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

OLAVO DE OSTI COMPARATO FILHO

DETECÇÃO MOLECULAR, A BAIXO CUSTO, DO PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO LABEL-FREE

São José dos Campos, S.P. 2017.

#### OLAVO DE OSTI COMPARATO FILHO

## DETECÇÃO MOLECULAR, A BAIXO CUSTO, DO PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO LABEL-FREE

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

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero.

#### OLAVO DE OSTI COMPARATO FILHO

# DETECÇÃO MOLECULAR, A BAIXO CUSTO, DO *PARACOCCIDIOIDES* BRASILIENSIS PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO *LABEL-FREE*

Dissertação	de Mestrado aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em	Física e Astronomia, do Programa de Pós-Graduação em Física e
Astronomia,	da área de concentração em Física da Matéria Condensada, do Instituto
de Pesquisa	e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos
Campos, SP	, pela seguinte banca examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Oli Dors Júnior (UniVap)
Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero (UniVap)
Membro Ext.: Profa. Dra. Ana Maria do E. Santo (UniFesp)
Membro Interno: Profa. Dra. Cristina P. Soares (UniVap)

Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D - UniVap

São José dos Campos, 23 de fevereiro de 2017.

#### **DEDICATÓRIA**

Aos professores: licenciados, especialistas, mestres e doutores envolvidos com a Ciência.

Aos alunos de pós-graduação Stricto Sensu envolvidos com área de pesquisa.

Aos amores da minha vida, sempre: Ana Paula e Paloma.

#### **AGRADECIMENTOS**

Aos professores: Elisangela Pavanelo, Francisco Carlos Rocha Fernandes, Cassio Leandro Dal Ri Barbosa e Iuri Rojahn da Silva pelo incentivo ao ingresso no mestrado, parceria e confiança.

Aos amigos, colegas, parceiros de estudos, pesquisas e trabalhos do laboratório de Nanossensores do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, que me receberam e apoiaram durante toda a minha estadia do período da minha formação: Bianca, Bruna, Giulia, Guilherme, Josafá, Lia, Lucas, Maiara, Marcela, Nathanne, Paulo e Thaís.

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

À Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP e ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D pelo programa, infraestrutura e condições para a minha formação e o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

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

À minha esposa Ana Paula e filha Paloma pelo apoio incondicional e paciência durante todo esse período de estudo, aprendizado e formação.

#### **RESUMO**

Nanotecnologia e nanopartículas são temas cada vez mais presentes nas pesquisas e trabalhos científicos. Novas formas de tecnologia que possibilitem o estudo da interação dessas partículas com biomoléculas, tem proporcionado o surgimento de diferentes técnicas de diagnóstico de doenças. O objetivo deste trabalho foi realizar a Paracoccidioides identificação molecular do fungo brasiliensis nanopartículas de ouro e uma sequência de DNA como uma ferramenta para detecção. Este fungo termodimórfico é causador da Paracoccidioidomicose, doença granulomatosa crônica com grande variedade de manifestações clínicas localizadas ou disseminadas que podem evoluir para a letalidade. Para esse estudo, nanopartículas de ouro foram sintetizadas por redução do cloreto de ouro por citrato de sódio, obtendo-se uma solução com um máximo de absorção em torno de 523 nm, obtendo-se como resultado, partículas com formato esférico e diâmetro médio de 22 nm. As sequências gênicas específicas do Paracoccidioides brasiliensis utilizadas para os testes de complementação de sequência foram GP27 e GP43. A metodologia de detecção colorimétrica de DNA baseada em nanopartícula de ouro escolhida para a identificação do fungo foi a *Label-free*. Neste método, nanopartículas são cobertas ou não por oligonucleotídeos, permitindo que as mesmas se aglomerem, mudando a coloração da solução, ou não se aglomerem, mantendo a coloração da solução. Os oligonucleotídeos livres das coberturas das partículas seriam complementares às seguências de DNA do fungo; identificando assim, a presença do mesmo. A coloração tendendo para o azul representa o resultado do teste positivo (identificação molecular do fungo), a tendendo para o vinho, o resultado do teste negativo (não identificação). Inicialmente foram estudadas concentrações de soluções salinas (CaCl2, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e NaCl) que seriam responsáveis por induzir o processo de aglomeração. Posteriormente, feitos testes envolvendo oligonucleotídeos e a influência na cobertura da área superficial das nanopartículas. Os testes finais, utilizando a metodologia Label-free demonstraram resultados satisfatórios na identificação molecular do DNA do Paracoccidioides brasiliensis.

**Palavras-chave:** Nanotecnologia. Nanopartículas de ouro. Paracoccidioidomicose. *Label-freel*. DNA. Diagnóstico de doenças.

## MOLECULAR DETECTION, AT LOW COST, OF PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS BY THE COLORIMETRIC LABEL-FREE METHOD

#### **ABSTRACT**

Nanotechnology and nanoparticles are increasingly present issues in scientific research and development. New technologies that enable the study of the interaction of these particles with biomolecules has allowed the emergence of different techniques for diagnoses of disease. The aim of this study was to identify the presence of P. brasiliensis using gold nanoparticles and a DNA sequence as a tool for detection. This thermos-dependent dimorphic fungus causes the Paracoccidioidomycosis, chronic granulomatous disease with a variety of clinical manifestations for disseminated that could lead to lethality. For this study, we synthesized gold nanoparticles by reduction of gold chloride with sodium citrate to give a solution having a maximum absorption around 523 nm, considered geometrically spherical, with an average diameter of 22 nm. The specific gene sequences of P. brasiliensis DNA used for the following complementary tests were GP27 and GP43. Label-free is a colorimetric detection method based on DNA gold nanoparticles to identify the fungi. In this method, nanoparticles are covered or not by oligonucleotides, allowing them to agglomerate, changing the solution color, from agglomerating or otherwise, keeping the solution color. The free primers from the particle covers would be complementary to the DNA sequences of the fungus, thereby identifying the presence thereof. The color tends to blue represents the positive test, tending to the wine negative test. Initially saline concentrations were studied (CaCl2, KCl, LiCl, MgCl2.6H2O e NaCl) that would be responsible for this agglomeration process. Subsequently made tests involving oligonucleotides and their influence on nanoparticles coverage. The final tests, using Label-free method demonstrated efficacy in DNA identification of P. brasiliensis.

**Key words:** Nanotechnology. Gold nanoparticles. Paracoccidioidomycosis. *Labelfree*. DNA. Disease diagnosis.

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Tabela cor absorvida e observada por um composto	.18
Figura 2: Diagrama ilustrativo do mecanismo do teste Label-free	.24
Figura 3: Micrografias eletrônicas de varredura Paracoccidioides brasiliensis: a) levedur	ra
e b) micélio	.26
Figura 4: Representação do Potencial Zeta e a dupla camada elétrica na superfície de	
nanopartículas	.30
Figura 5: Fotografias da progressão/sequência da Síntese de AuNPs: a) solução de	
cloreto de ouro aquecida e em agitador magnético até 98°C, b) adição de solução de	
citrato de sódio hidratado, c) início da reação de redução, d) solução coloidal de ouro	33
Figura 6: Condições de amplificação das sequências <i>GP</i> 27 e <i>GP4</i> 3	.36
Figura 7: Tubos com resultados colorimétricos dos testes: positivo (esq.) e negativo (dir	-
Figura 8: Gráfico da distribuição do tamanho das partículas dispersas, como sintetizada	as
Figura 9: Espectro UV visível da solução de AuNPs (a) e uma alíquota desta solução (b	
rigura 9. Espectio OV visivei da solução de Adivir s (a) e dina aliquota desta solução (t	•
Figura 10: A influência do aumento da concentração da solução salina de LiCl no	.44
espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs (a) e registro fotográfico das cores (b)	
	45
Figura 11: A influência do aumento da concentração da solução salina de CaCl <sub>2</sub> no	0
espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs	45
Figura 12: A influência do aumento da concentração da solução salina de KCI no	
	46
Figura 13: A influência do aumento da concentração da solução salina de NaCl no	. •
espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs	46
Figura 14: A influência do aumento da concentração da solução salina de MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	
espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs	
Figura 15: Gráfico comparativo da razão das absorbâncias entre as bandas 523 nm e 6	
nm em função do aumento das concentrações das soluções salinas. Da esquerda para	
direita, curva solução: CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, KCl, NaCl e LiCl	
Figura 16: A influência do aumento do recobrimento superficial pelo <i>gp27</i> , na presença	
solução de MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O no espectro do UV-Vis da solução coloidal de AuNPs	
Figura 17: A influência do aumento do recobrimento superficial pelo <i>gp27</i> na presença	
solução de KCL no espectro do UV-Vis da solução coloidal de AuNPs	
,	_

Figura 18: A influência do aumento do recobrimento superficial pelo <i>gp43</i> na presença d	la
solução de MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O no espectro do UV-Vis da solução coloidal de AuNPs	50
Figura 19: A influência do aumento do recobrimento superficial pelo gp43 na presença d	la
solução de KCI no espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs	51
Figura 20: Espectro UV-Vis dos testes <i>Label-free GP</i> 27 com solução MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (a) e	
registro fotográfico das cores (b)5	53
Figura 21: Análise estatística testes <i>Label-free GP27</i> com MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O. Testes	
colorimétricos (abcissas) e In a1/a2 (ordenadas)5	54
Figura 22: Espectro UV-Vis dos testes <i>Label-free GP</i> 27 com solução KCl (a) e registro	
fotográfico das cores (b)5	54
Figura 23: Análise estatística testes Label-free GP27 com KCI. Testes colorimétricos	
(abcissas) e ln a1/a2 (ordenadas)	55
Figura 24: Espectro UV-Vis dos testes <i>Label-free GP43</i> com solução MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (a) e	
registro fotográfico das cores (b)5	6
Figura 25: Análise estatística testes <i>Label-free GP43</i> com MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O. Testes	
colorimétricos (abcissas) e In a1/a2 (ordenadas)5	57
Figura 26: Espectro UV-Vis dos testes Label-free GP43 com solução KCl (a) e registro	
fotográfico das cores (b)5	57
Figura 27: Análise estatística testes Label-free GP43 com KCI. Testes colorimétricos	
(abcissas) e ln a1/a2 (ordenadas)	58

## LISTA DE EQUAÇÕES E TABELAS

Equação 1: Potencial produzido por um dipolo	21
Equação 2: Energia de interação entre momentos dipolares	21
Equação 3: Energia considerando ângulos polares	21
Equação 4: Momento dipolo considerando campo e polarizabilidade produzido pe	or cargas
e dipolos de outras moléculas	22
Equação 5: Energia das forças atrativas entre duas moléculas homopolares	22
Equação 6: Equação de Stokes-Einstein	29
Equação 7: Lei de Beer-Lambert	32
Equação 8: Concentração Molar	34
Equação 9: Diluição de soluções	34
Equação 10: Logaritmo neperiano de uma divisão	41
Tabela 1: Descrição dos <i>primers</i>	35
Tabela 2: Recobrimento de superfície das AuNPs	38

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AuNPs Nanopartículas de ouro

BAAR Bacilo Álcool-Ácido Resistentes

CEI Campo Eletromagnético Incidente

CG Citosina Guanina

DLS Espalhamento da Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering)

DNA Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

ELISA Ensaio imunoenzimático ligado à enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent

Assay)

GP27 Sequência gênica do Paracoccidioides brasiliensis

GP43 Sequência gênica do Paracoccidioides brasiliensis

HIV-AIDS Vírus da imunodeficiência humana-Síndrome da imunodeficiência adquirida

(Human Immunodeficiency Virus-Acquired Immunodeficiency Syndrome)

HOMO Nível ocupado de maior energia (Highest occupied molecular orbital)

ITS1 Sequência gênica do Paracoccidioides bresiliensis

LUMO Nível desocupado de menor energia (Lowest unoccupied molecular orbital)

OL5 Sequência gênica do Paracoccidioides brasiliensis

PCR Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PCS Espectroscopia de correlação de fótons (Photon Correlation Spectroscopy)

PFGE Eletroforese em gel de campo pulsado (Pulse Field Gel Eletrophoresis)

rRNA Sequência gênica do Paracoccidioides brasiliensis

RCF Força Centrifuga Relativa ou Força G (Relative Centrifugal Force)

ssDNA Fita simples de DNA (single-stranded DNA)

SPR Ressonância plasmônica de superfície (Surface Plasmon Resonance)

TBA Solução tampão contendo uma mistura de base T (Tris), ácido Bórico e EDTA

TCAR Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (High resolution computed

tomography)

u.a. Unidades arbitrárias

UV Espectro eletromagnético na região do ultravioleta

UV-Vis Espectro eletromagnético na região do ultravioleta visível

### SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Espectro eletromagnético na região de luz visível	18
3.2 Nanopartículas de ouro	19
3.3 Interações entre partículas de um corpo sólido	20
3.4 Nanossensores de DNA e testes colorimétricos Cross-linking, l	Non-
cross- linking e Label-free	23
3.5 Fungos	25
3.5.1 Paracoccidioides brasiliensis	25
3.5.2 Paracoccidioidomicose	27
4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	29
4.1 Espalhamento da luz dinâmico e Potencial Zeta	29
4.2 Espectroscopia na região Ultravioleta-visível	30
4.2.1 Princípios da Espectroscopia de Absorção	. 32
5 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Sínteses das nanopartículas de ouro	33
5.2 Processo de purificação	
5.3 Preparação das soluções salinas	34
5.3.1 Cálculos de preparação das soluções e diluições	34
5.4 Estabilidade das nanopartículas de ouro na presença de soluções salinas .	35
5.5 Oligonucleotídeos iniciadores	35
5.5.1 Reações em Cadeia da Polimerase	36
5.5.2 Eletroforese em gel de agarose	. 36
5.5.3 Purificação das amostras	37
5.6 Cálculos de concentração e áreas superficiais	37
5.7 Testes de estabilidade das nanopartículas com oligonucleotídeos e solução	0
salina	38
5.8 Detecção molecular do P. brasiliensis pelo método Label-free	39
5.8.1 Testes colorimétricos	40
5.8.2 Análise estatística dos resultados	41

5.9 Análise do Potencial Zeta e diâmetro hidrodinâmico	41
6 RESULTADOS	43
6.1 Solução coloidal de nanopartículas de ouro	43
6.2 Influência da adição de soluções salinas nas nanopartículas de ouro 4	14
6.3 Testes de estabilidade de nanopartículas de ouro, oligonucleotídeos e	
soluções salinas	48
6.4 Testes colorimétricos Label-free	52
6.4.1 Testes Label-free da GP275	52
6.4.2 Testes Label-free da GP435	55
7 DISCUSSÃO 5	59
7.1 Solução de nanopartículas de ouro na presença de solução salina 5	59
7.2 Estabilidade de nanopartículas de ouro com oligonucleotídeos na presença o	ek
solução salina	61
7.3 Método Label-free para detecção molecular e diagnóstico de doenças 6	62
8 CONCLUSÃO	65
9 PERSPECTIVAS E PROJETOS FUTUROS	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO 1 – Publicações	72
ANEXO 2 – Fórmulas	80

#### 1 INTRODUÇÃO

A tecnologia é importante aliada para a continuidade do desenvolvimento de diversas áreas, tanto para o mercado de trabalho, quanto para a vida doméstica e também a área acadêmica. Tal progresso não existe somente nos grandes projetos e construções, observáveis aos nossos olhares atentos e curiosos; mas no campo microscópico ou da nanotecnologia, muitos avanços importantes já foram alcançados e outros ainda virão, nesse mundo que cada vez mais surpreende os envolvidos.

As nanopartículas têm diâmetros entre 1 nm até 100 nm e podem ser encontradas dispersas em meio sólido, líquido ou gasoso [1]. Quando excitadas por um campo eletromagnético incidente (CEI), podem dar origem ao efeito de Ressonância Plasmônica de Superfície (Surface Plasmon Resonance - SPR). O efeito consiste na oscilação coletiva de elétrons livres, produzindo absorções e sendo responsável pela dispersão de cores intensas que podem ser observadas nas soluções. As propriedades elétricas e óticas também se modificam em relação ao material em forma volumétrica. O efeito SPR pode ser observado em soluções coloidais.

Uma solução coloidal consiste em nanopartículas dispersas numa segunda substância, como por exemplo água [2]. Um dos principais fatores que contribuem para o aumento da estabilidade coloidal é a repulsão eletrostática, que evita a sua aglomeração e precipitação. Outra característica é a adsorção do dispersante, que leva à formação de uma película protetora em torno da partícula coloidal, que é denominada camada de solvatação. Por outro lado, para precipitá-la podem-se neutralizar as cargas elétricas das mesmas ou eliminar a camada de solvatação.

Outros fatores que influenciam neste efeito são: o tamanho, a composição, a forma e o meio dielétrico onde elas estão imersas. Mudanças sutis no meio, como a presença de soluções salinas ou de oligonucleotídeos, promovem alterações significativas na *SPR* em virtude do processo de desestabilização da solução, que pode levar à aglomeração dessas partículas [3]. Esse efeito permite a utilização de nanopartículas como nanossensores.

O metal ouro, quando dividido em finas e minúsculas partículas (escalas nanométricas) transforma-se em fragmentos permanentes suspensos, em uma solução. Trata-se do ouro coloidal (AuNPs), com novas propriedades devido ao seu volume e área superficial. O coloide tornou-se presente em recentes pesquisas e

aplicações devido às suas pequenas dimensões e alta biocompatibilidade. A funcionalização de nanopartículas de ouro também tem se mostrado útil para a utilização como sondas para alvos biológicos, como por exemplo, na detecção de uma sequência complementar de DNA e como carreadores de drogas.

AuNPs são utilizadas em diagnóstico de doenças, devido a propriedades óticas, em virtude da mudança de coloração, que é originada por um processo de aglomeração que altera a Ressonância Plasmônica de Superfície e por exibirem forte absorção na região do visível do espectro [4]. Estas nanoparticulas sintetizadas em meio aquoso, permanecem dispersas, estabilizadas e com determinadas características de tamanho; têm coloração vinho, com banda de *SPR* centrada na região dos 523 nm [5]. No processo de desestabilização, caracterizado pela cor azul, o centro da banda *SPR* desloca-se para comprimentos de onda menos energéticos [4]. Outra particularidade é a facilidade de funcionalização de superfície e síntese das nanopartículas de ouro que contribuem como fatores importantes para ampliar a sua utilização [6].

Um dos métodos de detecção colorimétrico de DNA baseado em AuNPs foi descrito em 1996 [7], utilizando oligonucleotídeos de DNA, de cadeia simples, que foram detectados por meio de duas nanossondas diferentes, compostas de nanopartículas de ouro funcionalizadas com uma sequência de oligonucleotídeo. Cada uma foi funcionalizada com uma sequência complementar a uma das regiões do DNA alvo, denominado *Cross-linking*. Outro método, o *Non-cross-linking* possibilitou a identificação de uma sequência gênica com apenas uma nanossonda utilizando uma solução reveladora [8]. Recentemente surgiu a metodologia *Label-free*, que possibilita a detecção de ácidos nucleicos sem a necessidade de funcionalizar as nanopartículas, cujo processo pode demandar de 24 a 48 horas. Houve, portanto, um decréscimo do custo dos testes e do tempo decorrente do processo de funcionalização.

Na presente dissertação foram estudadas as influências da adição de soluções salinas na estabilidade de nanopartículas de ouro e o comportamento de oligonucleotídeos, sequências específicas de DNA, para a detecção do DNA do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* por meio da metodologia *Label-free*.

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico, apresentando as formas de micélio e levedura, dependendo da temperatura. Ao ser inalado causa a doença Paracoccidioidomicose, uma das micoses sistêmicas com grande incidência na

América Latina. No Brasil, as áreas endêmicas são as regiões subtropicais, atividades agrícolas são principalmente onde as predominantes Paracoccidioidomicose é considerada uma micose sistêmica da América Latina. Embora o registro da doença não seja compulsório, os dados estatísticos mostram que o Brasil tem o maior número de casos registrados. O teste colorimétrico é estudado como uma alternativa aos testes de diagnóstico tradicionais já existentes que apresentam, em certos casos, baixa sensibilidade, ou seja, mais propensos a fornecer resultados chamados de falso-negativos e baixa especificidade, ou seja, mais propensos a dar resultados falso-positivos. Portanto, métodos moleculares desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da doença e identificação do fungo serão de extrema utilidade. A utilização de oligonucleotídeos na realização de testes de cobertura ou recobrimento da superfície, parcial ou total, das nanopartículas; assim como a utilização de soluções salinas para reações com as cargas positivas e negativas, estão presentes na metodologia Label-free. Essa metodologia altamente sensível e de baixo custo pode ser uma alternativa de alta aplicabilidade no método de detecção de DNA em diagnóstico clínico [9].

A grande vantagem do método *Label-free* é a ausência do procedimento de funcionalização das nanopartículas, dispensando consumo de tempo e reagentes, sendo testado na identificação de proteínas e ácidos nucleicos. Neste contexto, o presente trabalho foi motivado pela simplicidade deste método.

#### 2 OBJETIVOS

Identificar molecularmente o *Paracoccidioides brasiliensis* por meio de nanopartículas de ouro, utilizando a metodologia *Label-free*.

#### 2.1 Objetivos específicos

- a) Analisar o comportamento de AuNPs na presença de soluções salinas com os sais: CaCl<sub>2</sub>, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e NaCl.
- b) Analisar a influência da concentração de oligonucleotídeos, no comportamento das nanopartículas, nas soluções com: AuNPs, oligonucleotídeos e soluções salinas.
  - c) Elaborar curvas de estabilidade das AuNPs pelos espectros de absorção.
- d) Validar o método *Label-free* como sendo de alta sensibilidade, simples, rápido e de baixo custo para a identificação molecular do *Paracoccidioides* brasiliensis.
- e) Desenvolvimento de um método de análise estatística para comparar os resultados dos testes colorimétricos.

#### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### 3.1 Espectro eletromagnético na região do visível

A região visível do espectro eletromagnético compreende o intervalo espectral de 400 nm a 800 nm. Fora desse intervalo de frequências o olho humano é insensível.

Quando observamos a onda eletromagnética emitida de uma fonte luminosa, como uma lâmpada, o que visualizamos é a cor correspondente ao comprimento de onda da luz emitida. Porém, quando observamos a cor de um objeto ou de uma substância, não estamos observando esse objeto ou essa substância emitindo luz. Em vez disso, verificamos a luz que está sendo refletida. A cor que nosso olho percebe não é a cor correspondente ao comprimento de onda da luz absorvida, mas seu complemento, conforme tabela da Figura 1.

Figura 1 – Tabela cor absorvida e observada por um composto

Cor da Luz Absorvida	Comprimento de Onda Absorvida (nm)	Cor observada
Violeta	400	Amarelo
Azul	450	Laranja
Verde-azulado	500	Vermelho
Verde-amarelado	530	Violeta-avermelhado
Amarelo	550	Violeta
Vermelho-alaranjado	600	Verde-azulado
Vermelho	700	Verde

Fonte: PAIVA et. al., 2013 [10]

O conhecimento de conceitos óticos e o entendimento dos fenômenos que envolvem o espectro eletromagnético são relevantes para a compreensão e conclusão dos resultados obtidos nestes experimentos. Metodologias de pesquisa como *Cross-linking, Non-cross-linking* e *Label-free* que envolvem nanopartículas e auxiliam no diagnóstico de doenças, baseiam-se no princípio da absorção e emissão de ondas eletromagnéticas em soluções.

#### 3.2 Nanopartículas de ouro

Os nanomateriais apresentam propriedades distintas das propriedades das moléculas e dos sólidos cristalinos típicos, em virtude dos efeitos de tamanho e de superfície que se tornam especialmente evidentes para lineares tipicamente entre 1 nm a 100 nm. O desenvolvimento de tecnologias que possibilitam a monitoração da interação de nanomateriais com estruturas biológicas tem impulsionado a criação de novas técnicas e dispositivos de diagnóstico e terapêutica. Os avanços tecnológicos nesta área levaram ao aparecimento de novas áreas de conhecimento como, por exemplo, a nanobiotecnologia e a nanomedicina [1]. Considerando uma nanopartícula esférica com um diâmetro da ordem de nanômetros, à medida que esse diâmetro diminui, a relação entre átomos da superfície por átomos no volume total aumenta. Isso determina propriedades importantes dos nanomateriais.

O conhecido metal ouro, quando dividido em finas e minúsculas partículas (escalas nanométricas) transforma-se em fragmentos permanentes suspensos, em uma solução. Com essas características, trata-se do ouro coloidal (AuNPs), com novas propriedades devido ao seu volume e área superficial. Dessa forma, o coloide tornou-se presente em recentes pesquisas e aplicações devido às suas pequenas dimensões e alta biocompatibilidade. A funcionalização de nanopartículas de ouro também tem se mostrado útil para a utilização como sondas para alvos biológicos, como uma determinada sequência complementar de DNA.

As nanopartículas de ouro são utilizadas no diagnóstico de doenças em virtude da mudança de coloração, que é originada por um processo de aglomeração que altera a Ressonância Plasmônica de Superfície e por exibirem forte absorção na região do visível do espectro [4]. Este fenômeno pode ser explicado pelas equações de Maxwell, que envolvem cálculos de campo e ondas eletromagnéticas. Quando nos referimos a estabilidade de uma solução de nanopartículas, dependemos da interação entre os plasmons de superfície, que são excitações coletivas de elétrons, ou qualquer mistura de partículas em movimento, eletricamente carregadas e com densidades e energias diferentes.

Para uma partícula esférica com diâmetro muito menor que o comprimento de onda da luz visível, um campo eletromagnético incidente é capaz de induzir uma oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução do metal, de maneira que todos os elétrons confinados ficam submetidos ao mesmo campo em um dado intervalo de tempo.

Com isso, o movimento da nuvem eletrônica sob influência do campo elétrico leva a uma separação dipolar de cargas na superfície da partícula. Quando as partículas são irradiadas ou absorvem radiação em comprimentos de onda dentro da faixa de ressonância do plasmon, há um aumento da intensidade da onda que as excitou. Ao absorver energia, os elétrons são promovidos para um nível eletrônico excitado. No caso das partículas, fornecer energia aos plasmons seria como promovêlos para um "nível plasmônico excitado", porém, para que isso ocorra, é necessária uma perda da coerência dos elétrons superficiais em um tempo absolutamente curto.

Os processos de relaxação de uma oscilação plasmônica são compostos de decaimentos não-radiativos (absorção) temporais, compondo a "extinção" da luz visível; quando o diâmetro das partículas metálicas variar entre 5 e 30 nm. Nesse caso, a banda observada nos espectros pode ser chamada de banda de absorção. A mudança de coloração ocorre quando há partículas maiores ou agregados; o que implica em uma limitação da capacidade dos plasmons individuais de serem excitados, pois o campo incidente não é capaz de excitar todos os elétrons em fase, já que excitações multipolares passam a ser dominantes [11].

#### 3.3 Interações entre partículas de um corpo sólido

Nos cristais iônicos, as partículas possuem um movimento constante em torno de uma posição média, originado pela energia térmica, sob a ação de forças de atração e de repulsão coulombianas, bem como de forças de repulsão a curtas distâncias. Em um cristal molecular, as partículas sendo eletricamente neutras, as forças de atração não são coulumbianas. Neste caso, tratam-se das forças atrativas de *Van der Waals*, entre moléculas neutras, considerando-as resultantes das interações entre momentos dipolares permanentes, no caso de moléculas polares; ou, no caso de moléculas homopolares, entre momentos dipolares induzidos pelos campos elétricos criados por suas cargas. Para moléculas que possuam um momento dipolar permanente, essa força atrativa é criada pela interação dipolo-dipolo e pela

agitação térmica molecular. Quando não, resulta da interação entre dipolos induzidos em cada átomo pelas cargas de outro [12].

A força de atração clássica entre duas moléculas polares é descrita pela interação dipolo-dipolo. Um momento dipolo **p**<sub>1</sub> produz, a uma distância **r**; sendo ε<sub>0</sub> a permissividade do vácuo (8,85x10<sup>-12</sup> C<sup>2</sup>/Nm<sup>2</sup>), um potencial, conforme Equação 1:

$$\Phi_1(r) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{\mathbf{p_1.r}}{r^3}.$$
 [1]

O campo deste dipolo é igual a  $E_1$ . A energia de interação entre os momentos dipolares  $\mathbf{p_1}$  e  $\mathbf{p_2}$  a uma distância r é então, conforme Equação 2:

$$W = -(\mathbf{p_2}.\mathbf{E_1}) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0 r^3} \left[ (\mathbf{p_1}.\mathbf{p_2}) - \frac{3(\mathbf{p_1}.\mathbf{r})(\mathbf{p_2}.\mathbf{r})}{r^2} \right].$$
 [2]

A energia potencial entre duas moléculas polares depende não somente da sua distância mútua, mas também dos ângulos que os momentos dipolares fazem entre eles e com a linha de separação. O campo, neste caso, não é central.

Esta energia ainda não representa a energia de integração de  $Van \ der \ Waals$ ; como as moléculas possuem um movimento de agitação térmica permanente, a energia média de interação dos dipolos em todas as direções do espaço é a única quantidade com significado físico. Se a energia W é pequena em relação à energia térmica kT, os dipolos podem, então, girar facilmente sob impulso das colisões moleculares.

Levando em consideração os ângulos polares de  ${\bf p_1}$  e  ${\bf p_2}$ , em um sistema de referência onde o eixo  $O_z$  é tomado como suporte de vetor r. Considerando o caso em que W/kT << 1, podemos escrever, conforme Equação 3:

$$\langle W \rangle = -\frac{2}{3} \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{p_1^2 p_2^2}{kT} \frac{1}{r^6}.$$
 [3]

Os átomos neutros e as moléculas neutras são classificados como homopolares. No entanto, o movimento dos elétrons e dos núcleos provoca a formação de dipolos elétricos instantâneos. O campo  ${\bf E}$ , produzido por essas cargas e pelos dipolos instantâneos de uma molécula, age sobre as cargas e dipolos das outras moléculas. Existe, então, um momento dipolar induzido que pode ser escrito pela Equação 4 [12]:

$$\mathbf{p} = \alpha \varepsilon_0 \mathbf{E} \,. \tag{4}$$

As componentes do campo produzido pelos dipolos instantâneos de um átomo B, em um ponto A, situado a uma distância r de B, muito maior do que as dimensões do átomo, são proporcionais a  $1/r^3$ . A constante  $\alpha$  é a suscetibilidade ou polarizabilidade elétrica.

As moléculas polares, de momento dipolar permanente  $\mathbf{p_1}$ , produzem um campo elétrico cuja ordem de grandeza é  $p1/r^3$ . Este campo induz um momento dipolar  $\alpha_2 E_1$  nas moléculas homopolares, de polarizabilidade  $\alpha_2$ , que estão misturadas às primeiras. A energia de integração entre estes dois tipos de molécula, pode ser escrito pela Equação 5, considerando valor médio de W para W/kT << 1:

$$W = -\frac{\alpha_2 \varepsilon_0 p_1^2}{(4\pi \varepsilon_0)^2 r^6}.$$
 [5]

De forma sucinta, moléculas, quando estão muito próximas, se atraem mutuamente. Essa força de atração, de origem elétrica, que mantém unidas as moléculas de uma substância sólida, impedindo-as de se afastar umas das outras, se chama força intermolecular.

Para duas moléculas, cujos centros estão à distância d, as forças intermoleculares são atrativas quando d é maior que a dimensão  $d_0$  das próprias moléculas (cerca de 1 nm). Quando a distância d aumenta, as forças intermoleculares diminuem e se reduzem praticamente a zero para distância da ordem de 100 nm.

Entretanto, quando as moléculas estão tão próximas à uma distância inferior a  $d_0$ , as forças intermoleculares se tornam repulsivas.

A coesão dos sólidos, ou seja, o ato de um sólido oferecer resistência à ruptura, deve-se à atração entre as moléculas que o constituem. No interior de todo o corpo, seja ele líquido, sólido ou gasoso, os átomos das moléculas não permanecem imóveis, mas estão em contínuo movimento e se agitam com uma energia que cresce quando a temperatura do corpo aumenta. Esse movimento incessante é chamado de movimento molecular ou movimento de agitação térmica [13].

# 3.4 Nanossensores de DNA e testes colorimétricos *Cross-linking*, *Non-cross-linking* e *Label-Free*

Devido a características específicas da solução coloidal das AuNPs, o efeito da SPR na região visível do espectro eletromagnético, percebemos a mudança de coloração em processos de aglomeração induzidos por uma solução salina.

A mudança de coloração é empregada nos testes colorimétricos. As tecnologias de detecção estão divididas em três metodologias *Cross-linking* [14], *Non-cross-linking* [15] e *Label-free* [16]. Em todas elas, o DNA alvo precisa ser amplificado, uma vez que a quantidade de DNA de um patógeno de uma amostra biológica é muito pequena, na maioria dos materiais coletados. Um único ciclo térmico é necessário para a desnaturação do DNA amplificado e anelamento de um oligonucleotídeo, durante o teste colorimétrico.

No método *Cross-linking*, utilizam-se duas sequências diferentes de oligonucleotídeos tiolados complementares ao DNA alvo. As nanopartículas de ouro são funcionalizadas por meio da afinidade química do agrupamento tiol destes oligonucleotídeos pelo ouro, formando nanossensores de DNA. Assim, os dois grupos de nanossensores se ligam quando em contato com o DNA alvo, causando uma aglomeração e, consequentemente modificando a cor vermelha pela azul. Caso contrário, a cor vermelha é mantida. No método *Non-cross-linking* é utilizado apenas um grupo de nanossonda associado a uma solução salina. Quando as nanossondas entram em contato com o DNA teste complementar, a estabilidade química do sistema é conservada na presença da solução salina, mantendo a coloração vermelha inicial. Entretanto, quando o DNA teste não é complementar, as nanossondas aglomeram-se na presença da solução salina [17].

Na metodologia *Label-free* não há necessidade do procedimento de funcionalização, dispensando consumo de alguns reagentes e reduzindo custos. A

funcionalização das nanopartículas é um processo que pode demandar entre 24 e 48 horas. O teste positivo é feito utilizando uma mistura composta de nanopartículas de ouro, fita simples de DNA (ssDNA) e uma fita dupla de DNA complementar à fita simples. No teste negativo, a ssDNA não é complementar à fita dupla de DNA. Ambas as amostras são submetidas a um ciclo de temperatura para a desnaturação e anelando, possibilitando a estabilização das nanopartículas [18].

A Figura 2 mostra o diagrama esquemático do teste *Label-free*. Após o processo de desnaturação haverá o anelamento entre fitas simples de DNA, os iniciadores, e o seu complemento no DNA amplificado. Isso indicará resultado positivo do teste ou, que houve uma identificação molecular do fungo. Se não houver a identificação do seu complementar, pelos iniciadores, o teste resulta em negativo. Em caso de anelamento, os iniciadores não mais recobrem a superfície das nanopartículas, que em presença de solução salina perdem sua estabilidade e se aglomeram. Não havendo o anelamento, mesmo em presença de solução salina, as nanopartículas permanecem estabilizadas e não sofrem o processo de aglomeração.

Teste positivo

Desnaturação

Anelamento

Anelamento

Adição de Au-NPs e solução salina

Au-NPs

Au-NP

Figura 2 – Diagrama ilustrativo do mecanismo do teste Label-free

Fonte: HUIXIANG, 2004 [18]

#### 3.5 Fungos

Os fungos constituem um dos grandes reinos da vida, incluindo os conhecidos cogumelos e mofos (bolores), e as microscópicas unicelulares leveduras. Alimentamse de matéria orgânica viva ou morta.

Os que causam doenças se dividem em dois principais grupos: as leveduras, unicelulares e os fungos filamentosos, que crescem numa rede de fios ramificados (em latim, *hyphae micelio*). Alguns tipos causam doenças superficiais de pele, pouco graves (embora de aparência desagradável), de cabelo ou de unhas, ou das membranas mucosas, por exemplo, a Candidíase.

Outras, como a Histoplasmose, resultam em infecção potencialmente fatal de alguns órgãos, dentre os quais os pulmões. Algumas dessas doenças estão associadas ao trabalho no campo ou à produção de alimentos.

Outras infecções fúngicas, por exemplo, a Dermatofitose, tem maior incidência entre pessoas com o sistema imunológico debilitado, como as afetadas pelo HIV-AIDS [19].

Fungos como: Blastomyces dermatides, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis e Paracoccidioides brasiliensis apresentam dimorfismo, uma característica genética associada à sua patogenicidade, que consiste em uma adaptação morfofisiológica dependente de fatores intrínsecos e principalmente extrínsecos; os quais podem ser temperatura, alimento ou disponibilidade de oxigênio [20].

#### 3.5.1 Pracoccidioides brasiliensis

Trata-se de um fungo termodimórfico que passa de micélio para levedura a uma temperatura média de 37°C. É o agente causador da Blastomicose Sul-Americana ou Paracoccidioidomicose. O *Paracoccidioides brasiliensis* é encontrado historicamente com maior incidência na América do Sul e Central. Relatos destacam o México, Argentina e Brasil [21]. O primeiro cultivo isolado do fungo foi apresentado por Adolf Lutz em 1908 [22]. Pertence ao reino *Fungi*, gênero *Paracoccidioides*, espécie *Paracoccidioides brasiliensis* [23].

A forma característica das lesões na pele humana é consequência da interação parasita-hospedeiro e o modo como esses agentes agridem nosso organismo. Sua disseminação é transmitida por vias sanguíneas [24].

Quanto ao polimorfismo genético, o tamanho do genoma estimado por *Pulse Field Gel Eletrophoresis-PFGE*; uma técnica de eletroforese em campo pulsátil apropriada, para separar grandes fragmentos de DNA, por meio de reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados [25], foi de aproximadamente 30 Mb [26].

O padrão de eletroforese revelou polimorfismo cromossomal no fungo, presença de quatro a cinco moléculas de DNA cromossomais e marcadores moleculares variando de 2 a 10 Mb [26]. Baseado no sequenciamento de DNA de aproximadamente 50 Kb, o genoma desta espécie mostrou uma densidade de um gene a cada 3,5 a 4,5 Kb, sugerindo um total de cerca de 7.500 a 9.000 genes [27]. Genes como: *GP43*, *GP27*, *ITS1*, *OL5* e *rRNA* são estudados nesta espécie para a detecção de polimorfismos genéticos.

Tais fungos vivem em solos úmidos, locais ricos em proteínas e com variações mínimas de temperatura. Nesses locais crescem como micélio, produzindo conídios compatíveis com a dispersão aérea, e que quando inalados, penetram pelas vias respiratórias alojando-se nos alvéolos pulmonares [28]. As formas levedura e micélio do fungo são mostrados na Figura 3.

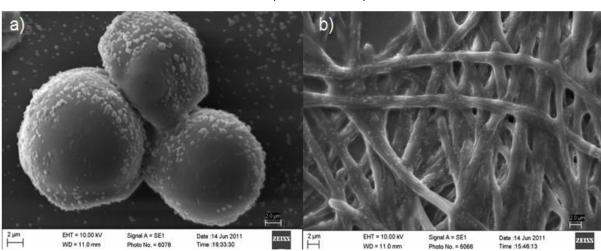


Figura 3 – Micrografias eletrônicas de varredura das formas do *Paracoccidioides* brasiliensis: a) levedura e b) micélio

Fonte: Laboratório de Nanossensores

#### 3.5.2 Paracoccidioidomicose

Doença onde o principal órgão afetado é o pulmão. Na denominada forma aguda, progride rapidamente disseminando-se pelo sistema retículo-endotelial: baço, fígado, linfonodos e medula óssea.

Nessa fase, não aparecem lesões na pele ou no órgão respiratório. Já na forma crônica, vários órgãos podem ser afetados, principalmente os pulmões e a mucosa orofaríngea [29]. Sintomas podem aparecer na pele. Essa forma é mais comum. O contágio aparece mais predominantemente em indivíduos adultos do sexo masculino. Os trabalhadores rurais são os mais atingidos, principalmente aqueles que trabalham com atividades relacionadas ao solo e à agricultura [30].

De acordo com levantamentos realizados nos anos 90, o Brasil registrou o maior número de casos, onde estimava-se haver uma incidência anual de até 3 casos por 100.000 habitantes e uma mortalidade aproximada de 0,14:100.000 habitantes [31].

Já em 2013, um informe da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca publicou que o Brasil detém 80% dos casos de Paracoccidioidomicose e que a doença é responsável por 52% das mortes por micoses brasileiras [32]. No país, já houve casos registrados em todas as regiões. Em 1994, por exemplo, 115 casos foram diagnosticados no Hospital de Doenças Infecto Contagiosas em Teresina, Piauí onde os pacientes eram provenientes também do Maranhão, Pará e Tocantins [33].

O tratamento das micoses sistêmicas é feito com antifúngicos sistêmicos, nos casos de pacientes imunossuprimidos, as formas leveduriformes proliferam intensamente devido à deficiência da resposta imune inata e adaptativa. Nestas condições, a terapêutica é pouco eficiente e períodos longo de tratamento são necessários com risco de recidivas da doença [24].

Os testes de *BAAR* ou Baciloscopia (exame de escarro), em que as microbactérias são bacilos álcool-ácido resistentes, os quais são circundados por uma parede celular hidrofóbica, e que resistem a descoloração causada pelas misturas de álcool-ácido usadas na identificação [34]; *ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay)*, um teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos, usado no diagnóstico de doenças que induzem a produção de imunoglobulinas; e Broncoscopia, exame ótico dos Brônquios, geralmente são eficientes ao diagnóstico da doença, porém há relatos na literatura de resultados negativos [35].

A Tomografia Computadorizada de Alta Resolução (TCAR) pode ser utilizada na identificação dos nódulos, mas não é empregada como única técnica, por não ser um diagnóstico específico neste caso. Desta forma se tornam necessários testes micológicos e sorológicos para o correto diagnóstico [24].

Os métodos tradicionais para o diagnóstico têm sido realizados por meio da identificação microscópica do *Paracoccidioides brasiliensis* e do diagnóstico da sorologia que depende da presença de anticorpos, entre eles o da Gp43, que consiste na principal glicoproteína antigênica secretada pelo fungo e é o anticorpo referência para Paracoccidioidomicose [36]. Contudo este método de detecção apresenta alguns problemas, tais como a diminuição do anti-Gp43 da circulação durante o tratamento, resultados falsos negativos e ocasionalmente reações cruzadas. Desse modo, várias técnicas moleculares de identificação e diagnóstico do fungo, principalmente a técnica de *PCR* sozinha ou em combinação com outras metodologias, estão sendo incorporadas na rotina dos laboratórios clínicos com o objetivo de aumentar a eficácia dos métodos microbiológicos e imunobiológicos correntes.

Embora o diagnóstico morfológico e sorológico do fungo tenha sido realizado, a técnica de *PCR* é uma importante ferramenta para a detecção de fungos em pacientes com reações sorológicas negativas, sendo a concentração de antígeno e anticorpo baixa, fazendo ser difícil determinar o melhor método terapêutico para o paciente.

Portanto, métodos moleculares desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da doença juntamente com a descoberta de marcadores específicos na identificação do fungo serão extremamente úteis tanto no diagnóstico quanto na terapêutica em estudos epidemiológicos.

#### 4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

#### 4.1 Espalhamento de luz dinâmico e Potencial Zeta

A técnica do espalhamento dinâmico de luz, *DLS*, também chamada *PCS*, é baseada no princípio de que a intensidade da radiação dispersa a partir de uma partícula quando absorve radiação oriunda de um laser, se espalha com o tempo, dependendo do Movimento Browniano e, portanto, da média do coeficiente de difusão *D*. Para uma partícula esférica, por meio da análise das variações na intensidade da radiação dispersa é possível se obter o coeficiente de difusão pela equação de *Stokes-Einstein* como mostrado na Equação 6:

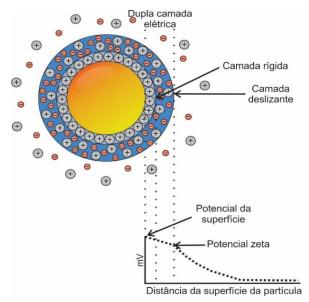
$$D_h = \frac{k_{\rm B}T}{6\pi\eta D}.$$
 [6]

Sendo  $K_B$  a constante de Boltzmann (1,38x10<sup>-23</sup> J/K), T é temperatura absoluta da solução,  $\eta$  é viscosidade do meio (em Pa s). Quando essas partículas começam a se agregar depois de se misturarem com o analito, o valor de D deve diminuir devido ao aumento do  $D_h$ . Essa técnica, geralmente tem uma melhor sensibilidade do que a análise turbidimétrica e nefelométrica sequencial [37]. É a mais usual para inferir o tamanho de nanopartículas, permitindo a determinação do diâmetro hidrodinâmico por meio do coeficiente de difusão, quando um feixe incidente da radiação é espalhado por uma partícula de diâmetro menor que o comprimento de onda.

Por meio da análise das variações na intensidade da radiação dispersa é possível se obter o coeficiente de difusão [38].

O Potencial Zeta está relacionado com a estabilidade química de uma solução coloidal. Na superfície de partículas em solução existem cargas elétricas originadas por diversos motivos, dependendo do material disperso e do meio. A superfície destas partículas pode ser carregada positivamente ou negativamente, levando a formação de uma dupla camada ao redor de cada partícula, pois íons opostos às cargas se acumulam na região de interface partícula-líquido, conforme representado na Figura 4.

Figura 4 – Representação do Potencial Zeta e a dupla camada elétrica na superfície de nanopartículas



Fonte: COSTA, 2015 [39]

O potencial elétrico na interface entre o líquido do meio e a unidade partículaíons é denominado potencial eletrocinético, ou abreviando-se, Potencial Zeta [40]. O
valor em mV é um indicativo de estabilidade coloidal. Por meio de uma fórmula
empírica, quando este valor está entre 30 mV e – 30 mV a solução é classificada como
instável [41]. Este é um parâmetro relacionado à estabilidade de um sistema coloidal,
por meio do qual avalia-se a interação entre uma partícula e outra [42]. O ponto
isoelétrico tem valor de Potencial Zeta igual a zero, quando existe equilíbrio de cargas
anulando a repulsão eletrostática entre nanopartículas, resultando no processo de
aglomeração [40].

#### 4.2 Espectroscopia na região Ultravioleta-visível

A análise de uma amostra pela espectroscopia ótica na região do UV-Visível é baseada na interação de um feixe de radiação com o material, podendo ser refletido, absorvido e/ou transmitido. O processo de absorção interfere na movimentação de elétrons. Como resultado da absorção de energia, átomos ou moléculas passam de um estado de energia mais baixa (inicial ou estado fundamental) para um estado de energia maior (estado excitado). A radiação eletromagnética absorvida tem energia igual à diferença de energia entre os estados excitado e fundamental.

Quando uma molécula absorve energia, elétrons de seus átomos têm probabilidades de serem transferidos de um orbital ocupado para um orbital desocupado de maior energia potencial. Em geral, a transição mais provável é do orbital ocupado de maior energia (HOMO) para o orbital desocupado de menor energia (LUMO) [10].

A energia necessária para ocasionar transições do nível ocupado de maior energia (HOMO), no estado fundamental, para o nível desocupado de menor energia (LUMO) é menor do que a energia necessária para a transição de um nível ocupado de menor energia.

Para moléculas, a absorção na região do UV ocorre, em geral, em uma ampla faixa de comprimento de onda, pois as moléculas (ao contrário dos átomos) normalmente têm muitos modos excitados de vibração e rotação em temperatura ambiente. Os níveis de energia dos estados de excitação vibracional e rotacional são pouco espaçados, correspondendo a diferenças de energia consideravelmente menores do que os de níveis eletrônicos. Os níveis rotacionais e vibracionais são, assim, "sobrepostos" aos níveis eletrônicos. Uma molécula pode, portanto, passar simultaneamente por uma excitação eletrônica e vibracional.

Transições vibracionais e rotacionais somente são observadas em moléculas. No processo de absorção ou transação eletrônico, ocorrem mudanças nas distribuições dos elétrons de átomos ou moléculas. No processo de absorção ou transição vibracional, ocorrem mudanças nas distâncias de separações entre os núcleos (comprimentos das ligações). No processo de absorção ou transição rotacional, ocorrem mudanças na energia de uma molécula na forma de rotações ao redor de um centro de gravidade. Cada estado eletrônico é subdividido em um número de subníveis vibracionais. Cada subnível vibracional é dividido em subníveis rotacionais. Com moléculas, não temos um espectro de linhas e sim um espectro de bandas devido as interações da luz com outras moléculas e com solventes.

Normalmente, as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível; as vibrações na região do infravermelho e as rotacionais na região de microondas. Não considerando a energia devida aos movimentos translacionais, a energia total de uma molécula pode ser considerada como a soma da energia eletrônica, da energia vibracional e da energia rotacional; esta última só no caso de moléculas em fase gasosa [10].

#### 4.2.1 Princípios da Espectroscopia de Absorção

Espectroscopia é um método ou técnica para a análise de substâncias, baseado na produção e interpretação de seus espectros de emissão ou absorção de radiações eletromagnéticas. A energia absorvida, espalhada ou emitida pelos átomos e moléculas das amostras podem ser aferidas por essa técnica, por meio de um instrumento de análise conhecido como espectrofotômetro, que registra essas interações por meio dos espectros [43]. O espectro é a função que caracteriza a distribuição de energia em uma onda ou em um feixe de partículas e que exprime esta distribuição em termos de variáveis apropriadas (comprimento de onda, frequência) [44].

Quanto maior for o número de moléculas capazes de absorver a radiação de certo comprimento de onda, maior será a extensão dessa absorção. Assim, definiu-se a expressão empírica, chamada de Lei de *Beer-Lambert*, sendo calculada a concentração (C) pela Equação 7 [45]:

$$C = \frac{A}{\varepsilon l}.$$
 [7]

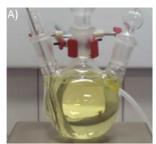
Sendo: A, valor de absorbância; l, caminho ótico (cm); e  $\varepsilon$ , coeficiente de extinção molar. A Lei de Beer-Lambert é rigorosamente obedecida quando uma única espécie gera a absorção observada. No entanto, essa lei pode não ser obedecida quando diferentes formas de moléculas absorventes estão em equilíbrio, quando o soluto e o solvente formam complexos por meio de algum tipo de associação, quando existe equilíbrio térmico entre o estado eletrônico fundamental e um estado excitado de baixa energia, ou quando compostos fluorescentes ou compostos que são modificados pela irradiação estão presentes.

#### **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 5.1 Síntese das nanopartículas de ouro

Todos os reagentes foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich, com grau de pureza superior a 99,99%. Previamente à realização dos experimentos, toda a vidraria utilizada foi lavada com água régia na proporção de 1:3 de ácido nítrico (HNO₃) e ácido clorídrico (HCI), para remover íons contaminantes. Realizada com base na metodologia descrita por *Lee* e *Meisel* de 1982 [46], sendo obtidas AuNPs esféricas com diâmetro em torno de 22 nm. Inicialmente foi adicionado 25 ml da solução de cloreto de ouro (HAuCl₄) na concentração de 1,41 mM, à 450 ml de água ultrapura; aquecendo até 95°C e agitando constantemente a uma velocidade de rotação de 112 RCF. O processo foi finalizado adicionando 50 ml de uma solução de citrato de sódio (C₅H₅Na₃O₁) na concentração de 5,65 mM. A solução foi mantida por uma hora em aquecimento e permanecendo em agitação até o resfriamento a 45°C. As soluções obtidas durante o processo são mostradas na Figura 5. A análise de caracterização foi feita por espectroscopia na região do UV-Vis (padronizada com uma absorbância de 4,0 u.a. na região de 523 nm).

Figura 5 – Fotografias da progressão/sequência da Síntese de AuNPs: a) solução de cloreto de ouro aquecida e em agitador magnético até 98°C, b) adição de solução de citrato de sódio hidratado, c) início da reação de redução, d) solução coloidal de ouro.









Fonte: Laís Vieira. Laboratório de Nanossensores

#### 5.2 Processo de purificação

Com o objetivo de remover excessos de reagentes no processo de síntese, as nanopartículas foram lavadas. Tal procedimento foi realizado com a utilização de uma centrífuga (Thermo Scientific – Multifuge X1R Centrifuge).

Neste processo foram utilizados três ciclos: o primeiro de 7.168 RCF por 6 min, o segundo de 7.168 RCF por 15 min e o terceiro de 25.200 RCF por 2 min. Após o primeiro ciclo, retirou-se o sobrenadante e o direcionou para o segundo ciclo.

Guardou-se esse primeiro precipitado. Após o segundo ciclo, retirou-se o sobrenadante e o direcionou para o terceiro ciclo. Guardou-se esse segundo precipitado. Após o terceiro ciclo, descartou-se o sobrenadante e guardou-se esse terceiro precipitado. Ao término do processo, juntaram-se os três precipitados e acrescentou-se água ultrapura em cada tubo, até atingir o volume total de 1,5 ml por tubo.

#### 5.3 Preparação das soluções salinas

Para a realização dos testes de estabilidade das nanopartículas em soluções salinas foram escolhidos cinco sais, sendo eles: cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de lítio (LiCl), cloreto de magnésio hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl). Para cada sal foi preparado 50 ml de cada solução a 0,8 M, as demais soluções de menores concentrações foram feitas por meio de diluições.

#### 5.3.1 Cálculos de preparação das soluções e diluições

Foram utilizados os valores das massas moleculares dos sais, a concentração inicial desejada da solução salina de 0,8 M e o volume inicial desejado, da mesma solução, de 50 ml. Com esses dados, foi calculada a massa necessária de cada sal em cada solução, por meio da Equação 8:

$$m_{j} = \frac{m_{1}}{M_{1}V}.$$
 [8]

Para a obtenção de soluções salinas menos concentradas, foi utilizada a Equação 9:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
 . [9]

Dessa forma, partiu-se de uma solução inicial a 0,8 M para a obtenção das demais concentrações: 0,7 M; 0,6 M; 0,5 M; 0,4 M; 0,3 M; 0,2 M; 0,1 M; 0,05 M e 0,025 M.

Essas concentrações iniciais foram necessárias para os testes de estabilidade. Entretanto para o MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e CaCl<sub>2</sub> houve a necessidade de soluções de menores concentrações.

#### 5.4 Estabilidade das nanopartículas de ouro na presença de soluções salinas

Nos testes de estabilidade e de aglomeração foram estudadas as soluções salinas de: CaCl<sub>2</sub> nas concentrações de 0,55 a 4,42 mmol L-1, LiCl de 0,05 a 0,80 mol L-1, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O de 0,3 a 5,3 mmol L-1, KCl de 0,05 a 0,80 mol L-1 e NaCl de 0,025 a 0,400 mol L-1. Nos testes, 10 µl de uma solução coloidal de nanopartículas de ouro foram misturados a 2 µl das soluções salinas em estudo. Os espectros UV-Vis foram verificados no espectrofotômetro DeNovix DS-11, na faixa espectral de 190-840 nm. A padronização dos experimentos foi realizada com objetivo de evitar divergência nos resultados, todos os testes foram feitos em triplicatas e os espectros coletados após um tempo médio de 26 s; desde o momento do contato das duas soluções (coloidal e salina) e homogeneização.

#### 5.5 Oligonucleotideos iniciadores

Oligonucleotídeos (iniciadores ou *primers*) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. As sequências iniciadoras são mostradas na Tabela 1.

**Primers** Lenght MW nmol GC% μg *Sequence* (5' – 3') gp43-F 21 6332 379,7 59,9 47,6 TCGCTTCCTCATGACAGACTT gp43-R 21 6261 465,7 74,3 47,6 TCACCTGCATCCACCATACTT 6346 369,9 58,2 57,1 CTGTTGTTTCCGTCCTTGCGC gp27-F 21 21 42,8 AACTCTTGGCTTTGGTTGAAG gp27-R 6467 370,3

Tabela 1 – Descrição dos *primers* 

Fonte: Technical datasheet Sigma-Aldrich Brasil Ltda

#### 5.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase

Para a amplificação do DNA do *P. brasiliensis*, utilizou-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*). Neste processo, 2 μl do DNA total do *P. brasiliensis* extraído do fungo em etapas anteriores do Projeto FAPESP 2009/9559-5, em uma concentração de 200 ng/μl, foram misturados com 45 μl de *PCR* Supermix, adquirido da (Invitrogen<sup>TM</sup>), 2 μl do iniciador *forward* e 2 μl do iniciador *reverse*, produzidos pela *Sigma Aldrich* e específicos da região de interesse. Uma amostra controle foi preparada, de modo a se observar a qualidade e pureza do processo. Todas as amostras foram submetidas a um ciclo de temperatura para que ocorresse a amplificação, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Condições de amplificação das sequências GP27 e GP43

Ciclos de temperatura		Componentes Supermix
Temperatura	Tempo	
95°C	5 min	22mM Tris-HCl (pH
35 ciclos		8,4), 55mM KCl,
95°C	1 min	1,65mM MgCl <sub>2</sub> ,
40°C	3 min	220μM dGTP, 220 μM
72°C	2 min	dATP, 220 dTTP, 220
Para final	izar:	μM dCTP, 22U
72°C 5 min	4°C e fim.	recombinante Taq DNA
		Polymerase/mL.

Fonte: Laboratório de Nanossensores

#### 5.5.2 Eletroforese em gel agarose

Com intuito de verificar a qualidade, integridade e ausência de contaminação do DNA previamente amplificado, empregou-se a técnica de eletroforese em gel agarose. Inicialmente, 0,75 g de agarose (Invitrogen<sup>TM</sup>) foram diluídas em 50 ml de uma solução tampão TBE 1X, aquecendo-se a mistura em um forno de micro-ondas. Após a completa dissolução da agarose, 2 µl de brometo de etídeo foram pipetados na solução de agarose em TBE. Depois de colocada na câmara de eletroforese e adicionando uma solução de TBE 1X até cobrir o gel, a solidificação ocorreu em 40 minutos. A aplicação da tensão foi feita por meio de uma fonte Loccus, LPS 4.000V.

As amostras de PCR colocadas nos poços do gel de agarose foram feitas conforme descrição: Poço do marcador molecular padrão (*Ladder*), sendo adicionado 1,5 µl de *ladder* misturados a 2 µl do corante *Blue Juice*; poços de amostras, adicionado 4 µl de amostras misturados a 2 µl do corante *Blue Juice*.

Após a pipetagem das amostras, uma diferença de potencial de 60 Volts foi aplicada a uma corrente de 33 mA. Nessas condições, foi possível observar a migração do DNA em direção ao eletrodo.

#### 5.5.3 Purificação das amostras

A purificação das amostras foi necessária para uma leitura correta do DNA no espectrofotômetro por meio da remoção dos excessos de reagentes da *PCR*. Em um tubo *Eppendorf* foram colocados 20 μl do produto amplificado da *PCR*, 2 μl de acetato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>) a 3 M e 40 μl de etanol absoluto gelado (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O). Após as misturas, as amostras foram mantidas a – 20°C por 24 horas. Em seguida, foram centrifugadas por 30 min a 21.952 RCF. No final do processo, o sobrenadante foi retirado e o precipitado suspendido novamente em etanol 70%, levado a centrífuga novamente por 5 min a 25.200 RCF. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi seco a vácuo. As amostras foram reconstituídas em 20 μl de água ultrapura, tipo 1.

#### 5.6 Cálculos de concentração e áreas superficiais

Para os experimentos dos testes de estabilidade e aglomeração, a concentração das nanopartículas foi calculada, pela Lei de *Beer-Lambert* (Equação 7), por meio da região de *SPR* em 523 nm e considerando o coeficiente de extinção do ouro,  $\varepsilon = 1,0x10^9 \, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [47].

Para os oligonucleotídeos, o peso molar de cada um deles, em g/mol; quantidade e sequência de bases foram calculadas conforme exemplificado na Tabela 1. No cálculo do recobrimento da área da nanopartícula por oligos, foi feita uma aproximação da dimensão das nanopartículas com uma forma perfeitamente esférica. A distribuição dos tamanhos das nanopartículas de ouro foi calculada anteriormente em laboratório pelo grupo de pesquisa, sendo verificada uma distribuição normal, com

o diâmetro médio de 22,0 <u>+</u> 2,0 nm [8]. Dessa forma, a área superficial pôde ser calculada pela equação da superfície de esfera.

As fitas simples das bases nitrogenadas foram consideradas retangulares. Sequências com 21 bases, possuem uma área de 9,282 nm². Dessa forma, foi possível obter a relação entre áreas de cobertura das fitas, com relação à área da esfera da nano.

# 5.7 Testes de estabilidade das nanopartículas com oligonicleotideos e solução salina

Os testes de estabilidade e aglomeração foram feitos envolvendo nanopartículas de ouro, os oligonucleotídeos iniciadores F(gp43 e gp27) e a solução salina. Foram estudadas soluções com 5 µl de nanopartículas de ouro na concentração 4,08x10-9 M e 2 µl de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores separadamente, nas concentrações indicadas na Tabela 2. Para acelerar o processo de reação, antes dos registros para a determinação das curvas características, as soluções foram encubadas em um banho-maria digital a temperatura de 33°C. Por fim, as amostras receberam 1 µl da solução salina. No caso da solução salina do MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, a concentração de 2,6 mM. Com a solução salina do KCl, a concentração de 2,25 M (gp43) e 2,5 M (gp27).

Tabela 2 – Recobrimento de superfície das AuNPs

Percentual de Recobrimento da	Concentração
Superfície (%)	(x10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> )
100	6,6834
90	6,0150
80	5,3467
70	4,6783
60	4,0100
50	3,3417
40	2,6733
30	2,0050
20	1,3366
10	0,6683

Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

#### 5.8 Detecção molecular do P. brasiliensis pelo método Label-free

O *Label-free*, método de diagnóstico de doenças, utiliza soluções com nanopartículas de ouro estabilizadas. Fragmentos amplificados de sequências de DNA, por exemplo do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, são desnaturados. Para isso utiliza-se um termociclador, por exemplo, o Biocycler MJ96G.

Os oligonucleotídeos que não cobrirem a área superficial das nanopartículas, em processos já descritos anteriormente, se juntam a esses fragmentos; sendo, portanto complementares.

Uma solução salina serve para induzir o processo de aglomeração, de acordo com o que ocorrer com as sequências de DNA. Os fragmentos iniciadores, quando complementam as sequências de bases nitrogenadas dos fragmentos amplificados do fungo, indicam a presença desse microorganismo no paciente e, portanto, é diagnosticada a doença. O resultado dos testes, em caso positivo, mostra uma solução de cor azulada ou roxa num primeiro momento. Posteriormente, minutos ou horas depois, dependendo da velocidade do processo de aglomeração, essas soluções tendem ao cinza ou ao transparente. No caso do teste negativo, observa-se uma solução vermelha que deve permanecer por alguns minutos ou até horas, dependendo do tempo de estabilidade da solução. Isso significa que que não houve um complemento entre as sequências de bases nitrogenadas dos fragmentos amplificados e dos *primers*. Exemplos de resultados dos testes podem ser observados na Figura 7.



Figura 7 – Tubos com resultados colorimétricos dos testes: positivo (esq.) e negativo (dir.)

Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

A solução coloidal de nanopartículas de ouro utilizada possui uma absorbância de 4,08 u.a. na banda centrada em 523 nm ( $\lambda$ ). Assim, conforme Equação 7, A=4,08 u.a.,  $\varepsilon=1,0$ x $10^9$  M $^{-1}$ cm $^{-1}$  e b=1 cm, possibilitando calcular o valor de C=4,08x $10^{-9}$  M.

Se 1 M equivale a 6,022x10<sup>23</sup> partículas por litro, então 4,08x10<sup>-9</sup> M equivalem a 2,4569x10<sup>15</sup> partículas por litro. Esse valor multiplicado pela relação de áreas, da nanopartícula e dos oligos *gp27* ou *gp43*, obtém-se o valor 4,0247x10<sup>17</sup> partículas por litro ou "fitas" por litro. Dividindo esse valor pelo número de Avogadro obtém-se 6,68x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>, que é a concentração necessária para cobertura da superfície das nanopartículas pelos fragmentos iniciadores *gp27* ou *gp43*.

#### 5.8.1 Testes colorimétricos

Os testes colorimétricos foram executados contento 5 µl AuNPs na concentração 4,08x10-9 M, 2 µl de fragmento amplificado (complementar ou não complementar do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*) na concentração 10 ng/µl (*GP27*) e 20 ng/µl (*GP43*). Quanto aos oligonucleotídeos (iniciadores *F* e *R*), 1 µl de cada, na concentração 10 µM. Estes testes foram levados a um termociclador utilizando um ciclo de temperaturas, sendo ele: 5 min a 95°C, 10 min a 64°C e 10 s a 25°C. Após o ciclo finalizado, uma solução salina foi adicionada para induzir a aglomeração das nanopartículas não estabilizadas.

Para os testes do *GP*27 foram adicionados 1,75 μl da solução de MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O a 2,6 mM ou 1,0 μl da solução de KCl a 2,5 M. Para o *GP43* foi utilizado 1,25 μl da solução de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O a 2,6 mM ou 1,25 μl da solução de KCl a 2,25 M. A grande diferença nas concentrações é explicada pela característica de eletronegatividade dos elementos químicos: magnésio e potássio. A diferença em volume não é tão significativa, mas está relacionada com o resultado colorimétrico mais adequado e preciso para o observador.

O tempo médio de observação das reações, após adição da solução de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O foi de 3 min. No caso do KCl, o tempo médio de observação das reações foi de 2 min. Com relação as concentrações dos oligonucleotídeos, inicialmente estava sendo usada uma concentração de 1 µM, próxima ao valor de 100% de cobertura da nano, conforme mostrado da Tabela 2. Porém, na sequência dos testes, as

concentrações foram alteradas para valores superiores aos calculados, sendo utilizadas concentrações a 10 µM.

No processo de otimização dos testes colorimétricos foram realizados 312 testes do *GP27*, 50% com a solução de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e 50% com a solução de KCl. Metade deles para resultados positivos e a outra, negativos. 312 testes do *GP43*, 50% com a solução de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e 50% com a solução de KCl. Metade deles para resultados positivos e a outra, negativos.

#### 5.8.2 Análise estatística dos resultados

Uma análise estatística foi utilizada a fim de comparar os resultados dos testes revelados pelas duas soluções salinas. A Equação 10 foi elaborada para permitir a análise da qualidade do teste positivo e negativo, ou dos espectros:

$$\ln \frac{a1}{a2}$$
. [10]

Sendo a1 e a2 os valores de área calculados por meio da integração de duas regiões espectrais. A primeira em torno da banda de 523 nm e a segunda em torno da banda de 650 nm, respectivamente. No caso de a1 = a2, a razão será igual a 1, logo ln1 = 0; se a1 > a2, a razão será maior que 1, logo ln(a1/a2) será positivo; se a1 < a2, a razão será menor que 1, logo ln(a1/a2) será negativo.

Portanto esta equação matemática permite verificar rapidamente testes positivos e negativos, quando a1 e a2 são determinados em regiões coerentes, onde observa-se, para testes positivos, uma diminuição de absorção das regiões mais energéticas em relação às menos energéticas. Para os negativos, existe uma conservação da banda de 523 nm e uma diminuição de absorção das regiões menos energéticas, logo os valores de a1/a2 serão maiores que 1.

#### 5.9 Análise do Potencial Zeta e diâmetro hidrodinâmico

O Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*) foi utilizado na medida de distribuição de diâmetros das soluções coloidais de AuNPs. Esta técnica permite correlacionar o tamanho da partícula com a intensidade de luz espalhada.

Para esta caracterização foi utilizado o equipamento Zeta Sizer nano – ZS90 da Malvern, no modo "Size", sendo as cubetas utilizadas de poliestireno da Started, de dimensões 12,5 x 12,5 x 45,0 mm, para utilização a partir de 220 nm, referência 67.758 (modelo D-51588).

A análise do potencial Zeta da nanopartícula de ouro foi feita utilizando o equipamento ZetaSizer nano – ZS90 da Malvern, no modo "Zeta", em cubetas capilares com eletrodos da Malvern (modelo DTS1070). A solução coloidal de nanopartículas foi injetada por meio de uma seringa na cubeta com eletrodo, evitandose a formação de bolhas de ar.

#### **6 RESULTADOS**

#### 6.1 Solução coloidal de nanopartículas de ouro

A solução coloidal da nanopartículas de ouro (AuNPs) sintetizada mostra uma distribuição uniforme de partículas com diâmetro de 18,0 ± 4,0 nm. A solução foi analisada por *DLS*, sendo o resultado apresentado na Figura 8. O gráfico de barras mostra a intensidade do espalhamento em função da distribuição de nanopartículas.

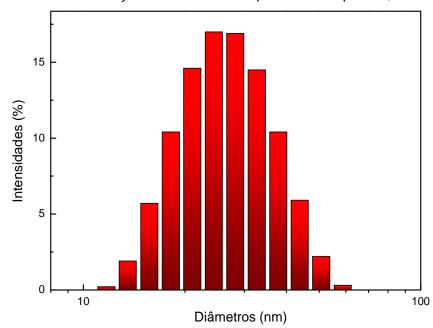


Figura 8 – Gráfico da distribuição do tamanho das partículas dispersas, como sintetizadas

Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

A Figura 9 mostra o espectro de UV-visível das nanopartículas dispersas e uma alíquota da solução AuNPs como sintetizada. A coloração vermelha é típica desta solução coloidal bem como uma banda de ressonância plasmônica centrada em 523 nm.

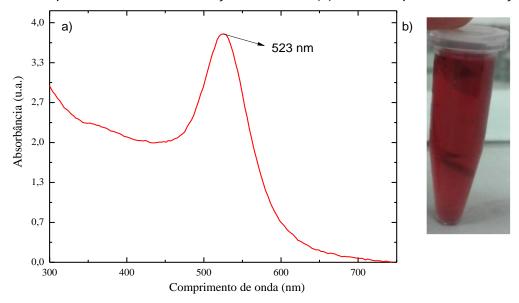


Figura 9 – Espectro UV visível da solução de AuNPs (a) e uma alíquota desta solução (b)

O valor do potencial Zeta da solução coloidal foi medido, sendo igual a 38,1 ± 2 mV. Portanto, a estabilidade coloidal foi alcançada para as nanopartículas como sintetizada, pois o valor do potencial Zeta é um indicativo de estabilidade coloidal, por meio de uma fórmula empírica, quando este valor está entre + 30 mV a – 30 mV a solução é classificada como instável [47].

#### 6.2 Influência da adição de soluções salinas nas nanopartículas de ouro

Para cada uma das soluções finais contendo nanopartículas de ouro e uma solução salina, nas devidas concentrações, foi possível analisar o espectro na região do UV-Vis. Nos testes de estabilidade, acompanhou-se, pelos espectros de cores visíveis ao olho humano, uma mudança gradual de cores, à medida que se aumentava a concentração das soluções salinas (Figura 10b). Dessa forma, identificou-se a partir de qual concentração iniciou-se o processo de aglomeração, conforme podemos verificar no espectro UV-visível referente à solução salina de cloreto de lítio na Figura 10a. As mudanças espectrais indicam desestabilização da solução coloidal, pois mostram as bandas de absorção das nanopartículas para um determinando comprimento de onda correlacionada com o diâmetro. As curvas representadas em vermelho indicam pouca aglomeração das nanopartículas, as representadas em azul indicam maior aglomeração, podendo ser correlacionada com a Figura 10b. Os resultados das demais soluções salinas estudadas estão nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

Figura 10 – A influência do aumento da concentração da solução salina de LiCl no espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs (a) e registro fotográfico das cores (b)

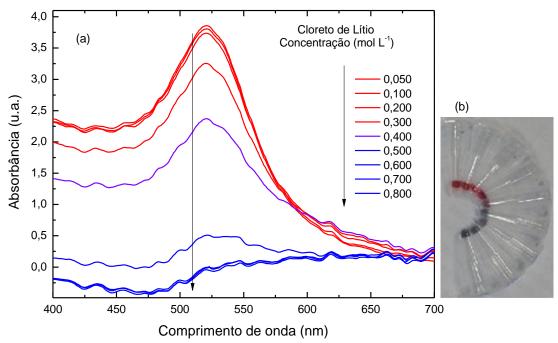
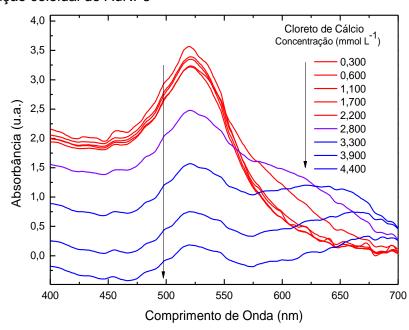


Figura 11 – A influência do aumento da concentração da solução salina de CaCl<sub>2</sub> no espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

Figura 12 – A influência do aumento da concentração da solução salina de KCl no espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs

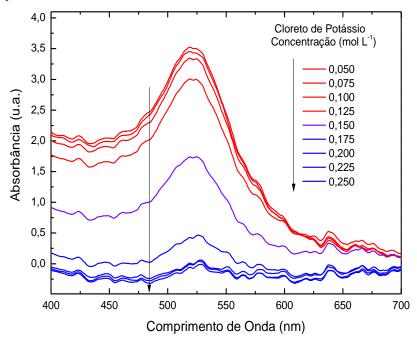
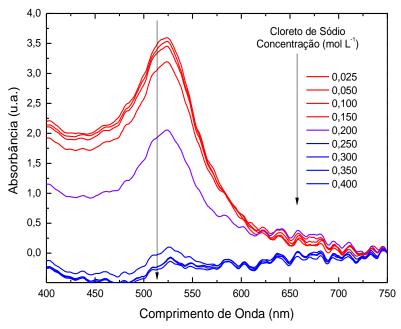


Figura 13 – A influência do aumento da concentração da solução salina de NaCl no espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

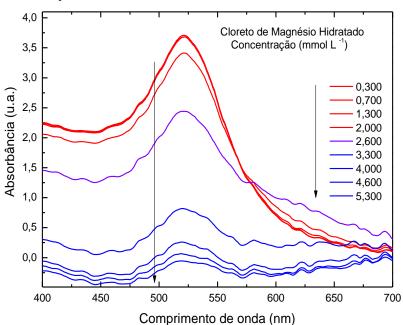
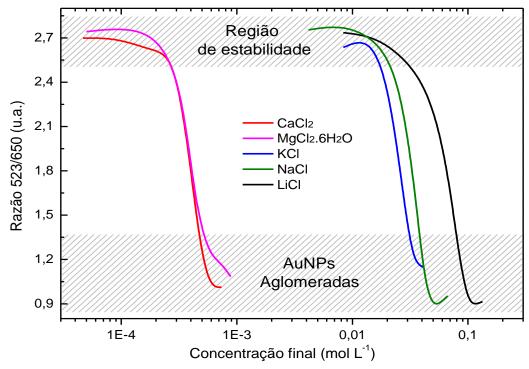


Figura 14 – A influência do aumento da concentração da solução salina de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O no espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs

A análise dos espectros permite verificar algumas semelhanças, como as bandas de absorção no comprimento de onda de 523 nm para as menores concentrações da solução salina. Já com o aumento das concentrações, verifica-se uma redução da absorção desta banda, aumentando as absorções para comprimentos de onda menos energéticos, como a de 650 nm.

Este comportamento pode ser explicado pelo início do processo de aglomeração. Para a solução com CaCl<sub>2</sub> isso ocorre na concentração de 2,8 mM, com KCl de 0,15 M, com NaCl de 0,20 M, com MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O de 2,6 mM e com LiCl de 0,40 M. Porém, observou-se um comportamento desigual quanto ao intervalo de suas concentrações utilizado nos experimentos. Para uma melhor comparação entre os resultados dos espectros das soluções salinas, foi elaborado um gráfico onde o eixo das abscissas, em escala logarítmica, relaciona as concentrações molares finais das soluções e o eixo das ordenadas relaciona a razão entre os valores das absorbâncias das bandas 523 nm e 650 nm; conforme Figura 15.

Figura 15 – Gráfico comparativo da razão das absorbâncias entre as bandas 523 nm e 650 nm em função do aumento das concentrações das soluções salinas. Da esquerda para a direita, curva solução: CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, KCl, NaCl e LiCl.



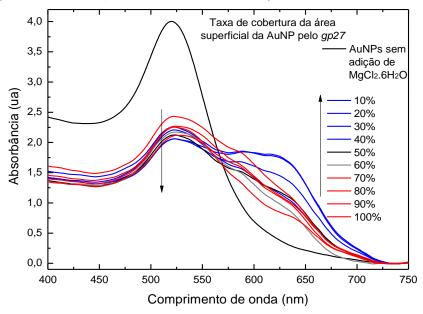
## 6.3 Teste de estabilidade de nanopartículas de ouro, oligonucleotídeos e soluções salinas

Nesta etapa de procedimentos, além de nanopartículas e a solução salina, foram acrescentados os oligonucleotídeos. As nanopartículas sintetizadas mostraram características típicas de uma solução coloidal de nanopartículas de ouro.

A concentração medida foi de 2,45x10<sup>15</sup> partículas por litro, pela aproximação à Lei de *Beer-Lambert* (Equação 7). No caso do *gp27* e do *gp43* utilizados, a relação entre as áreas da superfície esférica da nano e de uma fita simples foi de 163,81 oligos/nano. Dessa forma, a concentração pôde ser calculada e o valor obtido foi de 6,68x10<sup>-7</sup>mol L<sup>-1</sup>. Com esses dados, foram calculadas as quantidades necessárias para cobertura percentual variando entre 10 a 100. Quando adicionada à solução salina na concentração que inicia o processo de aglomeração (estudo feito no item 6.2), a influência da adição de oligonucleotídeos pode ser analisada. Os espectros obtidos e os testes colorimétricos podem ser verificados para os fragmentos do *gp27* (Figuras 16 e 17) e *gp43* (Figuras 18 e 19).

As curvas em vermelho mostram que, entre 70% e 100% da área superficial das nanopartículas está recoberta, favorecendo a estabilidade da solução mantendo a coloração vermelha. As curvas em azul mostram que, entre 10% e 40% da área superficial das nanopartículas está recoberta, desestabilizando a solução e permitindo o processo de aglomeração dessas partículas.

Figura 16 – A influência do aumento do recobrimento superficial pelo *gp27*, na presença da solução de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O no espectro do UV-Vis da solução coloidal de AuNPs



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

Figura 17 – A influência do aumento do recobrimento superficial pelo *gp27* na presença da solução de KCl no espectro do UV-Vis da solução coloidal de AuNPs

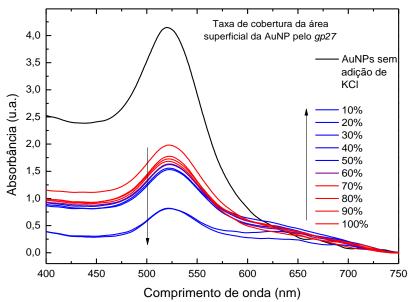
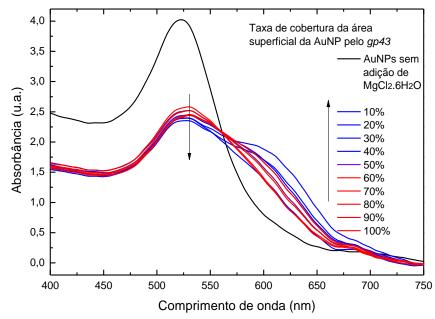


Figura 18 – A influência do aumento do recobrimento superficial pelo *gp4*3 na presença da solução de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O no espectro do UV-Vis da solução coloidal de AuNPs



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

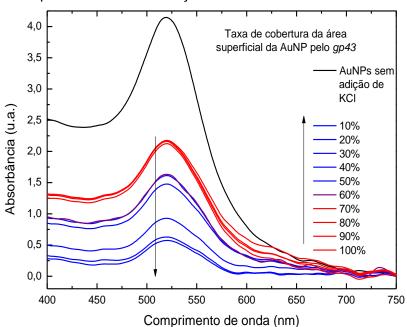


Figura 19 – A influência do aumento do recobrimento superficial pelo *gp43* na presença da solução de KCI no espectro UV-Vis da solução coloidal de AuNPs

Para ambos os oligonucleotídeos, os testes foram realizados e os resultados foram satisfatórios, como podem ser observados nos espectros e nas curvas de aglomeração. Algumas curvas de estabilidade mostram a banda de absorção das nanopartículas dispersas sem adição da solução salina, centrada em 523 nm.

Na presença da solução salina, à medida que a cobertura superficial dessas partículas, feita pelos oligonucleotídeos, foi diminuindo (porcentagens 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10), essa banda foi se deslocando para 650 nm. Nanopartículas com pouca aglomeração possuem maiores porcentuais de recobrimento, mas aquelas com menores percentuais aglomeram-se com maior facilidade. Por meio dos testes colorimétricos, observou-se a evolução da aglomeração de nanopartículas em função da variação de cobertura de sua área superficial pelos oligonucleotídeos.

#### 6.4 Testes colorimétricos Label-free

Os testes foram compostos de 5 μl de AuNPs na concentração 4,08x10<sup>-9</sup> M, 2 μl de fragmento amplificado (complementar ou não complementar) nas concentrações 10 ng/μl (*GP27*) e 20 ng/μl (*GP43*), 1 μl de *oligonucleotídeos*-F e 1 μl *oligonucleotídeos*-R na concentração 10 μM.

Foram necessários vários testes preliminares até que se conseguisse chegar aos parâmetros considerados ideais para a realização dos experimentos e a aplicação nas situações de diagnóstico da doença e a presença do *Paracoccidioides brasiliensis*. Conforme se pôde verificar, os parâmetros não foram os mesmos para as sequências e as soluções salinas envolvidas. Foram realizados 624 testes no total, sendo 50% deles para testes positivos e 50% deles para testes negativos. Devido as dificuldades iniciais em otimizar os parâmetros experimentais, 152 foram completamente descartados. Dos restantes 472 testes, 192 ou 40,6% dos experimentos foram considerados satisfatórios; ou seja, observaram-se os resultados colorimétricos nos tubos e foi possível interpretar os espectros diferenciando os resultados entre testes positivos e negativos.

Por meio das caracterizações por espectroscopia UV-Visível observou-se que com a solução salina MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, a banda de absorção para o teste positivo se desloca para direita, mantendo praticamente o mesmo valor na absorbância e com relação ao teste com solução salina KCl, há uma variação na banda de absorção na banda de 523 nm e uma pequena elevação na banda de 650 nm.

#### 6.4.1 Testes Label-free da GP27

As Figuras 20 e 22 mostram os resultados obtidos nos testes envolvendo o GP27 com solução salina de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e KCl, respectivamente.

O espectro de linha na cor azul representa o resultado positivo do teste, enquanto que o vermelho representa resultado negativo.

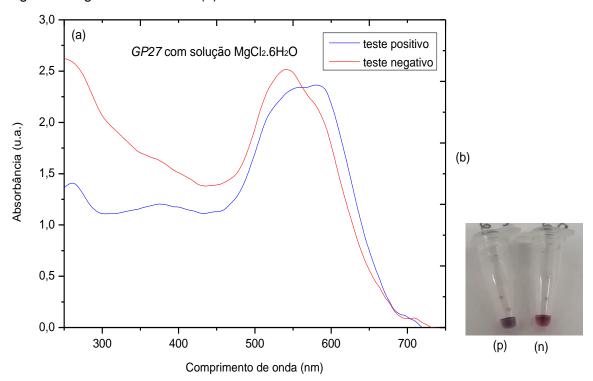


Figura 20 – Espectro UV-Vis dos testes *Label-free GP27* com solução MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (a) e registro fotográfico das cores (b)

Na figura 20 é possível observar a absorbância máxima em torno de 523 nm, para o teste negativo, e um deslocamento da absorbância máxima em torno de 600 nm para o positivo. Neste caso, o cálculo das áreas por meio de integração, se concentrou entre os comprimentos de onda 520 e 540 nm (a1); 560 e 580 nm (a2).

O gráfico da análise estatística (Figuras 21 e 23) relaciona no eixo das ordenadas, o logaritmo das razões entre as áreas dos testes negativos e dos positivos, nas bandas de 523 nm e 650 nm.

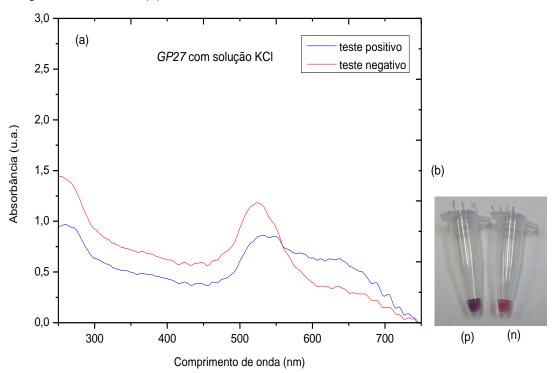
Um bom resultado, mostra valores positivos para os resultados positivos dos testes e valores negativos para os resultados negativos dos testes. Resultados muito próximos ou iguais a zero, indicam pouca diminuição ou ganho de absorbância, em uma mesma região ou banda, de um teste negativo e positivo, o que não mostra um bom resultado.

(-) soylivood (-

Figura 21 – Análise estatística testes *Label-free GP*27 com MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. Testes colorimétricos (abcissas) e In a1/a2 (ordenadas)

Percentual de resultados satisfatórios de acordo com o gráfico: 93,8%

Figura 22 – Espectro UV-Vis dos testes *Label-free GP27* com solução KCI (a) e registro fotográfico das cores (b)



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

Neste caso, o cálculo das áreas por meio de integração, se concentrou entre os comprimentos de onda 440 e 460 nm (a1); 565 e 585 nm (a2), conforme a influência da solução salina no espectro UV-Vis.

Figura 23 – Análise estatística testes *Label-free GP*27 com KCl. Testes colorimétricos (abcissas) e ln a1/a2 (ordenadas)



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

Percentual de resultados satisfatórios de acordo com o gráfico: 75,0%

#### 6.4.2 Testes Label-free da GP43

As figuras 24 e 26 mostram os resultados obtidos nos testes envolvendo o *GP43* com solução salina de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e KCl, respectivamente.

O espectro azul representa o resultado positivo do teste. O vermelho representa o resultado negativo.

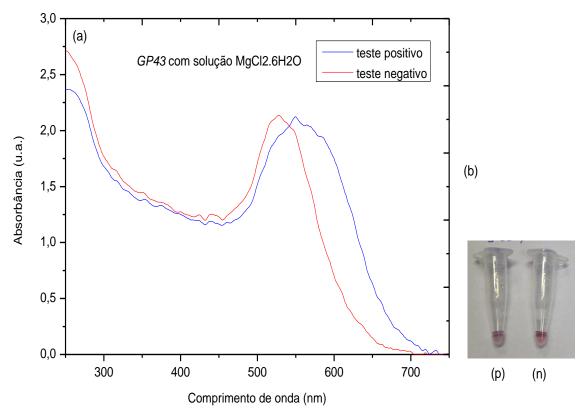


Figura 24 – Espectro UV-Vis dos testes *Label-free GP43* com solução MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (a) e registro fotográfico das cores (b)

Neste caso, o cálculo das áreas por meio de integração, se concentrou entre os comprimentos de onda 520 a 540 nm (a1); 560 a 580 nm (a2).

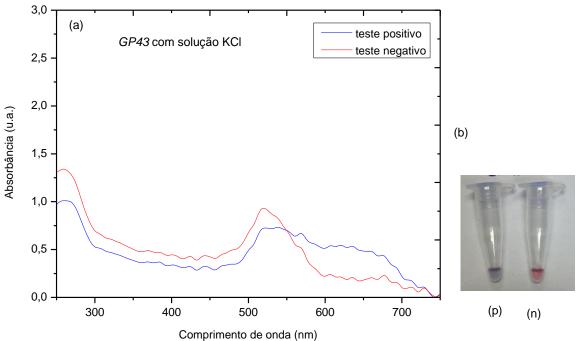
As análises estatísticas feitas por meio da equação 10 são mostradas nas Figuras 25 e 27, para os testes colorimétricos da *GP43* utilizando a solução de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e KCl, respectivamente.

(+) sovitisod (-) sovitised (-

Figura 25 – Análise estatística testes *Label-free GP43* com MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. Testes colorimétricos (abcissas) e In a1/a2 (ordenadas)

Percentual de resultados satisfatórios de acordo com o gráfico: 97,9%

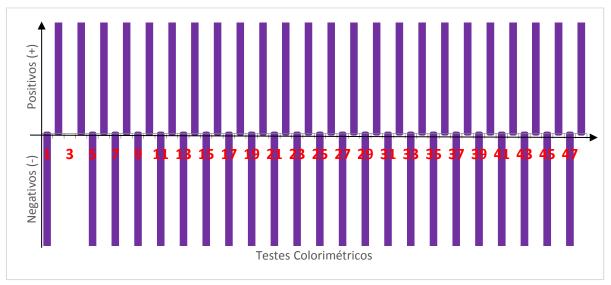
Figura 26 – Espectro UV-Vis dos testes *Label-free GP43* com solução KCI (a) e registro fotográfico das cores (b)



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

Neste caso, o cálculo das áreas por meio de integração, se concentrou entre os comprimentos de onda 440 a 460 nm; 565 a 585 nm.

Figura 27 – Análise estatística testes *Label-free GP43* com KCl. Testes colorimétricos (abcissas) e ln a1/a2 (ordenadas)



Fonte: Autor. Laboratório de Nanossensores

Percentual de resultados satisfatórios de acordo com o gráfico: 97,9%

#### 7 DISCUSSÃO

#### 7.1 Solução de nanopartículas de ouro na presença de solução salina

Na síntese de nanopartículas de ouro, após a adição de citrato de sódio, a coloração muda de amarelada para vinho, formando uma solução coloidal. As nanopartículas do líquido são separadas por uma força iônica devido à camada de citrato de sódio absorvida na superfície [4]. Possuindo cargas de mesmo sinal, as partículas se repelem, e isto evita sua aglomeração e precipitação.

Uma solução coloidal é mais estável mediante o tempo necessário para a precipitação das nanopartículas. Soluções coloidais de nanopartículas metálicas exemplificam partículas nanométricas em um meio líquido. A gravidade ou fatores externos, como a exposição da luz, podem fazer com que partículas disseminadas formem agregados de tamanho maior, pela adesão de umas nas outras [48].

No estudo da influência da solução salina na estabilidade coloidal, soluções finais contendo nanopartículas de ouro e uma das soluções salinas nas devidas concentrações, foram analisadas por meio do UV-Vis. Para as soluções salinas dos sais envolvidos: CaCl<sub>2</sub>, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e NaCl observou-se pela análise dos gráficos algumas semelhanças como, por exemplo: as bandas de absorção no comprimento de onda de 523 nm para as menores concentrações das soluções salinas, muito próximas do ponto máximo de absorção da solução coloidal da nanopartícula sintetizada. O aumento da concentração dessas soluções salinas provocou uma redução de absorção desta banda, aumentando as absorções para comprimentos de onda menos energéticos. Este comportamento pode ser explicado pelo início do processo de aglomeração.

As faixas de concentrações destas soluções foram: cloreto de potássio entre 0,050 e 0,250 mol L<sup>-1</sup>; cloreto de sódio entre 0,025 e 0,400 mol L<sup>-1</sup>; e a de cloreto de lítio entre 0,050 e 0,800 mol L<sup>-1</sup>.

Estes valores são similares levando em consideração a característica de cada elemento, sendo um resultado explicado pelos valores de eletronegatividade destes elementos da família (1A) metais alcalinos serem muito próximos, lítio 1,0 eV, sódio 0,9 eV e potássio 0,8 eV [49].

Enquanto que para a solução de cloreto de cálcio foi utilizado uma faixa bem diferente, entre 0,30 a 4,40 mmol L<sup>-1</sup> e para a solução de cloreto de magnésio hidratado entre 0,30 a 5,30 mmol L<sup>-1</sup>. Este resultado era esperado, pois magnésio e cálcio pertencem à família (2A) metais alcalinos terrosos, por isso há uma proximidade entre o intervalo de concentração das soluções salinas. O que explica essa diferença de intervalo entre as famílias é a eletronegatividade. Magnésio e cálcio, com eletronegatividade de 1,3 eV, são mais eletronegativos do que lítio, sódio e potássio.

Nos testes de aglomeração das soluções salinas com elementos da família 1A, por exemplo, soluções a 0,15 mol L<sup>-1</sup>, 0,20 mol L<sup>-1</sup> e 0,40 mol L<sup>-1</sup> influenciavam a intensidade da banda de absorção na região de comprimento de onda de 523 nm, devido a desestabilização das nanopartículas de ouro. Entretanto, este comportamento foi diferente para as soluções com elementos da família 2A, que precisavam de uma solução a 2,6 mmol L<sup>-1</sup> ou 2,8 mmol L<sup>-1</sup> para ocorrer o mesmo efeito. Os principais fatores que contribuem para o aumento da estabilidade dos coloides são as cargas elétricas e a adsorção do dispersante que leva a formação de uma película em torno da partícula coloidal, que é denominada camada de solvatação, a qual evita o contato direto entre as nanopartículas em suspensão e, consequentemente, sua aglomeração e precipitação.

Dependendo dos elementos químicos envolvidos e de suas características, deve estar mais concentrado ou menos concentrado, para que o resultado colorimétrico seja o mesmo; pois aumentando-se a concentração dos reagentes envolvidos, pode-se aumentar a frequência dos choques entre as moléculas reagentes e, consequentemente, aumentar a velocidade da reação. Elementos da família 2A possuem dois elétrons na sua última camada e os da família 1A possuem um elétron na sua última camada. Assim, magnésio e cálcio atraem elétrons com maior força do que lítio, potássio e sódio [50]. Dessa forma, esses dois elementos precisam de uma concentração menor para reagir com as nanopartículas. A velocidade de uma reação é proporcional às concentrações molares dos reagentes. O tempo previsto de reação entre a solução salina e a nanopartícula deve ser padronizado; pois análises feitas com o tempo das reações muito diferentes, podem ocasionar distorções nos resultados. A detecção da ocorrência da aglomeração, nas soluções, por meio das mudanças graduais de cores pelo olho humano torna-se eficiente e quantificável por meio da análise de espectrofotometria.

Foi possível verificar por meio dos espectros dos resultados, dos testes de aglomeração com as soluções salinas, que, para os elementos da família 1A, com o aumento da concentração, a absorbância máxima na banda de 523 nm decresce, não havendo um deslocamento de absorbância máxima para outra região espectral. Para as soluções salinas dos elementos da família 2A, observou-se que, com o aumento da concentração, e consequentemente o processo de aglomeração, há um decréscimo da absorbância máxima na banda de 523 nm e um deslocamento de absorbância máxima para a banda de 650 nm [51].

Uma das maiores preocupações nas sínteses é controlar o tamanho das partículas a fim de obter uma boa relação entre a ressonância plasmônica superficial e distribuição de tamanho das partículas estabilizadas. Considerando partículas esféricas, quanto maior o deslocamento da ressonância plasmônica para menores comprimentos de onda, menor é o tamanho da partícula. A luz polariza menos as partículas menores, que possuem uma força eletrostática atuante maior [11]. Conforme pode-se observar nas Equações 1 e 2, a força de atração e a energia de interação dipolo-dipolo estão relacionadas com o tamanho do raio das partículas envolvidas. Como seu valor está elevado ao cubo, a perda de energia é muito elevada a medida de o raio aumenta. Pode-se interpretar esse aumento do raio como uma situação de aglomeração de partículas.

# 7.2 Estabilidade de nanopartículas de ouro com oligonucleotídeos na presença de solução salina

Conforme observado nos espectros, os resultados da absorbância, na banda de 523 nm, para qualquer valor percentual de recobrimento superficial da nanopartícula, são consideravelmente menores do que os da nanopartícula estabilizada. As fotografias foram feitas em tempo cronometrado, registrando início e término dos experimentos, quando foi verificada uma quantidade maior de amostras com as cores mais próximas do azul (aglomeração) para o magnésio, em relação ao potássio que mantinha mais a coloração vermelha (estabilidade).

Nos espectros, também pode-se verificar que, no caso dos elementos da família 2A, a absorbância diminui com maior rapidez na banda de 523 nm quando comparada aos valores dos elementos da família 1A.

As amostras recobertas com: 10%, 20% ou 30%, também apresentam colorações diferentes para as soluções de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e de KCl.

Em todos os experimentos foi observado que a adição de oligonucleotídeos, independentemente da sequência e da solução salina, aumentou a estabilidade da solução coloidal, preservando a banda de *SPR*.

Porém, existe um descrécimo de absorção comparado com as nanopartículas sintetizadas, em virtude de eventuais processos de aglomeração em função da distribuição de oligonucleotídeos em cada nanopartícula, sendo um processo aleatório [52].

#### 7.3 Método Label-free para detecção molecular e diagnóstico de doenças

Existe uma demanda por novas formas de diagnóstico de doenças causadas por fungos. A busca pela redução de custos na elaboração dos diagnósticos, pela simplicidade no manuseio dos materiais envolvidos e interpretação dos resultados em um menor espaço de tempo devem permanecer constantes. Exames e testes laboratoriais são dispendiosos e laboriosos.

O reconhecimento do valor das nanopartículas veio da demonstração da visível mudança de cor causada pela aglomeração e consequente encontro de sensores com sequências de DNA alvo. Essa mudança de cor é um resultado da ressonância plasmônica influenciada pelo espaçamento de organização das mesmas, um processo que pode ser influenciado pelo contato de ácidos nucleicos. Isso indica que tais pesquisas podem ter aplicações no mundo real [53]. Nanopartículas de ouro funcionalizadas com oligonucleotídeos tiolados têm apresentado vantagens sobre diagnósticos convencionais tais como praticidade, aumento da sensibilidade, especificidade e custo razoável [52,54]. Biossensores possibilitam a detecção de ácidos nucleicos, entre outras aplicações, pois estas sondas reagem rapidamente com o DNA [4,55].

A grande vantagem do método *Label-free* é ausência do procedimento de funcionalização das nanopartículas, dispensando consumo de tempo e reagentes, sendo testado na identificação de proteínas e ácidos nucleicos [18,56]. Neste contexto, o presente trabalho foi motivado pela simplicidade deste método.

Os primeiros testes colorimétricos não mostraram resultados satisfatórios. Três parâmetros foram otimizados, um de cada vez, sendo eles: 1º) aumento do percentual de recobrimento das nanopartículas por oligonucleotídeos iniciadores, utilizando 100%; 2º) purificação do produto amplificado em laboratório [8] e padronização em 10 ng/µl; e 3º) redução da concentração da solução salina de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. As alterações proporcionaram resultados mais significativos.

Os resultados das análises estatísticas demonstraram que a utilização do GP27 com a solução salina de KCI é mais indicada em comparação a de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. Com a solução salina de KCL, os resultados colorimétricos foram confirmados, quase na sua totalidade, pelos espectros que resultaram no estudo utilizando a Equação 10. Embora as observações colorimétricas tenham sido coerentes para a segunda solução salina, o resultado pela análise dos espectros apresentou incoerências.

A utilização do *GP43*, que foi o primeiro gene caracterizado em *P. bresiliensis*, se demonstrou uma boa alternativa com ambas às soluções salinas, pois os resultados colorimétricos foram confirmados, quase na totalidade, pelos espectros que resultaram no gráfico da Equação 10. As soluções salinas provenientes da família 1A mostraram resultados semelhantes no gráfico da Figura 15, mas o KCI foi pouco explorado na literatura. Portanto, o estudo dessa solução salina contribuirá para futuras comparações.

Houve, inicialmente, uma certa dificuldade em otimizar os parâmetros experimentais, para cada sequência de DNA envolvida: concentração e volume. Essas dificuldades surgiram em virtude de parâmetros como: sequência de bases, concentração CG e temperatura de anelamento. O período de observação das reações foi de 2 a 3 minutos [4]. Um resultado colorimétrico satisfatório elimina a exigência de comprovação do teste com equipamentos eletrônicos como o espectrofotômetro. No caso do *GP27*, tanto utilizando a solução salina de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O como de KCl, a melhor concentração foi de 10 ng/μl. No caso do *gp43*, utilizando as mesmas duas soluções salinas, a melhor concentração foi de 20 ng/μl. Este fato pode ser explicado pelo tamanho, pois o *GP27* possui 538 pares de bases e o *GP43*, 378 pares, sua sequência é maior, portanto seria necessária uma quantidade menor de sequências para o recobrimento da nano.

O que ocorreria o oposto com o *GP43*, pois para a mesma concentração são necessários mais fragmentos complementares em virtude do maior número de fitas.

Por isso a concentração necessária do *GP27* foi menor que a concentração necessária do *GP43*.

Neste contexto, o resultado dos testes colorimétricos com a solução salina de magnésio apresentou cores mais fortes do que uma com potássio, que apresenta cores menos fortes ou vivas. Isso ocorre, pois como já explicado anteriormente, a família 2A é mais eletronegativa e atrai a nanopartícula com mais intensidade do que os elementos da família 1A.

A análise estatística mostra que a utilização do *GP43*, utilizando a solução salina com magnésio ou com potássio, apresentou melhores resultados do que a utilização do *GP27*.

#### 8 CONCLUSÃO

A análise do comportamento de AuNPs na presença de soluções salinas mostrou que aquelas compostas pelos elementos químicos da família dos metais alcalinos terrosos, em uma baixa concentração, produzem um efeito semelhante às formadas pelos elementos da família dos metais alcalinos em concentrações muito maiores. O efeito é de aglomeração das nanopartículas de ouro ou desestabilidade coloidal, a partir de uma determinada concentração dessas soluções salinas.

Nos testes de estabilização das nanopartículas de ouro, por meio de oligonucleotídeos na presença de solução salina, foi observado que um aumento do recobrimento superficial das nanopartículas retarda o processo de aglomeração ou desestabilização, alterando a sua coloração inicial vermelha ou vinho, com absorção máxima centrada em 523 nm, para roxa ou azul com aumento de absorção na região em torno de 650 nm. Entretanto nos experimentos de 100% de recobrimento superficial, a estabilidade foi mantida na presença da solução salina.

O método *Label-free* utilizado nos testes colorimétricos mostrou-se eficiente para o objetivo de detecção do DNA do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Houve a identificação molecular do fungo, no caso de sequências complementares, e o resultado colorimétrico visível permitiu um resultado correto. A análise espectral comprovou o observado nos testes colorimétricos. No caso do *GP27*, tanto utilizando a solução salina de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O como de KCl, a melhor concentração foi de 10 ng/μl. No caso do *GP43*, utilizando as mesmas duas soluções salinas, a melhor concentração foi de 20 ng/μl.

A análise estatística, realizada por meio de um recurso matemático simples, permitiu concluir que a detecção molecular do *Paracoccidioides brasiliensis* foi mais eficiente utilizando a *GP43* em comparação com o *GP27*, tanto para a solução salina de KCl ou MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, com 97,9% dos testes com resultados satisfatórios.

#### **9 PERSPECTIVAS E PROJETOS FUTUROS**

Otimizar o processo, na busca de resultados satisfatórios da análise estatística mais próximos dos 100%.

Validar a metodologia *Label-free* por meio de outros processos, além da análise estatística com recurso matemático simples utilizado.

Padronizar o procedimento após otimização.

Testar outros metais, por exemplo, nanopartículas de prata para utilização da metodologia sugerida.

Diagnosticar, molecularmente, outros fungos ou outra sequência gênica conhecida, através do método *Label-free*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química nova**, Vol. 35, Nº 7, 1434-1446, 2012.
- [2] FREIRE, R. Físico-Química. 2ª ed. São Paulo: Ed. Moderna, 1982.
- [3] COMPARATO FILHO, O. O. et al. **Análise comparativa de soluções de nanopartículas de ouro na presença do Cloreto de Magnésio hidratado e do Cloreto de Lítio**. Resumo. Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XV EPG). 2015. [Orientador: Prof. Dr. Leandro J. Raniero].
- [4] MARTINS, J. F. S. Identificação do fungo *Paracoccidiodes brasiliensis* por nanossondas de ouro. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2012. [Orientação: Prof. Dr. Leandro J. Raniero].
- [5] THAKOR, J. J. et. al. Gold Nanoparticles: A Revival in Precious Metal Administration to Patients. **Nano Letters**, v. 11, p. 4029-4036, 2011.
- [6] ALMEIDA, C. M. S. **Gold nanoparticle-DNA conjugates for oligonucleotide vectorization towards gene silencing.** 2011. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- [7] MIRKIN, C. A. et. al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. **NATURE.** VOL. 382. 15 AUGUST 1996.
- [8] CASTILHO, M. L. **Diagnóstico por nanopartículas de ouro funcionalizadas com fragmento do gene** *gp27* do *Paracoccidioides brasiliensis.* 2012. 29f. TCC (Engenharia Biomédica). Faculdade de Engenharia, Arquitetura e Urbanismo. Universidade do Vale do Paraíba. [Orientador: Prof. Dr. Leandro J. Raniero].
- [9] SU, H. et al. Label-free DNA sensor with PCR-like sensitivity based on background reduction and target-triggered polymerization amplification. **Elsevier Biosensors and Bioeletronics.** 52 (2014), 417-421.
- [10] PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia.** Tradução da 4ª edição norte-americana. 1ª ed. São Paulo: Cengage Learnig, 2013.
- [11] ZAMARION, V. M. Estudos e Aplicações de Ressonância Plasmônica Superficial em Nanossondas SERS. São Paulo. 2008. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- [12] LOPES, J. L. **A Estrutura Quântica da Matéria.** Do átomo pré-socrático às partículas elementares. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 2005.
- [13] AMALDI, U. Imagens da Física. São Paulo: Ed. Scipione, 1985.

- [14] STORHOFF, J. J. et al. What Controls Optical Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies?, **Journal of The American Chemical Society**, v. 122, issue 19, p. 4640-4650, 2000.
- [15] FERREIRA, I. et al. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* by FT-IR spectroscopy and nanotechnology, **Spectrochimica** Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 152, 397-403, 2016.
- [16] CHENG, F. et al. A gold nanoparticle-based label free colorimetric aptasensor for adenosine deaminase detection and inhibition assay. **Analyst**. 140(5):1572-7, 2015.
- [17] SATO K.; HOSOKAWA, M.; MAEDA, M. Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by *non-cross-linking* DNA hybridization. **J. Am. Chem. Soc.** 125 (2003) 8102-8103.
- [18] HUIXIANG, L; ROTHBERG, L. J. Label-free Colorimetric Detection of Specific Sequences in Genomic DNA Amplified by the Polymerase Chain Reaction; **Journal of The American Chemical Society**, v. 126, p. 10958-10961; 2004.
- [19] ABRIL COLEÇÕES. **Atlas do corpo humano**. Editora Abril. São Paulo. 2008. Vol. 3. p. 45.
- [20] MARESCA, B.; KOBAYASHI, G. S. Dimorphism in *Histoplasma capsulatum and Blastomices dermatitis.* In: ERNST J. F.; SCHIMIDT, A, (Ed). Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeast. **Contr. Microbiol. Basel:** Karger, 2000. p. 201-216. cap. 5
- [21] BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSEY, A. R. **Trends Microbiol.** 10, 2002.
- [22] MOTOYAMA, A. B.; et. al. Molecular Identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR Amplification of Ribosomal DNA. **Journal of clinical microbiology.** V.38, n.8,p.3106-3109, 2000.
- [23] GOODSELL, D. S. **Bionanotechnology:** Lessons from Nature. New York: Willey-Less, 2004.
- [24] FORTES, M. R. P.; et. al. Imunologia da Paracoccidioidomicose. **Anuário Brasil. Dermatolog.** Rio de Janeiro, v.86, n.3, June 2011.
- [25] MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia. Uma revisão teórica. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 64(2):155-161, 2005.
- [26] FEITOSA, L. S. et al. Chromosomal polymorphism, syntenic relationsships and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genet Biol.**, v. 39, p. 60-69.

- [27] REINOSO, C. et al. **The genome of** *Paracoccidioides brasiliensis:* an **overview.** In: Congresso virtual de Micologia de Hongos Patógenos em América Latina, 4., 2003. Caracas Venezuela. Anais... Caracar: Hongos Patógenos em América Latina, 2003.
- [28] BORELLI, D. Some ecological aspects of Paracoccidioidomycosis. **PAHO Sc. Publ.** v. 254, p. 59, 1972.
- [29] FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. Revista Soc. Brasil. Med. Trop. 20, p.129, 1987.
- [30] RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323-334, 1985.
- [31] LAZERA, M. S. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hellow. Medical **Mycology.** 1998, 36, 119-122.
- [32] ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA << http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/34214 >>. Acesso em: 23 fev. 2016.
- [33] MARQUES, S. A. *Paracoccidioidomycosis*: epidemiological, clinical and treatment up-date. **An bras Dermatol**, v. 78, n. 2, p. 135-150, 2013.
- [34] BIOLABOR MEDICINA DIAGNÒSTICA << http://www.biolabor.com.br >>. Acesso em: 27 fev. 2016.
- [35] NOGUEIRA, A. C. et al. Fístula traqueoesofágica associada a *Paracoccidioidomicose*. **Autopsy Case Rep.**, v. 1, p. 31-38, 2011.
- [36] SAN-BLAS, G. *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioidomycosis:* molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 225-242, 2002.
- [37] ELAISSARI, A. **Colloidal Nanoparticles in Biotechnology.** John Wiley & Sons, Inc. Publication. Hoboken. 2008.
- [38] PEREIRA, D. A. **Síntese e funcionalização de nanopartículas de ouro para a formação de bionanoconjugados para o desenvolvimento de biossensores.** 2014. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- [39] COSTA, G. B. Relatório de atividades de dois anos de bolsa de Iniciação Científica, p.8, 2015. [Orientador: Prof. Dr. Leandro J. Raniero].
- [40] BEDÊ, P. M. Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro.

- [41] EVERTT, D. H. Principles of Colloidal Science. **Journal of Chemical Technology** and **Biotechnology**, v.45, p.328-329, 1989.
- [42] XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potencial measurement. **Particuology**, v.6, p.112-115, 2008.
- [43] LINNE, M. A. Spectroscopic Measurement. An Introduction to the Fundamentals. Academic Press, 2002.
- [44] BARBOSA, A. L. **Dicionário de Química.** 4ª ed. Goiania: AB Editora, 2007.
- [45] JENSEN, T. R., SCHATZ, G. C., VAN DUYNE, R. P. Nanosphere Lithography: Effect of the External Dieletric Medium on the Surface Plasmon Resonance Spectrum of a Periodic Array of Silver Nanoparticles. **J. Phys. Chem.**; 103:2934, 1999.
- [46] LEE, P.; MEISEL, D. Adsorption and surface-anhaced Raman of dyes on silver and gold sols. **J. Phys. Chem.** 86 (1982) 3391-3395.
- [47] TOMA, H. E.; **O mundo nanométrico: a dimensão do novo século.** Ed. Oficina de textos: São Paulo, 2004.
- [48] ZHANG, J. Z.; NOGUEZ, C. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures. **Plasmonics.** v.3, p.127-150, 2008.
- [49] SLIDE PLAYER << http://www.slideplayer.com.br >>. Acesso em: 12 jul. 2016
- [50] DOMINGUES, S. Classificação Periódica dos Elementos. 2ª ed. São Paulo: Ed. Edart, 1975.
- [51] DORIA, G.; FRANCO, R.; BATISTA, P. Nanodiagnostics: fast colorimetric method for single nucleotide polymorphism/mutation detection. **IET Nanobiotechnol.** 1 (2007) 53-57.
- [52] COMPARATO FILHO, O. O.; CÂNDIDO, M. A.; LEMES, G. M.; RANIERO, L. J. Influência da concentração de oligonucleotídeos no efeito de aglomeração de nanopartículas na presença de solução salina. **Revista Univap revista.univap.br.** São José dos Campos SP Brasil, v. 22, n. 39, jul. 2016. ISSN 2237-1753.
- [53] GIUSTO, A. D.; KING, G. C. Special-Purpose Modifications and Immobilized Functional Nucleic Acids for Biomolecular Interactions. School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, University of New South Wales, NSW 2052 Sydney, Australia. **Top Curr Chem.** v. 261, p. 131-168. September 2005.
- [54] LARGUINHO, M.; BAPTISTA, P. V. Gold and silver nanoparticle for clinical diagnostics-from genomics to proteomics. **J. Proteomics.** 75, p.2811-2823, 2011.
- [55] KELLEY, S. O. Detector de doenças. **Scientific American Brasil.** Ano 14, nº 163, p. 42 45, dezembro de 2015.

[56] RACKUS, D. G., et. al. A digital microfluidic device with integrated nanostructured microelectrodes for electrochemical immunoassays. **Lab on a Chip.** vol. 15, nº 18, p. 3776-3784; 21 de dezembro de 2015.

#### **ANEXO 1 - Publicações**

Resumo do trabalho de participação no XV EPG UNIVAP 2015: Ciência, Luz e Tecnologias

#### ANÁLISE COMPARATIVA DE SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO NA PRESENÇA DO CLORETO DE MAGNÉSIO HIDRATADO E DO CLORETO DE LÍTIO

Olavo Comparato Filho, Marcela Aparecida Cândido, Guilherme Lemes, Leandro Raniero

Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, S.J.Campos, SP. ocfilho69@hotmail.com

**Resumo:** Neste trabalho, nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas e padronizadas. A influência das soluções salinas, de cloreto de magnésio hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) e cloreto de lítio (LiCl), na estabilidade coloidal foi estudada por meio da Espectroscopia de UV visível. Foram observadas as mudanças de coloração das soluções finais e os efeitos de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Gráficos de espectros (UV-Vis), relacionando absorbância e comprimentos de onda foram utilizados para o registro e a visualização do processo de aglomeração. O objetivo deste trabalho foi a análise comparativa do comportamento destes sais com as (AuNPs) e a verificação, das diversas concentrações molares, para a elaboração das curvas de estabilidade.

**Palavras-chave:** nanopartículas, ressonância plasmônica, soluções salinas, espectros de absorção UV-Vis.

Área do Conhecimento: Física da matéria condensada.

# INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS NO EFEITO DE AGLOMERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NA PRESENÇA DE SOLUÇÃO SALINA

COMPARATO FILHO, O. O.<sup>1</sup> CÂNDIDO, M. A.<sup>2</sup>; LEMES, G.<sup>3</sup>; RANIERO, L.<sup>4</sup>

Resumo: O desenvolvimento de tecnologias que auxiliam no estudo da interação de nanopartículas com biomoléculas, tem proporcionado o surgimento de novas técnicas de diagnóstico de doenças. Nanomateriais possuem características químicas e físicas específicas, como o efeito de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Este trabalho, parte do princípio da utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs), previamente sintetizadas e padronizadas, para o estudo da influência de concentrações de oligonucleotídeos, em presença de solução salina de cloreto de magnésio hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), na sua estabilidade coloidal, por meio da Espectroscopia de UV-Visível. Foram realizados experimentos com nanopartículas, oligonucleotídeos e soluções salinas, onde se observou, por meio de testes colorimétricos, a influência da porcentagem de cobertura das superfícies das nanopartículas das soluções finais, nos efeitos da SPR. Os resultados gráficos dos experimentos, dos espectros UV vis que relacionam absorbância e comprimentos de onda, registraram o processo de aglomeração. O objetivo foi analisar comparativamente a influência da concentração dos oligonucleotídeos nas soluções com nanopartículas e solução salina, para a elaboração das curvas de estabilidade das AuNPs.

**Palavras-chave:** oligonucleotídeos; nanopartículas de ouro; ressonância plasmônica de superfície; processo de aglomeração.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Aluno de mestrado da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D - Laboratório de Nanossensores. E-mail: ocfilho69@hotmail.com

<sup>&</sup>lt;sup>2 e 3</sup> Alunos de iniciação científica da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D - Laboratório de Nanossensores. E-mail: marcela.aparecida.candido@gmail.com; gui.lemes10@gmail.com

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Professor Doutor da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D - Laboratório de Nanossensores. E-mail: Iraniero@univap.br

Resumo dos trabalhos de participação no Encontro Nacional de Física da SBF 2016

### LABEL-FREE DETECTION OF Paracoccidioides brasiliensis BY GOLD NANOPARTICLES USING GP43 SEQUENCE

\*Comparato Filho, O.O.1, Cândido, M.A.1, Lemes, G.1, Aguiar, J.C.2, Raniero, L.1

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

2 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Povoado Santa Teresa – Km 05 – Zona Rural – CEP 77950-000 – Araguatins - Tocantins – Brazil, josafa\_aguiar@hotmail.com

Abstract: Paracoccidioidomycosis is multisystem infection and progressive disease that attacks skin, lungs and other internal organs caused by Paracoccidioides brasiliensis (P. brasiliensis), which is a thermo-dependent dimorphic fungus. The epidemiological data shows predominance in the South America countries and the diagnosis of Paracoccidioidomycosis is complex due to cross-reaction with other disease. The aim of this study was to identify the P. brasiliensis presence by gold nanoparticles combined to specific GP43 gene using label-free methodology. We synthesized the gold nanoparticles and the UV-Visible spectroscopy and Dynamic Light Scattering characterized the colloidal solution. The chemical stability was verified by Zeta potential measurements. The P. brasiliensis DNA was amplified using the region using the primers TCGCTTCCTCATGACAGACTT-F gene TCACCTGCATCCACCATACTT-R, the amplified DNA was confirmed by agarose gel electrophoresis. The free-label colorimetric tests were performed with complementary and non-complementary sequence for *qp43*. The results of gold nanoparticles characterization have shown nanoparticles with diameter average of 23 nm + 2 nm, and surface plasmon resonance centered at 524 nm. The colloidal stability was good with values lower that -30 mV. The DNA amplification achieved successful results and colorimetric tests were able to identify gp43 sequence with positive results and a negative result for other DNA.

Keywords: Label-free detection, Paracoccidioides brasiliensis, GP43.

### INFLUENCE OF OLIGONUCLEOTIDE ON THE STABILITY OF GOLD NANOPARTICLES, IN THE PRESENCE OF DIFFERENT SALTS SOLUTIONS

Cândido, M. A.<sup>1\*</sup>, Comparato Filho, O. O.<sup>1</sup>, Lemes, G.<sup>1</sup>, Castilho, M. L.<sup>1</sup>, Aguiar, J. C.<sup>2</sup>, Raniero, L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos - SP, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Povoado Santa Teresa, Km 05 – Zona Rural, 77950-000, Araguatins – TO, Brazil.

**Abstract:** *Paracoccidioides brasiliensis* (*P.brasiliensis*) is a thermo-dimorphic fungus that causes Paracoccidioidomycosis (PCM). A great challenge currently in the diagnosis of PCM are the cross reactions with another diseases. Gold nanoparticles have been studied due to its chemical and optical property dependent on their size and shape, which can be used for clinical diagnosis. In this work, the influence of oligonucleotides on the stability of gold nanoparticles were studied in the presence of salts, potassium chloride and magnesium chloride, observing the change of colorimetric assays color, as well as comparing the use of two salt solutions in the agglomeration curve. Dynamic Light Scattering and UV-Visible spectroscopy characterized the gold nanoparticles synthesized, which show average diameter of approximately 22 nm and maximum absorption peak in 523 nm. The oligonucleotide specific ribosomal sequence of *P.brasiliensis* (GCG CAC AAG AGT GAT TAG CG), was used to cover of 10% at 100% the surface area of gold nanoparticle, which was been tested in the presence of salts solutions for the development of agglomeration curves characterized by UV-Visible spectroscopy. The optimization control of the agglomeration process was essential for standardizing colorimetric tests free label in the *P.brasiliensis* diagnosis.

**Keywords:** Paracoccidioides brasiliensis, ribosomal sequence, agglomerations curves.

### APPLICATION OF THE TECHNIQUE OF FT – IR SPECTROSCOPY FOR DIFFERENTIATION OF THE *T. cruzi* AND *Leishmania* SPECIES

J. C. Aguiar<sup>1,2\*</sup>, Comparato Filho, O. O. 1, Cândido, M. A. L. Raniero 1. Iraniero @gmail.com

**Abstract:** The *T. cruzi* species cause Chagas disease and *Leishmania* (*L. braziliensis* and *L. chagasi* species) cause Leishmaniasis. These diseases may lead to death without adequate treatment. The *T. cruzi* and *Leishmania* species have a high degree of agreement in their molecular phylogenetic, which leads to cross-reaction results in the serological tests. Furthermore, these tests are time consuming and require additional information. The aim of this study was to use the Fourier Transform Infrared (FT - IR) spectroscopy to discriminate these species. Culture was grown in the LIT medium and the subcultures were replicated weekly. All cultures were washed with NaCl solution, centrifuged, dried, and analyzed by FT - IR. The dendrogram results obtained by Cluster Analysis showed clear heterogeneity among the species using two spectral regions (A and B). The spectral deconvolution of the A and B regions using the second derivatives allowed quantitative differentiation of vibrational regions of fatty acids, amino acids, polysaccharides, phospholipids, and nucleic acids.clinical and epidemiologic.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, Shishima Hifumi Avenue, 2911, Urbanova, 12244.000, São José dos Campos-SP, Brazil,

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Campus de Araguatins, Povoado Santa Teresa - KM 05 - Zona Rural - CEP 77950-000 - Araguatins-Tocantins – Brasil, \*josafa\_aguiar@hotmail.com

Resumo do artigo aceito para publicação na revista UNIVAP, v.22, n.39, jul.2016, ISSN 2237-1753

Revista Univap – revista.univap.br São José dos Campos-SP-Brasil, v. 22, n. 39, jul.2016. ISSN 2237-1753

Recebido em 04/2016. Aceito para publicação em 06/2016.

## INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃODE OLIGONUCLEOTÍDEOS NO EFEITO DE AGLOMERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS NA PRESENÇA DE SOLUÇÃO SALINA

Olavo de Osti Comparato Filho<sup>1</sup> Marcela Aparecida Cândido<sup>2</sup> Guilherme Mosquim Lemes<sup>3</sup> Leandro José Raniero<sup>4</sup>

Resumo: O desenvolvimento de tecnologias que auxiliam no estudo da interação de nanopartículas com biomoléculas tem proporcionado o surgimento de novas técnicas de diagnóstico de doenças. Nanomateriais possuem características químicas e físicas específicas, como o efeito de ressonância plasmônica de superfície (SPR). Este trabalho parte do princípio da utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs), previamente sintetizadas e padronizadas, para o estudo da influência de concentrações de oligonucleotídeos, em presença de solução salina de Cloreto de Magnésio hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), na sua estabilidade coloidal, por meio da Espectroscopia de UV-Visível. No laboratório de nanossensores, realizaram-se experimentos com nanopartículas, oligonucleotídeos e sal, onde se observou, por meio de testes colorimétricos, a influência da porcentagem de cobertura das superfícies das nanopartículas das soluções finais, nos efeitos da SPR. Os resultados gráficos dos experimentos, dos espectros UV vis que relacionam absorbância e comprimentos de onda, registraram o processo de aglomeração. O objetivo foi analisar comparativamente a influência da concentração dos oligonucleotídeos nas soluções com nanopartículas e sal, para a elaboração das curvas de estabilidade das AuNPs.

**Palavras-chave:** oligonucleotídeos; nanopartículas de ouro; ressonância plasmônica de superfície; processo de aglomeração.

**Abstract:** The development of technologies in the study of nanoparticles interaction with biomolecules has been used as new techniques in diseases diagnostics. Nanomaterials have specific chemistry and physics properties such as the surface plasmon resonance (SPR). In this work, we studied the influence of MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O salt solution on colloidal stability of the gold nanoparticles as function of oligonucleotides concentration by of UV-Vis spectroscopy. The experiments were done at Nanossensors laboratory using nanoparticles, oligonucleotides and MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O salt. The experiments results reveal values of absorbance and wavelength, which showed the agglomeration process. The aim was analyses comparatively the influence of the oligonucleotides concentration in the nanoparticles solutions with the addition of salt solution to determine the curves of stability.

Keywords: oligonucleotides; Gold nanoparticles; surface plasmon resonance; agglomeration process.

<sup>1</sup> Mestrando em Física e Astronomia - Laboratório de Nanossensores -da Universidade do Vale do Paraíba -UNIVAP, Brasil. E-mail: ocfilho69@hotmail.com.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Graduanda em Engenharia Química da FEAU -Laboratório de Nanossensores -Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, Brasil. E-mail: marcela.aparecida.candido@gmail.com.

<sup>3</sup> Graduando em Engenharia Química da FEAU -Laboratório de Nanossensores -Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, Brasil. E-mail: gui.lemes10@gmail.com.

<sup>4</sup> Doutorado em Engenharia de Materiais pela Universidade Nova de Lisboa, Portugal. Professor Doutor da Universidade do Vale do Paraíba –UNIVAP / Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento -IP&D -Laboratório de Nanossensores, Brasil. E-mail: Iraniero@univap.br.

Resumo do trabalho de participação no XVI EPG UNIVAP 2016: Educação Ciência para, a cidadania global

### TESTES COLORIMÉTRICOS PELA METODOLOGIA *LABEL-FREE* PARA IDENTIFICAÇÃO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Olavo de O. Comparato Filho\*, Marcela A. Cândido, Guilherme M. Lemes, Leandro Raniero

Laboratório de Nanossensores, IP&D, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, S.P. ocfilho69@hotmail.com

**Resumo:** Paracoccidioidomicose é uma doença que afeta principalmente os pulmões, podendo progredir por meio da disseminação para outros sistemas. A infecção é causada pelo Paracoccidioides brasiliensis, um fungo termodimórfico, que modifica sua forma de micélio para levedura a uma temperatura de 37°C. O objetivo deste estudo foi identificar a presença do Paracoccidioides brasiliensis por meio de nanopartículas de ouro, combinadas com o gene *GP27*, usando a metodologia *Label-free*. Inicialmente, AuNPs foram sintetizadas com caracterização do diâmetro em 22 nm + 2 nm e uma banda de SPR centrada em 523 nm. O DNA do fungo foi amplificado usando a região do gene *GP27* utilizando os oligonucleotídeos CTGTTGTTTCCGTCCTTGCGC-F e AACTCTTGGCTTTGGTTGAAG-R. Os testes colorimétricos são compostos de oligonucleotídeos específicos, AuNPs e DNA teste. Os resultados mostraram mudança de coloração da solução coloidal na presença de DNA do fungo.

Palavras-chave: GP27, Label-free, nanopartículas de ouro, Paracoccidioides brasiliensis.

Área do Conhecimento: Física da matéria condensada.

Resumo do trabalho de participação no XVI EPG UNIVAP 2016: Educação Ciência para a cidadania global aceito para publicação da revista UNIVAP, v.22, n.40, out.2016, ISSN 2237-1753

179

## TESTES COLORIMÉTRICOS PELA METODOLOGIA *LABEL-FREE* PARA IDENTIFICAÇÃO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Olavo de Osti Comparato Filho<sup>1</sup> Marcela Aparecida Cândido<sup>2</sup> Guilherme Mosquim Lemes<sup>3</sup> Leandro José Raniero<sup>4</sup>

Resumo: Paracoccidioidomicose é uma doença que afeta principalmente os pulmões, podendo progredir por meio da disseminação para outros sistemas. A infecção é causada pelo Paracoccidioides brasiliensis, um fungo termodimórfico, que modifica sua forma de micélio para levedura a uma temperatura de 37°C. O objetivo deste estudo foi identificar a presença do Paracoccidioides brasiliensis por meio de nanopartículas de ouro, combinadas com o gene GP27, usando a metodologia Label-free. Inicialmente, AuNPs foram sintetizadas com caracterização do diâmetro em 22 nm + 2 nm e uma banda de SPR centrada em 523 nm. O DNA do fungo foi amplificado usando a região do gene GP27 utilizando os oligonucleotídeos CTGTTGTTTCCGTCCTTGCGC-F e AACTCTTGGCTTTGAAG-R. Os testes colorimétricos são compostos de oligonucleotídeos específicos, AuNPs e DNA teste. Os resultados mostraram mudança de coloração da solução coloidal na presença de DNA do fungo.

Palavras-chave: GP27; Label-free; nanopartículas de ouro; Paracoccidioides brasiliensis.

<sup>1</sup> Laboratório de Nanossensores, IP&D/Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: ocfilho69@hotmail.com.

<sup>2</sup> Laboratório de Nanossensores, IP&D/Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: marcela.aparecida.candido@gmail.com.

<sup>3</sup> Laboratório de Nanossensores, IP&D/Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: gui.lemes10@gmail.com.

<sup>4</sup> Laboratório de Nanossensores, IP&D/Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: Iraniero@univap.br.

#### **ANEXO 2 – Fórmulas**

Para uma melhor compreensão da sessão **3.3**, serão explicadas, em detalhes, as passagens das equações. A atração entre duas moléculas polares ocorre pela interação dipolo-dipolo e o potencial é dado pela Equação 1:

$$\Phi_1(r) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{\mathbf{p}_1 \cdot \mathbf{r}}{r^3}.$$
 [1]

Sendo  $\mathbf{p}_1$  um dipolo,  $\mathbf{r}$  a distância para produzir um potencial e  $\boldsymbol{\varepsilon}_0$  a permissividade do vácuo (8,85x10<sup>-12</sup> C<sup>2</sup>/Nm<sup>2</sup>)

Pode-se concluir que o campo deste dipolo é dado pela Equação 2:

$$\mathbf{E}_{1} = -\nabla \Phi_{1} = -\frac{\mathbf{p}_{1}}{4\pi\varepsilon_{0}r^{3}} + \frac{3\mathbf{p}_{1}.\mathbf{r}}{4\pi\varepsilon_{0}r^{5}} \mathbf{r}.$$
 [2]

A interação entre os momentos dipolares dos dipolos, distanciados por *r* produz uma energia dada pela Equação 3:

$$W = -(\mathbf{p}_2. \mathbf{E}_1) = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0 r^3} \left[ (\mathbf{p}_1. \mathbf{p}_2) - \frac{3(\mathbf{p}_1.\mathbf{r})(\mathbf{p}_2.\mathbf{r})}{r^2} \right].$$
 [3]

A energia potencial entre essas moléculas polares depende da sua distância mútua e dos ângulos que os momentos dipolares fazem entre eles e com a linha de separação que determina a distância r. De acordo com a agitação térmica permanente, a energia média da interação dos dipolos no espaço é a única quantidade com significado físico. Sendo W pequena em relação à energia térmica kT, os dipolos podem girar facilmente sob impulso das colisões entre as moléculas. Consideremos  $\theta_1$ ,  $\theta_1$ ,  $\theta_2$  e  $\theta_2$  os ângulos polares de  $\theta_1$  e  $\theta_2$ , em um sistema de referência onde o eixo  $\theta_2$  é tomado como suporte do vetor  $\theta_2$ . Podemos calcular, pela Equação 4:

$$\langle W \rangle = \frac{\iint e^{-w/kT} W d\Omega_1 d\Omega_2}{\iint e^{-w/kT} d\Omega_1 d\Omega_2},$$
 [4]

ou, em caso de W/kT << 1, pela Equação 5:

$$\langle W \rangle = \frac{\iint (1 - W/kT)Wd\Omega_1 d\Omega_2}{\iint (1 - W/kT)d\Omega_1 d\Omega_2}.$$
 [5]

Temos, de acordo com a Equação 6:

$$W = \frac{p_1 p_2}{4\pi\varepsilon_0 r^3} [\cos\varphi_1 \sin\theta_1 \cos\varphi_2 \sin\theta_2 + \sin\varphi_1 \sin\theta_1 \sin\varphi_2 \sin\theta_2 - 2\cos\theta_1 \cos\theta_2],$$
 [6]

então, pela Equação 7:

$$\iint W d\Omega_1 d\Omega_2 = 0, \tag{7}$$

resultando, conforme Equação 8:

$$\langle W \rangle = -\frac{2}{3} \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{p_1^2 p_2^2}{kT} \frac{1}{r^6}.$$
 [8]

Considerando-se um gás de moléculas polares de momento **p**, a energia é dada pela Equação 9:

$$\langle W \rangle = -\frac{2}{3} \frac{p^4}{4\pi\varepsilon_0 kTr^6} \tag{9}$$

Em átomos neutros e em moléculas neutras, o movimento dos elétrons e dos núcleos provoca a formação de dipolos elétricos instantâneos. Produzido o campo **E**, ele age sobre as cargas e dipolos de outras moléculas, resultando em um momento dipolar induzido conforme Equação 10:

$$\mathbf{p} = \alpha \varepsilon_0 \mathbf{E} \,. \tag{10}$$

Na Equação 11 verifica-se a energia de um dipolo de momento **p**, sob ação do campo:

$$W = -\int_0^E (\mathbf{p}. d\mathbf{E}).$$
 [11]

Se E for fraco, substitui-se p, conforme Equação 12:

$$W = -\frac{1}{2}\alpha\varepsilon_0 E^2.$$
 [12]

Se produzido por cargas e dipolos instantâneos das moléculas do gás, o campo  $\mathbf{E}$  tem valor médio nulo:  $\langle \mathbf{E} \rangle = 0$ ,  $\langle \mathbf{p} \rangle = 0$ . Calculando o valor médio de W, de acordo com a Equação 13:

$$\langle W \rangle = -\frac{1}{2} \alpha \varepsilon_0 \langle E^2 \rangle.$$
 [13]

Considerando as componentes do campo produzido pelos dipolos instantâneos de um átomo J, em um ponto I, com distancia d de J, bem maior do que dimensões do átomo, são proporcionais a  $1/d^3$  de acordo com a Equação 14:

$$E_d=rac{2}{d^3}rac{1}{4\piarepsilon_0}\sum_n p_n\cos heta_n$$
 ,  $E_{ heta}=rac{2}{d^3}rac{1}{4\piarepsilon_0}\sum_n p_n\sin heta_n$  ; [14]

conclui-se conforme Equação 15:

$$W_{J \to I} = -\frac{\alpha_I \alpha_J}{d^6},\tag{15}$$

e o valor de  $\alpha_J$  descrito pela Equação 16:

$$\alpha_J = \frac{1}{2} \frac{\varepsilon_0}{(4\pi\varepsilon_0)^2} \left[ 4(\sum_n p_n \cos\theta_n)^2 + (\sum_n p_n \sin\theta_n)^2 \right].$$
 [16]

Para duas moléculas homopolares, a energia das forças atrativas é, de acordo com a Equação 17:

$$W = -\frac{J}{d^6}.$$

No caso de moléculas polares, de momento dipolar permanente, produzem um campo elétrico que induz um momento dipolar  $\alpha_2 E_1$  nas moléculas homopolares, de polarizabilidade  $\alpha_2$ , misturadas às primeiras. Verifica-se na Equação 18 a energia de interação entre estes dois tipos de molécula:

$$W = -\frac{1}{2}\alpha_{2}\varepsilon_{0}E_{1}^{2} = -\frac{1}{2}\frac{\alpha_{2}\varepsilon_{0}p_{1}^{2}}{(4\pi\varepsilon_{0})^{2}r^{6}}\left(4\cos^{2}\theta + \sin^{2}\theta\right).$$
 [18]

Na Equação 19, verifica-se valor médio de Wpara W/kT muito menor que 1:

$$W = -\frac{\alpha_2 \varepsilon_0 p_1^2}{(4\pi \varepsilon_0)^2 r^6}.$$
 [19]

Essa interação ocorre entre moléculas de um gás homopolar [12].