; GRIFFITHS, 2002; MOHAN, 2000; SALA, 2008). A figura 15 demonstra esquematicamente, o deslocamento entre dois átomos de massas diferentes  $m_1$  e  $m_2$ .

Figura 15 - Representação da vibração de uma molécula diatômica pela Lei de Hooke



Fonte. Autor.

A equação 08 mostra a variação da posição de equilíbrio em função das coordenadas internas  $R$  e  $r_e$  de ligação entre os dois átomos ilustrados na figura 15.

$$q = R - r_e \quad (08)$$

Sendo o  $R$  a posição de deslocamento dos átomos,  $r_e$  a posição de equilíbrio entre os átomos e  $q$  a variação entre a posição de equilíbrio  $r_e$  e o deslocamento  $R$ , que é conhecida como coordenada interna.

Quando o  $R > r_e$  ou  $R < r_e$ , indicará que os dois átomos estão em vibração; por outro lado, quando tivermos  $R = 0$ , ou seja,  $R = r_e$ , indicará que os átomos estão na posição de equilíbrio. Dito de outro modo, não estão em vibrações que justifiquem a existência da coordenada interna  $q$ .

A equação que define esse movimento harmônico é a lei de Hooke, cuja formula é dada pela equação 09. A força  $F$ , responsável pelo deslocamento dos átomos do estado de equilíbrio, é proporcional à deflexão  $q$  entre os átomos; entretanto, isso não altera o centro de gravidade entre átomos no decorrer da vibração (HOLLAS, 2004).

$$F = -k q, \text{ sendo } q = q_0 \cos 2\pi \bar{\nu} t \quad (09)$$

Sendo  $k$  (dina/cm) a constante de força da ligação (o sinal negativo corresponde à força de restauração e é oposta ao deslocamento dos átomos),  $q_0$  a amplitude da deflexão dos átomos e  $\bar{\nu}$  a frequência da vibração do oscilador.

As vibrações da molécula diatômica em termos de frequências podem ser expressas por meio da equação 10. Logo, podemos calcular as frequências aproximadas das vibrações que ocorrem com as ligações entre os átomos (HOLLAS, 2004; SALA, 2008; STUARTS, 2004).

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (10)$$

Sendo  $c$  a velocidade da luz e  $\mu$  a massa reduzida que representa as massas dos átomos envolvidos na vibração.

A energia de vibração da molécula diatômica em cada nível vibracional é dada pela equação 11.

$$E_{vib} = h\nu_0 \left( n + \frac{1}{2} \right), \text{ para } n = 0, 1, 2, 3 \dots \quad (11)$$

Sendo que  $\nu_0$  é a frequência vibracional do estado fundamental da molécula e o  $n$  é o número quântico vibracional.

Para o  $n$  igual a zero, temos uma diferença importante entre a mecânica clássica e a mecânica quântica. Na teoria quântica, a energia vibracional no estado fundamental é a metade da energia que corresponde à mecânica clássica (CHALMERS; GRIFFITHS, 2002; MOHAN, 2000; SALA, 2008). A energia potencial da vibração (oscilador harmônico) é em função da deflexão da coordenada interna  $q$ , que pode ser verificada pela expressão da série de Taylor, dada pela equação 12.

$$V(q) = V_0 + \left( \frac{dV}{dq} \right)_0 q + \frac{1}{2!} \left( \frac{d^2V}{dq^2} \right)_0 q^2 + \dots \quad (12)$$

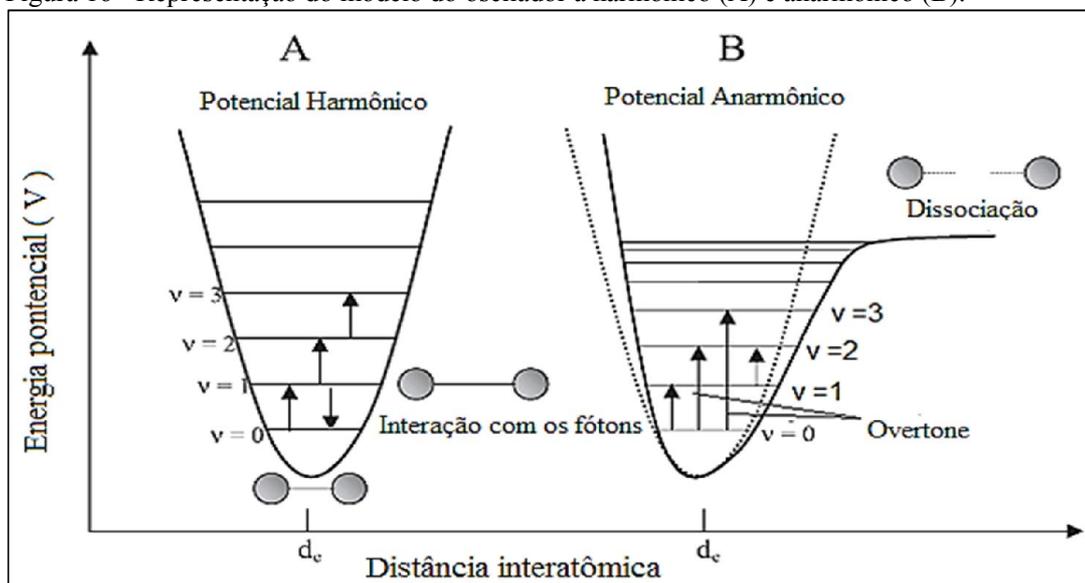
Sendo que  $V_0$  é o termo constante, dependendo do referencial adotado convenientemente considerado igual a zero, o segundo termo é a derivada da posição mínima da função potencial para um pequeno deslocamento mecânico dos átomos. Este deslocamento causa um pequeno potencial que pode ser desprezado. A derivada do terceiro termo descreve uma curva de potencial, ou seja, o movimento harmônico elétrico, que é representado como uma parábola. Isso pode ser representado na equação 13.

$$V(q) = \frac{1}{2!} \left( \frac{dV^2}{dq^2} \right)_0 q^2, \text{ sendo } K = \left( \frac{dV^2}{dq^2} \right)_0 \therefore V(q) = \frac{1}{2} K q^2 \quad (13)$$

A anarmonicidade (o movimento não harmônico) ocorre quando consideramos os termos de maiores ordens no desenvolvimento da equação de Taylor como  $\frac{1}{3!} \left( \frac{dV^3}{dq^3} \right)_0 q^3$ ,  $\frac{1}{4!} \left( \frac{dV^4}{dq^4} \right)_0 q^4 \dots$  (HOLLAS, 2004; TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994). A figura 18 retrata os dois tipos de osciladores, o harmônico e o anarmônico mecânico, para a energia potencial de uma molécula diatômica.

A figura 16 mostra a energia potencial em função da distância interatômica para uma molécula diatômica. A figura 16A reproduz o oscilador harmônico, representado por uma parábola, a partir da ordem da coordenada interna. Esta parábola indica uma aproximação da curva de potencial com a situação ideal de vibração. A energia potencial está em função da posição de equilíbrio (energia mínima) dos átomos. Nesse modelo, a energia de transição entre os níveis vibracionais é verificada no intervalo de número quântico de  $\pm 1$ . Além disso, para esse modelo, a diferença de energia entre os dois estados adjacentes é sempre o mesmo. A seta para cima designa transição de absorção e a seta para baixo indica a transição de emissão (PASQUINI, 2003; WARTEWIG, 2003, p. 27 - 30).

Figura 16 - Representação do modelo do oscilador harmônico (A) e anarmônico (B).



Fonte: Pasquini (2003).  $d_e$  é a distância de equilíbrio

Na Figura 16 B é mostrado o oscilador anarmônico, o qual é um modelo mecânico mais realista para a molécula diatômica. Ele ocorre quando as ligações químicas se dissociam em função do movimento rápido de afastamento e de aproximação entre os átomos. Nesse modelo, as distâncias entre os níveis de energia não são as mesmas. Sendo assim, para descrever a energia potencial do último efeito ou dissociação, utilizam-se os termos de ordem superiores da série de Taylor (WARTEWIG, 2003, p. 27 - 30).

As transições do estado fundamental para o estado excitado ( $\nu = 1$ ) são chamadas de transição fundamental. No entanto, as transições, que ocorrem do estado fundamental, mostrado na figura 16 B, para os estados excitados como  $\nu = 2$  e  $\nu = 3$ , assim por diante, são uma consequência da anarmonicidade chamada de overtones (WARTEWIG, 2003, p. 27 - 30).

Outro tipo de função de energia para molécula diatômica, que se aproxima do modelo anarmônico, é a função de Morse que está especificada na equação 14 (PASQUINI, 2003; WARTEWIG, 2003, p. 27 - 30).

$$V(q) = D_e(1 - e^{-(\beta q)})^2 \quad (14)$$

Sendo  $V(q)$  função o potencial elétrico,  $D_e$  a dissociação de energia da molécula e  $\beta$  a constante que descreve o grau de curvatura da curva.

No que diz respeito ao oscilador anarmônico, as transições, quando o número quântico varia entre  $\pm 1$ , apresentam maior probabilidade de ter intensidades mais elevadas em um espectro. Em contrapartida, as transições, quando o número quântico varia entre  $\pm 2$ ,  $\pm 3$ , possuem bandas espectrais de intensidades menores (HOLLAS, 2004, p. 142 - 147; PASQUINI, 2003).

#### 2.4.2 Espectrômetros

Os instrumentos utilizados para obtenção dos espectros de infravermelho são chamados espectrômetros, os quais são classificados em dispersivos e não dispersivos (FT - IR) (STUARTS, 2004).

Os espectrômetros dispersivos foram bastante utilizados na década 40 para obtenção dos espectros de infravermelho, porém tiveram um declínio na década de 60, quando surgiram

as novas tecnologias. Tais instrumentos consistem em dispersar a luz policromática em várias faixas de comprimento de onda, obtendo assim uma radiação monocromática. Este processo de obtenção da radiação monocromática é feito por meio de espelhos, fendas e elementos dispersivos, como, por exemplo, o prisma e grade de difração. Esses elementos organizados formam o monocromador. O feixe, que provém da radiação desses instrumentos, tem, em seu caminho ótico, a amostra que interage com ele. Uma parte do feixe é absorvida e a outra parte é transmitida, esta última segue até o detector, o qual tem a função de transformar a radiação infravermelha em sinais elétricos para serem amplificados e registrados por meio dos gráficos que são chamados de espectros (STUARTS, 2004).

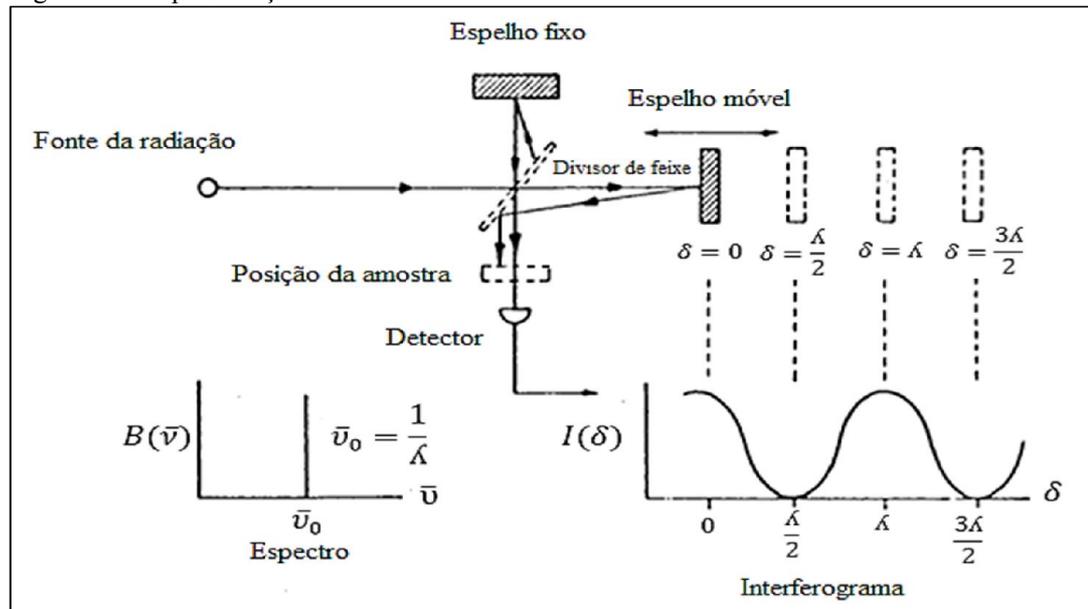
Os espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier (FT - IR) são instrumentos não dispersivos, que foram substituindo os instrumentos dispersivos por volta da década de 70, os quais predominam em pesquisas que envolvem a análise da radiação infravermelha, pois melhora, de forma significativa, a aquisição de espectros. Esses espectrômetros têm inúmeras vantagens sobre os espectrômetros dispersivos. Dentre essas vantagens, podemos destacar duas: a de Fellgett e a de Jacquinot (STUARTS, 2004).

As vantagens de Fellgett decorrem do fato de que as informações de todos os comprimentos de onda do feixe chegam ao detector simultaneamente ganhando muito tempo. Isso resulta em uma maior velocidade da varredura (“scans”), ou seja, o espelho móvel permite fazer varredura em torno de 0,2s para um espectro. Essas varreduras combinadas melhoram a relação entre sinal e ruído, o que possibilita garantir espectros de boa qualidade. Contrariamente, os instrumentos dispersivos permitem que apenas uma pequena faixa de frequência atinja o detector, ou seja, o maior tempo para fazer uma varredura de espectro nas mesmas condições é de, aproximadamente 3 min (STUARTS, 2004).

A vantagem de Jacquinot consiste no aumento da quantidade de energia que chega ao detector que é limitado somente pelo diâmetro do feixe proveniente da fonte de radiação, o qual é responsável pela resolução que tem a capacidade de distinguir vizinhanças de regiões espectrais. Isto acarreta uma combinação de varredura melhorando a relação sinal ruído. Diferentemente dos espectrômetros dispersivos, que a quantidade de energia e a resolução são determinadas pelas fendas e pelos elementos dispersivos do monocromador, o que aumenta a relação sinal ruído (STUARTS, 2004).

O FT - IR tem como estrutura básica a fonte, o interferômetro, a porta amostra, o detector, o amplificador, o conversor de analógico para digital e o computador. Este equipamento está fundamentado no princípio do interferômetro de Michelson, segundo indica a figura 17 (STUARTS, 2004).

Figura 17 - Representação do interferômetro de Michelson.



Fonte: Naumann (2000).  $B(\bar{\nu})$  é a fonte da intensidade,  $\bar{\nu}_0$  é o número de onda e  $\lambda$  é o comprimento de onda.

A fonte da radiação IR emite um feixe de radiação que segue direto para o interferômetro, este consiste em dois espelhos planos perpendiculares entre si, um espelho divisor de feixe que permite, teoricamente, dividir a radiação incidente em dois feixes iguais. Os 50% do feixe incidente são refletidos e seguem até o espelho fixo, os outros 50% são transmitidos e seguem até o espelho móvel. Os dois feixes tornam a ser refletidos por esses espelhos e retornam para se interferir no divisor de feixes (WARTEWIG, 2003)

Em outra análise, 50% do feixe proveniente do espelho fixo são transmitidos e atingem o detector, os outros 50% percorrem na direção da fonte. O feixe proveniente do espelho móvel tem caminho óptico diferente, isto é, sofre um retardamento em relação ao feixe do espelho fixo. Essa diferença de distância ou retardamento ( $\delta$ ) percorrida pelos feixes forma uma sequência de interferências entre eles (WARTEWIG, 2003)

O retardamento do feixe depende do movimento do espelho que pode ser definido como a distância percorrida de ida e volta pelo feixe transmitido do divisor feixe até o espelho móvel. A expressão matemática que define o retardamento está inserida na equação 15 (WARTEWIG, 2003).

$$\delta(t) = 2x = 2vt \quad (15)$$

Sendo  $x$  o deslocamento do espelho móvel,  $v$  a velocidade constante do espelho móvel e  $t$  o tempo.

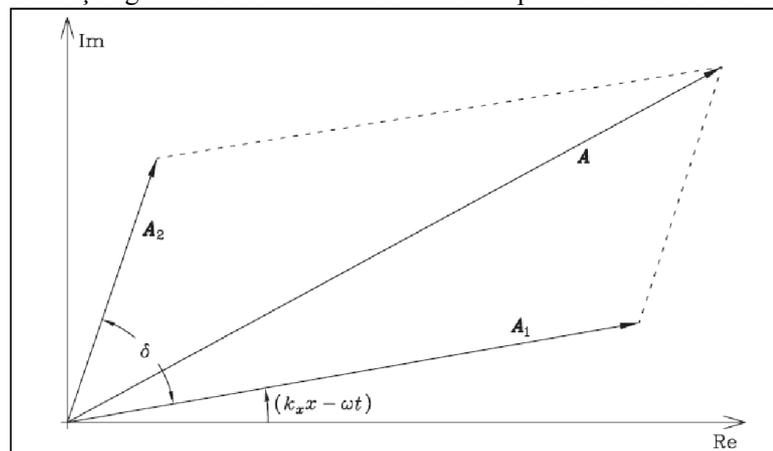
Um feixe monocromático tem intensidade do campo elétrico  $E$  dado pela equação 16:

$$E = Ae^{i(kr-\omega t)} \quad (16)$$

Sendo  $A$  a amplitude da onda,  $k$  o vetor onda,  $r$  a posição do vetor e  $\omega$  a frequência angular.

O princípio da interferência da onda ocorre quando a intensidade do campo  $E_1 = A_1e^{i(kr-\omega t)}$  e a intensidade do campo  $E_2 = A_2e^{i(kr-\omega t+\delta)}$ , ambas no mesmo sentido, são dadas pela resultante das amplitudes das suas ondas, consoante a figura 18 (KAUPPINEN; PARTANEN, 2001)

Figura 18 - Representação gráfica da somatória vetorial da amplitude de duas ondas do campo elétrico.



Fonte. Kauppinen; Partanen (2001). Sendo Im a parte imaginária, Re a parte real e A a resultante das amplitudes das ondas

A intensidade da energia eletromagnética é dada por área, ou seja, a intensidade  $I$  é proporcional ao quadrado da amplitude da onda  $A$ :

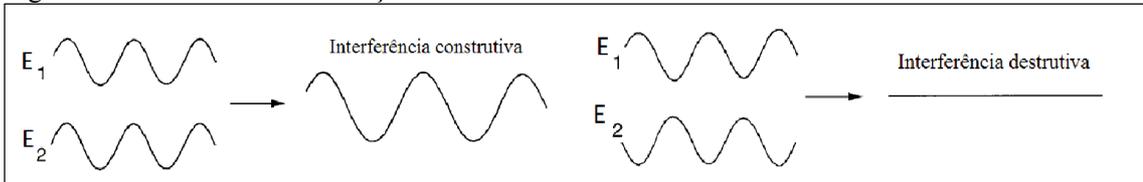
$$I \propto A^2 \quad (17)$$

Assim sendo, a amplitude resultante das intensidades dos campos  $E_1$  e  $E_2$  das ondas pode ser descrita pela lei dos cossenos:

$$A^2 = A_1^2 + A_2^2 + 2A_1A_2 \cos\delta \quad (18)$$

A interferência dos feixes é uma função do retardamento ótico ( $\delta$ ) e pode ser construtiva ou destrutiva, conforme mostrado na figura 19. A interferência construtiva ocorre quando as ondas estão em fase, ou seja,  $\delta$  é um múltiplo inteiro do comprimento de onda ( $0, \lambda, 2\lambda, 3\lambda\dots$ ). Para a interferência destrutiva, as ondas estão fora de fase quando  $\delta$  tem como fator multiplicador  $\frac{\lambda}{2}$  ( $\lambda/2, 3\lambda/2, 5\lambda/2, 7\lambda/2\dots$ ) (HOLLAS, 2004, p. 56).

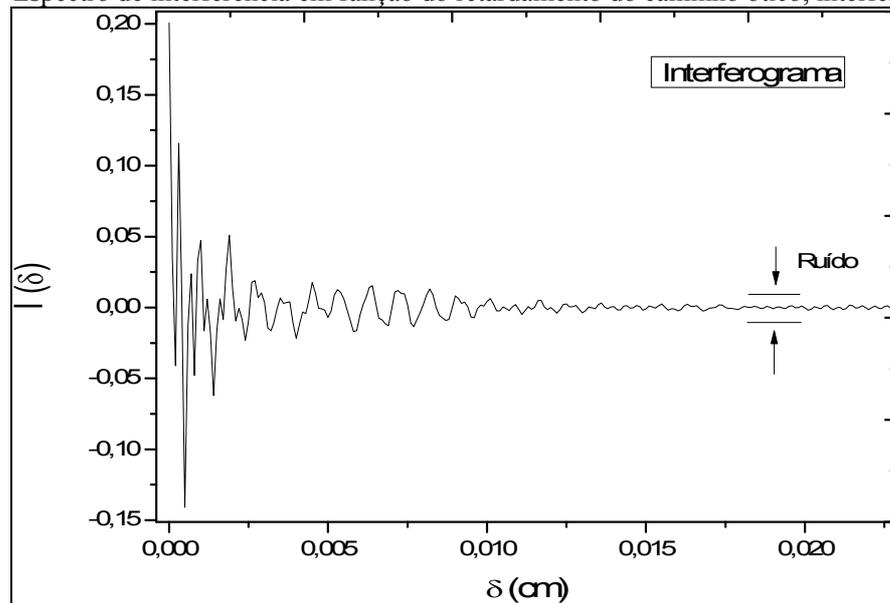
Figura 19 - Interferência da radiação construtiva e destrutiva



Fonte. Hollas (2004)

As interferências formam um espectro característico e aparentemente irregular chamado de interferograma, sendo a intensidade do sinal em função do retardamento ótico  $I$  ( $\delta$ ), como mostrado na figura 20.

Figura 20 - Espectro de interferência em função do retardamento do caminho ótico, interferograma



Fonte: Autor.

Para o  $\delta = 0$ , o sinal do interferograma é intenso porque todas as ondas estão em fase, todavia, com o aumento do deslocamento, as ondas tendem a ficar fora de fase, quer dizer, o

sinal tende a ser apenas ruído. Este interferograma é definido matematicamente pela equação 19 (HOLLAS, 2004, p.57-59).

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\bar{\nu}) \cos 2\pi \bar{\nu} \delta d\bar{\nu} \quad (19)$$

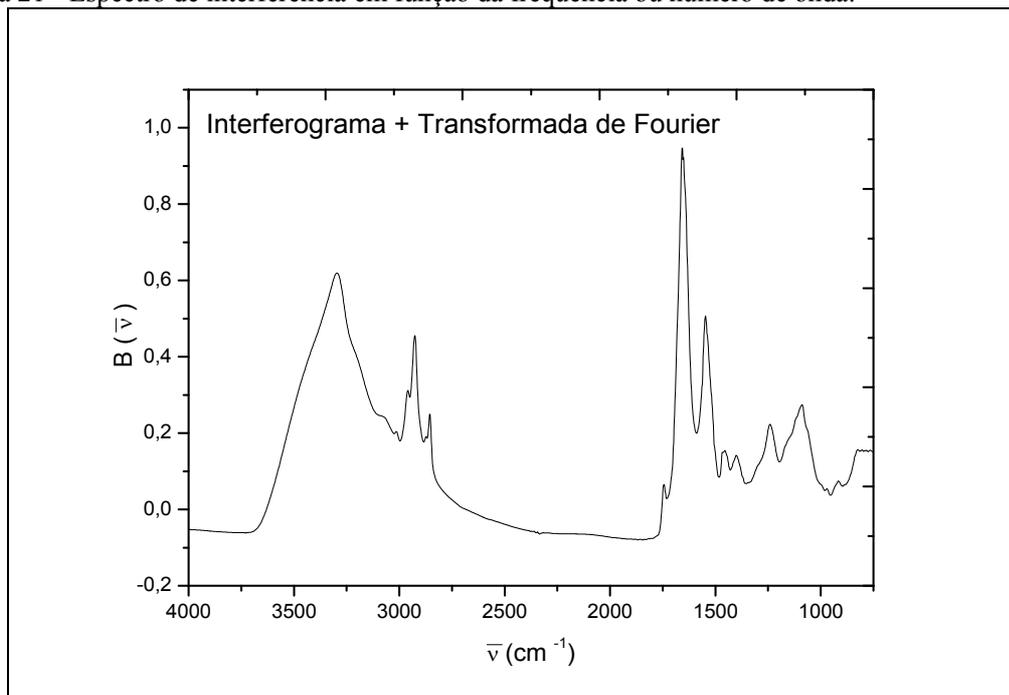
Sendo  $B(\bar{\nu})$  a intensidade da fonte da radiação.

O processo de conversão do interferograma para o domínio da frequência é feito pela equação 20. Esse procedimento de conversão exige operações matemáticas complexas (WARTEWIG, 2003).

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi \bar{\nu} \delta d\delta) \quad (20)$$

Essa equação evidencia a variação da intensidade da fonte de radiação em função do número de onda. A conversão do espectro da figura 20, após a transformação de Fourier, é detalhada na figura 21.

Figura 21 - Espectro de interferência em função da frequência ou número de onda.



Fonte: Autor.

Com base nesse espectro proveniente da IR absorvida, é possível fazer um detalhamento das principais regiões. A primeira (de  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $2800\text{ cm}^{-1}$ ), que representa vibração de estiramento do grupo funcional  $-\text{CH}_3$ ,  $>\text{CH}_2$ ,  $\equiv\text{CH}$ , usualmente, em amostras biológicas, contém componentes de ácidos graxos. A segunda (de  $1800\text{ cm}^{-1}$  a  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) denota a região de amida I e II, melhor dizendo, de proteínas. A terceira região (de  $1500\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ ) também apresenta informações relacionadas às proteínas e aos ácidos graxos. A quarta região espectral (correspondente à faixa de frequência de  $1200\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ ) indica a região de polissacarídeo. A última região (de  $900\text{ cm}^{-1}$  a  $700\text{ cm}^{-1}$ ) é caracterizada por apresentar uma “impressão digital do material”, ou seja, mostra alguns padrões espectrais extremamente específicos, que ainda não são atribuídos aos componentes celulares ou aos grupos funcionais. (HELM et al., 1991).

### 2.4.3 Fontes e detectores

As fontes de radiação infravermelha para o espectrômetro FT - IR são Nernst e Globar, as quais são constituídas, basicamente, por uma resistência elétrica. Essas resistências, ao serem percorridas por uma corrente elétrica, emitem radiação produzida por efeito Joule. O emissor de Nernst é uma mistura de óxido de zircônio e ítrio, chegando a temperatura de  $1500^{\circ}\text{C}$  a  $2000^{\circ}\text{C}$ . Enquanto o Globar é um composto sintetizado de carvão de silício, que chega a  $1500^{\circ}\text{C}$  a  $1700^{\circ}\text{C}$ . Portanto, a Globar é menos intensa que a fonte Nernst, porém é mais satisfatória acima de  $667\text{ cm}^{-1}$ , visto que a sua emissividade decai mais lentamente e é ideal para estudos de células e tecidos (STUARTS, 2004, p.19-20; TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994, p.59).

Os fotodetectores são elementos do espectrômetro FT – IR, que convertem a radiação IR em um sinal elétrico, que, posteriormente, é amplificado. A aquisição e/ou o processamento matemático dos dados são feitos via computador. Os detectores mais utilizados na região do infravermelho médio são o DTGS (Deuterated Triglycine Sulfate) e o MCT (Mercury Cadmium Telluride). O detector DTGS opera em temperatura ambiente, é de fácil utilização e tem boa sensibilidade. O detector MCT, por sua vez, é resfriado com nitrogênio líquido, sendo 4 a 10 vezes mais sensível, mais rápido e produz menos ruído no sinal quando comparado ao DTGS (STUARTS, 2004, p. 19 - 20; TWARDOWSKI; ANZENBACHER, 1994, p. 59).

#### 2.4.4 Análise de dados

Os métodos estatísticos mais utilizados na análise de dados espectrais são os métodos estatísticos multivariados e o ajuste de curva. Os métodos estatísticos multivariados utilizados para fazer a análise dos dados fazem uso da análise de cluster hierárquico, a qual é normalmente utilizada para diferenciação e classificação de micro-organismos (DAVIS; MAUER, 2010). Para realizar a análise de cluster hierárquico, utilizou-se o algoritmo de Ward, que também é conhecido como método da mínima variância. Este método foi desenvolvido por Joe. H. Ward Jr (WARD, 1963), o qual está fundamentado no agrupamento por similaridade entre grupos (cluster). O objetivo é minimizar a soma dos quadrados das distâncias euclidianas dentro dos grupos.

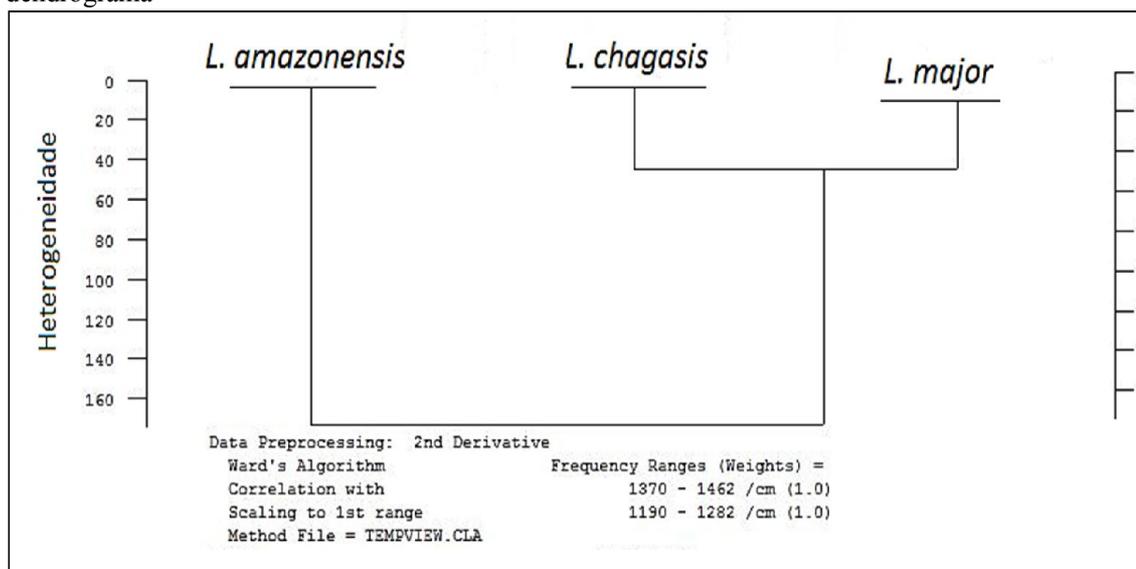
Os dados dos espectros de infravermelho são analisados pelo algoritmo de Ward, que permite identificar as semelhanças entre os espectros dos micro-organismos utilizando as distâncias entre os espectros e algoritmos de agregação. O algoritmo de Ward representa graficamente a classificação de micro-organismos por meio do dendrograma, possibilitando a visualização bem definida de grupos. Este algoritmo é definido pela equação 21 (DZUBA et al., 2007; HAIR et al., 1998; SANDT et al., 2006).

$$ESS_g = \sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{1}{n} \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \quad (21)$$

Sendo ESS a soma dos erros de quadrados, o índice g o agrupamento dos elementos, n o número total de objetos do agrupamento g e  $x_i$  o i-ésimo objeto do agrupamento k.

O dendrograma é um diagrama que tem a forma de uma árvore usada frequentemente para mostrar os agrupamentos por meio da similaridade dos elementos ou objetos decorrentes do método hierárquico de cluster (DZUBA et al., 2007; HAIR et al., 1998; SANDT et al., 2006). Um exemplo da análise cluster são os grupos de Leishmania, representados pelo dendrograma ilustrado na figura 22.

Figura 22 - Exemplo da análise de Cluster das espécies de Leishmania representadas pelo dendrograma



Fonte: Autor.

O método de ajuste de curva é usado para decompor a área das bandas dos espectros em cada subárea, objetivando quantificar os componentes constituintes na banda. Com base nesse conceito, foi utilizada a ferramenta estatística *qui* quadrado ( $X^2$ ) e o  $R^2$  ajustado. O *qui* quadrado ( $X^2$ ) serve para fazer inferência estatística que nos reporta a teste de hipóteses em que duas variáveis categorizadas são independentes. O quantitativo de  $X^2$  tem distribuição de probabilidade definida, de acordo com a equação 22 (MORETTIN, 2000).

$$f(X^2) = \frac{1}{2^{a/2} \Gamma(a/2)} e^{-x^2/2} X^{(a/2)-1} \quad (22)$$

Sendo  $X^2$  o qui quadrado,  $a$  o grau de liberdade e  $\Gamma$  a função gama.

Essa equação define uma curva e a área sob esta curva determinando assim a probabilidade de ocorrer o evento. A distribuição  $X^2$  depende do grau de liberdade  $a$ , que número inteiro. O grau de liberdade dos dados indica que quanto maior for este grau, maior será a simetria por meio das gaussianas da região delimitada.

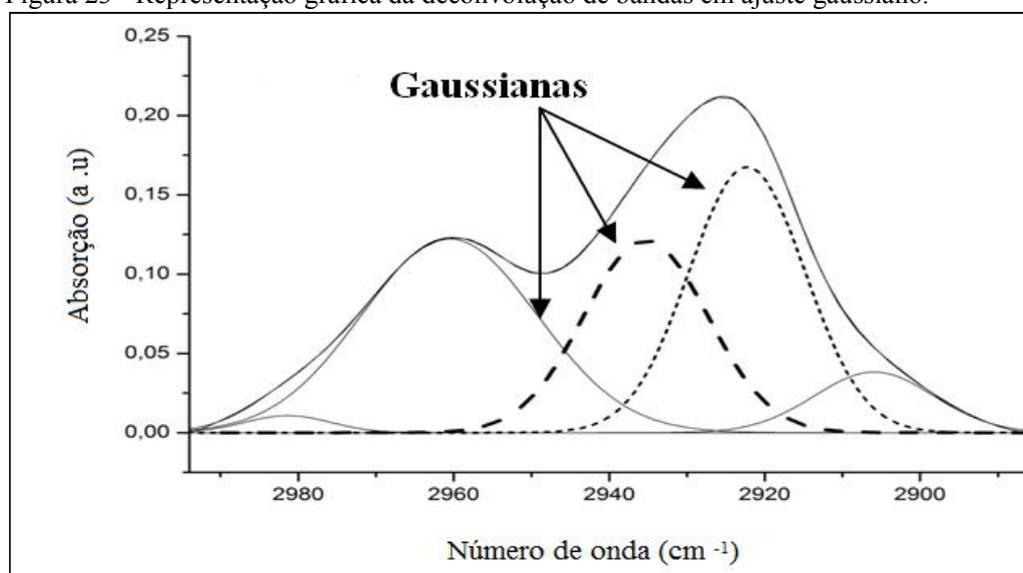
O  $R^2$  ajustado permite explorar e inferir uma relação entre duas ou mais variáveis dependentes (representadas pelo eixo Y) com variáveis independentes (representadas pelo eixo x), ou seja, ajusta o valor estatístico com base no número de variáveis independentes do modelo. A equação 23 descreve a relação entre duas ou mais variáveis (KENNEDY, 2008; SOUZA, 1998).

$$R^2_{ajustado} = 1 - \frac{n - 1}{n - (k + 1)} (1 - r^2), \text{ onde } r^2 = \frac{t[20] - [20]}{t[20]} \quad (23)$$

Sendo que o  $n$  representa o número de elementos, o  $k$  representa as variáveis independentes, o  $r^2$  é o coeficiente de determinação e  $[20]$  e  $t[20]$  são as relações de funcionais de Ward.

O coeficiente de determinação está diretamente associado a qualidade do ajuste, ou seja, quanto maior o coeficiente de determinação calculado significa melhor a qualidade do modelo ajustado (SOUZA, 1998). Neste sentido, a eq.23 determina a menor distância entre os pontos e a curva, por outra forma, nos mostra a curva que melhor se ajusta aos números de pontos. Um exemplo do ajuste de curva está exposto na figura 23.

Figura 23 - Representação gráfica da deconvolução de bandas em ajuste gaussiano.



Fonte. Autor.

A região delimitada para fazer a análise estatística acima mencionada é uma região do espectro. Nestas regiões é possível fazer a decomposição ou deconvolução da sua área em subáreas. Para fazer este procedimento, temos como suporte a segunda derivada desta região espectral que produz uma melhor resolução dos espectros, o que facilita a localização adequada das bandas que servem de parâmetros para realizar a deconvolução da região espectral. Essa deconvolução é representada pelas gaussianas e suas respectivas áreas representam as contribuições bioquímicas de cada região espectral. Assim, podemos obter informações estruturais capazes de identificar os grupos funcionais. Frise-se que, por meio do

ajuste de curva, podemos expressar as diferenças entre as espécies (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1997; HELM et al., 1991; MAITY et al., 2013).

### 3 METODOLOGIA

Neste capítulo, serão mostrados de onde as cepas foram adquiridas, como foram identificadas, os procedimentos de cultura dos parasitos, metodologia de preparação da amostra para o FT-IR e a forma como os dados foram analisados.

#### 3.1 Leishmania

Foram utilizadas no estudo as espécies *Leishmania braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2904), *Leishmania chagasi* (cepa MHOM/BR/1974/PP75), *L. major* (cepa MHOM/SU/1973/5 - ASKH) e *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/73 M2269). As cepas foram isoladas de pacientes com lesões ulceradas localizadas e identificadas por PCR. (MIRANDA et al., 2014). A faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ /UNESP), do campus de Botucatu - Brasil, forneceu as cepas. A forma promastigota foi cultivada em meio M199, pH 7,4, suplementado com 10 % de soro bovino fetal, 2 % de urina, 10U/ml de penicilina, 10 µg/ml estreptomicina, 0,25 % de hemina, 0.1 % biotina, 10µM adenina, 1M hepes, e mantida a 26 °C. Os repiques das subculturas para a manutenção dos promastigotas foram realizados semanalmente.

#### 3.2 Trypanosoma

Em relação ao *Trypanosoma rangeli* (Cepa SC - 58) e ao *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y), os procedimentos foram executados da seguinte forma: a cepa SC - 58 foi isolada do roedor da família Echimyidae, caracterizada por transmissão experimental e desenvolvida em hospedeiro invertebrado e vertebrados, com a morfometria de tripomastigotas, a cultura e as formas de glândulas salivares, a proteção cruzada, a susceptibilidade de complemento da cobaia, inclusive o humano, a aglutinação de lectina e o perfil de isoenzima; e a cepa Y foi isolada de humanos e identificada por PCR (STEINDEL et al., 1993). As cepas foram fornecidas pelo Dr. Mário Steindel da Universidade Federal de Santa Catarina – Brasil.

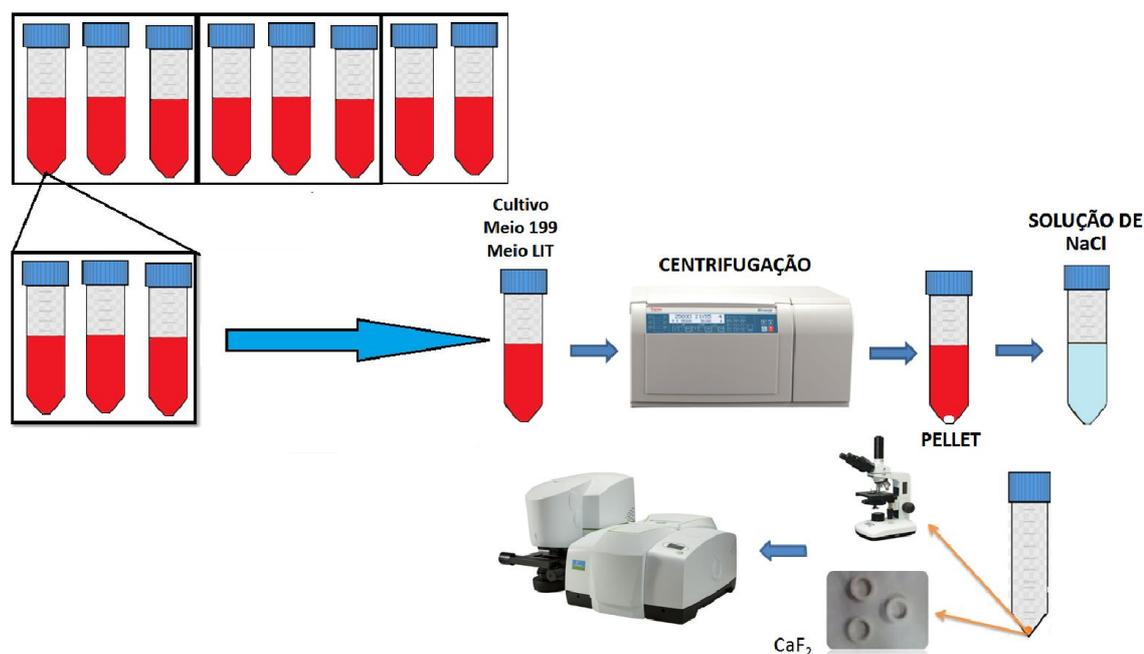
Esses parasitos em estágio epimastigota foram cultivados no meio LIT e suplementado com 10% soro fetal bovino, 2 % de urina, 10U/ml de penicilina, 10 U/ml estreptomicina, 0.25 % de hemina, pH 7,4 e mantida em 26 °C. Os repiques das subculturas para a manutenção dos epimastigotas foram realizados semanalmente.

### 3.3 A preparação da amostra

Para realização da análise pelo FT - IR, a preparação da amostra é de suma importância. Primeiramente, para cada amostra foram feitas oitoplicasatas para realizar este experimento. Em cada turbo de 20 ml desta oitoplicasatas foram feitos três novos turbos de 20 ml e para cada turbo desses três turbos foi necessário remover o meio de cultura, pois é riquíssimo em proteínas, lipídios e aminoácidos e podem causar forte influência nos resultados, dificultando a sua interpretação. No processo de remoção do meio, a membrana de parasitos pode ser danificada e as organelas podem ser levadas para fora. Neste âmbito, um protocolo de limpeza foi elaborado e permitiu remover o meio de cultura de todas as espécies e manter a integridade dos parasitos. Assim, tubos com 20 ml de meio de cultura foram centrifugados a 3500 rpm (uma força de 2300G) durante 10 min, levando a formação de um pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 15 ml de solução de NaCl a 0,2 %. O processo foi repetido por três vezes, obtendo um pellet sem meio de cultura.

Após a obtenção deste pellet a integridade destes parasitos foi verificada por meio do microscópio ótico. O protocolo assegurou a limpeza e a integridade dos parasitos de todas as amostras. Na figura 24 mostra de forma ilustrativa a preparação das amostras de cada espécie referente aos parasitos do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*.

Figura 24 - Ilustração do protocolo de preparação da amostra até a obtenção do espectro



Fonte: Autor

### 3.4 FT - IR espectroscopia e análise estatística

Após o procedimento de limpeza, uma gota de 10  $\mu\text{l}$  de cada amostra foi depositada em janelas de fluoreto de Cálcio ( $\text{CaF}_2$ , transparente na região do infravermelho médio). As amostras foram desidratadas utilizando um liofilizador (Eppendorf Concentrator), as quais permitiram a formação de um filme fino das espécies de *Leishmania* e de *trypanosoma*.

Os espectros de IR foram obtidos em 22 pontos (ou 22 espectros) coletados aleatoriamente [em coordenada (x, y)] de cada amostra, o que foi realizado a partir da observação da banda centrada  $1650\text{ cm}^{-1}$  e dos valores de absorbância que ficaram em torno de 0,9 a 1,0 unidade de absorbância. Por isso, podemos afirmar que os pontos coletados de cada amostra da superfície dos filmes finos sobre as janelas de  $\text{CaF}_2$  têm aproximadamente a mesma espessura.

O espectrofotômetro FT - IR utilizado para a aquisição dos espectros foi o Spectrum 400 de versão 3.6.2, acoplado a um microscópio (Spotlight Perkin Elmer 400, EUA) e controlado por um computador com software Spotlight 400. A obtenção dos espectros, que estão na faixa de frequência entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  e  $750\text{ cm}^{-1}$ , foi feita pelo modo de transmissão com um tempo de varredura espectral de 0,2 s,  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolução e uma média de 64 pontos espectrais da amostra.

A análise estatística multivariada e o ajuste de curvas foram o processo utilizado para analisar os espectros. Primeiramente, foi feita a análise hierárquica de cluster representada pelo dendrograma que expressa a heterogeneidade entre os parasitos. Para esse procedimento foi utilizado o software OPUS versão 4.2, com os seguintes parâmetros: a segunda derivada, suavização da curva em 9 pontos, algoritmo de Ward's e o método de intervalo de primeira ordem (scaling to first range), o qual calcula a distância espectral separadamente para regiões espectrais de separação usando coeficientes de correlação (WERNECK, 2008).

A segunda análise foi o método de ajuste de curva, que tem como base a deconvolução de bandas por meio de curvas gaussianas. As áreas dessas gaussianas representam as contribuições bioquímicas de cada região espectral (KONG; YU, 2007). Portanto, o ajuste de curva permitiu quantificar bioquimicamente as diferenças entre as espécies. O software usado para este procedimento foi o Origin Pro versão 8.5.

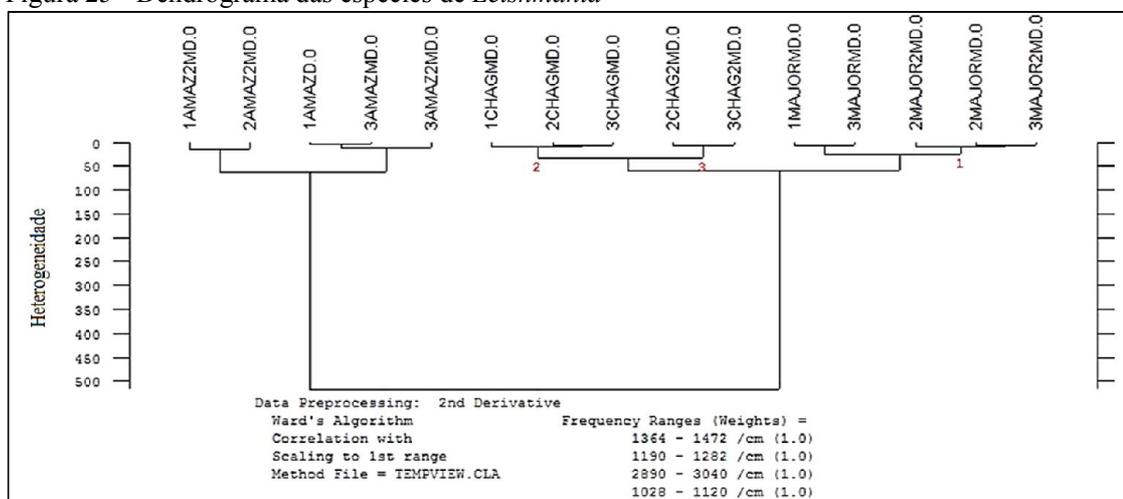
## 4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em tópicos, conforme as duas publicações dispostas nesta tese. O subtítulo 4.1 e a sua discussão descrita no subtítulo 5.1 já foram publicados como relata o anexo A. Já os subtítulos 4.2 e 4.3 e a suas discussões descritas nos subtítulos 5.2 e 5.3 respectivamente estão submetidos, em conformidade com os anexos B e C desta pesquisa.

### 4.1 Resultados alusivos às espécies de *L. major*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*

O dendrograma da figura 25 mostra os resultados da análise de cluster, utilizando médias espectrais das amostras de *Leishmania* feitas em quintuplicatas, sendo elas: a) 1AMAZ2MD, 2AMAZ2MD, 1AMAZD, 3AMAZMD e 3AMAZ2MD, representando as espécies da *L. amazonensis*; b) 1CHAGMD, 2CHAGMD, 3CHAGMD, 2CHAG2 e 3CHAG2MD, representando as espécies de *L. chagasi*; e c) 1MAJORMD, 3MAJORMD, 2MAJOR2MD, 2MAJORMD e 3MAJOR2MD, representando as espécies de *L. major*. Os resultados das análises mostram uma evidente heterogeneidade entre as espécies de *Leishmania*. As espécies de *L. major* e *L. chagasi* apresentaram menor heterogeneidade entre si e a espécie de *L. amazonensis* indicou uma maior heterogeneidade quando comparada as outras duas espécies. Essa heterogeneidade está relacionada à sua filogenética, que está fortemente correlacionada com sua origem geográfica. (ZEMANOVA et al., 2007).

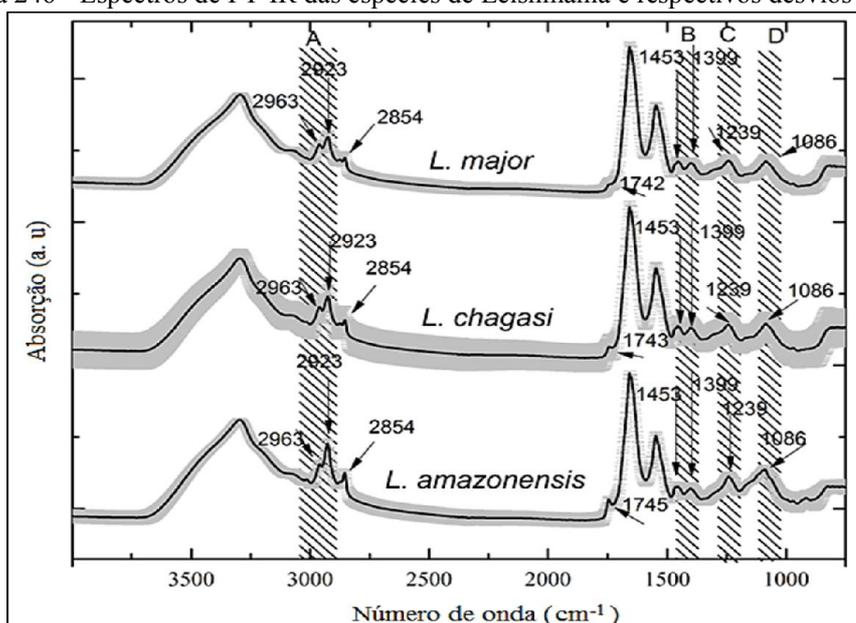
Figura 25 - Dendrograma das espécies de *Leishmania*



Fonte: Autor. A análise de cluster usou a segunda derivada para agrupar as espécies por similaridade. As regiões de separação ficaram entre 2890  $\text{cm}^{-1}$  a 3040  $\text{cm}^{-1}$ , 1364  $\text{cm}^{-1}$  a 1472  $\text{cm}^{-1}$ , 1190  $\text{cm}^{-1}$  a 1282  $\text{cm}^{-1}$  e 1028  $\text{cm}^{-1}$  a 1120  $\text{cm}^{-1}$ .

A figura 26 exhibe a média dos espectros de infravermelho das espécies de *L. major*, *L. chagasi* e *L. amazonensis* com seus respectivos desvios padrão (cor cinza). Os melhores resultados de análise de agrupamento, que permitem a diferenciação destas três espécies de *Leishmania*, foram encontrados utilizando as regiões espectrais indicadas por: A (2890  $\text{cm}^{-1}$  a 3040  $\text{cm}^{-1}$ ); B (1364  $\text{cm}^{-1}$  a 1472  $\text{cm}^{-1}$ ); C (1190  $\text{cm}^{-1}$  a 1282  $\text{cm}^{-1}$ ); e D (1028  $\text{cm}^{-1}$  a 1120  $\text{cm}^{-1}$ ).

Figura 246 - Espectros de FT-IR das espécies de *Leishmania* e respectivos desvios padrão.



Fonte: Autor. (2014). As letras A, B, C e D representam as principais regiões de separação.

As bandas de absorção de ácidos graxos estão representadas pela região A, a qual indica a diferença de intensidade nas bandas 2923  $\text{cm}^{-1}$  e 2963  $\text{cm}^{-1}$ , sendo a primeira atribuída a estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$  e a segunda 2963  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a ligação de C-H de estiramento assimétrico de  $\text{CH}_3$ . Ambas com características de ácidos graxos (MAQUELIN et al., 2002; NAUMANN, 2000).

Na região B pode – se citar as bandas de absorção de lipídios e proteínas. Nesta região, existem duas principais bandas: a banda em 1399  $\text{cm}^{-1}$ , devido ao estiramento de C = O de ligação de  $\text{COO}^-$ , que está associada aos aminoácidos e aos ácidos graxos; e a banda em 1453  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída a vibração tipo tesoura de  $\delta(\text{CH}_3)$  e  $\delta(\text{CH}_2)$  associada aos lipídios (BEEKES; LASCH; NAUMANN, 2007; DAVIS; MAUER, 2010; MAQUELIN et al., 2002; WANG et al., 2010).

A região C representa a banda de amida III, sendo o principal componente de proteínas. No que concerne ainda a essa região, observou-se uma pequena diferença de intensidade em relação à banda  $1239\text{ cm}^{-1}$

A região D representa as bandas de absorção de polissacarídeos e inclui uma banda em  $1086\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a  $\text{P} = \text{O}$  de estiramento simétrico de  $> \text{PO}_2^-$  em ácido nucleico. Uma pequena diferença entre as intensidades deste grupo funcional fosfodiéster de DNA / RNA é observada nos espectros (NAUMANN, 2000).

A tabela 1 expõe as contribuições de bandas espectrais do FT - IR das espécies de *Leishmania*, usando a segunda derivada ( $2^{\text{o}}$ d) e aos valores de áreas das gaussianas (GF). O parâmetro estatístico utilizado foi  $R^2$ , ajustado em 0,999 para todas as regiões.

Tabela 1 - Atribuições de bandas encontradas nos espectros da *Leishmania* em FT - IR

<i>L. amazonensis</i>			<i>L. chagasi</i>			<i>L. major</i>			Atribuições *
$2^{\text{o}}$ d	GF - %		$2^{\text{o}}$ d	GF - %		$2^{\text{o}}$ d	GF - %		
3496	3512	----	3496	3530	----	3496	3509	----	$\nu$ de O-H de grupo hidroxilo (BEEKES et al., 2007; COLTHUP et al., 1997)
3434	3427	12,7	3434	3423	14	3434	3433	8,7	$\nu$ (N-H) de amida A (SPENCE, 2012)
3352	3352	27	3352	3357	19,8	3352	3341	41,4	$\nu$ (N-H) de amida B (SPENCE, 2012)
~3285	3291	23,7	3285	3291	39,5	3285	3286	17,6	$\nu$ de (N-H) (amida A) (BARTH, 2007)
3193	3218	31,1	3193	3208	21,4	3193	3223	20,6	$\nu_s$ N-H (amida A) de proteína (MAQUELIN et al., 2002)
3089	3125	1,5	3089	3126	2,4	3089	3169	8,4	Cadeia de ácido graxo (NAUMANN, 2000)
3062	3069	3,4	3062	3068	2,6	3062	3068	2,9	Ácido graxo (DAVIS; MAUER, 2010; NAUMANN, 2000)
3012	3013	0,2	3014	2756	---	3014	3015	0,03	$\nu$ de = C-H de cadeia de ácido graxo insaturada (NAUMANN, 2000)
2985	-----	-----	2985	2983	0,14	2985	3042	-----	Ácido graxo (SCHMITT; FLEMMING, 1998)
2962	2959	23,8	2962	2961	25,2	2962	2961	28,7	$\nu$ de C-H (as) de $> \text{CH}_3$ em ácido graxo (NAUMANN, 2000; SARAVIA et al., 1989)
2925	2926	46,2	2923	2926	46,9	2923	2925	44,5	$\nu$ de C-H de vibração de ácido graxo de $> \text{CH}_2$ (MAQUELIN et al., 2002)
2897	2900	5,7	2897	2899	2,9	2897	2899	3,1	$\nu$ de C-H de $\rightarrow$ C-H de aminoácidos (DAVIS; MAUER, 2010)
2874	2870	16,7	2874	2872	18,1	2874	2873	18,2	$\nu$ de C-H (s) de $-\text{CH}_3$ (MAQUELIN et al., 2002)
2854	2854	7,3	2854	2853	5,8	2854	2853	5,3	$\nu$ de C-H (s) de $> \text{CH}_2$ em ácido graxo (MAQUELIN et al., 2002)
1467	1468	7,6	1467	1468	4,5	1467	1469	6,6	C-H de $> \text{CH}_2$ (BEEKES et al., 2007; MAQUELIN et al., 2002)

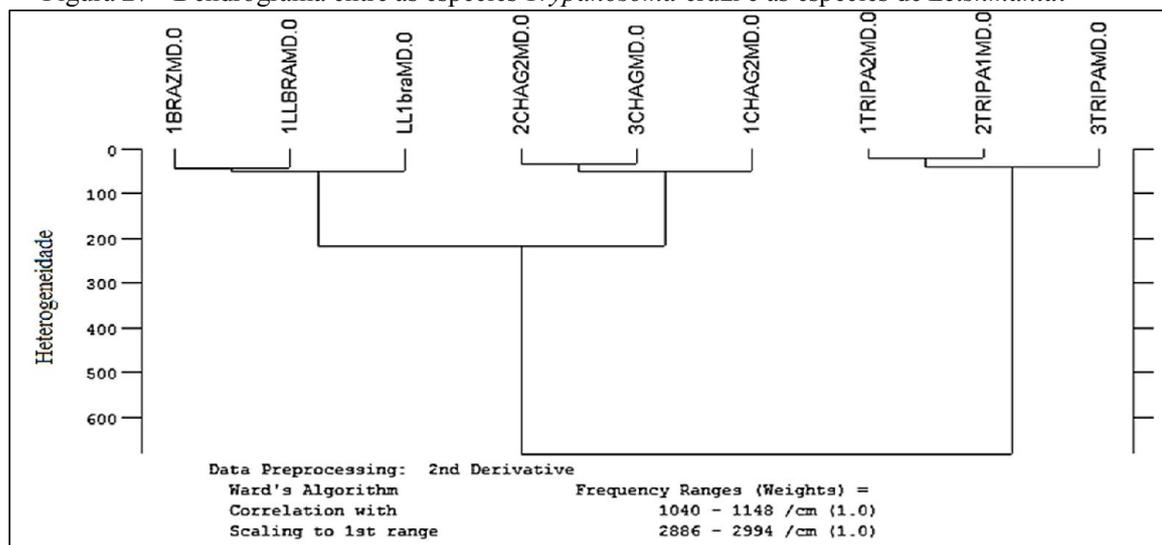
1453	1456	25,9	1453	1454	27,4	1453	1457	18,4	$\delta(\text{CH}_3)$ e $(\text{CH}_2)$ tipo tesoura de lipídios e proteínas (WANG et al., 2010)
1443	1442	10	1443	1441	17,5	1443	1443	18,4	$\text{CH}_2$ de vibração de flexão (HELM et al., 1991; KAMNEV et al., 2006)
1413	1417	19,2	1414	1413	11,7	1414	1416	17,6	$\nu_s(\text{CH}_3)$ de lipídios e aromáticos (WANG et al., 2010)
1401	1396	32,2	1401	1401	14,2	1401	1400	18,2	$\nu$ de $\text{C}=\text{O}$ (s) de $\text{COO}^-$ (BEEKES et al., 2007; MAQUELIN et al., 2002)
1380	1379	3,9	1387	1387	22,8	1387	1385	19	$\delta(\text{CH}_3)$ (BARTH, 2007)
1367	1368	0,8	1368	1368	1,5	1368	1368	1,4	$\nu$ de $\text{COO}^-$ e flexão (s) de $\text{CH}_3$ em proteínas e lipídios (WANG et al., 2010)
1313	1316	0,9	1314	1311	5,7	1314	1312	3,6	Amida III. $\delta(\text{CH})$ (BARTH, 2007; NAUMANN, 2000)
1298	1303	4,5							Amida II, $(\text{C}-\text{N})$ (SCHMITT; FLEMMING, 1998)
1282	1274	27,6	1282	1283	29,4	1282	1283	32,1	Amida II (NAUMANN, 2000)
			1266	1258	12,8	1266	1257	3,2	Amida III, $\alpha$ – helix (WANG et al., 2010)
1242	1240	60,5	1239	1238	46,2	1239	1237	60,6	Amida III, componentes de proteínas (MAQUELIN et al., 2002)
1221	1219	6,5							C-O-C e C-O, polissacáridos (DAVIS; MAUER, 2010)
			1206	1216	5,6	1206	1210	0,2	Triptofano, $\nu_s$ de $(\text{CC})$ (BARTH, 2007)
1172	1172	2,3	1172	1172	1,1	1172	1171	1,1	Polissacáridos (NAUMANN, 2000)
1153	1154	8,9	1151	1152	7,7	1152	1152	6,5	Polissacáridos (NAUMANN, 2000)
1119	1119	29,6	1119	1110	26,2	1119	1119	14,4	Polissacáridos (NAUMANN, 2000)
1101	1104	5,6	1102	1096	7,3	1102	1102	9,2	$\nu_s$ de $(\text{PO}_2^-)$ em ácido nucleico (WANG et al., 2010)
1086	1086	25,5	1086	1084	13,2	1085	1085	22,7	$\nu$ de $\text{P}=\text{O}$ (s) de $>\text{PO}_2^-$ , em DNA, RNA e fosfolipídios (BEEKES et al., 2007; DAVIS; MAUER, 2010)
			1068	1072	9	1068	1068	6,4	C-O-C e C-O, polissacáridos (DAVIS; MAUER, 2010)
1058	1058	19,2	1057	1059	15,7	1057	1058	23,2	Vibração de flexão no plano de C – H aromático (WAHAB, 2011)
1039	1041	0,9	1034	1040	10,9	1034	1034	7,1	C–O–C do anel de polissacarídeos (NAUMANN, 2000)
1030	1031	4,7							Serina, $\nu_s$ de $(\text{C} - \text{O})$ (BARTH, 2007)
1010	1011	0,7	1009	1019	6,5	1009	1009	7,2	Triptofano, $\nu_s$ de $(\text{CC}), \delta$ de $(\text{CH})$ (BARTH, 2007)
994	996	1,1	1000	1001	0,4	1000	998	----	C–O–C e C–O, carboidrato. $\nu_s$ de $\text{PO}_2^-$ em ácidos nucleico (ALVAREZ-ORDONEZ; PRIETO, 2010; NAUMANN, 2000)
969	969	0,9	968	968	1,5	968	968	1,7	C–C e C–O vibração de em desoxirribose (AHMED, 2009)

Fonte: Autor. O s = simétrica; as = antissimétrico; v = vibração de estiramento;  $v_s$  = vibração de estiramento simétrico;  $\bar{\delta}$  = vibração de flexão no plano. O parâmetro estatístico foi  $R^2$ , ajustado em 0,999 para todas as Gaussianas.

#### 4.2 Resultados relacionados às espécies de *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *T. cruzi*

O dendrograma da figura 27 feito por meio das médias dos espectros das espécies de *Leishmania* em quintuplicadas, sendo elas: a) 1BRAZMD, 1LLBRAMD e LL1braMD, representando as espécies de *L. braziliensis*; b) 1CHAG2MD, 2CHAG2MD e 3CHAGMD, representando as espécies de *L. chagasi*; e c) 1TRIPA2MD, 2TRIPA1MD e 3TRIPAMD, representando as espécies de *T. cruzi*. Os resultados das análises mostram uma heterogeneidade entre a espécie de *T. cruzi* e as espécies de *Leishmania* ao mostrar dois ramos, um para as espécies de *Leishmania* e outro para as espécies de *T. cruzi*. As espécies de *T. cruzi* registrou aproximadamente uma heterogeneidade de 700 relativos às duas espécies de *Leishmania*. Em se tratando somente das espécies de *Leishmania*, a *L. chagasi* e a *L. braziliensis* registraram uma heterogeneidade de 200 entre si aproximadamente.

Figura 27 - Dendrograma entre as espécies *Trypanosoma cruzi* e as espécies de *Leishmania*.

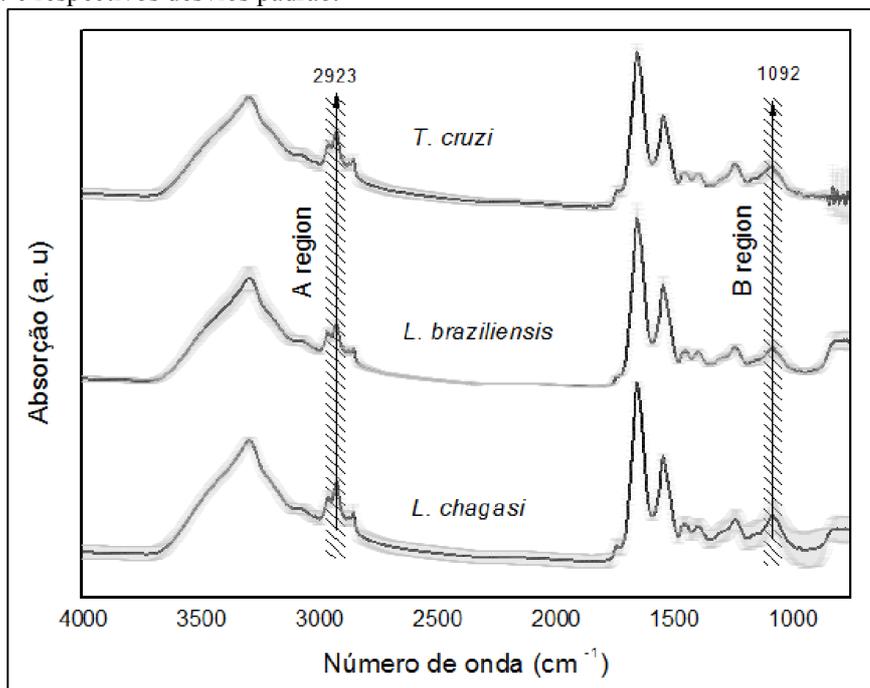


Fonte: Autor. A análise de cluster usou a segunda derivada para agrupar as espécies por similaridade. As regiões de separação ocorreu entre 1040  $\text{cm}^{-1}$  a 1148  $\text{cm}^{-1}$  e 2886  $\text{cm}^{-1}$  a 2994  $\text{cm}^{-1}$ .

A figura 28 mostra a média dos espectros das espécies de *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* e a cor cinza representa o desvio padrão, a qual apresenta diferenças entre as espécies. Os melhores resultados de análise de agrupamento, que permitem a diferenciação destas três

espécies de parasitos, foram encontrados utilizando as regiões espectrais indicadas por A (2994  $\text{cm}^{-1}$  a 2886  $\text{cm}^{-1}$ ) e B (1148  $\text{cm}^{-1}$  a 1040  $\text{cm}^{-1}$ ).

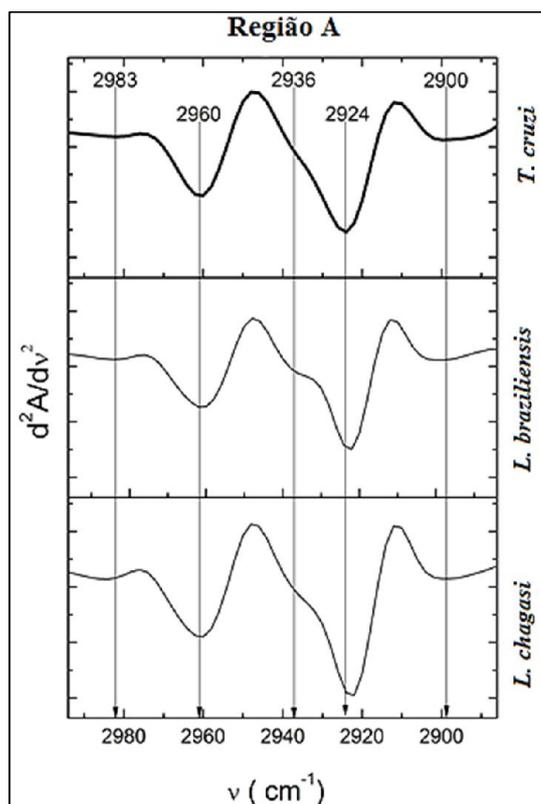
Figura 28 - Espectros de absorção representativos das espécies de *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* e respectivos desvios padrão.



Fonte: Autor. A e B são as regiões que possibilitaram a separação desses parasitos.

As regiões A e B foram selecionadas a partir dos espectros de infravermelho que permitiram a distinção desses parasitos. A região A representa a banda de absorção dos ácidos graxos, a qual revelou diferença entre as intensidades da banda de absorção em 2924  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$  da ligação C-H (MAQUELIN et al., 2002; NAUMANN, 2000). A banda em 2936  $\text{cm}^{-1}$  mostrou diferença de absorção, que contribuiu fortemente para separar os parasitos. Para melhor visualização dessas diferenças espectrais, foi feita a segunda derivada destas regiões, que permitiram observar as bandas que contribuíram para diferenciar essas três espécies, conforme as figuras 29 e 30.

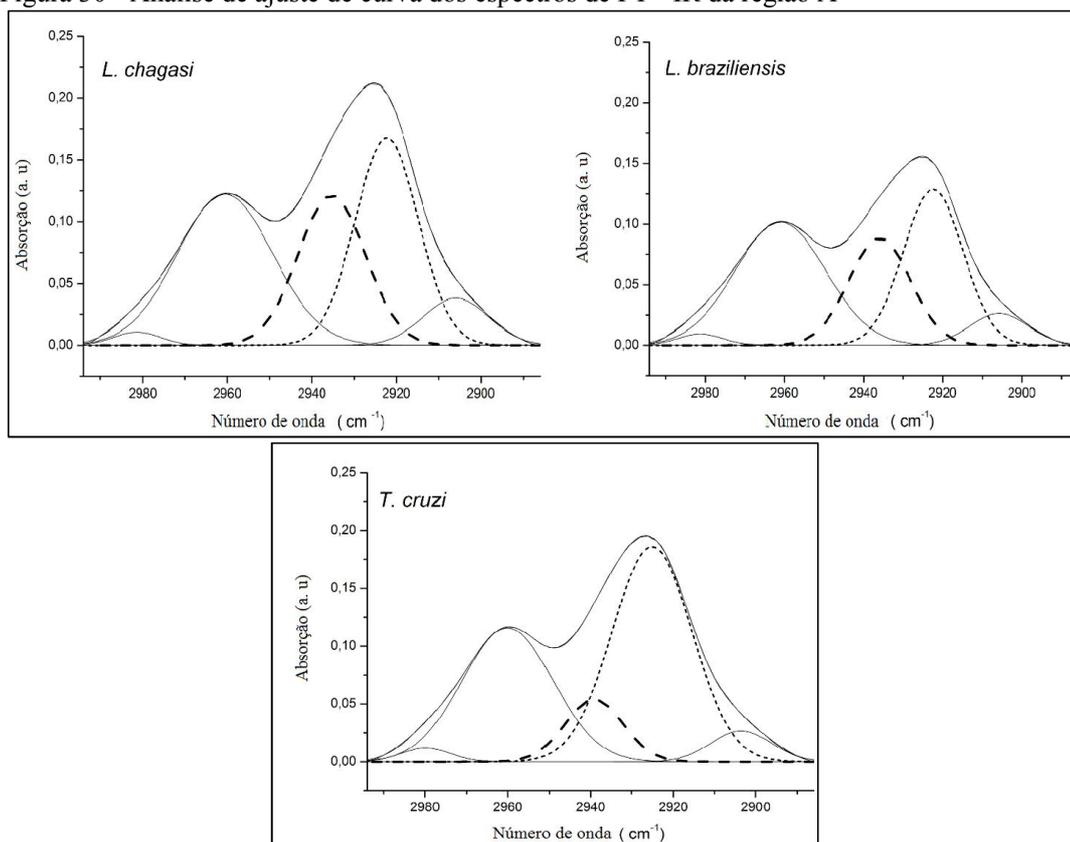
Figura 29 - Gráfico da segunda derivada e os pontos de absorção dos espectros da região A das espécies de *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*.



Fonte : Autor.

A deconvolução das bandas da região A utilizando a segunda derivada dos espectros pode ser visualizada na figura 30. As diferenças entre as gaussianas indicam a variação na composição bioquímica das espécies, o que representa a variação de composto químico da membrana dos parasitos. Isso nos leva a uma melhor compreensão dos modos vibracionais do grupo funcional.

Figura 30 - Análise de ajuste de curva dos espectros de FT - IR da região A



Fonte: Autor. As gaussianas da região A ( $2994\text{ cm}^{-1}$  a  $2886\text{ cm}^{-1}$ ) indicaram uma variação entre as espécies *T. cruzi* e as espécies de *Leishmania*.

As áreas totais das três regiões espectrais estão em porcentagem e representadas pelas cinco gaussianas que cada uma contém. O centro das posições das gaussianas é dado em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e o coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  ajustado) foi de 0,999 para todas as gaussianas, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Atribuições das bandas espectrais da região A dos espectros do FT - IR referente às espécies de *T. cruzi*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*.

<i>L. chagasi</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>T. cruzi</i>		Atribuições
( $\text{cm}^{-1}$ )	GA (%)	( $\text{cm}^{-1}$ )	GA (%)	( $\text{cm}^{-1}$ )	GA (%)	
2983	1,48	2983	1,71	2980	1,86	Ácido graxo (SCHMITT; FLEMMING, 1998)
2961	34,9	2961	37,9	2961	34,36	$\nu$ de C-H (as) de $-\text{CH}_3$ em ácido graxos (NAUMANN, 2000)
2936	24,5	2936	22,5	2936	10,23	$\nu$ de C-H (as) de $\text{CH}_2$ (NAUMANN, 2000)
2921	31,6	2921	31,5	2923	48,33	$\nu$ de C-H de $>\text{CH}_2$ em ácido graxo (MAQUELIN et al., 2002)

2900	7,4	2900	6,3	2900	5,2	$\nu$ de C-H de $\rightarrow$ C-H de aminoácidos (DAVIS;MAUER, 2010)
------	-----	------	-----	------	-----	---

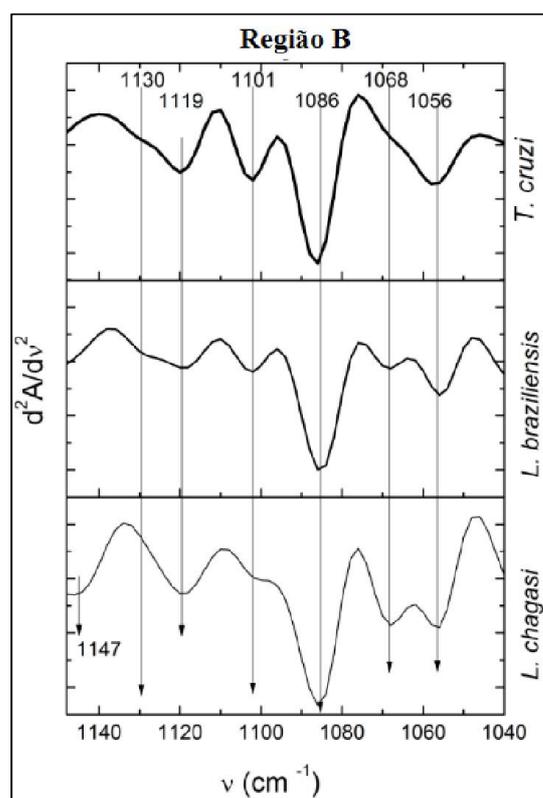
Fonte: Autor. A área da Gaussiana - GA; \*  $\nu$  = vibração de estiramento; as = antissimétrico.

A deconvolução espectral da região A nos possibilitou destacar duas bandas indicadas por traços longos e curtos. A primeira banda observada em  $2936\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico C - H do grupo de  $\text{CH}_2$ , e isso colaborou fortemente na separação das espécies de *T. cruzi* das espécies de *Leishmania*.

A segunda banda observada foi em  $2921\text{ cm}^{-1}$ , à qual é atribuída à vibração de estiramento de C-H de ácido graxo de  $> \text{CH}_2$ , o que também cooperou para discernir as espécies. Quantitativamente, a espécie de *T. cruzi* apresenta maior percentual de ácidos graxos nessa banda em relação às espécies de *Leishmania*, de acordo com o explicitado na tabela 4.

A região B representa as bandas de absorção do polissacarídeo, e isto contribui para acentuar ainda mais as diferenças entre as espécies. A segunda derivada dessa região é mostrada na figura 31.

Figura 31 - Gráfico da segunda derivada e os pontos de absorção referentes à região B das espécies de *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*.

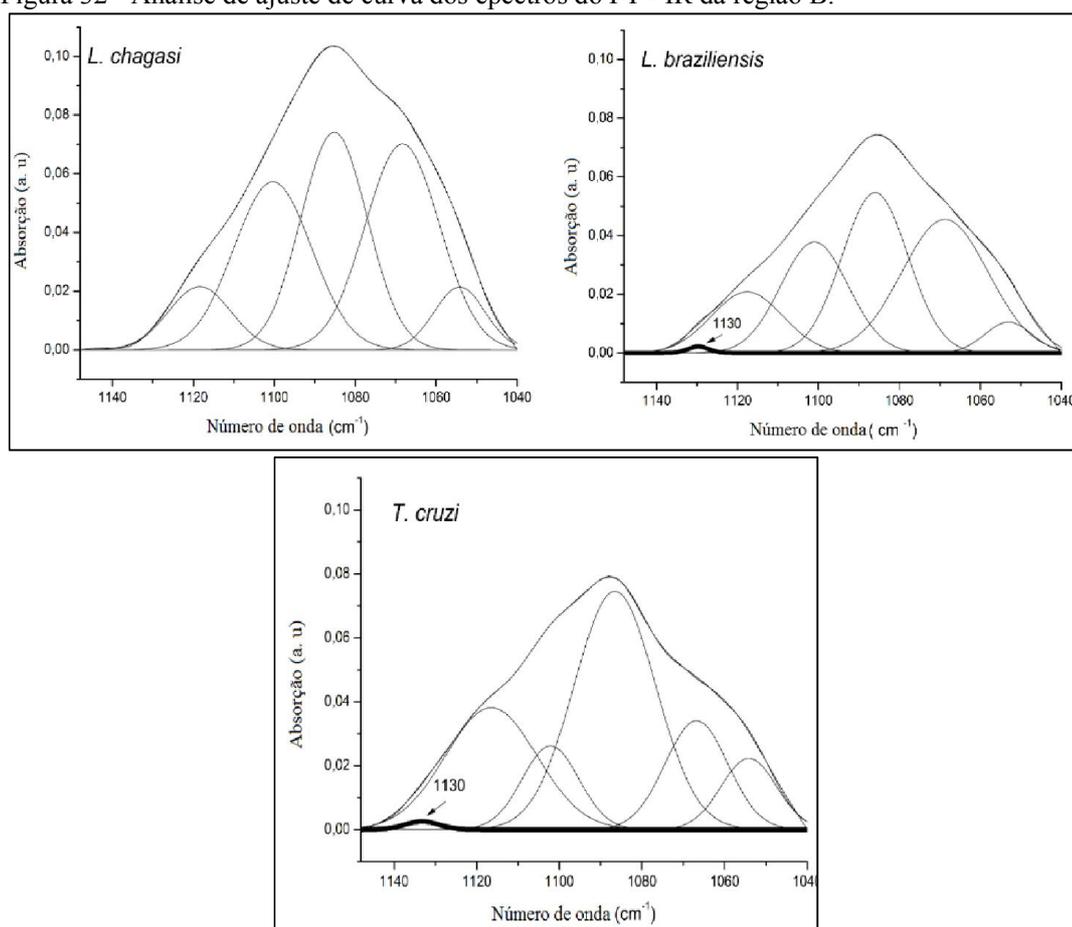


Fonte: Autor.

Nessa região foram observados duas bandas específicas. A primeira banda em  $1147\text{ cm}^{-1}$  somente foi registrada para as espécies *L. chagasi*. A segunda banda em  $1130\text{ cm}^{-1}$  foi registrada para as espécies de *L. braziliensis* e *T. cruzi*. As outras bandas da região, nomeadamente as bandas em  $1119\text{ cm}^{-1}$ ,  $1101\text{ cm}^{-1}$ ,  $1086\text{ cm}^{-1}$ ,  $1056\text{ cm}^{-1}$  e  $1068\text{ cm}^{-1}$ , estão presentes nas três espécies, mas, saliente-se, todas elas apresentaram diferenças na absorção.

A deconvolução das bandas da região B foi feita utilizando a segunda derivada do espectro de absorção FT – IR, como mostra a figura 32.

Figura 32 - Análise de ajuste de curva dos espectros do FT - IR da região B.



Fonte: Autor. As gaussianas da região B (compreendidas entre  $1148\text{ cm}^{-1}$  a  $1040\text{ cm}^{-1}$ ) indicaram a variação entre as espécies de *T. cruzi* e as espécies de *Leishmania*.

A curva da Gaussiana centrada em  $1130\text{ cm}^{-1}$  foi destacada (linha mais grossa sólida) para indicar que só está presente nas espécies de *L. braziliensis* e *T. cruzi*. A curva da Gaussiana em  $1147\text{ cm}^{-1}$  na espécie de *L. chagasi* foi muito pequena e não é evidenciada

A tabela 3 registra as contribuições bioquímicas da banda espectral da região B. As gaussianas foram dadas em porcentagem da área geométrica em relação à área total das regiões espectrais; o centro das posições das gaussianas foi dado em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e o coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  ajustado) foi de 0,999 para todas as gaussianas, conforme se observa na tabela 3.

Tabela 3 - Atribuições das bandas espectrais da região B dos espectros do FT - IR referente às espécies de *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *T. cruzi*.

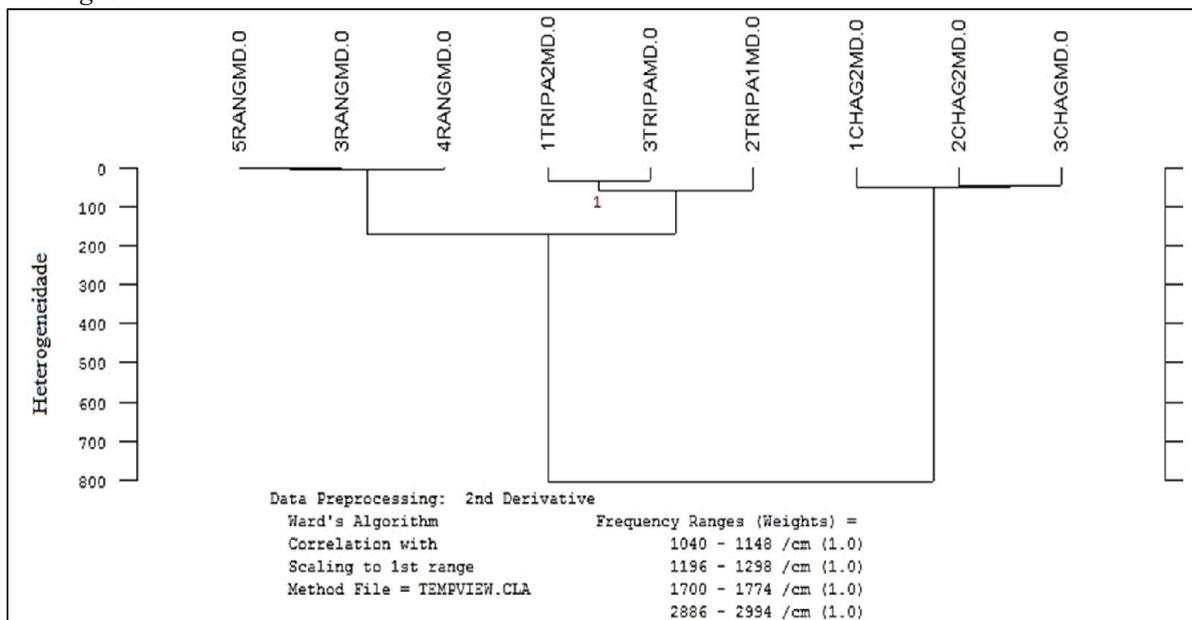
<i>L. chagasi</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>T. cruzi</i>		Atribuições*
( $\text{cm}^{-1}$ )	GA (%)	( $\text{cm}^{-1}$ )	GA (%)	( $\text{cm}^{-1}$ )	GA (%)	
1147	0,04					Polissacárideos (NAUMANN, 2000)
		1130	0,37	1130	0,59	Polissacárideos (NAUMANN, 2000))
1119	7,9	1119	12,2	1119	24,06	Polissacárideos (NAUMANN, 2000)
1101	26,1	1101	21,1	1101	10,2	$\nu_s$ de ( $\text{PO}_2^-$ ) em ácidos nucleico (WANG et al., 2010)
1086	28,9	1086	29,8	1086	41,9	$\nu$ de P= O (s) de $>\text{PO}_2^-$ , em DNA, RNA e fosfolipídios (BEEKES et al., 2007; DAVIS; MAUER, 2010)
1068	30,6	1068	32,3		14,7	C-O-C e C-O, polissacárideos (DAVIS; MAUER, 2010)
1056	6,3	1056	4,04	1056	8,3	Vibração de flexão no plano de C - H aromático (WAHAB, 2011)

Fonte: Autor. A área da Gaussiana - GA; \*s = simétrico;  $\nu$  = vibração de estiramento;  $\nu_s$  = vibração de estiramento simétrica.

#### 4.3 Resultados referentes às espécies de *T. rangeli*, *T. cruzi* e *L. chagasi*

O dendrograma da figura 33 mostra os resultados da análise de cluster, utilizando médias espectrais das amostras feitas em quintuplicatas das espécies de *Trypanosoma* e da espécie de *Leishmania*, sendo elas: a) 3RANGMD, 4RANGMD e 5RANGMD, representando a espécie de *T. rangeli*; b) 1TRIPA2MD, 2TRIPA1MD e 3TRIPAMD, indicando a espécie de *T. cruzi*; e c) 1CHAG2MD, 2CHAG2MD e 3CHAGMD, apontando a espécie de *L. chagasi*. Esses parasitos por terem uma similaridade morfológica e filogenética apresentaram apenas quatro regiões espectrais que os diferenciaram. Na figura 33 ilustra uma nítida heterogeneidade entre as espécies de *T. rangeli*, *T. cruzi* e *L. chagasi*, com base nas quatro regiões espectrais.

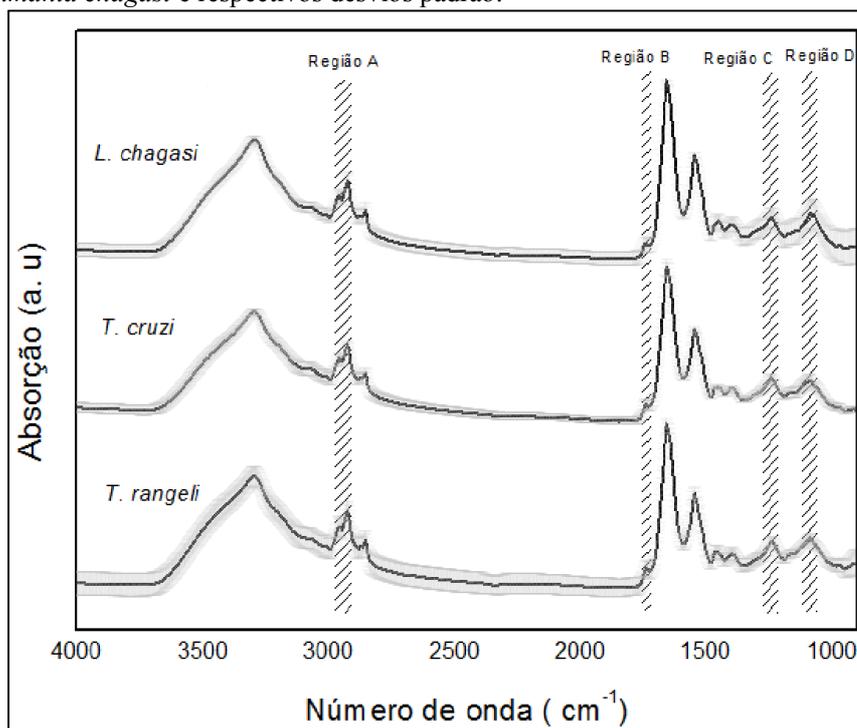
Figura 33 - Dendrograma das espécies de *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi*.



Fonte: Autor. O dendrograma indica a heterogeneidade entre as espécies de *T. rangeli*, *T. cruzi* e *L. chagasi*. Análise de cluster usou a segunda derivada dos espectros como parâmetro. As regiões espectrais de separação foram  $1040\text{ cm}^{-1}$  a  $1148\text{ cm}^{-1}$ ,  $1196\text{ cm}^{-1}$  a  $1298\text{ cm}^{-1}$ ,  $1700\text{ cm}^{-1}$  a  $1774\text{ cm}^{-1}$  e  $2886\text{ cm}^{-1}$  a  $2994\text{ cm}^{-1}$ .

A figura 34 mostra a média dos espectros de infravermelhos das espécies de *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* bem como as regiões que diferenciaram as espécies e o desvio padrão que está representado na cor cinza.

Figura 34 - Espectros de absorção representativos das espécies de *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania chagasi* e respectivos desvios padrão.



Fonte: Autor.

As análises da deconvolução de bandas foram feitas utilizando as quatro regiões espectrais representadas na figura 35, são elas: a região A ( $2886\text{ cm}^{-1}$  a  $2994\text{ cm}^{-1}$ ), a região B ( $1700\text{ cm}^{-1}$  a  $1774\text{ cm}^{-1}$ ), a região C ( $1196\text{ cm}^{-1}$  a  $1298\text{ cm}^{-1}$ ) e a região D ( $1040\text{ cm}^{-1}$  a  $1148\text{ cm}^{-1}$ ), a qual permitiu a diferenciação dos parasitos.

A tabela 4 descreve as contribuições bioquímicas das bandas espectrais das regiões que separaram as espécies utilizando a segunda derivada ( $2^{\text{d}}$ ) e as áreas das gaussianas em porcentagem de cada espécie. Além disso, mostra a banda de cada gaussiana e as atribuições das regiões encontradas nos espectros das espécies de *L. chagasi*, *T. cruzi*, *T. rangeli*. O parâmetro estatístico foi ajustado a  $R^2 = 0,999$  para todas as gaussianas.

Tabela 4 - Atribuições de bandas encontradas nos espectros das espécies de *L. chagasi*, *T. cruzi* e *T. rangeli* em FT - IR.

<i>L. chagasi</i>			<i>T. cruzi</i>			<i>T. rangeli</i>			Atribuição*
2 <sup>o</sup> d	Gaussiana	%	2 <sup>o</sup> d	Gaussiana	%	2 <sup>o</sup> d	Gaussiana	%	
2994	2981	1,05							Ácido graxo (Schmitt and Flemming 1998)

2960	2960	36,60	2961	2960	36,20	2964	2961	33,00	C-H str (asym) of > CH <sub>3</sub> em ácido graxo (Naumann 2000)
2936	2938	11,10							C-H str (asym) of > CH <sub>2</sub> (30) (NAUMANN 2000)
2922	2924	46,30	2924	2926	61,00	2926	2926	66,90	C-H str de vibração de ácido graxo de > CH <sub>2</sub> (MAQUELIN et al. 2002)
2898	2903	4,89	2897	2900	2,72				C-H str de → C-H aminoácido (Davis and Mauer 2010)
1747	1746	29,00	1742	1744	58,60	1740	1741	100	> C = O str de esters (NAUMANN, 2000)
1736	1741	70,90							> C = O str de ésteres (Naumann, 2000)
1728	1721	0,02	1729	1737	41,30				> C = O str de ésteres (Naumann, 2000)
1283	1305	0,10	1283	1272	10,40				Amida II (Naumann 2000)
1265	1262	25,20							Amida III, α - helix (Wang et al. 2010)
1239	1238	66,30	1240	1239	89,50	1240	1240	100	Amida III, componente de proteína (Maquelin et al. 2002)
1208	1218	8,30							Triptofano, ν <sub>a</sub> ( CC) (Barth, 2007)
1119	1115	9,60	1119	1118	19,70	1124	1119	21	Polissacarídeo (Naumann, 2000)
			1102	1104	1,50				ν <sub>s</sub> (PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) de ácido nucleico (Wang et al. 2010)
1085	1085	75,10	1086	1088	62,70	1091	1088	64,10	P=O str (sym) de >PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , em DNA, RNA e fosfolípidios (Beekes et al. 2007; Davis; Mauer 2010)
1069	1065	8,02							C-O-C and C-O, Polissacarídeo (Davis; Mauer, 2010)
1055	1054	7,09	1058	1059	15,80	1056	1058	14,70	Vibração de flexão no plano de C - H aromático (Wahab, 2011)

Fonte: Autor. \* Str = alongamento; sym = simétrica; asym = antisymmetric; ν<sub>s</sub> = simétrica vibração de alongamento; ν<sub>a</sub> = estiramento simétrico vibração. O parâmetro estatístico foi R<sup>2</sup> ajustado em 0,999 para todas as Gaussianas.

## 5 DISCUSSÃO

A discussão será apresentada em três blocos, conforme a apresentação dos resultados. Nos três blocos, foram observadas diferenças no desvio padrão entre as espécies consoante as figuras 27, 29 e 35. Essas diferenças dos desvios padrão podem ser reflexo do estágio de desenvolvimento da cultura, pois são parasitos diferentes, ou seja, respondem distintamente ao tempo. No entanto, no preparo das amostras, utilizamos um protocolo que garantiu uma boa qualidade dos espectros. Devemos mencionar que as diferenças desses desvios padrão não interferiram na análise estatística usada para separar as espécies.

### 5.1 Diferenciação entre as espécies de *Leishmania*

As diferenças podem ser em virtude da resposta distinta do tempo em relação à fase de crescimento de cada espécie. Entretanto, repita-se, no preparo das amostras, utilizamos um protocolo que garantiu uma boa qualidade dos espectros.

A deconvolução espectral utilizou a segunda derivada para exibir as diferenças que possam nos levar a uma compreensão da variação da composição química dos parasitos. Nesta variação química, podemos destacar os principais componentes químicos de interesse em micro-organismos, como polissacarídeos, ácidos nucleicos, aminoácidos, lipídios e proteínas. Assim, a diferença das bandas espectrais será discutida relacionando os grupos funcionais correspondentes.

Os resultados registraram bandas espectrais comuns às espécies, mas apresentaram diferenças em relação às suas áreas e bandas específicas para as espécies.

**Polissacarídeos:** Os resultados descritos na tabela 1 mostram que todas as espécies apresentaram diferenças quantitativas de polissacarídeo nas bandas centradas em 1039  $\text{cm}^{-1}$ , 1119  $\text{cm}^{-1}$ , 1172  $\text{cm}^{-1}$  e 1153  $\text{cm}^{-1}$ .

Na banda centrada em 1039  $\text{cm}^{-1}$ , a *L. chagasi* e *L. major* registraram respectivamente percentuais de 10% e 6,2%, maiores que *L. amazonensis*. Na banda centrada em 1119  $\text{cm}^{-1}$ , a *L. amazonensis* e *L. chagasi* revelaram, de modo respectivo, valores de 15,4% e 11,8%, maiores que a *L. major*. Nas demais bandas foram observadas pequenas variações nos percentuais. Além disso, a banda centrada em 1068  $\text{cm}^{-1}$  foi registrada apenas para as espécies de *L. chagasi* e *L. major*. A banda centrada em 1221  $\text{cm}^{-1}$  é específica para *L. amazonensis*.

As diferenças entre as bandas de absorção supramencionadas podem ser explicadas pelas modificações específicas na superfície da membrana de todas as espécies de

*Leishmania*. Mesmo que haja uma semelhança morfológica e química devido à sua proximidade filogenética, as bandas mostram variações de polissacarídeo, o que ajuda a discriminar esses parasitos. Estas diferenças de polissacarídeos podem ser justificadas pela quantidade de glicoconjugados presentes na superfície do parasito, já que varia de espécie para espécie. As substituições de um ou mais açúcares promovem um alto polimorfismo interespecífico e intraespecífico das espécies. Dentro do glicoconjugados, os lipofosfoglicano (LPG) e as glicoproteínas (gp63) são mais abundantes na membrana do parasito e desempenham um papel importante na invasão, virulência e sobrevivência dentro do macrófago. Além do mais, glicoconjugados são alvos potenciais para o desenvolvimento de vacinas (FERGUSON, 1999; MCCONVILLE et al., 1990; SCHNEIDER et al., 1993)

As moléculas de superfície celular mais abundantes na fase promastigota da *Leishmania* são os glicosilfosfatidilinositol (GPI), âncora de proteína. O GPI é chamado de âncora de membrana, por ser é um glicolípido que se liga às proteínas ou a um polímero de carboidrato na membrana (MARR; MULLER, 1995; TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

**Lipídios e proteínas:** Uma ampla variedade de lipídios e proteínas está presente na membrana ligada pela âncora GPI. Os lipídios e as proteínas variam drasticamente entre as espécies, inclusive entre as fases distintas do ciclo de vida da mesma espécie. Os lipídios são estruturalmente essenciais para a formação de fosfolipídios, que são parte da âncora GPI. Portanto, a variação quantitativa dos lipídios entre as espécies também pode indicar os vários tipos de glicoconjugados presentes na superfície externa dos parasitos (VIAL et al., 2003).

A tabela 1 mostra, quantitativamente, a diferença de lipídios entre as espécies e destaca duas bandas: a primeira centrada em  $1401\text{ cm}^{-1}$  tem maior percentual para a *L. amazonensis* quando comparado com as outras duas espécies. De modo inverso, a segunda banda centrada em  $1387\text{ cm}^{-1}$ , ou seja, a *L. chagasi* e *L. major*, indicou os maiores percentuais quando comparados aos da *L. amazonensis*. As outras bandas, como as centradas em  $1367\text{ cm}^{-1}$ ,  $1413\text{ cm}^{-1}$  e  $1467\text{ cm}^{-1}$ , também apontam pequenas diferenças entre as espécies.

Além das diferenças quantitativas de lipídios, foi encontrado um deslocamento de bandas nessa região. O deslocamento ocorreu nas bandas em  $1380\text{ cm}^{-1}$  e  $1387\text{ cm}^{-1}$ . A banda centrada em  $1380\text{ cm}^{-1}$  foi observada na *L. amazonensis* e a banda centrada em  $1387\text{ cm}^{-1}$  foi observada nas outras duas espécies. Este deslocamento das bandas espectrais e as diferenças de lipídios e proteínas, mostradas na tabela 1 pelas bandas, reforça a diferença entre os três parasitos (MCCONVILLE; BACIC, 1989).

Ainda nessa sequência, na banda centrada em  $1086\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde aos fosfolipídios, os resultados mostraram que a *L. amazonensis* e *L. major* têm respectivamente

diferenças de 12,3% e 9,5% quando comparados ao resultado da *L. chagasi*. Estas variações de fosfolipídios entre as espécies contribuem para diferenciar uma espécie da outra. A banda centrada em  $1101\text{ cm}^{-1}$ , que representa os ácidos nucleicos, exibiu pequenas diferenças.

**Aminoácido:** O aminoácido serina faz parte da composição de um tipo de fosfolipídios conhecido como fosfatidil serina. A fosfatidil serina é o componente da membrana que a mantém intacta, ajudando-a a executar suas funções vitais, tais como mover nutrientes para dentro e bombear os resíduos para fora da *Leishmania* (VANCE; VANCE, 2008). Nesse sentido, a banda centrada em  $2897\text{ cm}^{-1}$  na região A aponta diferença pequena na quantidade de aminoácidos entre as espécies. Portanto, a diferença de aminoácidos encontrados colabora para diferenciar as espécies.

Na região C, foi encontrada uma banda do aminoácido triptofano centrada em  $1206\text{ cm}^{-1}$  para as espécies de *L. chagasi* e *L. major*  $\text{cm}^{-1}$ . Este aminoácido está associado a virulência do parasito. Enquanto na região D, os resultados mostraram uma banda específica de serina centrada em  $1030\text{ cm}^{-1}$  para *L. amazonensis*.

**Ácidos graxos:** Os ácidos graxos mostram nas bandas pequenas contribuições entre as espécies. As bandas centradas em  $1453\text{ cm}^{-1}$  e  $1443\text{ cm}^{-1}$  apresentaram as maiores desigualdades entre as bandas. A banda centrada em  $3012\text{ cm}^{-1}$  apresentou pouca contribuição de ácidos graxos insaturados. Estas diferenças entre as espécies de *Leishmania* em relação ao ácido graxo podem ser explicadas pelas quantidades relativas a glicolipídios presentes na membrana e nas organelas do parasito, o que pode ajudar a distinguir as três espécies (ILGOUTZ; MCCONVILLE, 2001; ROBERTS et al., 2003; TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

**Amida III:** A região amida III é outra região espectral que colaborou para separar as espécies. Nesta região, *L. amazonensis* tem uma banda específica em  $1298\text{ cm}^{-1}$ . A *L. chagasi* apresentou um percentual inferior em relação às outras duas espécies de 14 % na banda  $1242\text{ cm}^{-1}$ . As *L. chagasi* e *L. major* apresentaram diferenças na banda em  $1266\text{ cm}^{-1}$ , esta banda é específica para essas duas espécies. Na região de amida II, não houve diferença importante entre as três espécies.

Os resultados do subtítulo 4.1 e a sua discussão descrita no subtítulo 5.1 já foram publicados na revista *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, que se encontra no anexo A desta tese.

## 5.2 Diferenciação das espécies de *T. cruzi* e das espécies de *Leishmania*

Os resultados de FT - IR mostraram que são suficientes para distinguir as espécies de *Leishmania* e *T. cruzi*, que pertencem à mesma família e à mesma ordem. O dendrograma mostrou dois ramos, o primeiro representa a espécie de *Leishmania* e segundo, as espécies de *T. cruzi* (Figura 28). Portanto, esta análise de cluster, representada pelo dendrograma, se mostrou eficiente em confirmar, de forma evidente, a heterogeneidade entre as espécies de *Trypanosoma cruzi* e as espécies de *Leishmania* e também foi capaz de promover dois ramos que separam as espécies de *Leishmania*.

As diferenças entre esses parasitos são atribuídas principalmente à composição bioquímica de sua membrana (FERGUSON, 1997). As contribuições de ácidos graxos e aminoácidos da região A foram quantificadas e estão descritas na tabela 2.

**Ácidos graxos:** Os ácidos graxos constituem a molécula mais abundante na superfície dos parasitos, o glicosilfosfatidilinositol (GPI). A função do GPI são se associar à molécula de proteína ou polímero de carboidrato, para fazer a interação com as células do hospedeiro e se proteger contra os efeitos do sistema de complemento dele (HELM et al., 1991; TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

As bandas centradas em 2983  $\text{cm}^{-1}$  e 2961  $\text{cm}^{-1}$  registraram poucas diferenças percentuais entre as espécies. Contudo, existem duas bandas pertencentes à região A que contribuíram inegavelmente para acentuar as diferenças entre as espécies de *T. cruzi* e as espécies de *Leishmania* quando comparadas com as espécies de *T. cruzi*. Considerando-se a primeira banda centrada em 2936  $\text{cm}^{-1}$ , as espécies de *L. braziliensis* apontaram uma diferença de 12,27 % e as espécies de *L. chagasi* indicaram uma diferença de 14,27 %. No que toca à segunda banda centrada em 2921  $\text{cm}^{-1}$ , as espécies *T. cruzi* exibiram uma diferença média de vibração de estiramento de C-H de  $> \text{CH}_2$  em ácidos graxos em torno de 16,78 % relacionados às duas espécies de *Leishmania*.

A partir do embasamento acima, a distinção entre os parasitos descritos na tabela 2 das bandas da região A é dada, sobretudo, pela variação do componente de membrana celular, correspondente aos ácidos graxos.

**Aminoácidos:** Na região A foi observada em 2900  $\text{cm}^{-1}$  uma atribuição dada ao estiramento de C - H de  $\rightarrow$  C - H de aminoácidos. A pequena diferença do aminoácido entre as espécies indica que as proteínas têm uma pequena contribuição para a distinção desses parasitos.

**Polissacarídeos:** A banda centrada em 1147  $\text{cm}^{-1}$  é específica para as espécies *L. chagasi*, mas em relação à banda centrada em 1130  $\text{cm}^{-1}$  não houve registro para estas espécies.

Na banda centrada em  $1119\text{ cm}^{-1}$ , a espécie *T. cruzi* mostrou diferenças de percentuais de 16,16% e 11,86% em relação às espécies de *L. chagasi* e *L. braziliensis*, respectivamente. Para a banda centrada em  $1068\text{ cm}^{-1}$ , de atribuição de C - O - C e C - O de polissacarídeos, as espécies de *L. chagasi* apresentaram uma diferença de percentual de 15,9 % e as espécies *L. braziliensis* de 17,6 % em relação às espécies de *T. cruzi*. Essas duas bandas contribuíram ainda mais para separação destes parasitos.

O polissacarídeo está presente na membrana celular desses parasitos e constitui o lipofosfoglicano (GPL) e a glicoproteína (GP63). A função destas moléculas é promover a sobrevivência e a virulência no hospedeiro (BEVERLEY; TURCO, 1998; MARR; MULLER, 1995; TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Assim, a diferença entre a quantidade de polissacarídeo observado na tabela 3 colaborou para a distinguir as três espécies.

**Ácido nucleico e fosfolipídios:** Na banda centrada em  $1086\text{ cm}^{-1}$ , a espécie *T. cruzi* obteve uma diferença de atribuição de estiramento simétrico de  $\text{P} = \text{O}$  de  $> \text{PO}_2^-$ , em DNA, RNA e fosfolipídios de 13 % em relação às espécies *L. chagasi* e de 12,1% em relação às espécies de *L. braziliensis*. Neste sentido, os resultados mostraram que as espécies de *T. cruzi* apresentam maior quantidade de fosfolipídios, o que acentua as diferenças entre as espécies. Já dentre as espécies de *Leishmania*, houve pequena diferença de fosfolipídios nesta banda.

Fosfolipídios desses parasitos são responsáveis por manter intacta a sua membrana e ajudar a executar funções vitais, tais como mover nutrientes para dentro dos parasitos e excretar os resíduos. Eles formam as estruturas de membrana específica do parasito e são mais abundantes na superfície deles (VIAL et al., 2003).

Na banda centrada em  $1101\text{ cm}^{-1}$  de vibração de estiramento simétrico de  $\text{PO}_2^-$  de ácidos nucleicos, foi constatada uma diferença das espécies *T. cruzi* de 15,9% quando comparadas com as espécies de *L. chagasi* e de 10,9% quando relacionadas às espécies de *L. braziliensis*, o que torna evidente a distinção entre esses parasitos. Ao mesmo tempo que a banda centrada em  $1056\text{ cm}^{-1}$  exibiu pequenas contribuições.

Os resultados do subtítulo 4.2 e a sua discussão descrita no subtítulo 5.2 já foram submetidos na revista *Vibrational Spectroscopy*, que se encontra no anexo B desta tese.

### **5.3 Diferenciação das espécies de *Leishmania* e das espécies de *Trypanosoma***

No dendrograma, as espécies de *L. chagasi* registraram aproximadamente uma heterogeneidade de 800 relativa às duas espécies de *Trypanosoma*. As espécies de *T. rangeli* e *T. cruzi* apresentaram uma heterogeneidade aproximadamente de 190 entre si.

Conseqüentemente, a análise de cluster, por meio do dendrograma também é capaz de diferenciar as espécies que pertencem à mesma ordem, família e ao mesmo gênero.

As diferenças entre os parasitos supramencionados são atribuídas especialmente à composição bioquímica de sua membrana. As contribuições do composto orgânico (ácidos graxos, ésteres, amida III e polissacarídeos) foram quantificadas e registradas na tabela 4. Esses compostos orgânicos são encontrados nas membranas dos parasitos, tais como GPI, PSP, GIPLs e LPG. (VIAL et al., 2003; FERGUSON, 1997).

A molécula mais abundante na membrana no estágio promastigota da *Leishmania* é o glicosilfosfatidilinositol (GPI), que atua como "âncora" para vários glicoconjugados, como as glicoproteínas chamadas de proteínas de superfície de promastigota (PSP), a família de glicoinositol-fosfolipídios (GIPLs) e o lipofosfoglicano (LPG). Esta molécula é constituída por carboidratos, lipídeos e fosfato. (FERGUSON, 1999; MCCONVILLE et al., 1990).

O GIPL varia entre as espécies de *Leishmania*, bem como entre os estágios promastigota e amastigota do parasito. O GIPL também está presente na membrana das espécies *T. rangeli* e *T. cruzi*, formando um denso glicocálice imediatamente adjacente à membrana. Este glicoconjugado varia entre as espécies, notadamente no estágio epimastigota e na forma metacíclica desses dois parasitos. (FERGUSON, 1997).

O LPG é um fosfosacarídeo ancorado pela molécula de GPI, o qual forma uma densa camada sobre a superfície do promastigota, enquanto que no estágio amastigota apresenta uma pequena quantidade ou uma quantidade negligenciável. As diferenças de LPG são registradas entre as diversas espécies de *Leishmania* e entre os estágios de diferenciação da mesma espécie. (NYALWIDHE et al, 2003).

A glicoproteína ancorada pelo GPI na membrana desses três parasitos é diferente. A glicoproteína e o LPG são responsáveis para assegurar a entrada do parasito dentro do hospedeiro, a proteção contra os efeitos do sistema de complemento, a invasão para dentro da célula, a multiplicação e sobrevivência. Além do que, promove o deslocamento do parasito dentro do vetor e dentro do hospedeiro. (NYALWIDHE et al, 2003; FERGUSON, 1997).

A diferença na estrutura química da membrana pode ser responsável por mudanças em determinadas regiões espectrais, que separam os micro-organismos. Neste entendimento, podemos dizer que as regiões foram principalmente separadas por atribuições da estrutura da molécula. Essas atribuições de estrutura da molécula de - CH<sub>3</sub>, > CH<sub>2</sub>, = CH, > C = O e N-H de estiramento (simétrico e assimétrico) ou vibrações de flexão normalmente estão presentes em todos os grupos funcionais.

**Ácidos graxos:** A região A representa a contribuição de ácidos graxos. Nesta região, a espécie de *L. chagasi* mostrou cinco bandas. As bandas centradas em 2994  $\text{cm}^{-1}$  e 2936  $\text{cm}^{-1}$  são específicas para a espécie de *L. chagasi*. As espécies de *T. cruzi* e *T. rangeli* apresentaram três bandas cada.

As duas bandas em 2922  $\text{cm}^{-1}$  e 2960  $\text{cm}^{-1}$  estão presentes nas três espécies. Na banda em 2922  $\text{cm}^{-1}$ , a espécie de *T. rangeli* tem um percentual de 20,60 % e a espécie de *T. cruzi* indicou um percentual de 14,70 % de ácidos graxos maiores do que a espécie de *Leishmania*. Enquanto a banda em 2960  $\text{cm}^{-1}$  apresentou pequena diferença de ácidos graxos entre as espécies. Estas bandas ajudaram acentuar a diferença entre as espécies.

A banda de 2898  $\text{cm}^{-1}$ , que representa a região de aminoácido, apresentou percentual de 4,89 % para a espécie de *L. chagasi* e percentual de 2,72 % para a espécie *T. cruzi*. Esta banda não foi registrada para a espécie de *T. rangeli*.

As diferenças quantitativas de ácidos graxos apresentados na região A podem indicar variação de fosfolípidios entre as espécies, os quais têm em sua constituição uma cadeia de ácidos graxos. Os fosfolípidios são o principal componente de membrana dos parasitos e estão associados à formação do GPI, o qual é a molécula mais abundante na superfície dos parasitos trypanosomatídeos. Esta molécula na membrana é ligada a proteínas ou a polímeros de carboidrato, o que contribui para a viabilidade e virulência do parasito no hospedeiro. Portanto, pelas razões expostas conclui que a região contribuiu para distinguir as três espécies.

**Ésteres lipídicos:** A região B mostra a ligação de  $> C = O$  de atribuição para estiramento de ésteres lipídicos. A segunda derivada indicou as diferenças com base no número de bandas para cada espécie, ou seja, para a espécie de *L. chagasi* três bandas foram registradas, para a espécie de *T. cruzi* duas bandas foram registradas e para as espécies de *T. rangeli* foi apresentada somente uma banda.

A banda em 1736  $\text{cm}^{-1}$  é específica para a espécie de *L. chagasi*, a banda em 1747  $\text{cm}^{-1}$  foi registrada para todas as espécies e a banda em 1728  $\text{cm}^{-1}$  foi registrada apenas para as espécies de *L. chagasi* e *T. cruzi*. Estas bandas mostraram diferenças no percentual de suas contribuições.

A banda em 1747  $\text{cm}^{-1}$  foi registrada 29 % para a espécie de *L. chagasi* e 58,6 % para as espécies de *T. cruzi*. A espécie de *T. rangeli* apresentou somente esta banda nesta região.

A banda de 1728  $\text{cm}^{-1}$  foi registrada para a espécie de *T. cruzi*, com o percentual de 41,30 %, o que denota uma banda forte para separar esta espécie das outras duas espécies. Nessa região, as referidas bandas ajudaram a acentuar a diferença entre as espécies.

Os ácidos graxos ligam-se à molécula de glicerol para formar ésteres, esses ésteres constituem o principal componente de membrana fosfolípida. Portanto, as diferenças encontradas nas bandas colaboram para distinguir as três espécies.

**Amida III:** A região C indica as bandas de absorção de Amida III. Para esta região, quatro bandas foram registradas para a espécie de *L. chagasi*; duas bandas para espécie de *T. cruzi*; e uma banda para a espécie de *T. rangeli*. As bandas em  $1265\text{ cm}^{-1}$  e  $1239\text{ cm}^{-1}$  estão presentes nesta região. A banda em  $1265\text{ cm}^{-1}$  é específica da espécie de *L. chagasi* e indica estruturas secundárias das proteínas,  $\alpha$  – hélice e a banda em  $1239\text{ cm}^{-1}$  estão presentes nas três espécies. A espécie de *T. rangeli* mostrou somente esta banda nesta região espectral e a espécie de *T. cruzi* revelou nesta banda uma diferença de 23,20 % em relação à espécie de *L. chagasi*. Assim, estas duas bandas colaboraram de modo significativo para distinguir estes parasitos.

A banda em  $1283\text{ cm}^{-1}$ , referente a espécie de *T. cruzi*, apresentou diferença de 10,30% de amida II em relação à espécie de *L. chagasi*. A banda em  $1208\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao aminoácido triptofano, foi registrada apenas para as espécies de *L. chagasi*. Estas bandas fornecem evidências para separação das espécies.

**Polissacarídeos:** A região D representa as bandas de absorção de polissacarídeos. Para a espécie de *L. chagasi*, uma banda específica em  $1069\text{ cm}^{-1}$  foi verificada. Esta banda tem atribuição de ligação C - O - C e C - O (polissacarídeos).

Relativamente à banda em  $1119\text{ cm}^{-1}$ , as espécies de *T. rangeli* e *T. cruzi* apresentaram percentuais de diferença quando comparadas a espécie de *L. chagasi* de 11,40% e 10,10% de polissacarídeo, respectivamente. Para a banda em  $1085\text{ cm}^{-1}$ , a qual tem atribuição de P = O str (sym) de  $> \text{PO}_2^-$ , em DNA, RNA e fosfolípidios, os parasitos apresentaram grande absorção, mas indicaram diferenças entre as espécies. A espécie de *L. chagasi* mostraram 75,10%, o maior percentual e a espécie de *T. cruzi* apresentou 62,70 %, o menor percentual para essa atribuição. A banda em  $1055\text{ cm}^{-1}$  mostrou que entre as espécies, a espécie de *L. chagasi* apresentou a menor absorção indicada pelo percentual de 7,09 % de atribuição de C-H aromático de vibração de flexão planar para aromáticos C - planar H dobra vibração. Enquanto os trypanossomas apresentaram o dobro do percentual que foi apresentado pelas espécies de *L. chagasi*, em se tratando desta atribuição. Portanto, a diferença encontrada nesta região contribuiu para a separação destas espécies.

Essas diferenças entre as espécies de polissacarídeos podem contribuir para a variação na quantidade de glicosilfosfatidilinositol (GPI), o que implica modificação da bioquímica na membrana dos parasitos para a determinação de uma espécie. As alterações quantitativas e

estruturais das moléculas de GPI podem resultar no aumento de ligações com glicoconjugados (que formam uma camada espessa e funcionam como proteção contra o sistema imune dos seus hospedeiros), assim como na invasão, aquisição de nutrientes e virulência do hospedeiro.

Os resultados do subtítulo 4.3 e a sua discussão descrita no subtítulo 5.3 já foram submetidos na revista *Journal of Physics D: Applied Physics* que se encontra no anexo C desta tese.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que essa técnica de espectroscopia vibracional FT - IR, quando associada à análise estatística multivariada (análise de cluster) e à análise de ajuste curva, permitiu fazer uma descrição, tanto qualitativa, quanto quantitativa das moléculas presentes na superfície da forma promastigota das espécies de *Leishmania* e da forma epimastigota das espécies de *Trypanosoma*, ou seja, mostrou ser um procedimento eficiente para diferenciar essas espécies.

A análise de cluster por meio do dendograma se revelou eficaz as regiões espectrais que separam esses parasitos que têm uma constituição bioquímica similar. No dendograma, foi possível visualizar a heterogeneidade das quintuplicatas, tanto das espécies de *Leishmania* entre si como das triplicatas das espécies de *Leishmania* e das espécies de *Trypanosoma*. Portanto, esta análise pôde nos garantir que essa técnica é adequada e reprodutível.

Nestas regiões espectrais foi possível fazer deconvolução de banda com base na segunda derivada que está representada pelas gaussianas, as quais espessaram as diferenças quantitativas das contribuições bioquímicas referentes aos modos vibracionais nas regiões de polissacarídeos, lipídios e proteínas, aminoácido, ésteres lipídicos, ácidos graxos e amida III dos espectros dos parasitos. Essas diferenças mostradas nos resultados foram suficientes para identificar, caracterizar e diferenciar esses parasitos.

A espectroscopia FT - IR de parasitos estabelece possibilidades para novos estudos sobre outras espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* e pode ser uma ferramenta promissora, não só para identificar e classificar, mas também para servir como suporte para outros métodos. Assim sendo, a espectroscopia FT - IR pode contribuir para minimizar os problemas que ocorrem com os testes sorológicos, pois costuma apresentar uma reação cruzada entre as infecções causadas por esses parasitos.

Neste processo de identificação das espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania* por espectroscopia FT - IR para utilização em trabalho de rotina, entendemos que seja necessário a criação de um banco de dados espectrais destes parasitos para possamos comparar para identifica-los. Lembrando que esta técnica utiliza uma amostra de cada espécie para obter os dados espectrais para que se torne possível a comparação.

Essa técnica é o primeiro passo para identificação de parasitos pertencentes à mesma família, o mesmo gênero. Além disso, pode se associar a nanotecnologia e tornar possível a aplicação em rotina laboratorial.

## REFERENCIAS

- AFCHAIN, D. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J Parasitol**, v. 65, n. 4, p. 507-14, 1979.
- AGUIAR, J. C. et al. Differentiation of *Leishmania* species by FT-IR spectroscopy. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 142, p. 80-5, 2015.
- AHMED, M. K. A., F.; SEALY, E.A. Unique spectral features of DNA infrared bands of some microorganisms. **Spectroscopy**, v. 23, p. 291 – 297, 2009.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e póscolombianas. **História, Ciências, Saúde — Manguinhos**, v. 10, n. 3, p. 853-82, 2003.
- ALVAREZ-ORDONEZ, A.; PRIETO, M. Changes in ultrastructure and Fourier transform infrared spectrum of *Salmonella enterica* serovar typhimurium cells after exposure to stress conditions. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 22, p. 7598-607, 2010.
- AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV - A Reconsideration of its systematic position. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 77, n. 4, p. 405-415, 1982.
- APT B, W. et al. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. **Revista chilena de infectología**, v. 25, n. 3, p. 194-199, 2008.
- BAHR, V. et al. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 58, n. 1, p. 107-21, 1993.
- BALANCO, J. M., F et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr Biol**, v. 11, p. 1870-1873, 2001
- BARATA, R. A. et al. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 481-7, 2004.
- BARRAL, A.; COSTA, J. M. L **Leishmanias e a Leishmaniose Tergumentar nas Américas**. 1. ed. Cytel, Salvador, 2011.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1767, n. 9, p. 1073-101, 2007.
- BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Vet Microbiol**, v. 123, n. 4, p. 305-19, 2007.

BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 35-40, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

\_\_\_\_\_, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a.

\_\_\_\_\_, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b.

\_\_\_\_\_, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007..

\_\_\_\_\_, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BREBBIA, C. A.; GREATED, C.; COLLINS, M. W. **Colour in Art, Design & Nature**. [s.l]: WIT Press, 2014.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. (Org.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: [s.n], 1979.

BRIGADA, A. M. et al. American tripanosomiasis: a study on the prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma cruzi*-like organisms in wild rodents in San Luis province, Argentina. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 249-253, 2010.

**BRUCKER, G.; GENTILINI, M. Las Leishmaniasis em América Latina**. Paris: Las Fondation Rhône, 1987.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDCP). **Epidemiology & Risk Factors**. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/>>. Acesso em: 28 ago. 2015.

CHALMERS, J. M.; GRIFFITHS, P. R. **Vibracional spectroscopy: Theory and Intrumentation**. Hants,UK: John Wiley & Sons, 2002.

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**. 3.ed. Academic Press, 1997.

COSTA, J. M. L. Leishmaniose Tergumentar Americana. **Acta Amazonica**, v. 22, n. 1, p. 71-77, 1992.

D'ALESSANDRO, A.; SARAIVIA, N. G. **Trypanosoma rangeli**. In: **Protozoal Diseases**. In: Protozoal Diseases. Oxford: Oxford University Press, p. 398-412, 1999

D'ALESSANDRO, B. A.; SARAVIA, N. G. Trypanosoma rangeli In: \_\_\_\_\_. **Parasitic Protozoa VW**. 2. ed. New York: Academic Press, 1992

DAVIS, R.; MAUER, L. J. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. **[s.n]**, v. 2, n. 2, 2010.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-52, 1992222222222222.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001a.

DESJEUX, P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. **Med Microbiol Immunol**, v. 190, n. 1-2, p. 77-9, 2001b.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]**. Rio de Janeiro, 1997.

DOENÇA DE CHAGAS. Disponível em:  
< [http://lineu.icb.usp.br/~farmacia/ppt/Chagas\\_2013.pdf](http://lineu.icb.usp.br/~farmacia/ppt/Chagas_2013.pdf) >. Acesso em: 27 nov.2014.

DOMINGUEZ, M.; TORANO, A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of Leishmania infection. **J Exp Med**, v. 189, n. 1, p. 25-35, 1999.

DZUBA, B. et al. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 3, p. 183 – 9, 2007.

FAUCHER, J. F.; BALTZ, T.; PETRY, K. G. Detection of an "epimastigote-like" intracellular stage of Trypanosoma cruzi. **Parasitol Res**, v. 81, n. 5, p. 441-3, 1995.

FERGUSON, M. A. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 352, n. 1359, p. 1295-302, 1997.

\_\_\_\_\_. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 17, p. 2799-2809, 1999.

FERREIRA, M. P. et al. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-L. brasiliensis antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 215-7, 2006.

FERREIRA, M. U. **Parasitologia contemporânea**. Rio de Janeiro: Sataiva, 2012.

GACHELIN, G.; OPINEL, A. The reception by French physicians of Chagas' discovery of Trypanosoma cruzi and American trypanosomiasis (1909-1925). **Hist Cienc Saude Manginhos**, v. 16 Suppl 1, p. 35-56, 2009.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 115-21, 2009.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. D.E. American cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli. In: **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

GROOT, H. Estudios sobre los tripanosomas humanos clasificados como *T. rangeli* con especial referencia a su evolución en *Rhodnius prolixus* y a su comparación con *T. ariarii*. **An. Soc. Biol. Bogotá**, v. 6, n. 3, p. 109-126, 1954.

HAIR, J. F. et al. **Multivariate data analysis**. 5. ed. New jersey: Prentice Hall, 1998.

HEISE, N.; ALMEIDA, M. L.; FERGUSON, M. A. Characterization of the lipid moiety of the glycosylphosphatidylinositol anchor of Trypanosoma cruzi 1G7-antigen. **Mol Biochem Parasitol**, v. 70, n. 1-2, p. 71-84, 1995.

HELM, D. et al. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **J Gen Microbiol**, v. 137, n. 1, p. 69-79, 1991.

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

ILGOUTZ, S. C.; MCCONVILLE, M. J. Function and assembly of the Leishmania surface coat. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 9, p. 899-908, 2001.

JACOBINA, R. R.; GELMAN, E. A. Juliano Moreira and the Gazeta Medica da Bahia. **História,Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 15, n. 4, 2008.

JENKINS, F. A.; WHITE, H. E. **Fundamentals of Optics**. 4. ed. [s.l]: McGraw-Hill Higher Education, 2001.

KAUPPINEN, J; PARTANEN, J. **Fourier Transforms in Spectroscopy**. [s.l]: Wiley-VCH, 2001.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, v. 22, n. 9, p. 439-45, 2006.

KAMNEV, A. A. et al. Instrumental analysis of bacterial cells using vibrational and emission Mossbauer spectroscopic techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 573, p. 445-452, 2006.

KENNEDY, P. **A Guide to Econometrics**. 6. ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2008

KIRSCHNER, C. et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 5, p. 1763-70, 2001.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549-559, 2007.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev Pan-Amaz Saude** v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-27, 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans D. A, editors. **Biology of the Kinetoplastida**. London; New York & San Francisco: [s.n], 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Evolution, classification and geographical distribution**. Academic Press, 1987.

LEVINE, N. D. et al. A newly revised classification of the protozoa. **J Protozool**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LINNE, M. A. **Spectroscopic Measurement. An Introduction to the Fundamentals**. Academic Press, 2002.

MAITY, J. P. et al. Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 116, p. 478-484, 2013.

MAQUELIN, K. et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, n. 3, p. 255-271, 2002.

MARR, J. J.; MULLER, M. **Biochemistry and Molecular of parasites**. Academic Press Inc, 1995.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012a.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. **Trop Med Int Health**, v. 17, n. 9, p. 1066-75, 2012b.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging Anthrozoosis and possibilities for Their Control. **Cad. Saúde Públ**, v. 10, n. 2, p. 359 -375, 1994.

MCCONVILLE, M. J.; BACIC, A. A family of glycoinositol phospholipids from Leishmania major. Isolation, characterization, and antigenicity. **J Biol Chem**, v. 264, n. 2, p. 757-66, 1989.

MCCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochem J**, v. 294 ( Pt 2), p. 305-24, 1993.

- MCCONVILLE, M. J. et al. Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. **Biochem J**, v. 310 ( Pt 3), p. 807-18, Sep 15 1995.
- MCCONVILLE, M. J. et al. Structure of the lipophosphoglycan from Leishmania major. **J Biol Chem**, v. 265, n. 32, p. 19611-23, 1990.
- MENEGUETTI, D. U. et al. First report of Rhodnius montenegrensis (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) infection by Trypanosoma rangeli. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 3, p. 374-6, 2014.
- MIRANDA, A. et al. The calmodulin intergenic spacer as molecular target for characterization of Leishmania species. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 35, 2014.
- MOHAN, J. **Organic Spectroscopy: Principles and Aplicações**. [s.l]: Narosa Publishing House, 2000.
- MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. **The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic Animals**. Londres: Taylor e Francis, 1983.
- MONTGOMERY, S. P. et al. Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 5, p. 814-8, May, 2014.
- MORETTIN, L. G. **Estatística Básica: Inferência**. 1. ed. [s.l]: Makron Books, 2000.
- NYALWIDHE, J; MAIER, U. G; LINGELBACH, K. **Intracellular parasitism: cell biological adaptations of parasitic protozoa to a life inside cells**. *Zoology*,v 106, p. 341-348 2003.
- NAUMANN, D. **Infrared Spectroscopy in Microbiology**. **John Wiley & Sons Ltd, Chichester**, p. 102-131, 2000.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9. ed. São Paulo: Editora: Atheneu, 1998.
- NIETO, P. D. et al. Comparison of two immunochromatographic assays and the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of Trypanosoma cruzi infection in dogs in south central Louisiana. **Vet Parasitol**, v. 165, n. 3-4, p. 241-7, 2009.
- NIEVES, E.; PIMENTA, P. F. P Development of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis in the sand fly Lutzomyia migonei (Diptera: Psychodidae) **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 134-140, 2000.
- PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.
- PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Leishmanioses tegumentares: Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio Janeiro, 1988.
- PIMENTA, P. F. P. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v. 115, p. 359-369, 1997.

PRATES, D. B. et al. Lutzomyia longipalpis saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 90, n. 3, p. 575-82, 2011.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

ROBERTS, C. W. et al. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Mol Biochem Parasitol**, v. 126, n. 2, p. 129-42, 2003.

SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of Leishmania promastigotes. **Infect Agents Dis**, v. 1, n. 4, p. 200-6, 1992.

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

SANDT, C. et al. FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. **J Appl Microbiol**, v. 101, n. 4, p. 785-97, 2006.

SANTOS, S. O. et al. Incrimination of Lutzomyia cruzi as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 12, n. 3, p. 315-7, 1998.

SARAVIA, N. G. et al. The relationship of Leishmania braziliensis subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 159, n. 4, p. 725-35, 1989.

SATOH, F. et al. Sudden death caused by chronic Chagas disease in a non-endemic country: Autopsy report. **Pathol Int**, v. 60, n. 3, p. 235-40, 2010.

SCARISBRICK, J. J. et al. Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis. **Travel Med Infect Dis**, v. 4, n. 1, p. 14-21, Jan, 2006.

SCHMITT, J.; FLEMMING, H. C. FTIR - spectroscopy in microbial and material analysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, n. 1, p. 1-11, 1998.

SCHNEIDER, P. et al. Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite Leishmania major. **Biochem J**, v. 295 ( Pt 2), p. 555-64, 1993.

SERRANO, A. A. et al. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of Trypanosoma cruzi changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 27244-53, 1995.

SHAHBAZI, F. et al. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. **Parasitol Res.**, v. 103, p. 1159-1162, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânica**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINAN- Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde. Disponível em: < <http://sinan.saude.gov.br/sinan/login/login.jsf> >. Acesso em: 2014.

SOUSA, M. A. Morphobiological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its Distinction from other Trypanosomes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 205-210, 1999.

SOUZA, G. S. **Introdução aos modelos de regressão linear e não-linear**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 1998.

SLIDEPLAYER. 2016..Disponível em : < <http://slideplayer.com.br/slide/1271247/>>. Acesso em 05 maio 2016.

SPENCE, A. K., FT-IR spectroscopic analysis of kaolinite–microbial interactions. **Vibrational Spectroscopy**, v. 61, p. 151 -155, 2012.

STEINDEL, M. et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol Biochem Parasitol**, v. 60, n. 1, p. 71-9, 1993.

STUARTS, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications**. [s.l]: John Wiley & Sons, 2004.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 5, p. 951-8, 2002.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **J Immunol**, v. 175, n. 12, p. 8346-53, 2005.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático:Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi**.1.ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ,Consórcio Cederj, 2011.

TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYREBC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental parasitology**, v.114, n.4, p.279 - 288, 2006.

TRONCARELLI, M. Z. et al. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 118-123, 2009.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 46, p. 65-94, 1992.

TWARDOWSKI, J.; ANZENBACHER, P. **Raman and IR spectroscopy in Biology and Biochemistry**. 1.ed. [s.l]: Ellis Horwood, 1994.

VALLEJO, G. A. et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Trop**, v. 72, n. 2, p. 203-12, 1999.

VANÇAN, S. I. S. **Phytomonas Serpens: caracterização da piruvato/indolpiruvato descaboxilase e funcionalidade da auxina produzida**. São Paulo, 2012. 25f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

VANCE, J. E.; VANCE, D. E. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Phospholipid biosynthesis in eukaryotes**. 4. ed. Elsevier B.V. p. 213-244, 2008.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

VIAL, H. J. et al. Phospholipids in parasitic protozoa. **Mol Biochem Parasitol**, v. 126, n. 2, p. 143-54, 2003.

WAHAB, A. Infrared Absorption Studies on Some New Potential Antimicrobial Diazotization product of 4 – aryl – Thiosemicarbazides. **Orient. J. Chem**, v. 27, n. 3, p. 1199-1202, 2011.

WALDMAN, G. **Introduction to light: the physics of light, vision, and color** Mineola: Dover Publications, 2002.

WANG, H. et al. Phenotypic Characterization of Shewanella oneidensis MR-1 under Aerobic and Anaerobic Growth Conditions by Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and High-Performance Liquid Chromatography Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6266-6276, 2010.

WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**.v.58, n. 301, p.236 -244, 1963.

WARTEWIG, S. **IR and Raman Spectroscopy Fundamental Processing**. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, 2003.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cad Saude Publica**, v. 24, n. 12, p. 2937-40, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. 2013. Disponível em: < [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/) >. Acesso em: 07 nov. 2013.

XAVIER, S. C. C. et al. Distantiae Transmission of Trypanosoma cruzi: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 6, p. 337-48, 2004.

ZEMANOVA, E. et al. The Leishmania donovani complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 2, p. 149-60, 2007.



ANEXO A: Artigo - Differentiation of *Leishmania* species by FT – IR spectroscopy

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 142 (2015) 80–85



Contents lists available at ScienceDirect  
Spectrochimica Acta Part A: Molecular and  
Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/saa](http://www.elsevier.com/locate/saa)Differentiation of *Leishmania* species by FT-IR spectroscopy

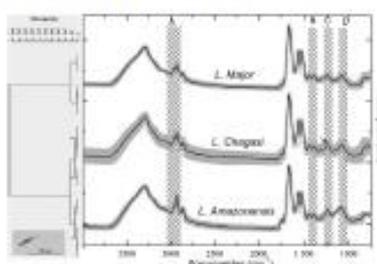
Josafá C. Aguiar\*, Josane Mittmann, Isabelle Ferreira, Juliana Ferreira-Strixino, Leandro Raniero

Laboratório de Nanosensores – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, Síndico Hefumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244-000 São José dos Campos-SP, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Differentiation of *L. amazonensis*, *L. chagasi* and *L. major* species by FTIR.
- Four spectral regions was able to identify *Leishmania* sp. by Cluster analysis.
- The polysaccharide region showed greater differences among the *Leishmania* species.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 June 2014

Received in revised form 11 December 2014

Accepted 5 January 2015

Available online 13 January 2015

## Keywords:

*L. amazonensis**L. chagasi**L. major*

FT-IR

Cluster analysis

Biochemistry

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic infectious disease caused by protozoa that belong to the genus *Leishmania*. It is transmitted by the bite of an infected female Sand fly. The disease is endemic in 88 countries Desjeux (2001) [1] (16 developed countries and 72 developing countries) on four continents. In Brazil, epidemiological data show the disease is present in all Brazilian regions, with the highest incidences in the North and Northeast. There are several methods used to diagnose leishmaniasis, but these procedures have many limitations, are time consuming, have low sensitivity, and are expensive. In this context, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) analysis has the potential to provide rapid results and may be adapted for a clinical test with high sensitivity and specificity. In this work, FT-IR was used as a tool to investigate the promastigotes of *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*, and *Leishmania major* species. The spectra were analyzed by cluster analysis and deconvolution procedure based on spectra second derivatives. Results: cluster analysis found four specific regions that are able to identify the *Leishmania* species. The dendrogram representation clearly indicates the heterogeneity among *Leishmania* species. The band deconvolution done by the curve fitting in these regions quantitatively differentiated the polysaccharides, amide III, phospholipids, proteins, and nucleic acids. *L. chagasi* and *L. major* showed a greater biochemistry similarity and have three bands that were not registered in *L. amazonensis*. The *L. amazonensis* presented three specific bands that were not recorded in the other two species. It is evident that the FT-IR method is an indispensable tool to discriminate these parasites. The high sensitivity and specificity of this technique opens up the possibilities for further studies about characterization of other microorganisms.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Introduction

*Leishmania*

Parasites of the genus *Leishmania* belong to the Kinetoplastida order and Trypanosomatidae family [2,3]. These parasites cause

\* Corresponding author.

E-mail address: [josafa\\_aguiar@hotmail.com](mailto:josafa_aguiar@hotmail.com) (J.C. Aguiar).

**ANEXO B:** Artigo - Differentiation between *Trypanosome* genus (*T. cruzi* species) and *Leishmania* genus (*L. chagasi* and *L. braziliensis* species) by FT-IR





My EES Hub available for consolidated users... [more](#)

Version: [EES 2016.3.1](#)

Contact us 

[Help ?](#)

Username: [josafa\\_aguiar@hotmail.com](mailto:josafa_aguiar@hotmail.com)

Switch To: Author | Go to: [My EES Hub](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

**Submissions Being Processed for Author [Josafá Carvalho Aguiar](#)**

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	VIBSPEC-D-16-00065	Differentiation between Trypanosome genus ( <i>T. cruzi</i> species) and Leishmania genus ( <i>L. chagasi</i> and <i>L. braziliensis</i> species) by FT-IR.	Apr 20, 2016	Apr 27, 2016	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

**ANEXO C: Artigo - Development of methodology for identification of the *T. cruzi*, *T. rangeli*, and the *L. chagasi* species by FT – IR spectroscopy**

ScholarOne Manuscripts™	Josafá Aguiar ▾	<a href="#">Instructions, Forms &amp; Policies</a>	<a href="#">Help</a>	<a href="#">Log Out</a>
<b>IOP</b>   Journal of Physics D: Applied Physics				
<a href="#">Main Menu</a> / <a href="#">Author Dashboard</a>				

My Manuscripts	Author Resources
<ul style="list-style-type: none"> <li>0 <a href="#">Unsubmitted and Manuscripts in Draft</a></li> <li>0 <a href="#">Resubmitted Manuscripts in Draft</a></li> <li>0 <a href="#">Revised Manuscripts in Draft</a></li> <li>1 <a href="#">Submitted Manuscripts</a></li> <li>0 <a href="#">Manuscripts with Decisions</a></li> <li>0 <a href="#">Manuscripts I Have Co-Authored</a></li> <li>0 <a href="#">Withdrawn Manuscripts</a></li> <li>0 <a href="#">Invited Manuscripts</a></li> </ul>	<p> <a href="#">Click here</a> to submit a new manuscript</p> <p>This section lists the subjects of the five most recent e-mails that have been sent to you regarding your submission(s). To view an e-mail, click on the link. To delete an e-mail from this list, click the delete link.</p> <p style="text-align: right;"> <a href="#">Your submission to J. Phys. D: Appl. Phys.: JPhysD-109651 (14-Jun-2016)</a>      <a href="#">Delete</a> </p>

#### Submitted Manuscripts

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
JPhysD-109651	Development of methodology for identification of the <i>T. cruzi</i> , <i>T. rangeli</i> , and the <i>L. chagasi</i> species by FT – IR spectroscopy <a href="#">[View Submission]</a> <a href="#">(Cover Letter)</a>	14-Jun-2016	14-Jun-2016	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manuscript Received</li> </ul> <a href="#">Copyright Form</a> due: 29-Jun-2016
				 <a href="#">top</a>

**ANEXO D:** Artigo - Amniotic membrane: An option for the treatment of induced injury of the Achilles tendon in rats



**Amniotic membrane: An option for the treatment of induced injury of the Achilles tendon in rats**

Journal:	<i>Connective Tissue Research</i>
Manuscript ID	GCTS-2015-0140.R1
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	30-Mar-2016
Complete List of Authors:	Arisawa, Emilia Anqela; Universidade do Vale do Paraiba, Health Science NICODEMO, Mariana; Universidade do Vale do Paraiba, das Neves, Lia; Universidade do Vale do Paraiba, AQUIAR, JOSAFÁ; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins BRITO, Flaviane; Universidade do Vale do Paraiba, FERREIRA, Isabelle; Universidade do Vale do Paraiba SANT'ANNA, Luciana; Universidade do Vale do Paraiba, RANIERO, Leandro; Universidade do Vale do Paraiba, BARJA, Paulo; Universidade do Vale do Paraiba, MARTINS, Rodrigo; Universidade de Mogi das Cruzes
Keywords:	Achilles Tendon, Amnion, Inflammation, Collagen, Tendon injury

**ANEXO E: Artigo - Analysis of serum by Fourier transform infrared Spectroscopy for diagnosis of stress in athletes**

RESEARCH ON  
**BIOMEDICAL  
ENGINEERING**

**Analysis of serum by Fourier transform infrared Spectroscopy for diagnosis of stress in athletes.**

Journal:	<i>Research on Biomedical Engineering</i>
Manuscript ID	RENG-2016-0012
Manuscript Type:	Original manuscript
Date Submitted by the Author:	17-Feb-2016
Complete List of Authors:	LEMES, LIA ; Universidade do Vale do Paraiba, CAETANO JUNIOR, PAULO; Universidade do Vale do Paraiba, FERREIRA-STRIXINO, JULIANA; Universidade do Vale do Paraiba, IP&D AGUIAR, JOSAFÁ; Universidade do Vale do Paraiba Raniero, Leandro; Universidade do Vale do Paraiba, Instituto de Pesquisa Desenvolvimento - LEVB
Journal's main topics:	Blood and biofluids < Physiological Systems modeling and simulation
Article keywords:	Infrared Spectroscopy, Blood, Physiological Stress, Sports

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## ANEXO F: Artigo – Isokinetic muscle performance and salivary immune-endocrine responses in handball players by Fourier transform infrared spectroscopy

G Model  
RAMD 1121-7

ARTICLE IN PRESS

Rev Andal Med Deporte. 2016;xxx(xx):xxx-xxx



Revista Andaluza de  
Medicina del Deporte

[www.elsevier.es/ramd](http://www.elsevier.es/ramd)



Original article

### 1 Isokinetic muscle performance and salivary immune-endocrine 2 responses in handball players by Fourier transform infrared 3 spectroscopy

4 **P.C. Caetano Júnior<sup>a,\*</sup>, J. Carvalho Aguiar<sup>a</sup>, J. Ferreira-Strixino<sup>a</sup>, J. José Raniero<sup>a</sup>**

5 *Laboratory of Nanosensors, Institute for Research and Development (IP&D), University of Vale of Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi, 2011, São José dos Campos, São Paulo*  
6 *12244-000, Brazil*

#### 8 ARTICLE INFO

##### 10 Article history:

11 Received 21 February 2015

12 Accepted 16 November 2015

13 Available online xxx

##### 14 Keywords:

15 Infrared spectroscopy

16 Fourier transform

17 Athletic performance

18 Sports medicine

#### 8 ABSTRACT

**Objective:** Evaluate isokinetic muscle performance of the hamstring and quadriceps muscles in male handball players, as well as verify the effect of handball match on salivary cortisol and immunoglobulin A by Fourier transform infrared spectroscopy.

**Method:** The isokinetic parameters evaluated were peak torque, fatigue index, and hamstring/quadriceps peak torque ratio. Saliva samples were collected before and after a simulated handball match, as well as after 2 h of recovery. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy was based on infrared region of the pure substances (cortisol and human salivary cortisol and immunoglobulin A).

**Results:** No significant difference was found between the non-dominant and dominant lower limb at 60 and 180°/s, in extension and flexion for variables of peak torque and fatigue index. The hamstring/quadriceps ratio at 60°/s was lower than at 180°/s. The main absorption bands of cortisol are in the region (1180–955 cm<sup>-1</sup>) and human salivary cortisol and immunoglobulin A bands in the region (1584–1489 cm<sup>-1</sup>). The saliva samples collected before and after match showed no significant difference. The variation of cortisol per playing positions was positively correlated with session rate of perceived exertion.

**Conclusions:** The handball players had good muscle performance of the lower limbs in the isokinetic evaluation. The Fourier transform infrared spectroscopy analysis identified the main absorption bands of cortisol and salivary cortisol and immunoglobulin A, as well as playing positions that demand higher stress levels, through changes of bands related to salivary cortisol.

© 2016 Consejería de Turismo y Deporte de la Junta de Andalucía. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## ANEXO G: Resumo - Differentiation of Leishmania by FTIR

**XXXVII ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA  
DA MATÉRIA CONDENSADA**  
XXXVII Brazilian Meeting on Condensed Matter Physics**CERTIFICADO**

O Comitê Organizador certifica que o trabalho Differentiation of Leishmania by FTIR de autoria de J. C. Aguiar, J. Mittmann, I. Ferreira, J. Ferreira-Strixino, L. Raniero foi apresentado na sessão BIO - BIOPHYSICS no XXXVII Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, realizado de 12 a 16 de maio de 2014 na Costa do Sauípe, BA, Brasil.



140-1162-1

Costa do Sauípe, 16 de maio de 2014

  
Andrea Brito Lotgé  
Coordenadora de Programa  
Gustavo Martini Dalpian  
Coordenador Geral

**ANEXO H: Resumo - Biochemical differentiation between the trypanosoma cruzi and leishmania amazonensis by FT - IR**



www.SPIE.org  
 help@spie.org  
 Tel: +1 360 676 3200  
 Fax: +1 360 647 1445  
 Mail: PO Box 10, Bellingham, WA, 98227-0010 USA  
 Ship: 1000 20th Street, Bellingham, WA, 98225-6705 USA

May 25, 2015

Josafá Carvalho Aguiar  
 Univ. do Vale do Paraíba  
 Lab de Nanossenso  
 Ave Shishima Hifumi  
 Urbanova Sao Jose dos Campos SP 12244-000  
 Brazil

**CONFIRMATION OF ATTENDANCE**

This is to confirm that Josafá Carvalho Aguiar  
 Univ. do Vale do Paraíba  
 attended

SPIE Biophotonics South America  
 23 - 25 May 2015  
 Rio de Janeiro, Brazil

**Title of the Paper Presented: Biochemical differentiation between the trypanosoma cruzi and leishmania amazonensis by FT - IR**  
**Authors: Josafa Carvalho Aguiar, Josane Mittmann, Paulo Caetano, Juliana Strixino, Leandro J. Raniero, Univ. do Vale do Paraíba (Brazil)**  
**Paper Number: 9531-101**

Marilyn Gorsuch  
 Event Manager

**SPIE.** BIOPHOTONICS  
 SOUTH AMERICA

**ANEXO I: Resumo - Band deconvolution analysis of infrared spectra of the saliva for monitoring physiological stress in athletes**



www.SPIE.org  
 help@spie.org  
 Tel: +1 360 676 3290  
 Fax: +1 360 647 1445  
 Mail: PO Box 10, Bellingham, WA, 98227-0010 USA  
 Ship: 1000 20th Street, Bellingham, WA, 98225-6705 USA

May 25, 2015

Josafá Carvalho Aguiar  
 Univ. do Vale do Paraíba  
 Lab de Nanossenso  
 Ave Shishima Hifumi  
 Urbanova Sao Jose dos Campos SP 12244-000  
 Brazil

**CONFIRMATION OF ATTENDANCE**

This is to confirm that Josafá Carvalho Aguiar  
 Univ. do Vale do Paraíba  
 attended

SPIE Biophotonics South America  
 23 - 25 May 2015  
 Rio de Janeiro Brazil

**Title of the Paper Presented: Band deconvolution analysis of infrared spectra  
 of the saliva for monitoring physiological stress in athletes**

**Authors: Paulo Caetano, Josafa Carvalho Aguiar, Juliana Strixino, Leandro J.  
 Raniero, Univ. do Vale do Paraíba (Brazil)  
 Paper Number: 9531-105**

Marilyn Gorsuch  
 Event Manager

**SPIE. BIOPHOTONICS  
 SOUTH AMERICA.**

## ANEXO J: Resumo - Human amniotic membrane: An option to the treatment of Achilles tendon induced tendinopathy



Luciana Barros Sant'Anna et al., J Tissue Sci Eng 2015, 6:2  
<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7552.S1.022>

# 4<sup>th</sup> International Conference on Tissue Science and Regenerative Medicine

July 27-29, 2015 Rome, Italy

### Human amniotic membrane: An option to the treatment of Achilles tendon induced tendinopathy

Luciana Barros Sant'Anna, Mariana de Castro Nicodemo, Lia Renó das Neves, **Josafa Carvalho Aguiar**, Flaviane de Souza Brito, Isabelle Ferreira, Leandro José Raniero, Paulo Roxo Barja and Emilia Angela Loschiavo Arisawa  
 University of Paraíba Valley, Brazil

Human placenta at term which is usually discarded as medical waste has attracted much attention as a source of tissues and stem/progenitor cells for research and potential clinical applications. The anti-inflammatory, anti-scarring and wound healing properties of amniotic membrane (AM) could make her useful for development of new therapeutic approaches in regenerative medicine and warrant studies of their effects in animal models of inflammatory and fibrotic pathologies. Biliary fibrosis and resultant cirrhosis are among the most common outcome of chronic liver disease. Currently, liver transplantation remains the only effective treatment. Here, we investigated if the intact hAM has the capacity to reduce a well-established liver fibrosis induced in rat by bile duct ligation (BDL) model. After 2 weeks from BDL, the liver was covered with a fragment of hAM or left untreated. Six weeks later, the fibrosis was first assessed by semi-quantitative scoring systems and by Cell Profiler digital image analysis to quantify the area occupied by ductular reaction, activated myofibroblasts, collagen deposition and by transforming growth factor (TGF)-1, the main profibrogenic factor in chronic liver disease. After 6 weeks of BDL, AM rats showed a significant reduction in the severity of fibrosis. The amount of collagen deposition, the ductular reaction and the myofibroblasts were all reduced to about 50% of levels observed in BDL rats. AM was able to markedly attenuated TGF-1 immunorexpression in liver. These findings suggest that hAM patching is useful for treating cholestatic fibrosis and the mechanism was partly by reduction in the TGF-1 expression.

#### Biography

Luciana Barros Sant'Anna obtained her Master in Buco Dental Biology and Pathology (2001) and PhD in Buco Dental Biology- focus on Histology (2004) from Campinas University, SP, Brazil. In 2009, she completed her Postdoctoral studies in the field of human adult stem cells with focus on cells and tissues derived from placenta at Centro di Ricerca E. Menni, Fondazione Poliambulanza, Istituto Ospedaleiro, Italy. Currently, she is Researcher of Immunology Laboratory of the Institute of Research & Development from University of Vale do Paraíba, São José dos Campos, Brazil and Professor of Embriology, Histology and Anatomy of the same University. Since 2009 she is member of International Placenta Stem Cell Society (IPLASS).

[lucianabsa@gmail.com](mailto:lucianabsa@gmail.com)

## ANEXO L: Resumo - Differentiation of saliva collected in resting and in stress by FT-IR spectroscopy

**Encontro de Física 2016**  
**03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN**



### Declaração

Declaramos que o trabalho *Differentiation of saliva collected in resting and in stress by FT-IR spectroscopy* de autoria de **P. C. Caetano Júnior, J. C. Aguiar, L. Raniero** foi aceito para apresentação no(a) **Encontro de Física 2016** no período de 03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN.

Apresentador: **J. C. Aguiar** (Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia)  
Inscrição/Trabalho: **421/2**

A forma de apresentação será informada em breve.

São Paulo, 15 de junho de 2016

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'A' followed by a horizontal line extending to the right.

Comitê Organizador  
ENF2016

---

**ANEXO M: Resumo - Differentiation of *Trypanosoma* species by FT - IR spectroscopy**

**Encontro de Física 2016**  
**03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN**

**Declaração**

Declaramos que o trabalho **Differentiation of *Trypanosoma* species by FT - IR spectroscopy** de autoria de **J. C. Aguiar, P. C. Caetano Júnior, L. Raniero** foi aceito para apresentação no(a) **Encontro de Física 2016** no período de 03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN.

Apresentador: **J. C. Aguiar** (Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia)  
Inscrição/Trabalho: **421/3**

A forma de apresentação será informada em breve.

São Paulo, 15 de junho de 2016

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'A' followed by a horizontal line that extends to the right and then loops back under the initial.

Comitê Organizador  
ENF2016

---

**ANEXO N: Resumo - Parasites Characterization by FT - IR spectroscopy**

**Encontro de Física 2016**  
**03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN**

**Declaração**

Declaramos que o trabalho **Parasites Characterization by FT - IR spectroscopy** de autoria de **J. C. Aguiar, O. O. Comparato Filho, M. A. Cândido, L. Raniero** foi aceito para apresentação no(a) **Encontro de Física 2016** no período de 03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN.

Apresentador: **J. C. Aguiar** (Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia)  
Inscrição/Trabalho: **421/4**

A forma de apresentação será informada em breve.

São Paulo, 15 de junho de 2016

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'A' followed by a horizontal line that extends to the right and then loops back down.

Comitê Organizador  
ENF2016

---

**ANEXO O: Resumo – Label – Free Detection of Paracoccidioides Brasiliensis by Gold Nanoparticles Using gp-43 Sequence**



**Encontro de Física 2016**  
**03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN**

**Declaração**

Declaramos que o trabalho LABEL-FREE DETECTION OF PARACOCCIDIoidES BRASILIENSIS BY GOLD NANOPARTICLES USING gp-43 SEQUENCE de autoria de Olavo de Osti Comparato Filho, Marcela Aparecida Cândido, Guilherme Lemes, Leandro Raniero, Josafá Aguiar foi aceito para apresentação no(a) Encontro de Física 2016 no período de 03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN.

Apresentador: **Olavo de Osti Comparato Filho** (Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba)  
Inscrição/Trabalho: 59/1

A forma de apresentação será informada em breve.

São Paulo, 16 de junho de 2016

Comitê Organizador  
ENF2016

---

**ANEXO P: Resumo – Influence of oligonucleotide on the stability of gold nanoparticles****Encontro de Física 2016**  
**03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN****Declaração**

Declaramos que o trabalho **Influence of oligonucleotide on the stability of gold nanoparticles, in the presence of different salts solutions** de autoria de **M. A. Cândido, O. O. Comparato Filho, G. Lemes, M. L. Castilho, J. C. Aguiar, L. Raniero** foi aceito para apresentação no(a) **Encontro de Física 2016** no período de 03 a 07 de setembro de 2016, Natal, RN.

Apresentador: **M. A. Cândido** (Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos - SP, Brazil.)  
Inscrição/Trabalho: **1206/1**

A forma de apresentação será informada em breve.

São Paulo, 16 de junho de 2016

Comitê Organizador  
ENF2016

---