

Requerente: Eiko Nakagawa Itano
Processo:24.445.047-4

Solicitação de autorização de pesquisa em Unidades de Conservação do Paraná

Unidade de Conservação: Parque Estadual Mata São Francisco, PE do Cerrado e PE Vale do Codó.

O presente processo visa analisar e, caso viável, emitir autorização de pesquisa para o projeto denominado **“Aplicações de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com anticorpos na captura do agente etiológico e diagnóstico da Paracoccidioidomicose”**.

Objetivo Geral:

- Desenvolver uma metodologia para o isolamento do fungo Paracoccidioides brasiliensis do solo e de um teste de dot-blotting para o diagnóstico da PCM, com o uso de nanopartículas magnéticas produzidas biologicamente e acopladas a anticorpos.

Objetivos Específicos:

- Isolar fungos filamentosos capazes de produzir nanopartículas magnéticas.
- Obter anticorpos monoclonais contra gp70 e gp43 de P. brasiliensis.
- Obter anticorpos policlonais contra os antígenos do fungo P. brasiliensis.
- Sintetizar as NPMs de óxido de ferro funcionalizadas com quitosana e anticorpos.
- Caracterizar as NPMs funcionalizadas.
- Padronizar uma metodologia de isolamento do fungo P. brasiliensis de amostras de solo inoculadas previamente com o fungo P. brasiliensis.
- Padronizar um teste de dot-blotting para detecção dos antígenos gp43 e gp70 de amostras de soro e urina previamente inoculadas com os antígenos e testar amostras de banco biológico da UEL.

Metodologia

➤ Isolamento de fungos filamentosos

Serão colhidas amostras de solo e a cada 10 g será adicionado 20 ml de água destilada estéril. Após leve agitação será colhido 1 ml da mistura que será transferida para placas de petri com ágar sabouraud e ficará em incubação por 5 dias. As culturas obtidas serão purificadas mediante repiques sucessivos em ágar sabouraud contendo antibiótico.

Rua Desembargador Westefalen, 3206 - Bairro Parolin CEP: 80220-031Curitiba - PR

Requerente: Eiko Nakagawa Itano
Processo:24.445.047-4

➤ **Seleção de fungos filamentosos produtores de nanopartículas magnéticas**

Será realizada a coleta dos esporos produzidos pelos fungos isolados e transferidos para frascos contendo 25mL de meio líquido (20% sacarose, 5% extrato de levedura) para cultivo em meio líquido. Após 5 dias será realizada a centrifugação da 5 ml massa fungica e misturada a 5 ml L de solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10mM) para cada amostra isolada com incubação por 48 horas à temperatura de 37 °C.

➤ **Identificação do Fungo Isolado**

O fungo filamentoso isolado e purificado produtor de nanopartícula magnética será identificado.

➤ **Obtenção do antígeno cell free (CFA)**

O fungo *P. brasiliensis* B-339 será cultivado em meio ágar Sabouraud a 35° C, sendo repicado a cada 5 dias. Será realizada a medição da concentração proteica por método espectrofotométrico e armazenado à temperatura de -18°C.

➤ **Obtenção de antígenos**

Serão obtidos anticorpos secretados pelo fungo (exoantígeno= ExoAg) e antígeno total obtido por maceração e sonicação.

➤ **Obtenção de anticorpos monoclonais anti-gp 70 e anti-gp 43**

A caracterização dos anticorpos obtidos será feita por análise de western-blotting utilizando o antígeno CFA.

➤ **Obtenção dos anticorpos policlonais contra ExoAg e contra antígenos totais de *P. Brasiliensis***

Carneiros adultos serão imunizados por via subcutânea em um intervalo de 15 dias, com a primeira imunização com uma mistura de antígeno solúveis liberados pelo fungo - denominado de exoantígeno (ExoAg). Após a avaliação do nível de anticorpo produzido será feita a coleta de sangue em frasco a vácuo acoplado ao sistema de coleta de sangue humano. A partir de soros obtidos, os mesmos serão fracionados em coluna de sepharose proteína G para obtenção de IgG anti- *P. brasiliensis* que serão armazenados no freezer -80C até o momento de uso.

➤ **Síntese das NPMs e funcionalização com quitosana**

As nanopartículas magnéticas serão centrifugadas por 3 vezes com água destilada. As nanopartículas formadas serão capturadas com um ímã de neodímio e lavadas com etanol na concentração de 70% até o pH neutro e realizada a secagem em forno a 450 C.

Rua Desembargador Westefalen, 3206 - Bairro Parolin CEP: 80220-031Curitiba - PR

Requerente: Eiko Nakagawa Itano
Processo:24.445.047-4

➤ **Acoplamento dos anticorpos às NPMs funcionalizadas com quitosana**

Os anticorpos não ligados serão lavados com tampão PBS por 3 vezes. A confirmação do acoplamento dos anticorpos será feita com base em teste de ELISA.

Considerando que a pesquisa pode ajudar na divulgação da importância de preservação das unidades de conservação, como fontes de biodiversidade com interesse econômico.

Considerando que pesquisa pode ajudar a detectar o fungo na natureza e levar a uma melhor compreensão de seu habitat, ressaltando a importância na prevenção da infecção por parte de trabalhadores em áreas rurais.

Considerando que os resultados de identificação dos fungos das regiões poderão contribuir para a produção de antígenos mais específicos para o estado do Paraná.

Sendo assim entende-se **não haver óbices** à realização da pesquisa no Parque Estadual Mata São Francisco.

Suzete de Fátima Kiatkoski Rauen
Engenheira Agrônoma

Jean Alex dos Santos
Gerente de Áreas Protegidas

Rua Desembargador Westefalen, 3206 - Bairro Parolin CEP: 80220-031 Curitiba - PR

Documento: **INF_DUC_28.25.pdf**.

Assinatura Avançada realizada por: **Jean Alex dos Santos (XXX.176.788-XX)** em 14/08/2025 09:20 Local: IAT/DIPAN/GEAP/DUC.

Assinatura Simples realizada por: **Suzete de Fatima Kiatkoski Rauen (XXX.225.739-XX)** em 13/08/2025 14:06 Local: IAT/DIPAN/GEAP/DUC.

Inserido ao protocolo **24.445.047-4** por: **Suzete de Fatima Kiatkoski Rauen** em: 13/08/2025 14:06.



Documento assinado nos termos do Art. 38 do Decreto Estadual nº 7304/2021.

A autenticidade deste documento pode ser validada no endereço:
<https://www.eprotocolo.pr.gov.br/spiweb/validarDocumento> com o código:
8f4c4ec917c5466810adafacd466eee1.