

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 15/11/2019.

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudos de transferência de energia peptídeos-lantanídeos com aplicações em biossensores”

LAIS RONCALHO DE LIMA

Tese de Doutorado
2018

LAIS RONCALHO DE LIMA

“Estudos de transferência de energia peptídeos-lantanídeos com aplicações em biossensores”

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

L732e Lima, Lais Roncalho de
Estudos de transferência de energia peptídeos-
lantanídeos com aplicações em biossensores / Lais Roncalho
de Lima. – Araraquara : [s.n.], 2018
93 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Sidney José Lima Ribeiro

1. Európio. 2. Análise eletroquímica. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Espectroscopia de luminescência. 5. Biossensores.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: "Estudo de transferência de energia peptídeos-lantanídeos com aplicações em biossensores"

AUTORA: LAÍS RONCALHO DE LIMA
ORIENTADOR: SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO

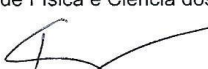
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.^a Dr.^a MÁRIA VALNICE BOLDRIN
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. OSVALDO NOVAIS DE OLIVEIRA JUNIOR
Departamento de Física e Ciência dos Materiais / Instituto de Física - USP - São Carlos


Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO KRIEGER
Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular / Instituto do Coração da Faculdade de Medicina - USP - São Paulo

Araraquara, 15 de maio de 2018

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Lais Roncalho de Lima

Data de nascimento: 09/09/1988

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Araraquara-SP

Estado civil: Solteira

Filiação: João Roberto de Lima e Elisete Helena Roncalho

Profissão: Química

Endereço: Rua Dante Giazzi, 1884, Santa Angelina, Araraquara-SP

Formação Acadêmica

1. Licenciatura em Química – curso concluído em 2011 – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IQ – UNESP, Araraquara-SP).
2. Mestrado em Química – curso concluído em 2014 – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IQ – UNESP, Araraquara-SP).

Produção Bibliográfica

1. MORAES, M. L.; LIMA, L. R.; SILVA, R. R.; CAVICCHIOLI, M.; RIBEIRO, S. J. L. Immunosensor based on immobilization of antigenic peptide NS5A-1 from HCV and silk fibroin in nanostructured films. **Langmuir**, v. 29, n. 11, p. 3829-3834, 2013.
2. FAPESP (Brasil). MORAES, M. L.; RIBEIRO, S. J. L.; LIMA, L. R.; DEFFUNE, E.; OLIVEIRA, J. C. V.; SOUZA, A. V. G. Processo de produção de um imunossensor, kit para detecção de um vírus e método de detecção. **BR 102013024172-5**, 20 set. 2013.
3. FAPESP (Brasil). MINARELLI, A. M.; BARUD, H. S.; MORAES, P. R. F. S.; RIBEIRO, S. J. L.; SPECIAN, S. S.; LIMA, L. R. Processo de obtenção de cobertura à base de celulose bacteriana com colágeno e produto obtido. **BR 102014023801-8**, 25 set. 2014.
4. LIMA, L. R.; SANTOS, D. B.; SANTOS, M. V.; BARUD, H. S.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; PECORARO, E.; RIBEIRO, S. J. L. Cellulose nanocrystals from Bacterial Cellulose. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1140-1147, 2015.
5. LIMA, L. R.; MORAES, M. L.; NIGOGHOSSIAN, K.; PERES, M. F. S.; RIBEIRO, S. J. L. Silk fibroin-antigenic peptides-YVO₄:Eu³⁺ nanostructured thin films as sensors for hepatitis C. **Journal of Luminescence**, v. 170, n. 2, p. 375-379, 2016.
6. GONÇALVES, J. M.; LIMA, L. R.; MORAES, M. L.; RIBEIRO, S. J. L. Immunosensor for diagnosis of Alzheimer disease using amyloid-β 1-40 peptide and silk fibroin thin films. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 68, p. 338-342, 2016.

7. MORAES, P. R. F. S.; SASKA, S.; BARUD, H. S.; LIMA, L. R.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G.; RIBEIRO, S. J. L.; GASPAR, A. M. M. Bacterial cellulose/collagen hydrogel for wound healing. **Materials Research**, v. 19, p. 106-116, 2016.
8. DA SILVA, R. R.; CAVICCHIOLI, M.; LIMA, L. R.; OTONI, C. G.; BARUD, H. S.; SANTAGNELI, S. H.; TERCJAK, A.; AMARAL, A. C.; CARVALHO, R. A.; RIBEIRO, SIDNEY J. L. Fabrication of biocompatible, functional, and transparent hybrid films based on silk fibroin and epoxy silane for biophotonics. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 33, p. 27905-27917, 2017.
9. LIMA, L. R.; GOLÇALVES, A-M. B.; PAULOVIKICH, F. V.; OLIVEIRA JR, O. N.; RIBEIRO, S. J. L.; MORAES, M. L. Electrical immunosensor made with antigenic peptide NS5A-1 immobilized onto silk fibroin for diagnosing hepatitis C. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, submitted and accepted, 2018. DOI: 10.21577/0103-5053.20180080.

Dedico este trabalho a minha mãe Lisa

AGRADECIMENTOS

Gratidão, em especial a minha mãe Lisa, responsável por eu estar e chegar aonde estou hoje. A ela os meus maiores agradecimentos! Ela quem sempre me incentivou, apoiou para que eu pudesse seguir meu caminho estudando e concluindo todas as etapas da minha vida acadêmica. Gratidão a ela por ter corrido atrás de privilégios que a vida não me deu e que, por sua insistência, foram essenciais para cursar um ensino superior, seguido da pós-graduação, o que consequentemente me proporcionou tantos conhecimentos não só científicos, mas principalmente, pessoais e culturais.

Gratidão a todos que nunca me deixaram desanimar e estiveram ao meu lado durante os anos deste trabalho. Nomes são muitos, mas cada um sabe quem eu devo meus mais sinceros agradecimentos: aos meus melhores e especiais da vida!

Gratidão ao Prof. Dr. Sidney Ribeiro, que me abriu sempre as portas durante todo este tempo em que estive no IQ-Unesp, Araraquara. Agradeço sua orientação durante esses anos e principalmente a oportunidade, em aprender com seus exemplos, o quão grande podemos nos tornar sendo apenas nós mesmos e fazendo aquilo que se gosta.

Gratidão aos Profs. Drs. Eduardo Maffud, Marli Leite de Moraes e Elenice Defune pelas colaborações para a realização deste trabalho, bem como às portas abertas de seus laboratórios de pesquisas sempre que precisei.

Gratidão ao Grupo de Pesquisa do Laboratório de Materiais Fotônicos e Lavie, em especial aos meus amigos de trabalho e companheiros diários Matão, Andreia, Laisinha, Vanessa, Chanchal e York, por todos os momentos em que compartilhamos no laboratório, em congressos e na vida!

Gratidão aos funcionários do IQ, em especial a todos da pós-graduação e biblioteca, pelo auxílio e compreensão nas tarefas desenvolvidas durante o curso e aos funcionários de limpeza e portaria, que me proporcionam sempre um ambiente agradável e com segurança.

Gratidão aos órgãos de fomento, mais especificamente à FAPESP e CAPES pela bolsa concedida (nº processo: 2014/05948-5) e por todo suporte financeiro destinado à realização deste trabalho, bem como do meu crescimento profissional.

Gratidão a Deus pela oportunidade e privilégio de finalizar este Doutorado. Gratidão eterna por ter conseguido seguir passos que a grande maioria de estudantes de baixa renda não conseguem trilhar. Gratidão por ter sido uma exceção! E além de grata, deixo minha sincera ideologia: um mundo mais justo, solidário, com menos ódio. Que uns possam olhar e fazer mais pelos outros, que possamos enxergar além dos nossos próprios ideais. Que a educação seja de alcance para todos e não apenas privilégio de alguns. Que sejamos seres humanos melhores a fim de construirmos um mundo melhor. A você, que compreende o caminho da educação como único e imprescindível meio de alcançarmos igualdade e assim transformarmos o país e o mundo, minha mais autêntica gratidão!

“Olhe para as estrelas e não para os seus pés”

(Stephen Hawking)

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos”*

(Marie Curie)

RESUMO

Neste trabalho, o peptídeo antimicrobiano hylina - a1 foi sintetizado e modificado estrategicamente com a adição de um resíduo de triptofano (W), visando o estudo da interação e a transferência de energia deste aminoácido aromático com nanopartículas luminescentes de $\text{YVO}_4:\text{Ln}^{3+}$. As análises foram realizadas em solução e no estado sólido por meio de filmes automontados via técnica *Layer-by-Layer (LbL)*, utilizando a fibroína da seda (SF) como matriz de imobilização para as nanopartículas (NPs). Os resultados mostraram que o mecanismo de transferência de energia ocorre somente nos filmes contendo o peptídeo Hyl-K0-W6 em contato com as NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$. Devido este peptídeo possuir atividade contra cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA), estudos espectroscópicos foram realizados utilizando a proteína PBP2a, presente na membrana citoplasmática da bactéria e responsável pela resistência contra os antibióticos β -lactâmicos. Os resultados confirmaram a interação da proteína somente com o peptídeo Hyl-K0-W6 em junção das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$. Visando a aplicação deste filme como biossensor, foram realizadas medidas eletroquímicas, na qual os resultados apresentaram nitidamente maior interação quando a PBP2a foi adsorvida sobre os filmes de SF/Hyl-K0-W6+NPs. A partir desses dados, o sistema foi aplicado como protótipo biossensor contra MRSA, através da detecção de um extrato antigênico contendo a bactéria real.

Palavras-chave: peptídeos, transferência de energia, nanopartículas, fibroína da seda, aminoácido aromático, detecção eletroquímica, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

In this work the antimicrobial peptide hylina - a1 was synthesized and strategically modified with add one tryptophan residue (W) in position 6 of the chain, aiming the interaction study and energy transfer that aromatic amino acid with $YVO_4:Ln^{3+}$ luminescent nanoparticles. The analyses were realized in solution and in solid state from self-assembled films by *Layer-by-Layer (LbL)* technique, using silk fibroin (SF) as immobilization matrix for the nanoparticles (NPs). Results show the energy transfer mechanism occurs only in the films containing the Hyl-K0-W6 peptide in touch with the $YVO_4:Eu^{3+}$ NPs. Because this peptide has activity against strains of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), spectroscopic studies were realized using the PBP2a protein, it is present at cytoplasmic membrane of the bacterium and it is responsible for resistance against β -lactam antibiotics. Results confirmed interaction of PBP2a protein only with the Hyl-K0-W6 peptide in conjunction of the $YVO_4:Eu^{3+}$ NPs. Aiming application that film as a biosensor, electrochemistry measurements were realized, which the results showed clearly greater interaction when PBP2a was adsorbed on SF/Hyl-K0-W6+NPs films. From these dates, the system was applied as MRSA biosensor prototype, through detection a antigenic extract containing the real bacterium.

Keywords: peptides, energy transfer, nanoparticles, silk fibroin, aromatic amino acid, electrochemistry detection, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tabela periódica dos elementos com destaque para os Lantanídeos. ^[7]	21
Figura 2. Distribuição radial das funções de onda hidrogenóides para os orbitais 4f, 5s e 6s. ^[10]	22
Figura 3. Níveis de energia das configurações 4f ⁿ dos lantanídeos trivalentes. ^[6]	23
Figura 4. Mecanismo de transferência de energia de um centro sensibilizador (S) para um centro ativador (A). S é o sensibilizador no estado fundamental; S*, sensibilizador no estado excitado; TE, transferência de energia; NR, processo não radiativo; A1* e A2*, estados excitados do ativador; A, ativador no estado fundamental. ^[5]	24
Figura 5. Representação esquemática da estrutura da fibroína da seda. ^[42]	26
Figura 6. Estrutura da fibroína da seda produzida pelo bicho-da-seda (<i>Bombyx mori</i>). ^[49]	27
Figura 7. Representação esquemática do processo de automontagem de uma bicamada do filme <i>LbL</i> . Inicialmente há a adsorção de um polieletrólito, por exemplo catiônico e, em seguida, há a adsorção de um polieletrólito aniônico. Após cada adsorção os substratos são lavados. Ao final, temos a estrutura idealizada do filme automontado. ^[66]	28
Figura 8. Representação esquemática da estrutura da <i>Staphylococcus aureus</i> contendo um envoltório, membrana de plasmática, parede celular e microcápsula com proteínas anexadas e ele. ^[93]	32
Figura 9. Representação esquemática das PBPs presentes na membrana plasmática da <i>Staphylococcus aureus</i> . ^[92]	33
Figura 10. Protocolo geral da síntese de peptídeos em fase sólida. ^[98]	35
Figura 11. Esquema do procedimento de preparação dos filmes automontados via técnica <i>LbL</i> (camada por camada). As soluções 1 e 3 representam, respectivamente, a SF e os peptídeos, NPS ou peptídeo+NPs e 2 e 4 representam a água Milli-Q utilizada para lavagem e remoção de moléculas fracamente adsorvidas. ^[4]	38
Figura 12. Representação esquemática dos filmes <i>LbL</i> montados sobre eletrodos impressos de carbono.....	39
Figura 13. Cromatogramas referentes ao peptídeo Hyl-K0-W6 bruto com 76,1% de pureza (vermelho) e após purificação com 91%.	45
Figura 14. Cromatogramas referentes ao peptídeo Hyl-D0-W6 bruto com 74,7% de pureza (vermelho) e após purificação com 97% de pureza (azul).....	45
Figura 15. Espectro de massas correspondente ao peptídeo Hyl-K0-W6 purificado.....	46
Figura 16. Espectro de massas correspondente ao peptídeo Hyl-D0-W6 purificado.....	46

Figura 17. Espectros de Dicroísmo Circular correspondentes ao peptídeo Hyl-K0-W6 em solução de tampão PBS, pH = 7,2 (preto) e em TFE 60% v/v PBS (vermelho).	48
Figura 18. Espectros de Dicroísmo Circular correspondentes ao peptídeo Hyl-D0-W6 em solução de tampão PBS, pH = 7,2 (preto) e em TFE 60% v/v PBS (vermelho).	49
Figura 19. Espectros de excitação e de emissão das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ em solução aquosa com concentração 12 mmol L ⁻¹	50
Figura 20. Distribuição de tamanhos das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ , com diâmetro médio de 21 nm.	51
Figura 21. FT-IR das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ na faixa de absorção de 4000 a 400 cm ⁻¹	52
Figura 22. Espectro Raman das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ na faixa de absorção de 100 a 4000 a cm ⁻¹	53
Figura 23. Espectros de excitação das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ ($\lambda_{em} = 620$ nm) com diferentes concentrações em solução. Zoom: linhas de excitação características do íon Eu ³⁺ em 465 nm.	54
Figura 24. Espectros de emissão das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ ($\lambda_{exc} = 300$ nm) com diferentes concentrações em solução.....	55
Figura 25. Estrutura secundária adquirida pelos peptídeos quando na presença de um solvente indutor (TFE). À esquerda, representação do peptídeo Hyl-K0-W6 (verde) e à direita Hyl-D0-W6 (vermelho), respectivamente.	56
Figura 26. Espectros emissão (λ_{exc} . 280 nm) das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ conforme adição de Hyl-K0-W6 em solução tampão.....	57
Figura 27. Espectros excitação (λ_{em} . 620 nm) das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ conforme adição de Hyl-K0-W6 em solução tampão.	57
Figura 28. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) dos filmes de SF/NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ (preto), SF/NPs+Hyl-K0-W6 (vermelho) e SF/NPs+Hyl-D0-W6 (azul) formados a partir da evaporação da solução tampão dos peptídeos.....	59
Figura 29. Espectros de excitação (λ_{em} . 620 nm) dos filmes de SF/NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺ (preto), SF/NPs+Hyl-K0-W6 (vermelho) e SF/NPs+Hyl-D0-W6 (azul) formados a partir da evaporação da solução tampão dos peptídeos.....	59
Figura 30. Espectros de Dicroísmo Circular (CD) dos peptídeos Hyl-K0-W6 e Hyl-D0-W6 em solução tampão PBS, pH 7,2, e na presença de NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺	60
Figura 31. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 620 nm.....	61
Figura 32. Espectros de excitação (λ_{em} . 620 nm) do filme de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 280 nm.....	62

Figura 33. Espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) do filme de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 285 nm	64
Figura 34. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) e excitação dos filmes de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas.	65
Figura 35. Espectros de excitação (λ_{em} . 620 nm) dos filmes de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 280 nm para os espectros.....	65
Figura 36. Espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) dos filmes de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 280 nm para os espectros.....	64
Figura 37. Espectros UV-vis. dos filmes de SF e SF/Hyl-D0-W6 contendo diferentes números de camadas e bicamadas, respectivamente. *	66
Figura 38. Espectros UV-vis. dos filmes de SF/Hyl-K0-W6 e SF/NPs, respectivamente. * ..	66
Figura 39. Espectros UV-vis. dos filmes de SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs, respectivamente.* *Inserções: aumento na absorção a 280 nm em função do número de camadas/bicamadas depositadas.	66
Figura 40. Espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) e emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF na ausência e presença da proteína PBP2a.	67
Figura 41. Espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) e emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF/Hyl-D0-W6 na ausência e presença da proteína PBP2a.	68
Figura 42. Espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) e emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF/Hyl-K0-W6 na ausência e presença da proteína PBP2a.	68
Figura 43. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF/NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.	69
Figura 44. Espectros de excitação (λ_{em} . 620 nm e λ_{em} . 320 nm, respectivamente) do filme de SF/NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.	69
Figura 45. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF/Hyl-D0-W6+NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.	70
Figura 46. Espectros de excitação (λ_{em} . 620 nm e λ_{em} . 320 nm, respectivamente) do filme de SF/Hyl-D0-W6+NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.	70
Figura 47. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.	71
Figura 48. Espectros de excitação (λ_{em} . 620 nm e λ_{em} . 320 nm, respectivamente) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.	72

Figura 49. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) e excitação (λ_{em} . 620 nm) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a.	73
Figura 50. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença da proteína PBP2a a 10^{-1} mg mL ⁻¹	73
Figura 51. Espectros de Dicroísmo Circular dos filmes de SF e SF/Hyl-D0-W6 na ausência e na presença da proteína PBP2a.	74
Figura 52. Espectros de Dicroísmo Circular dos filmes de SF/Hyl-K0-W6 e SF/NPs na ausência e na presença da proteína PBP2a.	74
Figura 53. Espectros de Dicroísmo Circular dos filmes de SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs na ausência e na presença da proteína PBP2a.	75
Figura 54. Espectros de Dicroísmo Circular das soluções de Hyl-D0-W6 e Hyl-K0-W6 em solução PBS e na presença das NPs de YVO ₄ :Eu ³⁺	76
Figura 55. Voltamogramas Cíclicos dos filmes LbL de SF e de SF/Hyl-D0-W6, respectivamente, em tampão PBS na ausência e presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a.	77
Figura 56. Voltamogramas Cíclicos dos filmes <i>LbL</i> de SF/Hyl-K0-W6, SF/NPs, SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs, respectivamente, em tampão PBS na ausência e presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a.	78
Figura 57. Curva analítica da variação de corrente com potencial fixo em 0,1V, em escala logarítmica, do filme automontado de SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a (diluições: 10^{-4} mg mL ⁻¹ , 10^{-3} mg mL ⁻¹ , 10^{-2} mg mL ⁻¹ , 10^{-1} mg mL ⁻¹ , e 1,0 mg mL ⁻¹).	79
Figura 58. Voltamogramas Cíclicos do filme <i>LbL</i> de SF/Hyl-K0-W6+NPs contendo diversas concentrações do antígeno MRSA.	80
Figura 59. Curva analítica da variação de corrente com potencial fixo em 0,1V em função do logaritmo de diversas concentrações (diluições: 0,01 μ g mL ⁻¹ , 0,02 μ g mL ⁻¹ , 0,1 μ g mL ⁻¹ , 0,2 μ g mL ⁻¹ e 1,0 μ g mL ⁻¹) do extrato antigênico MRSA adsorvido sobre o filme.	81

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Massas moleculares teóricas e experimentais obtidas para os peptídeos Hyl-K0-W6 e Hyl-D0-W6. 46
- Tabela 2.** Porcentagem de estrutura alfa-hélice presente no peptídeo Hyl-K0-W6 em solução tampão PBS pH = 7,2 e em TFE 60% v/v. 48
- Tabela 3.** Porcentagem de estrutura alfa-hélice presente no peptídeo Hyl-D0-W6 em solução tampão PBS pH = 7,2 e em TFE 60% v/v. 49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

HCV	Vírus da Hepatite C
NS5A-1	Peptídeo antigênico do Vírus da Hepatite C
<i>LbL</i>	<i>Layer-by-Layer</i>
SF	Fibroína da Seda
NPs	Nanopartículas
YVO ₄ :Eu ³⁺	Vanadato de Ítrio dopado com Európio
W	Triptofano
MRSA	Staphylococcus aureus resistente à meticilina
Y	Tirosina
F	Fenilalanina
PBP2a	Proteína ligante à penicilina
UV	Ultravioleta
G	Glicina
A	Alanina
S	Serina
LB	Langmuir-Blodgett
SAM	Self-assembled monolayer
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
D	Aspartato
K	Lisina
L	Leucina
Hyl-K0-W6	Peptídeo hylina modificado com resíduos de lisina no início e triptofano na posição 6 da cadeia de aminoácidos
Hyl-D0-W6	Peptídeo hylina modificado com resíduos de arpartato no início e triptofano na posição 6 da cadeia de aminoácidos
CD	Dicroísmo Circular
VC	Voltametria Cíclica
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
DIC	N,N' diisopropilcarbodiimida
HOBt	N-hidroxibenzotriazol

DMF	Dimetilformamida
DCM	Diclorometano
TIS	Tioanisol
TFA	Ácido Trifluoracético
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PCS	Espectroscopia de Correlação de Fótons
PBS	Solução Tampão Fosfato
FT-IR	Espectroscopia Infravermelho
TFE	Trifluoroetanol
$[\theta]$	Elipticidade molar

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Espectroscopia de Lantanídeos	21
1.1.1 Nanopartículas de $YVO_4:Ln^{3+}$	25
1.2 Seda <i>Bombyx mori</i>	26
1.3 Filmes automontados <i>Layer-by-Layer (LbL)</i>	28
1.4 Peptídeo antimicrobiano hylina - a1	30
1.5 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA).....	31
2. OBJETIVOS	34
3. METODOLOGIA.....	35
3.1 Síntese dos peptídeos	35
3.2 Obtenção das nanopartículas luminescentes de $YVO_4:Eu^{3+}$	36
3.3 Extração e obtenção da fibroína da seda.....	37
3.4 Preparação dos filmes sobre substratos de sílica	37
3.5 Preparação dos filmes sobre eletrodos impressos de carbono.....	38
3.6 Técnicas Experimentais	39
3.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	39
3.6.2 Espectrometria de Massas	40
3.6.3 Espectroscopia UV-visível	40
3.6.4 Espectroscopia de Correlação de Fótons	40
3.6.5 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	41
3.6.6 Espectroscopia de Espalhamento Raman	41
3.6.7 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	41
3.6.8 Espectroscopia de Luminescência	42
3.6.9 Voltametria Cíclica (VC)	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
4.1 Síntese e caracterização de peptídeos e nanopartículas	44
4.1.1 Síntese dos peptídeos.....	44
4.1.2 Análise por Dicroísmo Circular (CD)	47
4.1.3 Síntese das Nanopartículas Luminescentes de $YVO_4:Eu^{3+}$	50
4.2 Estudo da interação entre peptídeos e NPs em solução e filmes	55
4.3 Filmes de SF/peptídeos/ $YVO_4:Eu^{3+}$ na presença da proteína PBP2a visando a detecção da bactéria MRSA.....	66
4.3.1 Estudo dos filmes na presença da PBP2a por Espectroscopia de Luminescência ...	68
4.3.2 Estudo dos filmes na presença da PBP2a por Dicroísmo Circular	74
4.3.3 Estudo dos filmes na presença da PBP2a por Voltametria Cíclica	77
4.3.4 Estudo de filmes LbL SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença de antígenos MRSA	81
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	83
REFERÊNCIAS.....	85

APRESENTAÇÃO

A imobilização de peptídeos em filmes nanoestruturados é um processo muito promissor para o desenvolvimento de biossensores altamente específicos.^[1,2] Em recentes estudos, imunossensores para detecção do vírus da Hepatite C (HCV) foram desenvolvidos através da imobilização de biomoléculas. Neste caso, o peptídeo NS5A-1 derivado do HCV foi imobilizado via método camada-por-camada (do inglês Layer-by-Layer, *LbL*) juntamente com a fibroína da seda (SF)^[3] e nanopartículas (NPs) luminescentes de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ^[4].

As NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ foram utilizadas como uma sonda luminescente para o sistema SF/NS5A-1. O íon lantanídeo európio, dopado à matriz de YVO_4 , possui emissão característica por volta de 620 nm, e o filme imunossensor contendo as NPs, obteve luminescência 3 vezes maior quando em contato com o anticorpo específico para HCV.^[4] Apesar do filme ser considerado e aplicado como protótipo imunossensor, o mecanismo da transferência de energia que ocorreu proveniente das biomoléculas para as NPs não foi elucidado de forma clara, motivando assim este trabalho de doutorado.

A transferência de energia observada foi justificada pela presença de aminoácidos aromáticos. Mais especificamente, acreditava-se que o triptofano (W) era o resíduo de aminoácido responsável pela eficiência do processo. Com isso, o trabalho desta tese foi elaborado na investigação do real mecanismo envolvido na transferência de energia entre peptídeos e o aminoácido aromático W em relação à matriz YVO_4 com dopagem do íon európio. Os peptídeos utilizados nestes estudos, são derivados do peptídeo antimicrobiano hylina - a1 e, por possuírem atividade antibacteriana, foram analisados também como possíveis biomoléculas aplicadas em protótipos biossensores contra *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina (MRSA).

A tese é apresentada em 5 sessões. A sessão 1 consta de uma introdução que apresenta uma revisão bibliográfica dos temas envolvidos no trabalho, iniciada com a abordagem da Espectroscopia dos Lantanídeos, seguida da descrição da SF e da técnica *LbL* para montagem de filmes, e finaliza com a descrição do peptídeo antimicrobiano hylina - a1 e um breve exposição sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Na sessão 2 estão os objetivos do trabalho, bem como as metas intermediárias para a elaboração dos estudos. A sessão 3 consta de toda a metodologia experimental da pesquisa, desde a preparação dos materiais necessários para o desenvolvimento do trabalho, bem como a preparação dos filmes e os detalhes das técnicas utilizadas para caracterização dos mesmos. A sessão 4 apresenta os resultados e as discussões sobre cada estudo realizado, iniciados pela

caracterização dos peptídeos e NPs sintetizados, seguido do estudo sistemático da sua interação em solução e no estado sólido, através de filmes automontados via técnica *LbL* utilizando a SF como matriz de imobilização; posteriormente, o estudo de filmes contendo os peptídeos antimicrobianos analisados na presença da proteína responsável pela resistência contra antibióticos β -lactâmicos, a PBP2a, e posterior aplicação dos filmes como protótipos biossensores eletroquímicos visando a detecção da bactéria contida em um extrato antigênico MRSA. Por fim, a sessão 5 apresenta as principais conclusões e as perspectivas deste trabalho para pesquisas futuras.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espectroscopia de Lantanídeos

Os lantanídeos correspondem aos 15 elementos da tabela periódica que vão do Lantânio (La, número atômico 57) ao Lutécio (Lu, número atômico 71), Figura 1, e juntos com os elementos Escândio (Sc, número atômico 21) e Ítrio (Y, número atômico 39) formam o grupo das terras-raras.^[5] As inúmeras aplicações dos lantanídeos são devidas as suas propriedades singulares, principalmente às espectroscópicas e magnéticas.^[6]

IUPAC Periodic Table of the Elements

IUPAC Periodic Table of the Elements																	
1 H hydrogen 1.008																	2 He helium 4.0026
3 Li lithium 6.941	4 Be beryllium 9.0122	Key: atomic number Symbol name (conventional atomic weight) standard atomic weight										5 B boron 10.81	6 C carbon 12.011	7 N nitrogen 14.007	8 O oxygen 15.999	9 F fluorine 18.998	10 Ne neon 20.180
11 Na sodium 22.990	12 Mg magnesium 24.305											13 Al aluminum 26.982	14 Si silicon 28.086	15 P phosphorus 30.974	16 S sulfur 32.06	17 Cl chlorine 35.45	18 Ar argon 39.948
19 K potassium 39.098	20 Ca calcium 40.078(4)	21 Sc scandium 44.956	22 Ti titanium 47.867	23 V vanadium 50.942	24 Cr chromium 51.996	25 Mn manganese 54.938	26 Fe iron 55.845(2)	27 Co cobalt 58.933	28 Ni nickel 58.693	29 Cu copper 63.546(3)	30 Zn zinc 65.38(2)	31 Ga gallium 69.723	32 Ge germanium 72.630(8)	33 As arsenic 74.922	34 Se selenium 78.971(8)	35 Br bromine 79.904	36 Kr krypton 83.798(2)
37 Rb rubidium 85.468	38 Sr strontium 87.62	39 Y yttrium 88.906	40 Zr zirconium 91.224(2)	41 Nb niobium 92.906	42 Mo molybdenum 95.95	43 Tc technetium 98.906	44 Ru ruthenium 101.07(2)	45 Rh rhodium 102.91	46 Pd palladium 106.42	47 Ag silver 107.87	48 Cd cadmium 112.41	49 In indium 114.82	50 Sn tin 118.71	51 Sb antimony 121.76	52 Te tellurium 127.60(3)	53 I iodine 126.90	54 Xe xenon 131.29
55 Cs caesium 132.91	56 Ba barium 137.33	57-71 lanthanoids	72 Hf hafnium 178.49(2)	73 Ta tantalum 180.95	74 W tungsten 183.84	75 Re rhenium 186.21	76 Os osmium 190.23(3)	77 Ir iridium 192.22	78 Pt platinum 195.08	79 Au gold 196.97	80 Hg mercury 200.59	81 Tl thallium 204.38	82 Pb lead 207.2	83 Bi bismuth 208.98	84 Po polonium	85 At astatine	86 Rn radon
87 Fr francium	88 Ra radium	89-103 actinoids	104 Rf rutherfordium	105 Db dubnium	106 Sg seaborgium	107 Bh bohrium	108 Hs hassium	109 Mt meitnerium	110 Ds darmstadtium	111 Rg roentgenium	112 Cn copernicium	113 Nh nihonium	114 Fl flerovium	115 Mc moscovium	116 Lv livermorium	117 Ts tennessine	118 Og oganesson

57 La lanthanum 138.91	58 Ce cerium 140.12	59 Pr praseodymium 140.91	60 Nd neodymium 144.24	61 Pm promethium	62 Sm samarium 150.36(2)	63 Eu europium 151.96	64 Gd gadolinium 157.25(3)	65 Tb terbium 158.93	66 Dy dysprosium 162.50	67 Ho holmium 164.93	68 Er erbium 167.26	69 Tm thulium 168.93	70 Yb ytterbium 173.05	71 Lu lutetium 174.97
89 Ac actinium	90 Th thorium 232.04	91 Pa protactinium 231.04	92 U uranium 238.03	93 Np neptunium	94 Pu plutonium	95 Am americium	96 Cm curium	97 Bk berkelium	98 Cf californium	99 Es einsteinium	100 Fm fermium	101 Md mendelevium	102 No nobelium	103 Lr lawrencium

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY

For notes and updates to this table, see www.iupac.org. This version is dated 28 November 2016. Copyright © 2016 IUPAC, the International Union of Pure and Applied Chemistry.

Figura 1. Tabela periódica dos elementos com destaque para os Lantanídeos.^[7]

As propriedades químicas e físicas dos lantanídeos são muito semelhantes pelo fato de todos os átomos neutros possuírem em comum a configuração eletrônica $6s^2$ e uma ocupação variável do nível $4f$.^[5] Porém, é o estado de oxidação trivalente o mais comum e característico da maioria dos compostos de lantanídeos, além de ser o mais estável termodinamicamente.^[8] Para estes íons trivalentes, é observado um aumento regular na configuração $4f^n$, com n variando entre 1 a 14, resumindo assim a configuração eletrônica desses elementos em: $[Xe] 4f^n 5s^2 5p^6 5d^{0-1} 6s^2$.^[5] Através desta, observa-se que os orbitais $4f$ estão localizados na parte interna do átomo e são totalmente protegidos do ambiente químico pelos elétrons dos orbitais $5s$ e $5p$, Figura 2, o que faz com que eles tenham extensão radial limitada, não participem das ligações e que tenham somente um envolvimento muito pequeno com os orbitais dos ligantes. É por este motivo que os íons lantanídeos formam complexos com alto caráter iônico.^[9,10]

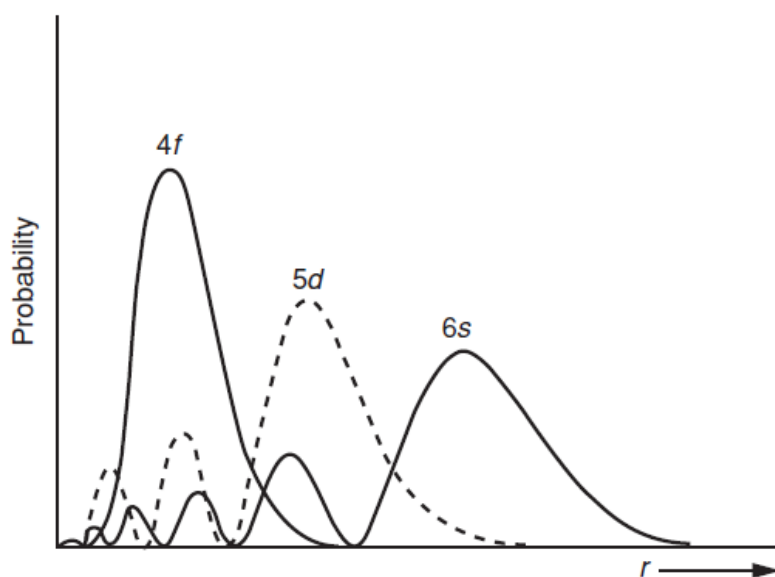


Figura 2. Distribuição radial das funções de onda hidrogenóides para os orbitais 4f, 5s e 6s.^[10]

Como resultado desta blindagem, os elétrons 4f sofrem efeitos muito fracos do campo dos ligantes e as propriedades eletrônicas são pouco afetadas pelo ambiente químico, o que faz com que as transições ópticas sejam geralmente muito finas, ou seja, os compostos com esses íons trivalentes exibem espectros de luminescência muito nítidos que leva a uma pureza de cor muito alta.^[10,11] Isso ocorre devido a sua rica estrutura de nível de energia como mostrado na Figura 3, que surge do acoplamento de spin-órbita e repulsão de Coulomb entre os elétrons 4f.^[6] Essas transições ff são proibidas pela regra de Laporte, por isso suas transições ópticas são geralmente caracterizadas por tempos de vida longos, de microsegundos a milisegundos.^[12] Suas propriedades magnéticas são determinadas inteiramente pelo estado fundamental, pois os estados excitados estão tão bem separados do estado fundamental que são, portanto, termicamente inacessíveis.^[13]

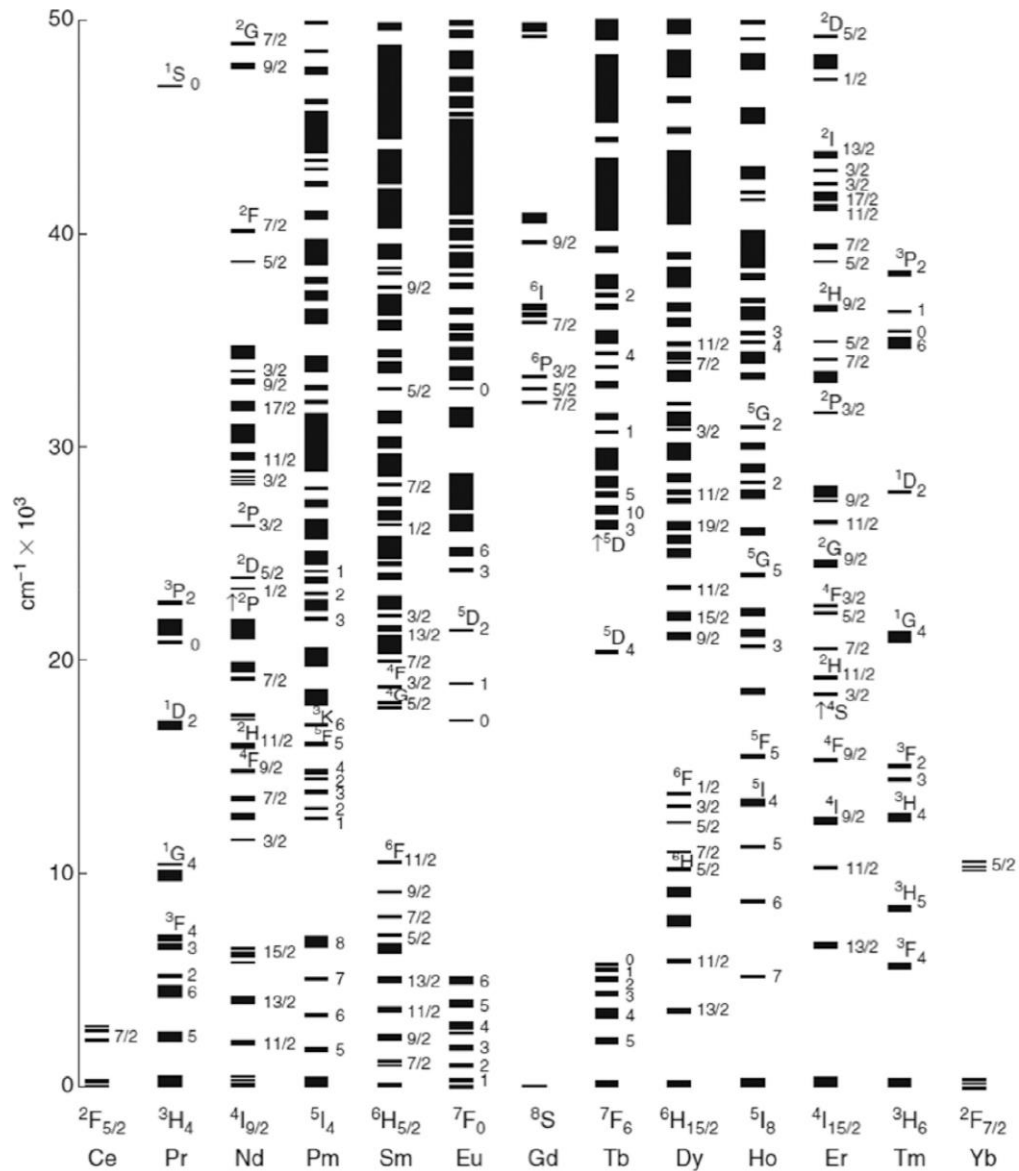


Figura 3. Níveis de energia das configurações $4f^n$ dos lantanídeos trivalentes.^[6]

Transições ópticas $4f-5d$ também são possíveis e originam bandas muito mais intensas que as transições tipo ff , mas essas bandas são geralmente muito largas.^[5,6] A luminescência por excitação direta do íon lantanídeo é pouco eficiente, porque os íons lantanídeos não têm absorvidades molares altas, por isso é comum o uso de um ligante que absorve luz e que transfere energia para o íon lantanídeo, emitindo assim sua luminescência mais eficientemente. O que de fato ocorre é uma transferência de energia intramolecular do ligante ao íon metálico central, conhecido na literatura como “efeito antena”. A eficiência da transferência de energia do ligante para o íon lantanídeo depende da natureza química do ligante coordenado ao íon.^[13,14]

Ao adicionar, portanto, outra espécie à matriz hospedeira, esta pode absorver energia e subsequentemente, transferi-la para o ativador (A) o qual luminesce, Figura 4. A espécie que

absorve energia é chamada de sensibilizador (S). Quando a desativação de uma espécie ocorre através da ativação de outra, o processo é denominado transferência de energia intermolecular. A transferência de energia do sensibilizador (S) para o ativador (A) só é possível se um dos níveis de energia do ativador for menor ou igual ao nível luminescente do sensibilizador, ou seja, que haja condição de ressonância.^[5,6,13]

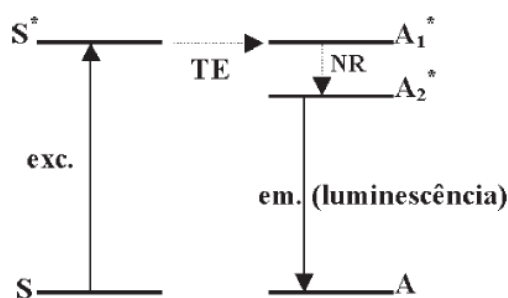


Figura 4. Mecanismo de transferência de energia de um centro sensibilizador (S) para um centro ativador (A). S é o sensibilizador no estado fundamental; S*, sensibilizador no estado excitado; TE, transferência de energia; NR, processo não radiativo; A1* e A2*, estados excitados do ativador; A, ativador no estado fundamental.^[5]

Dependendo do tipo de íon lantanídeo dopado em uma matriz hospedeira, dois tipos distintos de processo de luminescência podem ocorrer: o processo *downconversion* e o processo *upconversion*.^[15] O processo de *downconversion* ou conversão descendente de luz (deslocamento de Stokes convencional), é a conversão de fótons de energias mais altas em fótons de energias mais baixas, ou seja, a radiação de excitação de maior energia é convertida em uma radiação de emissão de menor energia.^[15,16] Por outro lado, a luminescência *upconversion*, ou conversão ascendente de energia (deslocamento anti-Stokes) é um processo no qual luz de mais baixa energia é convertida em luz de maior energia através da absorção sequencial de fótons múltiplos.^[17,18]

Devido às propriedades eletrônicas, ópticas e características químicas resultantes dos seus elétrons 4f, compostos de lantanídeos têm sido desenvolvidos e estudados para utilização em fotônica, dispositivos luminescentes de alto desempenho, sistemas fotovoltaicos, fotocatalisadores, agentes de tratamento de diagnóstico em medicina, determinação de analitos orgânicos, biosondas, monitoramento de liberação controlada de fármacos utilizando biovidros mesoporosos luminescentes, indicadores biológicos e sensores.^[19-27]

O uso de lantanídeos em marcadores biológicos luminescentes é baseado na técnica convencional FRET (Förster Resonance Energy Transfer), pois permite-se ter uma ideia da interação do marcador com proteínas de interesse. A técnica FRET consiste na transferência

de energia entre um doador e receptor. Para que haja transferência eficiente de energia, deve haver sobreposição entre as bandas de emissão do doador e excitação do receptor. A quantificação da transferência de energia pode ser feita em função da diminuição da intensidade ou do tempo de vida do doador ou ainda do aumento dos mesmos do receptor.^[28]

Os compostos aplicados como marcadores luminescentes devem ser cineticamente estáveis, ter um tempo de vida no estado excitado da ordem de milissegundos (ms), altos valores de absorção molar e rendimento quântico, além de uma baixa degradação pela exposição à radiação UV-vis.^[28]

Neste trabalho, NPs luminescentes de Eu^{3+} dopadas a uma matriz hospedeira de YVO_4 foram utilizadas como composto lantanídeo principal em todos os estudos desenvolvidos.

1.1.1 Nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Ln}^{3+}$

As propriedades de luminescência das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Ln}^{3+}$ e materiais relacionados têm sido estudados há mais de três décadas.^[29–32] O espectro de absorção do YVO_4 apresenta bandas largas na região do UV. A transição da absorção envolvida é uma transferência de carga do orbital 2p do oxigênio para os estados 3d do vanádio. Consideravelmente, um menor deslocamento de Stokes da emissão do vanadato (VO_4^{3-}) leva a uma rápida migração de energia ao íon lantanídeo, tornando o $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ um material muito eficiente com emissão no vermelho e o $\text{YVO}_4:\text{Tb}^{3+}$ eficiente com emissão no verde.^[33] Em relação ao $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, sua alta luminescência deve-se ao seu rendimento quântico elevado, em torno de 70% para a dopagem com íon európio.^[34]

O tamanho e a forma das partículas podem ser controlados e ajustados de forma eficaz através do controle das condições da reação, tais como o tempo de reação, as fontes de vanádio, os diferentes aditivos orgânicos e a proporção molar do aditivo orgânico. O citrato de sódio é um aditivo muito utilizado como estabilizante que ajusta a taxa de crescimento de diferentes morfologias em determinadas condições experimentais, resultando na formação de várias geometrias dos produtos finais.^[35]

A capacidade de preparar nanoestruturas de YVO_4 com diversas formas, com emissão na região do visível e contendo maior eficiência quântica, oferece uma grande oportunidade de explorar as suas aplicações em vários campos que estudam a exibição de cores.^[35] O európio dopado à matriz de vanadato de ítrio é muito utilizado em televisores a cores, tubos de raios catódicos, lâmpadas fluorescentes e em muitos aplicativos e dispositivos de exibição visual.^[36] As NPs são também úteis como marcadores biológicos ultrasensíveis, porque são

solúveis em água e biocompatíveis. Além disso, em comparação com corantes orgânicos e pontos quânticos semicondutores, as NPs possuem linhas espectrais mais estreitas e, provavelmente, são mais estáveis à fotodegradação.^[37,38]

1.2 Seda *Bombyx mori*

A seda é composta por fibras de proteínas que são produzidas na natureza por diversas espécies de insetos e aranhas.^[39] O fio de seda produzido pelo bicho-da-seda (*Bombyx mori*) é formado por duas proteínas: a sericina que é semelhante a uma cola que envolve as fibras, geralmente solúvel e pode ser removida por um tratamento termoquímico conhecido como degomagem; e a fibroína, que é uma proteína fibrosa, consiste no filamento da seda composta de regiões altamente organizadas com formas cristalinas folha- β e semicristalinas, Figura 5.^[40,41]

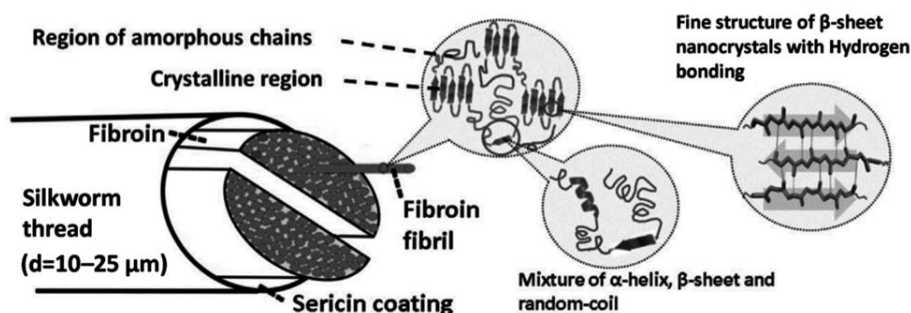


Figura 5. Representação esquemática da estrutura da fibroína da seda.^[42]

A sericina é uma proteína que contém 18 tipos de aminoácidos, sendo sua maioria composta por aminoácidos de grupos polares, aproximadamente 35% de serina e 13% asparagina, o que justifica sua alta solubilidade. Além destes, a sericina possui também resíduos de aminoácidos aromáticos como a fenilalanina e a tirosina.^[43,44] A sericina de seda, devido a sua natureza proteica, é suscetível à ação de enzimas proteolíticas presentes em nosso corpo e, portanto, é digerível.^[45] Esta propriedade a torna um material biocompatível e biodegradável.^[46] Além disso, a sericina possui algumas propriedades adicionais como, capacidade de gelificação, capacidade de retenção de umidade e adesão à pele e, por isso, é amplamente utilizada em aplicações cosméticas, farmacêuticas e na área médica.^[43-46]

A fibroína é composta basicamente pelos aminoácidos glicina, alanina, serina e, em menor quantidade, tirosina, triptofano e outros aminoácidos residuais.^[47] A glicina, a alanina e a serina se repetem e constituem a maior parte de sua composição, correspondentes a 80% em mol da proteína, podendo sua sequência ser basicamente considerada como $(GAGAGS)_n$.^[48]

As várias repetições desses aminoácidos em sequência constituem a região cristalina da fibroína, formando o arranjo conhecido como folha- β . As propriedades de tensão das fibras da seda dependem principalmente da estrutura cristalina, enquanto outras propriedades como retenção de umidade e resistência química, dependem do estado da região amorfa, que contém a maioria dos aminoácidos com uma cadeia lateral volumosa, polar e domínios ricos em tirosina.^[49-51]

Por ser composta por grande quantidade de glicina e alanina, a conformação β de sua estrutura é favorecida, já que é permitido um alto empacotamento entre suas folhas. A estrutura global dessa proteína é estabilizada por ligações de hidrogênio entre todas as ligações peptídicas dos segmentos polipeptídicos de cada cadeia β , otimizando as interações de Van der Waals entre as cadeias.^[52] A Figura 6 representa a estrutura da fibroína da seda, onde as setas indicam as folhas- β antiparalelas.

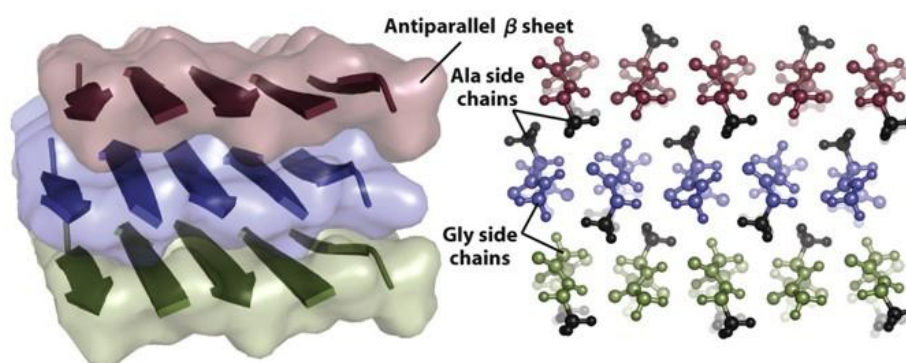


Figura 6. Estrutura da fibroína da seda produzida pelo bicho-da-seda (*Bombyx mori*).^[49]

A fibroína vem sendo largamente estudada no campo de biomateriais, pois apresenta compatibilidade com diversos tipos de células, alta resistência mecânica e microbiológica, além da possibilidade de ser obtida sob diversas formas como pós, filmes, esponjas e hidrogéis.^[42] Devido a sua alta transparência quando preparadas na forma de filmes, a fibroína é utilizada na fabricação de híbridos flexíveis que podem ser aplicados como diversos materiais fotônicos, grades de difração e *random lasers*. O uso de técnicas 3D permite a fabricação de estruturas pré-designadas de SF que podem atender aos requisitos para a aplicação de engenharia de tecidos como *scaffolds* de fibroína.^[53,54] Mais recentemente, Zhao et al. fabricaram um sistema microfluídico bio-funcionalizado usando um hidrogel de SF como material de substrato.^[55] Na área de biossensores, a fibroína foi comprovada como uma eficiente matriz de imobilização para outras biomoléculas, como por exemplo, peptídeos

antigênicos e enzimas para detecção de anticorpos específicos e detecção enzimática, respectivamente.^[3,4,56,57]

1.3 Filmes automontados *Layer-by-Layer (LbL)*

A atividade e estabilidade de biomoléculas imobilizadas sobre uma superfície sólida é essencial para o desenvolvimento de biossensores específicos.^[58] A imobilização de proteínas e peptídeos pode ser obtida por várias técnicas, como imobilização por reticulação (*cross-linking*)^[59], filmes Langmuir-Blodgett (LB)^[60], monocamadas automontadas (*self-assembled monolayer*, SAM)^[61] ou filmes automontados camada por camada (*Layer-by-Layer*, *LbL*)^[62].

Os filmes automontados são produzidos por compostos que podem formar uma fina película sobre um substrato sem a necessidade de intervenção externa, ou seja, seus processos de formação ocorrem por reações ou interações espontâneas.^[63]

Dentre os métodos de obtenção de filmes automontados, podemos destacar a técnica conhecida como camada por camada, ou simplesmente *LbL* (do inglês: *Layer-by-Layer*). Esta técnica foi proposta por Decher em 1991, e é baseada principalmente na montagem de filmes através de interações eletrostáticas entre moléculas que se alternam num processo de adsorção sobre uma superfície de carga oposta.^[62]

Em geral, nesta técnica de construção de filmes *LbL* um substrato sólido é tratado previamente e imerso por um determinado período de tempo em uma solução aquosa contendo o material a ser depositado. Uma vez que o substrato imerso possui, em sua superfície, carga elétrica oposta a das espécies em solução, inicia-se um processo espontâneo de adsorção por atração eletrostática.^[64]

O conjunto substrato/filme depositado é então lavado e seco de forma a remover o excesso das espécies fracamente adsorvidas, e sequencialmente é imerso em outra solução contendo uma espécie de cargas opostas às do filme já formado sobre o substrato. Ao repetir este processo sucessivas vezes é possível construir filmes de multicamadas catiônicas e aniônicas alternadamente adsorvidas, conforme se deseja.^[62,65] A Figura 7 ilustra o procedimento de formação de um filme via técnica *LbL*.

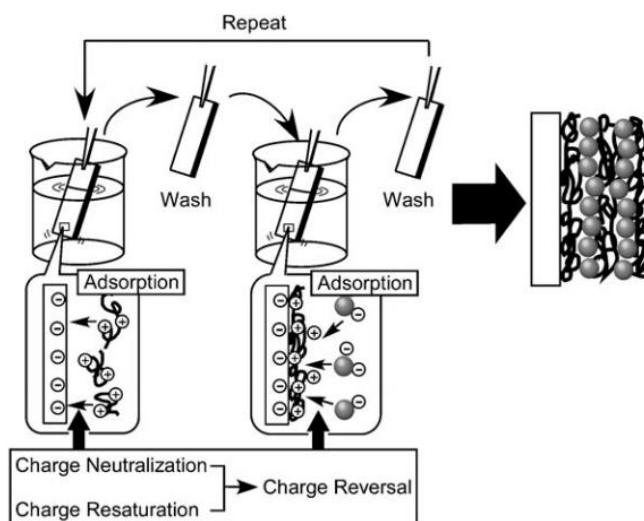


Figura 7. Representação esquemática do processo de automontagem de uma bicamada do filme *LbL*. Inicialmente há a adsorção de um polieletrólito, por exemplo catiônico e, em seguida, há a adsorção de um polieletrólito aniônico. Após cada adsorção os substratos são lavados. Ao final, temos a estrutura idealizada do filme automontado.^[66]

A deposição de filmes multicamadas a partir de soluções de policações e poliânions pode ser efetuada manualmente, levando à fabricação de filmes automontados por um método simples e de baixo custo operacional, de modo que os instrumentos necessários para a produção destes filmes são apenas os substratos, béqueres ou suportes para substratos e pinças. A técnica além de simples e versátil, permite o controle na espessura pelo número de camadas formadas e composição dos filmes em escalas nanométricas.^[67]

A formação do filme automontado pode também ocorrer por outros tipos de interações além das eletrostáticas, como por ligações de hidrogênio, quimissorção, interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, reconhecimento bio-específico, dentre outras.^[68] Esta multiplicidade de interações intermoleculares favorece o emprego de diferentes moléculas, como as biomoléculas, onde o efeito cooperativo de atração por vários pontos exerce papel fundamental na imobilização. É importante destacar também que os filmes automontados são construídos essencialmente com substâncias solúveis em água, favorecendo o emprego de biomoléculas que podem ser incorporadas em diferentes tipos, levando a aplicações em destaque para biossensores e em liberação controlada de fármacos através da imobilização de modelos de membrana.^[69,70] De fato, a desnaturação da biomolécula é minimizada devido à adsorção, que pode ser realizada em condições adequadas de pH e temperatura.^[64]

Nos últimos anos, houve um aumento significativo de interesse na utilização de polímeros naturais como a matriz de imobilização para biomoléculas, tais como quitina^[70], quitosana^[72,73] e fibroína da seda^[74-76]. Filmes *LbL* têm sido usados para imobilizar fibroína preservando propriedades mecânicas e a biocompatibilidade. Wang e colaboradores

produziram filmes de fibroína por sucessivas deposições sobre um substrato sólido. Estes filmes apresentaram estabilidade em condições fisiológicas e boa adesão de células, possibilitando o uso para funcionalizar superfícies de biomateriais.^[75] A fibroína também foi imobilizada em filmes *LbL* em junção de filmes de quitosana sobre superfície de titânio. A superfície modificada com o filme melhorou significativamente a compatibilidade celular, apresentou boa aderência e bom crescimento de osteoblastos.^[77] Em nosso grupo de pesquisa, a fibroína vem sendo utilizada também como uma eficiente matriz de imobilização em filmes *LbL* para estruturar peptídeos antigênicos e enzimas, visando a detecção por sistemas biossensores.^[3,4,56,57] As propriedades mecânicas dos filmes de fibroína foram investigadas por Jiang e colaboradores. Os filmes multicamadas apresentaram alta elasticidade e resistência, sugerindo sua utilização em microescala para a produção de biodispositivos, implantes biocompatíveis e revestimentos para pele artificial.^[78]

1.4 Peptídeo antimicrobiano hylina - a1

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são cadeias de moléculas com baixa massa molecular e uma vasta atividade inibitória contra fungos, vírus e bactérias.^[79] Os PAMs pertencem a um grupo abundante de moléculas que são produzidas por diversas células, tanto em plantas quanto em animais, e que são agrupadas de acordo com a sua atividade antimicrobiana intrínseca.^[80-82]

O potencial terapêutico dos PAMs é valorizado graças à capacidade destes compostos em matar rapidamente um grande número de microrganismos multiresistentes a antibióticos e/ou outros agentes antimicrobianos.^[83]

O Grupo de Pesquisa em Toxinologia, da Universidade de Brasília, coordenado pela Prof^a Dr^a Mariana S. Castro tem trabalhado com princípios ativos de origem animal, particularmente da secreção cutânea de anfíbios. Este grupo isolou um peptídeo bioativo a partir da secreção cutânea da rã *Hypsiboas albopunctatus*, nomeado hylina - a1 (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂). A identificação e caracterização do peptídeo foi realizada em colaboração com o Grupo de Pesquisa Unidade de Síntese, Estrutura e Aplicações de Peptídeos e Proteínas, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista de Araraquara, liderado pelo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli. Esta molécula mostrou atividade contra diversos tipos de bactérias *Gram-positivas*, *Gram-negativas*, fungos e eritrócitos.^[83,84]

Crusca e colaboradores criaram uma série de peptídeos derivados do hylina - a1 com diferentes cargas na região amino-terminal (N-terminal), visando novas informações sobre a

relação entre a atividade antimicrobiana do peptídeo e sua estrutura biológica. Uma das modificações realizadas, foi adicionar um resíduo de aspartato (D), que contém uma carga negativa em sua cadeia lateral, na extremidade N-terminal do peptídeo, e em outra modificação foi adicionado um resíduo de lisina (K), com carga positiva na cadeia lateral. Em ambas as modificações, foi realizado a troca de um resíduo de leucina (L), na posição 6 da cadeia, por um resíduo de triptofano (W), usado como uma sonda fluorescente para analisar o ambiente local e a influência das modificações na região N-terminal. A presença do W na sequência de aminoácidos do peptídeo hylina - a1 aumentou a afinidade por segmentos transmembranares, além da cadeia lateral do W se envolver na dobragem dos peptídeos, o que facilita a associação do peptídeo à membrana.^[85] Estes novos peptídeos modificados apresentaram uma atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, bem como atividade antifúngica contra *Candida albicans*.^[85,86]

1.5 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Staphylococcus aureus é uma bactéria do grupo dos cocos *Gram-positivos* que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até às mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, septicemia, entre outras.^[87]

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* tornaram-se resistentes a vários antibióticos, primeiro à penicilina em 1947, e logo depois à meticilina.^[88] Foram descobertas originalmente no Reino Unido em 1961 e são comuns em hospitais, sendo também chamadas de *Staphylococcus aureus* multi-resistentes. Mais de 2 bilhões de pessoas são portadores desta bactéria em todo o mundo, e destes, 53 milhões estão infectadas com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).^[89] As doenças relacionadas com MRSA são responsáveis por um grande número de hospitalizações e mortes.^[90]

A resistência a múltiplos antibióticos da MRSA tornou-se um grande problema clínico em todo o mundo. O fator determinante do amplo espectro de resistência em cepas de MRSA é a proteína que se liga à penicilina, nomeada PBP2a, devido a sua baixa afinidade para antibióticos β -lactâmicos. O gene *mecA*, determinante estrutural que codifica a PBP2a, é muito conservado entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina, o que dificulta o tratamento por esta classe de antibióticos.^[91]

Staphylococcus aureus tem uma estrutura complexa que consiste de uma membrana celular composta por lipídios e proteínas envolvidas por uma parede celular e uma

microcápsula, Figura 8. Dentre as constituintes do envoltório têm-se as proteínas de adesão, que promovem a colonização nos tecidos do hospedeiro, as invasivas que promovem a propagação bacteriana, Proteína A em conjunto com “disfarces imunológicos” e as toxinas que são liberadas através da membrana celular. A membrana celular tem papel fundamental na estrutura da bactéria e sua integridade é crucial para manter uma fronteira entre o ambiente externo e o citoplasma.^[92]

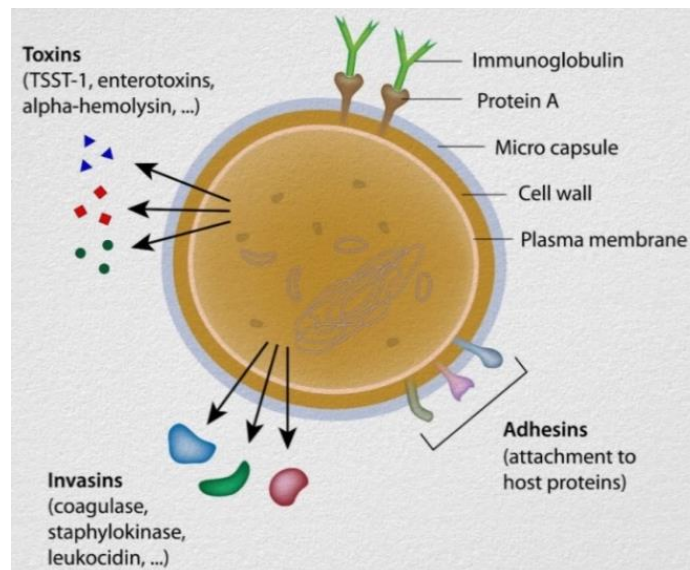


Figura 8. Representação esquemática da estrutura da *Staphylococcus aureus* contendo um envoltório, membrana de plasmática, parede celular e microcápsula com proteínas anexadas a ela.^[93]

A membrana plasmática da bactéria *Staphylococcus aureus* é constituída por uma bicamada lipídica, contendo os fosfolipídios fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e cardiolipina.^[94] Além dos fosfolipídios, a membrana celular contém as proteínas ligantes de penicilina (PBPs), como mostrado na Figura 9. As PBPs são enzimas, conhecidas como transpeptidase, que auxiliam a síntese da parede celular.^[95] PBPs apresentam resistência a antibióticos, mais especificamente a PBP2a, uma proteína de 78 kDa, que confere maior resistência a todos os agentes β -lactâmicos. Devido à baixa afinidade com os antibióticos, permitem a sobrevivência da *Staphylococcus aureus* mesmo após exposição a concentrações elevadas dos mesmos.^[91]

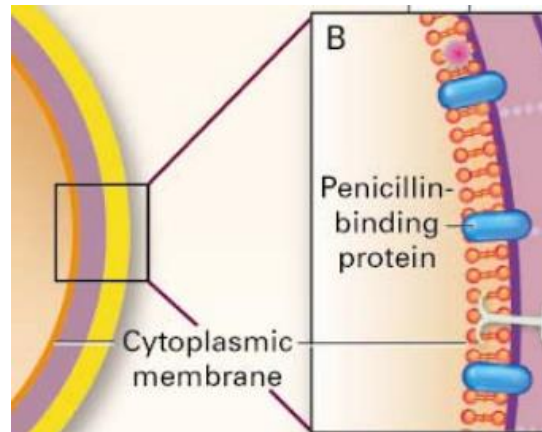


Figura 9. Representação esquemática das PBPs presentes na membrana plasmática da *Staphylococcus aureus*.^[92]

Os peptídeos hylina projetados, modificados e sintetizados para este trabalho possuem atividade contra MRSA.^[84] Desta forma, a proteína PBP2a e antígenos MRSA foram utilizados para os estudos espectroscópicos e eletroquímicos destes peptídeos visando sua aplicação em sistemas biossensores para bactérias *Staphylococcus aureus*.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, os peptídeos antimicrobianos Hyl-D0-W6 e Hyl-K0-W6 foram obtidos com sucesso através de síntese no estado sólido, e as nanopartículas (NPs) de $YVO_4:Eu^{3+}$ pelo método de co-precipitação. O estudo da influência do resíduo de triptofano (W) presente nestes peptídeos com relação à luminescência característica do európio foi realizado em solução e no estado sólido através de filmes nanoestruturados, via técnica *Layer-by-Layer* (LbL), contendo fibroína da seda (SF) como matriz de imobilização para NPs.

Os resultados obtidos confirmam apenas o peptídeo Hyl-K0-W6 como possível sensibilizador da luminescência das NPs e que há comportamento linear de acordo com o aumento da concentração de Hyl-K0-W6 adicionada sobre a superfície dos filmes.

Devido aos peptídeos apresentarem atividade contra cepas da bactéria *Staphylococcus aureus*, os filmes foram analisados na presença da proteína PBP2a, responsável pela resistência da bactéria aos antibióticos β -lactâmicos. A interação entre o peptídeo e a proteína ocorre somente no filme SF/Hyl-K0-W6+NPs. Foi observado que somente o Hyl-K0-W6 se estrutura na presença das NPs de $YVO_4:Eu^{3+}$, justificando assim sua efetiva atividade sobre a PBP2a. Ao adicionar a proteína PBP2a sobre este sistema, houve aumento na luminescência característica do Eu^{3+} em 620 nm, sugerindo que ocorreu uma possível transferência de energia dos aminoácidos aromáticos para a matriz de vanadato, além de um sinal de oxidação nos voltamogramas por volta de 0,1 V que se pronuncia conforme o aumento da concentração de PBP2a adsorvida sobre o filme.

A partir destes resultados, foi realizada a detecção eletroquímica do extrato antigênico da MRSA. É nítido que há mudanças significativas nos voltamogramas e linearidade na detecção em função de diferentes concentrações do extrato após a adsorção da amostra real contendo a bactéria MRSA.

As perspectivas deste trabalho incluem a validação do método por meio da detecção eletroquímica na qual se faz necessário a análise da estabilidade, seletividade e limite de detecção e quantificação do sistema, visando a confirmação destes filmes como protótipos biossensores específicos para MRSA ou para bactérias multirresistentes, em geral; o estudo da detecção óptica da MRSA, buscando a melhoria dos parâmetros em relação à preparação dos filmes para garantir melhor reprodutibilidade dos resultados; medidas do tempos de vida de todos os sistemas estudados, visando maior eficiência dos processos de transferência de energia entre os peptídeos e as NPs; análise de outros microrganismos que o peptídeo Hyl-K0-W6 apresenta atividade, como fungos das espécies *Candida albicans*, *Candida*

parapsilosis, *Candida krusei* (todos envolvidos em uma ampla gama de infecções) e *Cryptococcus neoformans* (causa comum de meningite fúngica); e por fim, a utilização do sistema utilizando outras biomoléculas e/ou peptídeos, com a estratégia de aplicação em diversos tipos de biossensores.

REFERÊNCIAS

- 1 ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Diagnostic tests for hepatitis C: recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis. **World Journal Gastroenterology**, v. 20, n. 42, p. 15476-15491, 2014.
- 2 RICKERT, J.; GÖPEL, W.; BECK, W.; JUNG, G.; HEIDUSCHKA, P. A “mixed” self-assembled monolayer for an impedimetric immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 11, n. 8, 757-768, 1996.
- 3 MORAES, M. L.; LIMA, L. R.; SILVA, R. R.; CAVICCHIOLI, M.; RIBEIRO, S. J. L. Immunosensor based on immobilization of antigenic peptide NS5A-1 from HCV and silk fibroin in nanostructured films. **Langmuir**, v. 29, n. 11, 3829-34, 2013.
- 4 LIMA, L. R.; MORAES, M. L.; NIGOGHOSSIAN, K.; PERES, M. F. S.; RIBEIRO, S. J. L. Silk fibroin-antigenic peptides-YVO₄:Eu³⁺ nanostructured thin films as sensors for hepatitis C. **Journal of Luminescence**, v. 170, n. 2, p. 375-379, 2016.
- 5 MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 111-117, 2005.
- 6 SOUSA FILHO, P. C.; LIMA, J. F.; SERRA, O. A. From lighting to photoprotection: fundamentals and applications of rare earth materials. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 12, p. 2471-2495, 2015.
- 7 IUPAC. **Periodic table of elements**. Disponível em <<https://iupac.org/what-we-do/periodic-table-of-elements/>> Acesso em: 09 de abril de 2018.
- 8 LEE, J. D. **Química Inorgânica não tão concisa**. Tradução da 5ª ed. inglesa. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.
- 9 BÜNZLI, J.-C. G.; PIGUET, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chemical Society Reviews*, v. 34, n. 12, p. 1048-1077, 2005.
- 10 EDELSTEIN, N. M. **Lanthanide and actinide chemistry and spectroscopy**. Washington: ACS Symposium Volume 131, American Chemical Society, 1980.
- 11 MONTEIRO, J. H. S. K. **Foto e eletroluminescência de complexos de samário, európio e gadolínio trivalentes com a beta-dicetona tta e o fosfinóxido quelante dppmo**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 12 SÁ, G.; MALTA, O.; DONEGÁ, C. M.; SIMAS, A.; LONGO, R.; SANTA-CRUZ, P.; SILVA, E. Spectroscopic properties and design of highly luminescent lanthanide coordination complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v.196, n. 1, p. 165-195, 2000.
- 13 GALAÇO, A. R. B. S.; LIMA, J. F.; SERRA, O. A. Os lantanídeos nas redes metalorgânicas: uma nova classe de materiais porosos. **Química Nova**, v. XY, n. XY, p. 1-13, 2018.
- 14 BINNEMANS, K. Interpretation of europium (III) spectra. **Coordination Chemical**

Reviews, v. 295, p. 1-45, 2015.

15 CALIL JR, M. A. **Síntese e caracterização de matrizes inorgânicas baseadas em NaYF₄ e ZnGa₂O₄: propriedades upconversion, downconversion e luminescência persistente**. 2017. 148 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

16 CATES, E. L.; CHINNAPONGSE, S. L.; KIM, J.-H.; KIM, J.-H. Engineering light: advances in wavelength conversion materials for energy and environmental technologies. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 22, p. 12316-12328, 2012.

17 RAMASAMY, P.; MANIVASAKAN, P.; KIM, J. Upconversion nanophosphors for solar cell applications. **RSC Advances**, v. 4, n. 66, p. 34873-34895, 2014.

18 SEDLMEIER, A.; GORRIS, H. H. Surface modification and characterization of photon-upconverting nanoparticles for bioanalytical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 6, p. 1526-1560, 2015.

19 CARLOS, L. D.; FERREIRA, R. A S.; BERMUDEZ, V. Z.; RIBEIRO, S. J. L. Lanthanide-containing light-emitting organic-inorganic hybrids: a bet on the future. **Advanced Materials**, v. 21, n. 5, p. 509-534, 2009.

20 BINNEMANS, K. Lanthanide-based luminescent hybrid materials. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 9, p. 4283-4374, 2009.

21 BÜNZLI, J. C. G.; ELISEEVA, S. V. Lanthanide NIR luminescence for telecommunications, bioanalyses and solar energy conversion. **Journal of Rare Earths**, v. 28, n. 6, p. 824-842, 2010.

22 BÜNZLI, J. C. G. Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2729-2755, 2010.

23 LEDUC, J.; GÖNÜLLÜ, Y.; RAAUF, A.; FISCHER, T.; MATHUR, S. Chapter five - rare-earth-containing materials for photoelectrochemical water splitting applications. **Semiconductors and Semimetals**, v. 97, p. 185-209, 2017.

24 BÜNZLI, J.-C. G. Lanthanide luminescent bioprobes (LLBs). **Chemistry Letters**, v. 38, n. 2, p. 104-109, 2008.

25 YANG, W.; LI, X.; CHI, D.; ZHANG, H.; LIU, X. Lanthanide-doped upconversion materials: emerging applications for photovoltaics and photocatalysis. **Nanotechnology**, v. 25, n. 48, p. 1-16, 2014.

26 CABLE, M. L.; LEVINE, D. J.; KIRBY, J. P.; GRAY, H. B.; PONCE, A. Luminescent lanthanide sensors. **Inorganic Photochemistry**. Eds: Academic Press, v. 63, p. 1-45, 2011.

27 YAN, J.; HE, W.; YAN, S.; NIU, F.; LIU, T.; MA, B.; SHAO, Y.; YAN, Y.; YANG, G.; LU, W.; DU, Y.; LEI, B.; MA, P. X. Self-assembled peptide-lanthanide nanoclusters for safe tumor therapy: overcoming and utilizing biological barriers to peptide drug delivery. **ACS Nano**, v. 12, n. 2, p. 2017-2026, 2018.

28 MONTEIRO, J. H. S. K. **Propriedades fotofísicas de complexos de íons lantanídeos no**

estado sólido e em solução aquosa: imageamento e atividade citotóxica. 2014. 205 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

29 REED, E. D.; MOOS, H. W. Multiphonon relaxation of excited states of rare-earth ions in YVO_4 , YAsO_4 , and YPO_4 . **Physical Review B**, v. 8, n. 3, p. 980-987, 1973.

30 REED, E. D.; MOOS, H. W. Nonthermalization and large variation in multiphonon relaxation rate among rare-earth-ion stark levels. **Physical Review B**, v. 8, n. 3, p. 988-992, 1973.

31 VENIKOUAS, G. E.; POWELL, R. C. Laser site-selection spectroscopy investigation of Eu^{3+} ions in YVO_4 crystals. **Physical Review B**, v. 17, n. 9, p. 3456-3461, 1978.

32 HSU, C.; POWELL, R. C. Energy transfer in europium doped yttrium vanadate crystals. **Journal of Luminescence**, v. 10, n. 5, p. 273-293, 1975.

33 JANG, K. H.; SUNG, W. K.; KIM, E. S.; SHI, L.; JEONG, J. H.; SEO, H. J. Time-resolved luminescence spectroscopy of a $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ thin film. **Journal of Luminescence**, v. 129, n. 12, p. 1853-1856, 2009.

34 RIWOTZKI, K.; HAASE, M. Wet-chemical synthesis of doped colloidal nanoparticles : $\text{YVO}_4:\text{Ln}$ (Ln = Eu, Sm, Dy). **Journal of Physics Chemistry B**, v. 102, n. 50, p. 10129-10135, 1998.

35 XU, Z.; KANG, X.; LI, C.; HOU, Z.; ZHANG, C.; YANG, D.; LI, G.; LIN, J. Ln^{3+} (Ln = Eu, Dy, Sm, and Er) ion-doped YVO_4 nano/microcrystals with multiform morphologies: hydrothermal synthesis, growing mechanism, and luminescent properties. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 14, p. 6706-6715, 2010.

36 GRANDHE, B. K.; BANDI, V. R.; JANG, K.; RAMAPRABHU, S.; LEE, H.-S.; SHIN, D.-S.; YI, S.-S.; JEONG, J.-H. Multi wall carbon nanotubes assisted synthesis of $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ nanocomposites for display device applications. **Composites Part B Engineering**, v. 43, n. 3, p. 1192-1195, 2012.

37 HUIGNARD, A.; GACOIN, T.; BOILOT, J.-P. Synthesis and luminescence properties of colloidal $\text{YVO}_4:\text{Eu}$ phosphors. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 4, p. 1090-1094, 2000.

38 SINGH, L. R. Eu^{3+} as a marker for formation of core-shell system: $\text{YVO}_4:\text{SiO}_2$. **OpenNano**, v. 2, p. 57-63, 2017.

39 PRINCE, J. T.; McGRATH, K. P.; DiGIROLAMO, C. M.; KAPLAN, D. L. Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. **Biochemistry**, v. 34, n. 34, p. 10879-10885, 1995.

40 TANSIL, N. C.; LI, Y.; TENG, C. P.; ZHANG, S.; WIN, K. Y.; CHEN, X.; LIU, X. Y.; HAN, M. Y. Intrinsically colored and luminescent silk. **Advanced Materials**, v. 23, n. 12, p. 1463-1466, 2011.

41 ALTMAN, G. H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R. L.; CHEN, J.; LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D. L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401-416, 2003.

- 42 QI, Y.; WANG, H.; WEI, K.; YANG, Y.; ZHENG, R. Y.; KIM, I. S.; ZHANG, K. Q. A review of structure construction of silk fibroin biomaterials from single structures to multi-level structures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 237-257, 2017.
- 43 WANG, Y. J.; ZHAG, Y. Q. Three-layered sericins around the silk fibroin fiber from *Bombyx mori* cocoon and their amino acid composition. **Advanced Materials Research**, v. 175-176, 158-163, 2011.
- 44 CHUNG, D. E.; LEE, J. H.; KWEON, H.; LEE, K.-G.; UM, I. C. Structure and properties of silk sericin obtained from different silkworm varieties. **International Journal of Industrial Entomology**, v. 30, n. 2, p. 81-85, 2015.
- 45 PADAMWAR, M. N.; PAWAR, A. P. Silk sericin and its application: a review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, n. 4, p. 323-329, 2004.
- 46 KUNDU, B.; KUNDU, S. C. Silk sericin/polyacrylamide *in situ* forming hydrogels for dermal reconstruction. **Biomaterials**, v. 33, n. 30, p. 7456-7467, 2012.
- 47 KOZLOWSKI, R. M. **Handbook of Natural Fibres**: Types, properties and factors affecting breeding and cultivation. Cambridge: Woodhead Publishing, 2012.
- 48 YANG, M.; TANAKA, C.; YAMAUCHI, K.; OHGO, K.; KUROKAWA, M.; ASAKURA, T. Silk like materials constructed from sequences of *Bombyx mori* silk fibroin, fibronectin, and elastin. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 84, n. 2, p. 353-363, 2008.
- 49 LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Lehninger**: principles of biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2005.
- 50 MORI, H.; TSUKADA, M. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 95-103, 2000.
- 51 LIN, N.; MENG, Z.; TOH, G. W.; ZHEN, Y.; DIAO, Y.; XU, H.; LIU, X. Y. Engineering of fluorescent emission of silk fibroin composite materials by material assembly. **Small**, v. 11, n. 9-10, p. 1205-1214, 2015.
- 52 HE, Y.-X.; ZHANG, N.-N.; LI, W.-F.; JIA, N.; CHEN, B.-Y.; ZHOU, K.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; ZHOU, C.-Z. N-Terminal domain of *Bombyx mori* fibroin mediates the assembly of silk in response to pH decrease. **Journal of Molecular Biology**, v. 418, n. 3-4, p. 197-207, 2012.
- 53 SOMMER, M. R.; VETSCH, J. R.; LEEMANN, J.; MÜLLER, R.; STUDART, A. R.; HOFMANN, S. Silk fibroin scaffolds with inverse opal structure for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 105, n. 7, p. 2074-2084, 2017.
- 54 COLUSSO, E.; DE FERRARI, F.; MINZIONI, P.; MARTUCCI, A.; WANG, Y.; OMENETTO, F. G. Engineering optical defects in biopolymer photonic lattices. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 6, n. 5, p. 966-971, 2018.
- 55 ZHAO, S.; CHEN, Y.; PARTLOW, B. P.; GOLDING, A. S.; TSENG, P.; COBURN, J.;

APPLEGATE, M. B.; MOREAU, J. E.; OMENETTO, F. G.; KAPLAN, D. L. Bio-functionalized silk hydrogel microfluidic systems. **Biomaterials**, v. 93, p. 60-70, 2016.

56 DELEZUK, J. A. M.; PAVINATTO, A.; MORAES, M. L.; SHIMIZU, F. M.; RODRIGUES, V. C.; CAMPANA-FILHO, S. P.; RIBEIRO, S. J. L.; OLIVEIRA, O. N. Silk fibroin organization induced by chitosan in layer-by-layer films: application as a matrix in a biosensor. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 146-151, 2017.

57 GONÇALVES, J. M.; LIMA, L. R.; MORAES, M. L.; RIBEIRO, S. J. L. Immunosensor for diagnosis of Alzheimer disease using amyloid- β 1-40 peptide and silk fibroin thin films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 338-342, 2016.

58 LAN, W.; CHEN, G.; CUI, F.; TAN, F.; LIU, R.; YUSHUPUJIANG, M. Development of a novel optical biosensor for detection of organophosphorus pesticides based on methyl parathion hydrolase immobilized by metal-chelate affinity. **Sensors**, v. 12, n. 7, p. 8477-8490, 2012.

59 SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

60 OSVALDO, N.; OLIVEIRA, J. Langmuir-Blodgett films - properties and possible applications. **Brazilian Journal of Physics**, v. 22, n. 2, p. 60-69, 1992.

61 SAGIV, J. Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 1, p. 92-98, 1980.

62 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.

63 LIMA, L. R. **Imunossensores à base de filmes nanoestruturados de fibroína da seda - peptídeo antigênico NS5A-1 - vanadato de ítrio: európio para detecção de hepatite C**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

64 ARIGA, K.; NAKANISHI, T.; MICHINOBU, T. Immobilization of biomaterials to nano-assembled films (self-assembled monolayers, Langmuir-Blodgett films, and layer-by-layer assemblies) and their related functions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 8, p. 2278-2301, 2006.

65 PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; OLIVEIRA JR., O. N. de Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.

66 ARIGA, K.; HILL, J. P.; JI, Q. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 19, p. 2319-2340, 2007.

67 CLARK, S. L.; HAMMOND, P. T. Engineering the microfabrication of layer-by-layer thin films. **Advanced Materials**, v. 10, n. 18, p. 1515-1519, 1998.

68 DHOTEL, A.; CHEN, Z.; DELBREILH, L.; YOUSSEF, B.; SAITER, J. M.; TAN, L.

Molecular motions in functional self-assembled nanostructures. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 2303-2333, 2013.

69 RUSLING, J. F.; HVAŠTKOVŠ, E. G.; HULL, D. O.; SCHENKMAN, J. B. Biochemical applications of ultrathin films of enzymes, polyions and DNA. **Chemical Communication**, v. 2, p. 141-154, 2008.

70 TANG, Z.; WANG, Y.; PODSIADLO, P.; KOTOV, N. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. **Advanced Materials**, v. 18, n. 24, p. 3203-3224, 2006.

71 KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

72 JIN, X.; XI, F.; LV, D.; WU, Q.; LIN, X. The effect of the chitosan membrane properties on the enzyme adsorption and performance for the construction of horseradish peroxidase biosensors. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 4, p. 786-791.

73 WU, B.-Y.; HOU, S.-H.; YIN, F.; LI, J.; ZHAO, Z.-X.; HUANG, J.-D.; CHEN, Q. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 6, p. 838-844, 2007.

74 XUE, R.; KANG, T. F.; LU, L. P.; CHENG, S. Y. Immobilization of acetylcholinesterase via biocompatible interface of silk fibroin for detection of organophosphate and carbamate pesticides. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 16, p. 6040-6045, 2012.

75 WANG, X.; KIM, H. J.; XU, P.; MATSUMOTO, A.; KAPLAN, D. L. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. **Langmuir**, v. 21, n. 24, p. 11335-11341, 2005.

76 OMENETTO, F. G.; KAPLAN, D. L. New opportunities for an ancient material. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 528-531, 2010.

77 CAI, K.; HU, Y.; JANDT, K. D. Surface engineering of titanium thin films with silk fibroin via layer-by-layer technique and its effects on osteoblast growth behavior. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 82, n. 4, p. 927-935, 2007.

78 JIANG, C.; WANG, X.; GUNAWIDJAJA, R.; LIN, Y.-H.; GUPTA, M. K.; KAPLAN, D. L.; NAIK, R. R.; TSUKRUK, V. V. Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films. **Advanced Functional Materials**, v. 17, n. 13, p. 2229-2237, 2007.

79 IZADPANA, A.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 381-390, 2005.

80 GALLO, R. L.; MURAKAMI, M.; OHTAKE, T.; ZAIYOU, M. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology: Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. **The Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 110, n. 6, p. 823-831, 2002.

81 BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in

bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 238-250, 2005.

82 MELLO, É. O. **Atividade antifúngica e mecanismo de ação da defensina PvD1 isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris* L.** 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.

83 CRUSCA JR, E. **Síntese, estudos estruturais e biológicos do peptídeo hilina a1 e análogos.** 2010. 91 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

84 CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C. G.; CILLI, E. M.; CRUSCA JR., E.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBEN, A.; RICART, C. A. O.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, n. 2, p. 291-296, 2009.

85 CRUSCA, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; GIANNINI, M. J. S. M.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. **Peptide Science**, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2011.

86 SILVA, B. R.; FREITAS, V. A. A.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; LORENZÓN, E. N.; AGUIAR, A. S. W.; CILLI, E. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial activity of the synthetic peptide Lys-a1 against oral streptococci. **Peptides**, v. 42, p. 78-83, 2013.

87 SANTOS, A. L. DOS; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. DE; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

88 HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 486-493, 2001.

89 GRUNDMANN, H.; AIRES-DE-SOUSA, M.; BOYCE, J.; TIEMERSMA, E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **The Lancet**, v. 368, n. 9538, p. 874-885, 2006.

90 RAYGADA, J. L.; LEVINE, D. P. Managing CA-MRSA infections: current and emerging options. **Infections in Medicine Journal**, v. 26, n. 2, p. 49-57, 2009.

91 RANI, N.; VIJAYAKUMAR, S.; THANGA VELAN, L. P.; ARUNACHALAM, A. Quercetin 3-O-rutinoside mediated inhibition of PBP2a: computational and experimental evidence to its anti-MRSA activity. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 12, p. 3229-3237, 2014.

92 PATEL, H.; VAGHASIYA, Y.; VYAS, B. R. M.; CHANDA, S. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: A challenge to researchers and clinicians. **Bacteriology Journal**, v. 2, p. 23-45, 2012.

93 ALILA MEDICAL MEDIA. **Medical illustrations and animations, health and science available online:** <<http://www.alilamedicalmedia.com>> Acesso em: 30 de março de 2018.

- 94 BANDYOPADHYAY, S.; JUNJIE, R. L.; LIM, B.; SANJEEV, R.; XIN, W. Y.; YEE, C. K.; HUI MELODIES, S. M.; YOW, N.; SIVARAMAN, J.; CHATTERJEE, C. Solution structures and model membrane interactions of ctriporin, an anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* peptide from scorpion venom. **Biopolymers**, v. 101, n. 12, p. 1143-1153, 2014.
- 95 LESKI, T. A.; TOMASZ, A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2a. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1815-1824, 2005.
- 96 FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.
- 97 KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.
- 98 ESTEBAN, N. L. **Efeito do comprimento e da polaridade do espaçador entre cadeias do peptídeo hylina-C na forma dimérica**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2011.
- 99 MILLNER, P. A. Peptide synthesis protocols: Methods in molecular biology. **Biochemical Education**, v. 23, n. 2, p. 116-116, 1995.
- 100 BARKER, M. G.; HOOPER, A. J. Preparation and X-ray powder diffraction patterns of the sodium vanadates NaVO_3 , $\text{Na}_4\text{V}_2\text{O}_7$, and Na_3VO_4 . **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 15, n. 15, p. 1513-1517, 1973.
- 101 GIAUME, D.; BUISSETTE, V.; LAHLIL, K.; GACOIN, T.; BOILOT, J.-P.; CASANOVA, D.; BEAUREPAIRE, E.; SAUVIAT, M.-P.; ALEXANDROU, A. Emission properties and applications of nanostructured luminescent oxide nanoparticles. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 33, n. 2-4, p. 99-106, 2005.
- 102 ROCKWOOD, D. N.; PREDA, R. C.; YUCEL, T.; WANG, X.; LOVETT, M. L.; KAPLAN, D. L. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. **Nature Protocols**, v. 6, n. 10, p. 1612-1631, 2011.
- 103 FASMAN, G. D. **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. New York: Springer, 1996.
- 104 GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.
- 105 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998.
- 106 SIERRA, M. M. S.; GIOVANELA, M.; DONARD, O. F. X.; BELIN, C. A utilização da espectroscopia de fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: evolução e perspectivas. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 294-301, 1996.

- 107 ATVARAS, T. D. Z.; MARTELLI, C. **Espectroscopia de luminescência**. 2002. p. 1-9. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2002/02/18/espectroscopia-de-luminescência/>>. Acesso em: 10 abr. 2018.
- 108 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- 109 ALEIXO, L. M. **Voltametria: conceitos e técnicas**. 2003. p. 1-21. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/03/25/voltametria-conceitos-e-técnicas/>>. Acesso em: 10 abr. 2018.
- 110 MANGONI, M. L. Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 9, p. 1060-1069, 2006.
- 111 CRUSCA, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. **Biopolymers**, v. 96, n. 1, p. 41-48, 2011.
- 112 CASALLANOVO, F.; DE OLIVEIRA, F. J. F.; DE SOUZA, F. C.; ROS, U.; MARTÍNEZ, Y.; PENTÓN, D.; TEJUCA, M.; MARTÍNEZ, D.; PAZOS, F.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; CILLI, E. M.; LANIO, M. E.; ALVAREZ, C.; SCHREIER, S. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Peptide Science**, v. 84, n. 2, p. 169-180, 2006.
- 113 JAMASBI, E.; BATINOVIC, S.; SHARPLES, R. A.; SANI, M. A.; ROBINS-BROWNE, R. M.; WADE, J. D.; SEPAROVIC, F.; HOSSAIN, M. A. Melittin peptides exhibit different activity on different cells and model membranes. **Amino Acids**, v. 46, n. 12, p. 2759-2766, 2014.
- 114 BUCK, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 31, n. 3, p. 297-355, 1998.
- 115 SHEN, J.; SUN, L.-D.; ZHU, J.-D.; WEI, L.-H.; SUN, H.-F.; YAN, C.-H. Biocompatible bright YVO₄:Eu nanoparticles as versatile optical bioprobes. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 21, p. 3708-3714, 2010.
- 116 XIE, L.; SONG, H.; WANG, Y.; XU, W.; BAI, X.; DONG, B. Influence of concentration effect and Au coating on photoluminescence properties of YVO₄:Eu³⁺ nanoparticle colloids. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 21, p. 9975-9980, 2010.
- 117 HUIGNARD, A.; BUISSETTE, V.; LAURENT, G.; GACOIN, T.; BOILOT, J. P. Synthesis and characterizations of YVO₄:Eu colloids. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 5, p. 2264-2269, 2002.
- 118 FROST, R. L.; HENRY, D. A.; WEIER, M. L.; MARTENS, W. Raman spectroscopy of three polymorphs of BiVO₄: Clinobisvanite, dreyerite and pucherite, with comparisons to (VO₄)³⁻ bearing minerals: namibite, pottsite and schumacherite. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 7, p. 722-732, 2006.
- 119 DONEGÁ, C. M.; MEIJERINK, A.; BLASSE, G. Saturation effects in the excitation spectra of rare-earth ions. **Journal of Luminescence**, v. 62, n. 5, p. 189-201, 1994.

120 REYNOLDS, A. M.; SCULIMBRENE, B. R.; IMPERIALI, B. Lanthanide-binding tags with unnatural amino acids: sensitizing Tb³⁺ and Eu³⁺ luminescence at longer wavelengths. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 588–591, 2008.