

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Química

“Utilização de fibroína de seda para imobilização de β -amiloide para
aplicação em imunossensores”

João Marcos Gonçalves

Dissertação de mestrado
2015

João Marcos Gonçalves

“Estudo e caracterização de matrizes poliméricas e a β -amiloide para o desenvolvimento de imunossensores”

Dissertação de mestrado apresentada
ao Instituto de Química da Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Marli Leite de Moraes

Araraquara

2015

Dedico este trabalho à minha família, pelo exemplo de conduta e ética que sempre me deram, aos meus amigos pelo suporte, e aos mentores do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Marco Antônio Gonçalves e Zilda Regina de Freitas Gonçalves, pelo exemplo diário de moral, ética, conduta e também conhecimento que me trouxeram até aqui e ainda irão me levar muito mais adiante nessa caminhada profissional.

Agradeço também à minha namorada, Juliana Vicentin de Matos, pelo apoio incondicional que me deu durante esse trabalho, durante os altos e tantos baixos e tantos momentos inesquecíveis que passei com você ao longo desses anos.

Também agradeço aos meus familiares mais próximos, primos e primas, tios e tias que sempre me apoiaram e deram suporte ao meu caráter.

À todos os meus amigos, tanto de Araraquara, quanto Ribeirão Preto e Votuporanga, por todas as conversas, risadas e distrações que eu tanto precisei; são tantos os que de alguma maneira colaboraram para minha saúde psicológica que fica impossível nomear todos.

Também devo um imenso agradecimento aos orientadores, Sidney José Lima Ribeiro e Marli Leite de Moraes que, além de me orientar durante esse caminho, também serviram de exemplo para o longo caminho que ainda preciso trilhar.

Preciso também agradecer à todo o grupo de Materiais Fotônicos pelo acolhimento, parceria e amizade. Em especial à Laís Roncalho de Lima por toda a ajuda durante este projeto.

À Naira e Alberto Alécio que sempre me acolheram e ajudaram durante os experimentos e também à todos os servidores do Instituto que tenham colaborado com esse trabalho em qualquer âmbito.

Às agências de fomento pela ajuda indispensável.

"A ciência, como um todo, não é nada mais do que um refinamento do pensar diário."

Albert Einstein

"Praticar o bem, abster-se do mal e purificar seus pensamentos, são os mandamentos de todo iluminado."

Sidarta Gautama

RESUMO

A construção de filmes pela técnica *layer-by-layer* com fibroína de seda (SF) e amiloide β de 40 aminoácidos (A β 40) para aplicação em imunossensores eletroquímicos e ópticos foi investigada. O crescimento desses filmes foi confirmado por voltametria cíclica (VC) pela área dos voltamogramas e também por espectroscopia na região ultravioleta-visível (UV-vis) pela absorbância do filme em 230 nm.

O recobrimento completo do eletrodo pela SF foi verificado por VC utilizando solução de ferri/ferrocianeto de potássio. A distorção dos voltamogramas foi observada com maior tempo de adsorção e o tempo de 30 minutos foi considerado como cobertura completa do eletrodo.

Também foi verificada uma mudança de estrutura do peptídeo em filme juntamente com a SF por dicroísmo circular (CD). Em solução a A β 40 apresentou um espectro característico de α -hélice, e quando incorporada no filme observou-se uma predominância de folhas- β .

Para o imunossensor óptico, utilizou-se nanopartículas de YVO₄:Eu³⁺ para monitorar a emissão do íon európio. Os filmes tiveram máximo de excitação em 270 nm e a emissão do Eu³⁺ em 619 nm e também uma emissão em 300 nm associada à SF e ao peptídeo. Após a adição dos anticorpos houve uma diminuição da emissão em 300 nm e um aumento da emissão em 619 nm, associada à uma transferência de energia entre SF e A β 40 e o európio.

Na detecção óptica foi verificado que o anticorpo era incorporado ao filme mesmo sem a presença do peptídeo, fazendo necessárias mudanças experimentais para diminuir interações não específicas.

A detecção eletroquímica da solução de anticorpos anti-A β 40 foi feita por VC, e foi observada uma mudança nas correntes obtidas em potenciais positivos, principalmente em 0,3V e também da área dos voltamogramas; em ambos os casos é verificada uma região linear entre 0 e 10 ng.mL⁻¹ e essa resposta foi obtida apenas na presença do peptídeo.

ABSTRACT

Silk fibroin (SF) and amyloid- β with 40 aminoacids (A β 40) layer-by-layer (LbL) films for optical and electrochemical immunosensing applications were investigated. The growth of this films was confirmed by cyclic voltammetry (VC), observing changes in the voltammogram area and ultraviolet-visible region spectroscopy (UV-vis), observing increasing absorbance in 230 nm.

The complete covering of an carbon electrode was verified using potassium ferrocyanide and ferricyanide in VC. There was distortion of the voltammograms with increasing adsorption time for the SF, and with 30 minutes was observed the maximum distortion, and therefore maximum electrode coverage.

A conformation change of the peptide A β 40 in the film was also observed using circular dichroism (CD). In the solution the peptide presented an characteristic spectrum of α -helix structure and in the film was observed the predominance of β -sheet structure.

For the optical immunosensor an YVO₄:Eu³⁺ nanoparticle suspension to monitor the europium emission. The LbL films had an excitation maximum centered in 270 nm and the europium emission in 619 nm, it was also observed an emission centered in 300 nm attributed to the SF and A β 40. After the addition of antibodies, it was observed an increase in Eu³⁺ emission and a decrease of protein emission, associated with an energy transfer from SF/A β 40 to the Eu³⁺. In the optical detection this effect was observed in the absence of peptide, therefore non-specific interactions between antibodies and the substrate.

The electrochemical detection of the antibodies solution was performed with VC and were observed changes in voltammograms: an increase of current in positive potentials and an increase in voltammogram area. Both had a linear response in the 0 through 10 ng.mL⁻¹ range and this response was observed only in the presence of the A β 40.

LISTRA DE FIGURAS

Figura 1 - Porcentagem da população dos EUA diagnosticada com doença de Alzheimer por faixa etária ¹	12
Figura 2 - Comparação entre o crescimento da mortalidade de diversas doenças nos EUA ¹	13
Figura 3 - Estrutura secundária da A β com 40 aminoácidos em meio aquoso ⁷	14
Figura 4 - Primeira proposta da cascata da A β , que procurava explicar o depósito da proteína no cérebro e a doença de Alzheimer ⁸	14
Figura 5 - Esquema da clivagem da PPA pelas enzimas β - e γ -secretases na DA familiar ¹²	15
Figura 6 - Esquema da cascata de amiloide β , levando em consideração tanto a deposição quanto oligômeros solúveis de amiloide β (representados pelos retângulos verdes) como eventos primários da patogênese da doença. Adaptado de: (Pimplikar, 2009).	16
Figura 7 - Representação esquemática de um biosensor ⁵¹	17
Figura 8 - Esquema de montagem dos filmes LbL ⁴⁴	19
Figura 9 - (a) Sequência de aminoácidos da SF ⁵⁸ e (b) estrutura tridimensional da SF ⁵⁹	21
Figura 10 - Representação esquemática do efeito antes até a emissão do íon Ln^{3+} ⁶⁷	23
Figura 11 - Espectro de absorção dos aminoácidos triptofano (W) e tirosina (Y) ⁷⁰	24
Figura 12 - Espectros de absorção na região UV-Vis da adsorção de camadas de SF e de A β 40. Inserção: absorção em 230 nm versus número de camadas adsorvidas.	30
Figura 13 - Voltamogramas cíclicos da adsorção de camadas SF.	31
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos da adsorção de camadas SF e de A β 40.	31
Figura 15 - Área dos voltamogramas versus número de camadas para os sistemas contendo apenas SF e contendo SF + A β 40.	32
Figura 16 - Voltamogramas do par redox ferri/ferrocianato de potássio.	33
Figura 17 - Espectro de CD da solução aquosa de A β 40.	34
Figura 18 - Espectro de CD do filme SF + A β 40 com 5 bicamadas.	35
Figura 19 - Voltamogramas obtidos para a detecção eletroquímica de solução de anticorpos anti-A β 40 em eletrodos com uma bicamada.	36
Figura 20 - Voltamogramas obtidos para um eletrodo contendo apenas SF para a detecção do anticorpo anti-A β 40.	37
Figura 21 - Respostas dos eletrodos com filme apenas de SF e contendo os dois componentes em função da concentração de anticorpos.	37
Figura 22 - Voltamogramas obtidos para a detecção de solução de anticorpos anti-A β 40 em eletrodo contendo 3 camadas de SF e 3 camadas de A β 40.	38
Figura 23 - Voltamogramas obtidos para a detecção de solução de anticorpos anti-A β 40 em eletrodo contendo 3 camadas de SF.	39
Figura 24 - Comparação entre a resposta do eletrodo contendo apenas SF e o eletrodo contendo o antígeno para 3 camadas.	39
Figura 25 - Voltamogramas obtidos para um eletrodo contendo apenas SF para a detecção do anticorpo anti-A β 40 em eletrodo contendo 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40.	40
Figura 26 - Voltamogramas obtidos para um eletrodo contendo apenas SF para a detecção do anticorpo anti-A β -40 em eletrodo de 5 camadas.	41
Figura 27 - Resposta do eletrodo contendo somente SF e do eletrodo de SF e antígeno.	41

Figura 28 - Voltamogramas selecionados da resposta do eletrodo com a adição de solução de anticorpos anti A β 40. (A) Eletrodo contendo SF + A β 40 e (B) Eletrodo contendo apenas SF.	42
Figura 29 - Resposta dos eletrodos em função da concentração da solução de anticorpos. (A) Todo o intervalo estudado e (B) Ampliação da região até 25 ng/mL. n=3	43
Figura 30 - Área dos voltamogramas em função da concentração da solução de anticorpos. (A) Toda a região analisada e (B) Ampliação da região até 25 ng/mL. n=3.....	44
Figura 31 - Espectros de excitação e emissão do filme de 5 camadas de SF e 5 camadas de NPs.....	46
Figura 32 - Espectro de emissão de filme com 5 camadas de SF e 5 camadas de NPs antes e após adição de anticorpos.	47
Figura 33 - Espectros de excitação e emissão de filme contendo 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40 e NPs.....	48
Figura 34 - Espectros de emissão de filme de 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40 antes e após adição de anticorpos.	49
Figura 35 - Espectros de excitação e emissão de filme contendo 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40W e NPs.	50
Figura 36 - Espectros de emissão de filme de 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40W antes e após adição de anticorpos.....	51

LISTRA DE ABREVIACES

DA – Doença de Alzheimer

A β – Proteína β -amilóide

A β 40 – Proteína β -amilóide com 40 aminoácidos

A β 40W – Proteína β -amilóide com 40 aminoácidos modificada com triptofano

RMN – Ressonância magnética nuclear

PPA – Proteína precursora da amilóide

FCE – Fluido cérebro-espinhal

LbL – *Layer-by-Layer*

SF – Fibroína de seda

UV-Vis – Ultravioleta-visível

CD – Dicroísmo circular

NPs - Nanopartículas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Doença de Alzheimer	12
1.2. Biossensores	17
1.2.1. Biossensores eletroquímicos.....	18
1.2.2. Biossensores ópticos	18
1.3. Filmes camada por camada (<i>Layer-by-Layer</i> , LbL).....	18
1.4. Fibroína de seda	20
1.5. Nanopartículas de lantanídeos	21
2. OBJETIVOS.....	25
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	26
3.1. Materiais e métodos.....	26
3.2. Preparação de filmes em substrato de quartzo.....	27
3.3. Preparação de filmes em eletrodos de carbono impresso.....	27
3.4. Verificação do recobrimento do eletrodo	27
3.5. Técnicas experimentais	28
3.5.1. Espectroscopia UV-Vis	28
3.5.2. Espectroscopia de fluorescência	28
3.5.3. Dicroísmo circular	28
3.5.4. Voltametria cíclica	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1.1. Crescimento do filme	30
4.2. Recobrimento do eletrodo	32
4.3. Estruturação das proteínas	33
4.4. Detecção eletroquímica.....	35
4.5. Detecção óptica	45
5. CONCLUSÕES	52
6. ATIVIDADES FUTURAS	53
6.1. Reprodutibilidade do sensor.....	53
6.2. Especificidade do sensor	53
6.3. Ajustes experimentais para o sensor óptico	53
REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência e afeta, principalmente, pessoas com mais de 65 anos de idade. Uma estimativa feita em 2014 diz que, nos Estados Unidos, aproximadamente 5,2 milhões de pessoas seriam diagnosticadas com a doença, sendo que 11% da população com mais de 65 anos será afetada pela doença e 32% da população acima de 83 anos¹. A figura 1 ilustra a faixa de idade mais afetada e evidencia a ligação entre a doença e a idade.

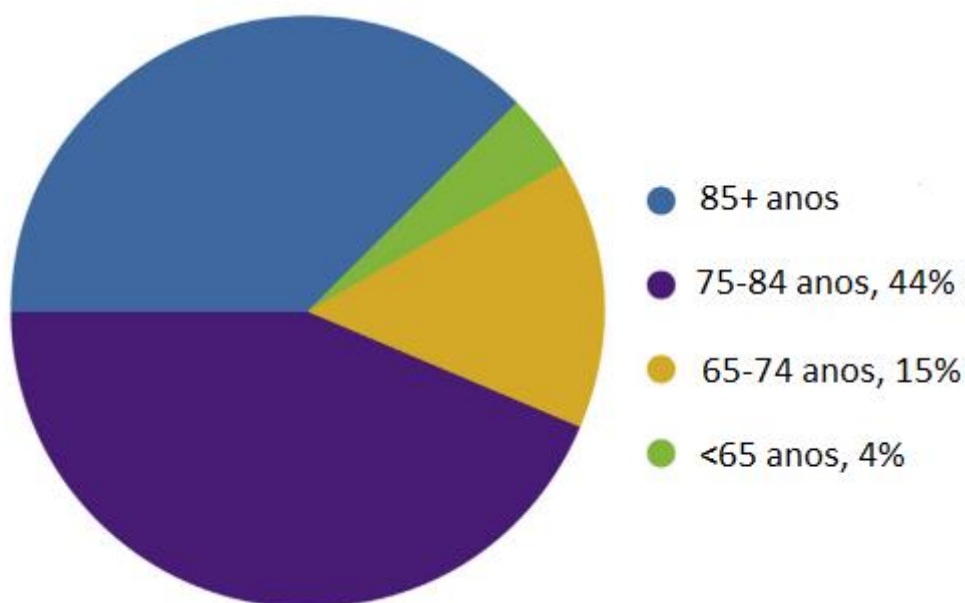


Figura 1 - Porcentagem da população dos EUA diagnosticada com doença de Alzheimer por faixa etária¹.

No ano de 2006, segundo Brookmeyer e colaboradores, foram 26,6 milhões de casos de Alzheimer e projeta-se que em 2050 o número quadruplicará, chegando aos 106,8 milhões, sendo que quanto maior a idade, maior a incidência da doença; 0,9% dos casos com 65 anos e 14,7% com 85 anos².

Embora as mortes por outras doenças, como cardiovasculares tenham diminuído nos Estados Unidos, a DA vem crescendo em mortalidade devida à falta de tratamento efetivo. A figura 2 mostra um comparativo entre várias causas de morte nos EUA, e sua porcentagem de crescimento entre os anos de 2000 e 2010¹, que mostra a queda de mortalidade de diversas doenças e o aumento considerável nas mortes pela DA.

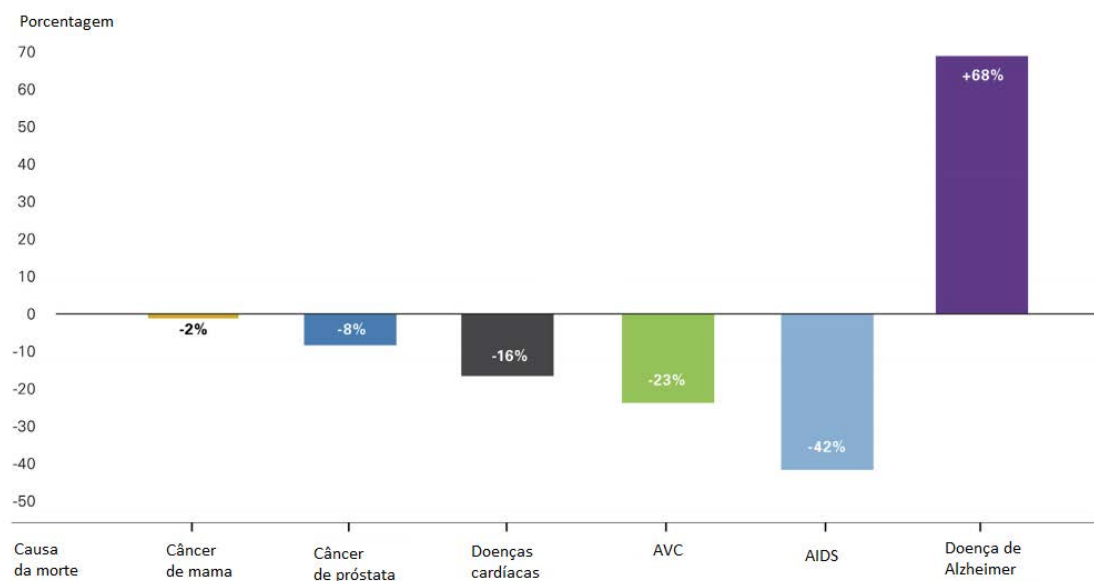


Figura 2 - Comparação entre o crescimento da mortalidade de diversas doenças nos EUA¹.

Um estudo projeta que em 2014 seriam gastos 214 bilhões de dólares em tratamento e cuidados com pessoas com doença de Alzheimer e que esse número saltará para 1,2 trilhão de dólares em 2050¹. A projeção de Wimo e colaboradores diz que em 2010 estima-se que houve um gasto de 604 bilhões de dólares com tratamento e cuidados de pacientes com demência, sendo que os maiores gastos estão concentrados em países mais ricos (América do Norte, Austrália e Oeste europeu) e são responsáveis por quase 89% dos gastos³.

Tamanho impacto na saúde e também na economia justificativa não só a procura por tratamentos efetivos para a DA, como também a investigação para esclarecimento de sua patogênese e diagnóstico precoce.

A DA foi primeiramente descrita pelo médico alemão Alois Alzheimer em 1906; uma paciente mulher de 51 anos apresentava um quadro clínico que incluía amnésia progressiva, afasia (perturbação da formulação e compreensão da linguagem), alexia (incapacidade de compreender a linguagem escrita), comportamento imprevisível e desorientação, e faleceu após 4 anos e meio a partir do aparecimento dos sintomas. Analisando o cérebro dessa paciente, Dr. Alzheimer descobriu que haviam fibrilas emaranhadas espessas no citoplasma das células neurais que foram associadas à morte celular dos neurônios⁴ e mais tarde a doença herdou seu nome.

Pesquisadores, então, concentraram-se na caracterização dessas fibras, que foram descobertas como um peptídeo insolúvel, com peso molecular de aproximadamente 4 kDa e 40 resíduos de aminoácidos que foi chamado de beta amiloide⁵; ⁶, cuja estrutura em ambiente aquoso foi determinada por Vivekanandan e colaboradores⁷ (**Figura 3**). A hipótese de que a deposição da β -amiloide ($A\beta$) é a causa primária da doença de Alzheimer começou a ser

proposta em 1992 por Hardy e Higgins⁸, na qual um caminho alternativo de quebra da proteína precursora da amiloide leva ao acúmulo de A β , que desregula a concentração de cálcio intraneuronal, o qual desencadeia a formação de fibrilas e consequentemente morte celular (**Figura 4**).

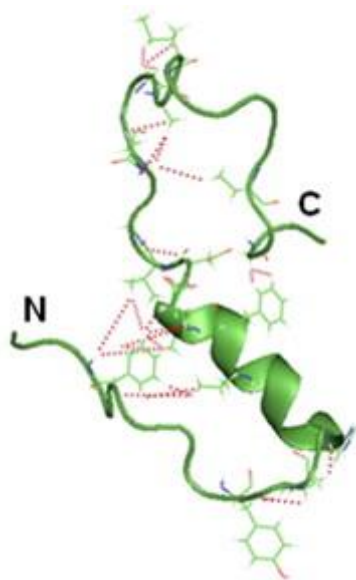


Figura 3 - Estrutura secundária da A β com 40 aminoácidos em meio aquoso⁷.

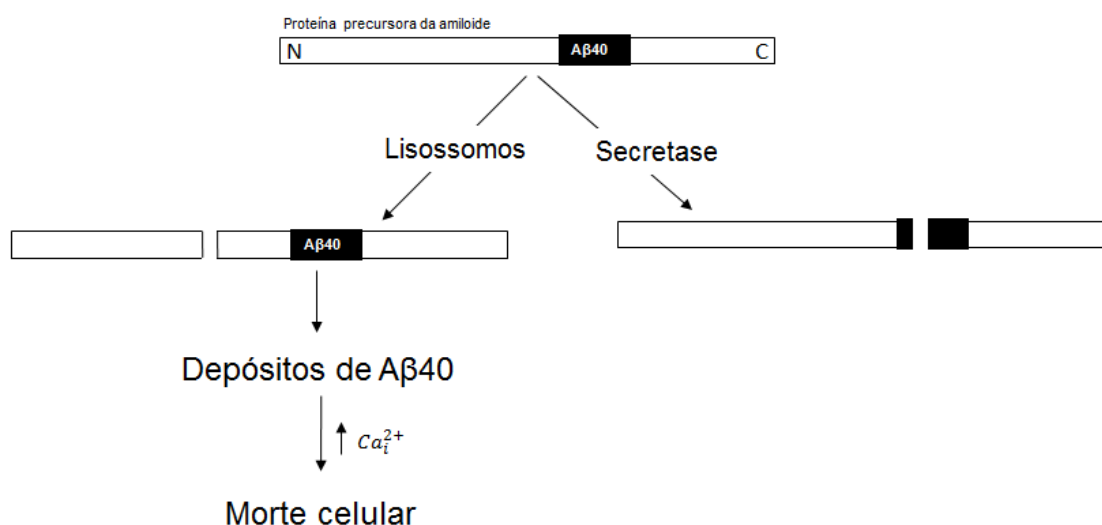


Figura 4 - Primeira proposta da cascata da A β , que procurava explicar o depósito da proteína no cérebro e a doença de Alzheimer⁸.

Nessa proposta há uma via de clivagem via secretase, separa a região de 40 aminoácidos encontrada nos depósitos no cérebro da proteína precursora da amiloide (PPA), não levando à deposição e consequentemente não levando à doença de Alzheimer. Entretanto, a PPA pode ser clivada por um caminho lisossomal, que preserva a sequência desses 40 aminoácidos e portanto leva à

depósitos de A β , que leva à um aumento da concentração de cálcio intracelular e enfim, à morte celular e à DA⁸.

Novos estudos, revisados por Hardy em 2002, indicam que a A β se originava da clivagem de uma proteína maior, chamada PPA e que mutações nos genes que a expressam poderiam causar a deposição protéica na chamada DA familiar, que é a forma hereditária da doença^{9; 10}. A PPA pode ser clivada por três diferentes secretases, que com o funcionamento alterado pelas mutações chamadas de presenilina 1 e 2, favorecem a clivagem da β - e γ -secretases e também aumentam a agregação da amiloide β para formação de fibrilas¹¹.

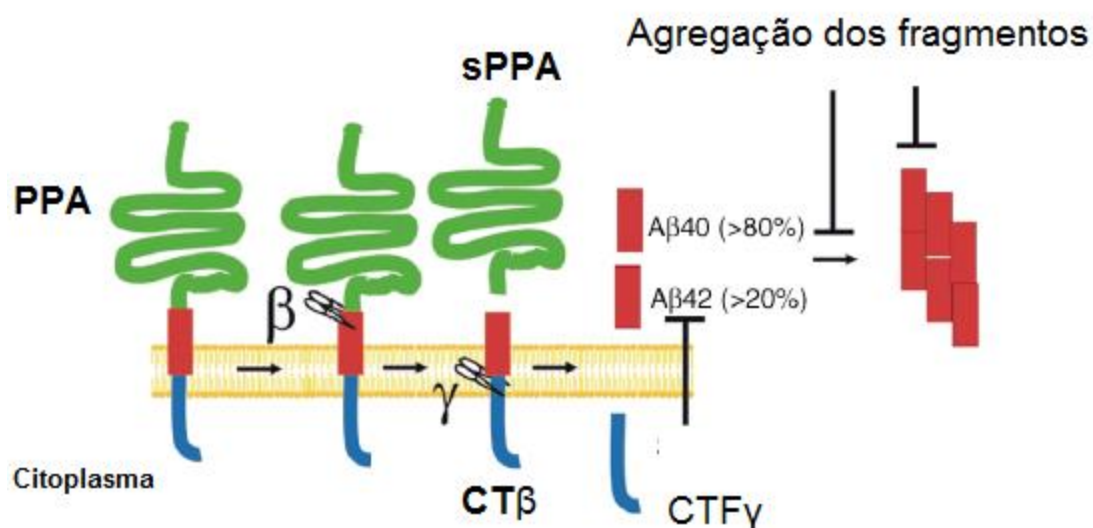


Figura 5 - Esquema da clivagem da PPA pelas enzimas β - e γ -secretases na DA familiar¹².

A A β é produzida pela clivagem sequencial da PPA, em primeiro lugar pela β -secretase, resultando na secreção de um derivado grande (sPPA) e um domínio ainda ligado à membrana (CT β), que é clivado por uma γ -secretase produzindo resíduos de A β agregáveis¹². Ainda não há consenso na literatura sobre o papel específico das amiloides de diferentes comprimentos na DA^{13; 14; 15}, entretanto evidências indicam pouca relação entre os sintomas da DA e a presença de placas e fibras de amiloide β no cérebro¹⁶. Esses resultados fazem com que a hipótese original de que as placas de A β são a causa dos sintomas da doença de Alzheimer sejam postas em dúvida e, por isso, alguns modelos alternativos foram propostos^{17 13}. Existem evidências de que, na realidade, oligômeros solúveis da A β são responsáveis pela morte de neurônios e não as placas depositadas no cérebro^{15; 18; 19}, com isso, houve uma mudança na sugestão da hipótese da A β sobre a patogênese da doença de Alzheimer. Os

eventos da hipótese da cascata de amiloide β pode ser representada pela **Figura 6**.

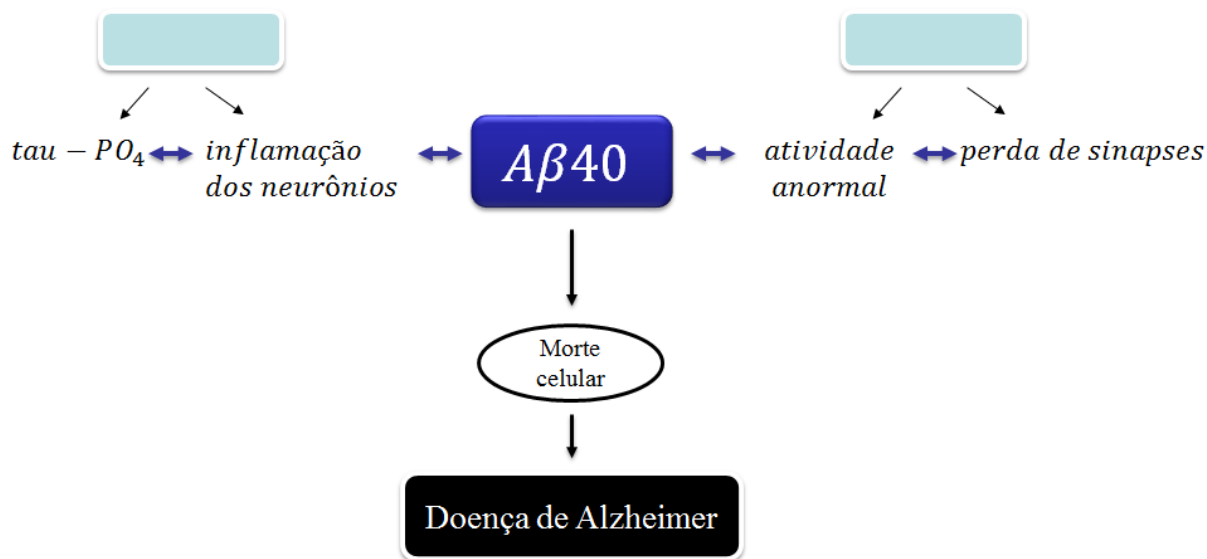


Figura 6 - Esquema da cascata de amiloide β , levando em consideração tanto a deposição quanto oligômeros solúveis de amiloide β (representados pelos retângulos verdes) como eventos primários da patogênese da doença. Adaptado de: (Pimplikar, 2009).

Uma extensa revisão da literatura feita por Pimplikar¹⁷ mostra os argumentos em favor da cascata da A β e também os contra e conclui que são outros os fatores primários para a aparição da DA, e esses resultarão no depósito de placas de proteína no cérebro; ou seja, mesmo que não seja o início da doença, a sua identificação criteriosa é fator importante para o diagnóstico da DA.

Atualmente, o diagnóstico da doença de Alzheimer se dá de maneira clínica; com testes de capacidade cognitiva para confirmar se há um estado de demência^{1; 4}. Não há um teste laboratorial que confirme a doença e a diferencie de outros casos de demência, embora existam diversos estudos que apontam biomarcadores para a doença²⁰; como a presença de oligômeros de amiloide β ^{21; 22}, um aumento da razão entre os peptídeos amiloide β -40 e amiloide β -42^{23; 24}, e a quantidade de tau fosforilada^{24; 25}, todos eles em fluido cérebro-espinhal (FCE).

Como um dos biomarcadores promissores consiste na quantificação do peptídeo amiloide β com 40 resíduos de aminoácidos (A β 40), ele foi selecionado para tentativa de desenvolvimento do imunossensor e já vem sendo estudado para aplicação em biossensores, destacando-se a transdução óptica^{26; 27} e eletroquímica^{28; 29}.

1.2. Biossensores

Biossensores são dispositivos que consistem em um elemento de reconhecimento de natureza biológica, responsável pela alta seletividade do analito, e um transdutor, que traduz a informação química em um sinal interpretável, e são classificados de acordo com o tipo de reconhecimento ou ainda com o tipo de transdução³⁰; a figura 7 consiste em uma representação esquemática de um biossensor.

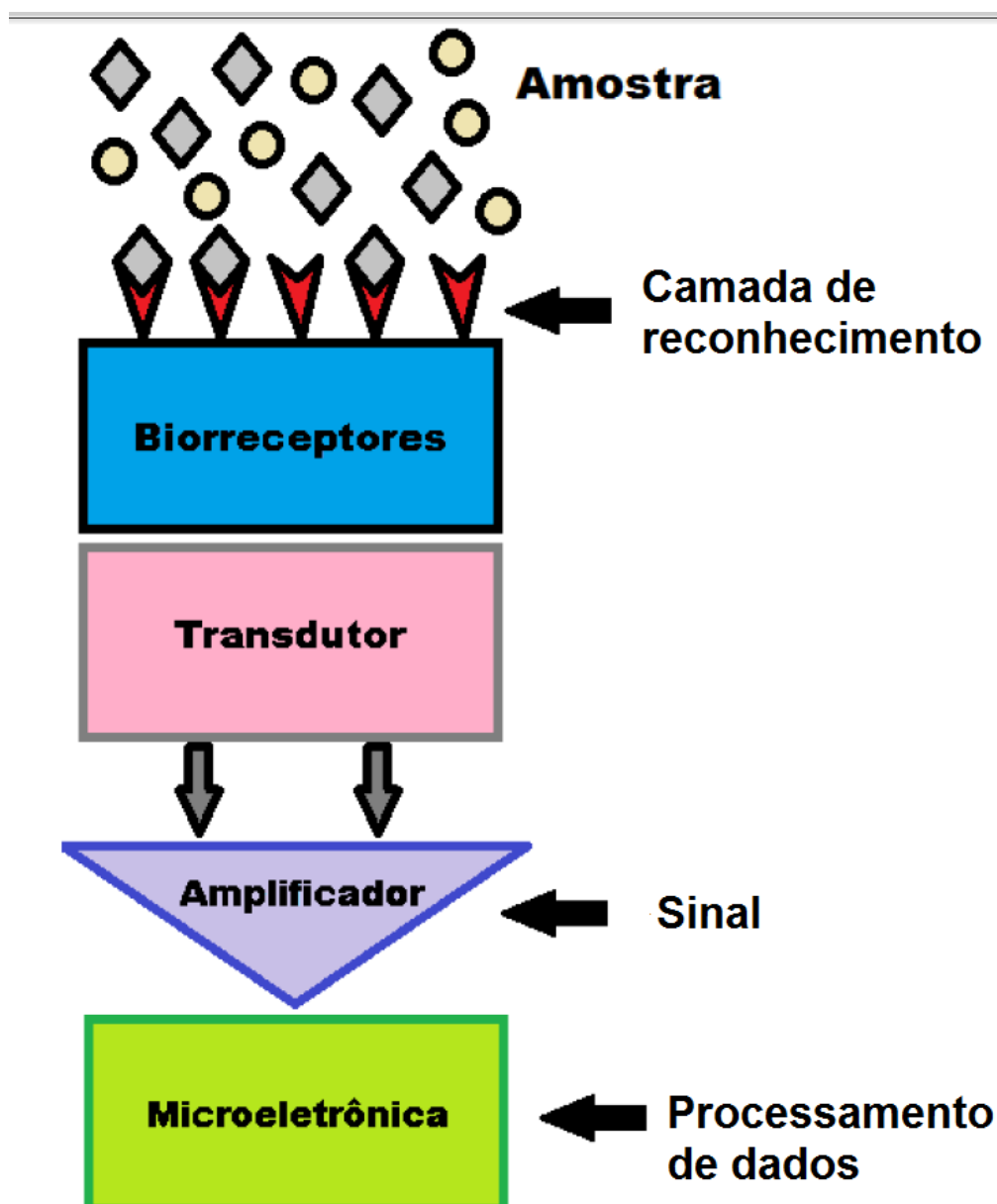


Figura 7 - Representação esquemática de um biossensor⁵¹.

Alguns dos elementos de reconhecimento explorados são: aptâmeros³¹, sacarídeos²⁸, antígenos³² e enzimas³³. Quando o reconhecimento se dá por

meio da interação entre antígeno e anticorpo o biossensor é chamado de imunossensor³⁴. Os transdutores podem também ser variados, podendo ele ser óptico²⁶, eletroquímico³⁵, entre outros. Com tamanha variação tanto de elementos de reconhecimento como transdutores, consegue-se detectar uma enorme gama de analitos, indo de detecção de patógenos e biomarcadores^{36; 37}, alergia a gatos³⁸ e também detecção de capsaicina para determinação de grau de ardência de pimentas³⁹.

1.2.1. Biossensores eletroquímicos

As vantagens em se utilizar a transdução eletroquímica em biossensores consistem na facilidade de uso, capacidade de se tornarem portáteis, simplicidade de construção e a necessidade de pequenos volumes de amostra. Eles podem ser classificados em três categorias de acordo com o método de detecção utilizado: corrente, potencial e impedância⁴⁰.

A voltametria, aplicada à esse estudo, é uma das técnicas que se baseia na leitura de corrente. Um potencial variável é aplicado no eletrodo e as mudanças na correntes são medidas.^{40;41}.

A modificação da superfície de eletrodos com elementos biológicos vem sendo amplamente utilizado para construção de biossensores e destaca-se os filmes *Layer-by-layer* (LbL) para esse propósito^{32; 42}.

1.2.2. Biossensores ópticos

A maior vantagem da detecção óptica em relação aos biossensores eletroquímicos é a facilidade de medir mais de um analito com um único sistema^{43; 44}.

Os biossensores ópticos obtém sua resposta por meio de uma mudança em uma das propriedades ópticas, como absorbância, reflectância, emissão e tempo de vida⁴⁵.

1.3. Filmes camada por camada (*Layer-by-Layer*, LbL)

É sabido que a estrutura de uma biomolécula influencia diretamente sua atividade e que, em geral, em solução essa atividade não é a melhor possível. Precisa-se, então, de um meio de imobilizar essas moléculas a fim de tornar suas

atividades melhores. De fato, a imobilização é um passo chave na construção de um biossensor, e há uma extensa literatura abrangendo este tema^{46; 47; 48}. Entre os métodos de imobilização, alguns abordados são filmes auto organizados (*Self assembled monolayers, SAMs*), filmes Langmuir-Blodgett e filmes camada por camada (*Layer by Layer, LbL*)⁴⁹.

Proposta inicialmente por Decher em 1997, a imobilização de biomoléculas por LbL pode ser considerada vantajosa por dois motivos, que são a utilização de matérias comuns de laboratório, como béqueres e pinças para automontagem dos filmes e pela deposição dessas biomoléculas ser realizada sob condições amenas e os diferentes materiais que podem ser incorporados⁵⁰. A técnica baseia-se na adsorção de sucessivas camadas de eletrólitos, alternando-se entre catiônicos e aniônicos, e a interação eletrostática entre eles faz com que o filme cresça⁴⁹. Um esquema de como são montados esses filmes está apresentado na figura 8.

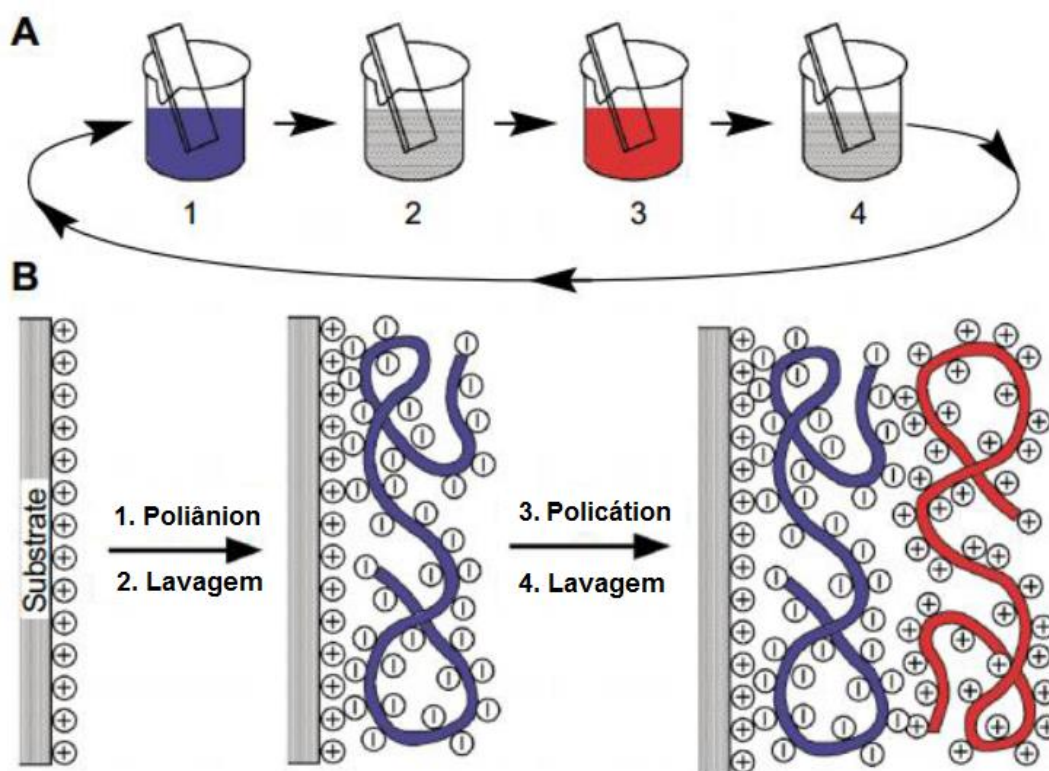


Figura 8 - Esquema de montagem dos filmes LbL⁴⁴.

De maneira geral, a construção do filme é feita com um substrato previamente lavado e tratado de forma que sua superfície se torne carregada; ele então é mergulhado em uma solução de polieletrólitos de carga oposta à de sua superfície, interações eletrostáticas serão responsáveis pela deposição do polieletrólito na superfície do substrato.

Após adição da primeira camada, há uma etapa de lavagem para retirada de material fracamente adsorvido e em seguida o substrato é mergulhado em

outro polieletrólito, dessa vez de carga oposta ao primeiro. Novamente há deposição do material por interações eletrostáticas e subsequente lavagem. Este processo pode ser repetido quantas vezes necessário.

1.4. Fibroína de seda

Uma das estratégias abordadas para a imobilização de materiais biológicos é a utilização de biopolímeros, como a quitina⁵¹, quitosana^{51; 52} e fibroína de seda (SF)⁵³. As vantagens em se utilizar esses materiais são sua biocompatibilidade, baixo custo de obtenção e baixa toxicidade⁵¹.

O casulo de *Bombyx mori* é composto de duas proteínas: a sericina, que envolve os casulos, e a fibroína. A SF é composta por dois domínios: um de cadeia leve (25kDa) e uma cadeia pesada (325 kDa) ligadas entre si por uma ponte dissulfeto. A cadeia pesada da SF é dividida ainda em duas partes: uma cristalina e uma amorfa^{54; 55}.

A fibroína é encontrada em 3 estruturas polimórficas diferentes, chamadas seda I, II e III. A estrutura seda I é encontrada em soluções e pode ser facilmente convertida para conformações de folhas- β que definem a seda II; a seda III é encontrada em interfaces ar-água⁵⁶. Em filmes *LbL* acredita-se que é observada a seda II, devido à grande incidência de folhas- β observadas por dicroísmo circular e fluorescência dos aminoácidos triptofano³².

A parte cristalina da SF são longas repetições de glicina e outro aminoácido (Gly-X) e é responsável pelas folhas β anti-paralelas e a parte amorfa são segmentos não repetidos na estrutura da proteína, responsáveis pelas voltas⁵⁷. A parte cristalina da SF é formada majoritariamente pelos resíduos alanina e glicina e em menor número por serinas e tirosinas^{54; 55}. Sua estrutura tridimensional está apresentada na figura 9.

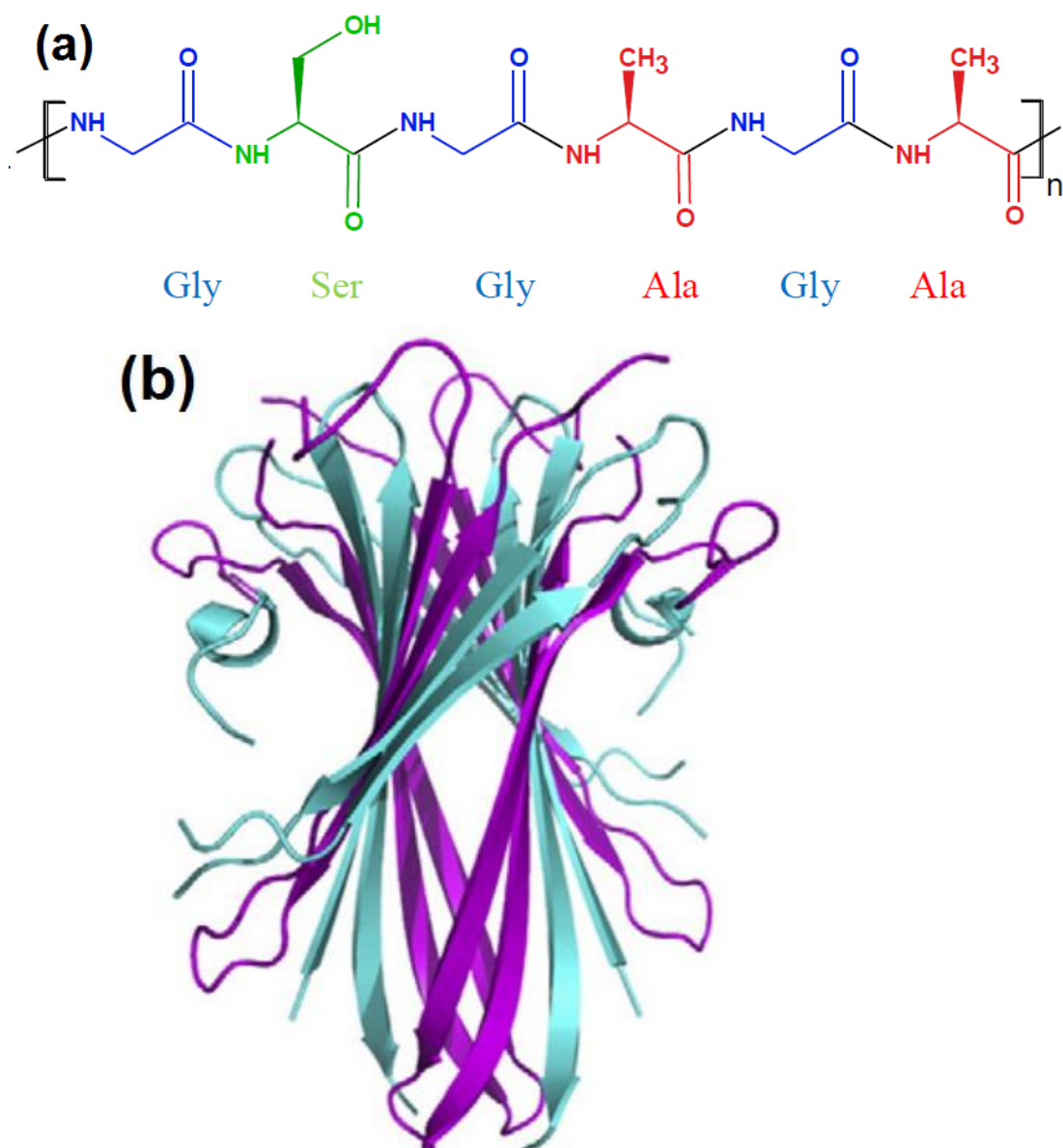


Figura 9 - (a) Sequência de aminoácidos da SF⁵⁸ e (b) estrutura tridimensional da SF⁵⁹.

A SF extraída do casulo do bicho-da-seda *Bombyx mori* possui diversos estudos e aplicações em biomateriais⁵⁴ e já foi utilizada anteriormente por Moraes e colaboradores em filmes LbL para induzir estruturação em peptídeo e ser utilizada na construção de imunossensores³².

1.5. Nanopartículas de lantanídeos

Nanopartículas (NPs) são amplamente utilizadas na área de sensoriamento devido às suas propriedades ópticas e eletroquímicas únicas⁶⁰. Em sensores eletroquímicos elas são utilizadas como catalisadores de algumas

reações e funcionar como mediador de transferência de elétrons entre a biomolécula e o eletrodo⁶¹. Nanopartículas de ouro já foram utilizadas como imobilizador de A β 40 e outros fragmentos²⁸. Suas propriedades ópticas são utilizadas para ensaios colorimétricos⁶², imageamento⁶³, entre outros.

Em imunossensores, nanopartículas de ouro e quantum dots são utilizados para detecção eletroquímica por voltametria obtendo alta sensibilidade e também para detecção colorimétrica, por fluorescência e por ressonância de plamon de superfície⁶⁴.

Além de nanopartículas metálicas, nanopartículas contendo íons terras-raras também estão sendo estudados para fins de sensoriamento.

Terras raras são os elementos de números atômicos 57 até 71 (La à Lu) e também 21 e 39 (Sc e Y) que possuem características físicas e químicas semelhantes⁶⁵. No que diz respeito à suas propriedades ópticas, geralmente possuem fraca absorção devido à transições proibidas (transições *f-f*)⁶⁶. Sua distribuição eletrônica termina em 4fⁿ e esses elétrons da camada de valência estão blindados pelos elétrons que ocupam níveis mais externos (5s e 5p). Esse isolamento dos elétrons de valência garante que a influência do campo cristalino em seus compostos seja pequena, fazendo com que espectros eletrônicos sejam relativamente independentes do ambiente, com apenas pequenas distorções⁶⁷.

Devido à baixa absorção e luminescência por transições proibidas, é necessário utilizar o chamado efeito antena. Utiliza-se um cromóforo como ligante que absorverá com maior coeficiente de absorção e irá transferir a energia absorvida para o íon terra rara emissor⁶⁷. Para ocorrer essa transferência, é necessário que os níveis excitados tanto do ligante quanto do emissor estejam próximos entre si (condição de ressonância)⁶⁶. A figura 10 representa um esquema do efeito antena para emissão de um íon lantanídeo (Ln³⁺).

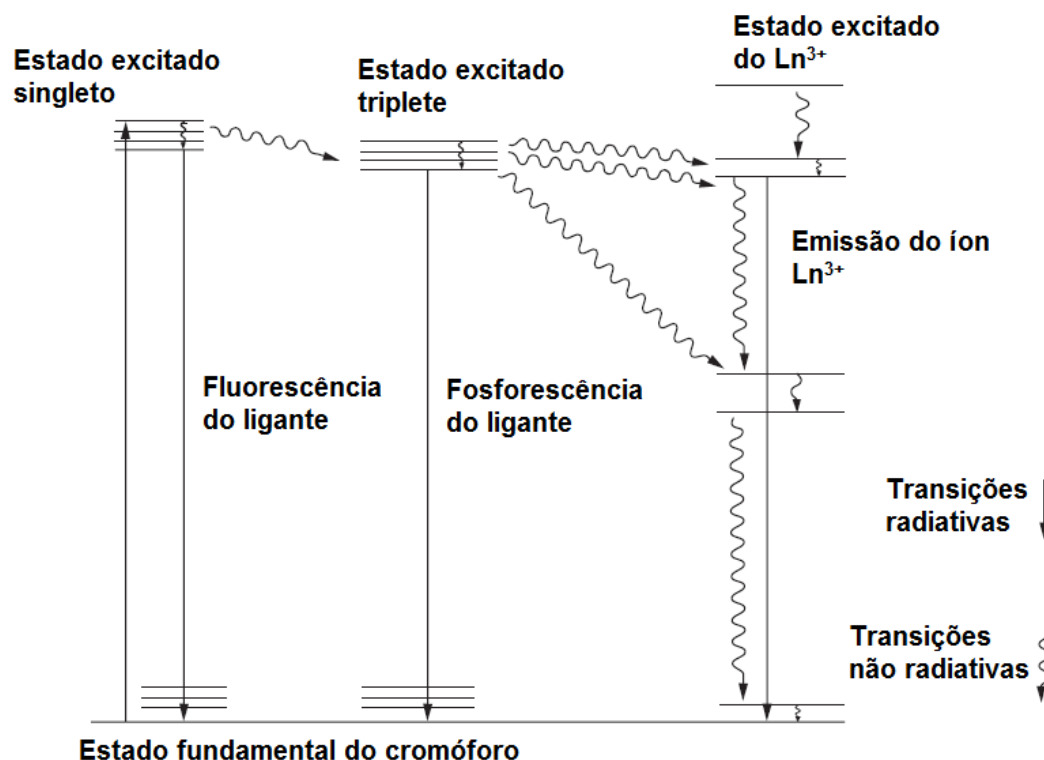


Figura 10 - Representação esquemática do efeito antes até a emissão do íon Ln^{3+} ⁶⁷.

Pela baixa influência do campo cristalino, os íons terra rara possuem espectros de emissão característicos é quase independente do ambiente em que se encontram e, por serem transições proibidas, possuem alto tempo de vida. Fluoróforos orgânicos podem sofrer interferência de outras moléculas orgânicas presentes em amostras complexas; utilizando-se terras raras e espectroscopia resolvida no tempo isso é facilmente contornado⁶⁸; a emissão de moléculas orgânicas se dá de forma rápida, enquanto o tempo de vida de emissão dos íons lantanídeos é maior.

Ye e colaboradores⁶⁹ descrevem uma nanopartícula contendo complexo de európio que foi utilizada para detecção de hepatite B altamente sensível, com limite de detecção da ordem de pg.mL^{-1} e mais recentemente a mesma abordagem proposta para este trabalho foi utilizada para o vírus da hepatite C⁵⁸.

Os aminoácidos aromáticos, principalmente a tirosina e o triptofano, possuem uma absorção na região de 280 nm (**figura 11**)⁷⁰, assim como as NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ⁷¹, essa condição de ressonância fez com que o sistema de SF com peptídeos juntamente com essas NPs despertasse interesse para a aplicação em imunossensores.

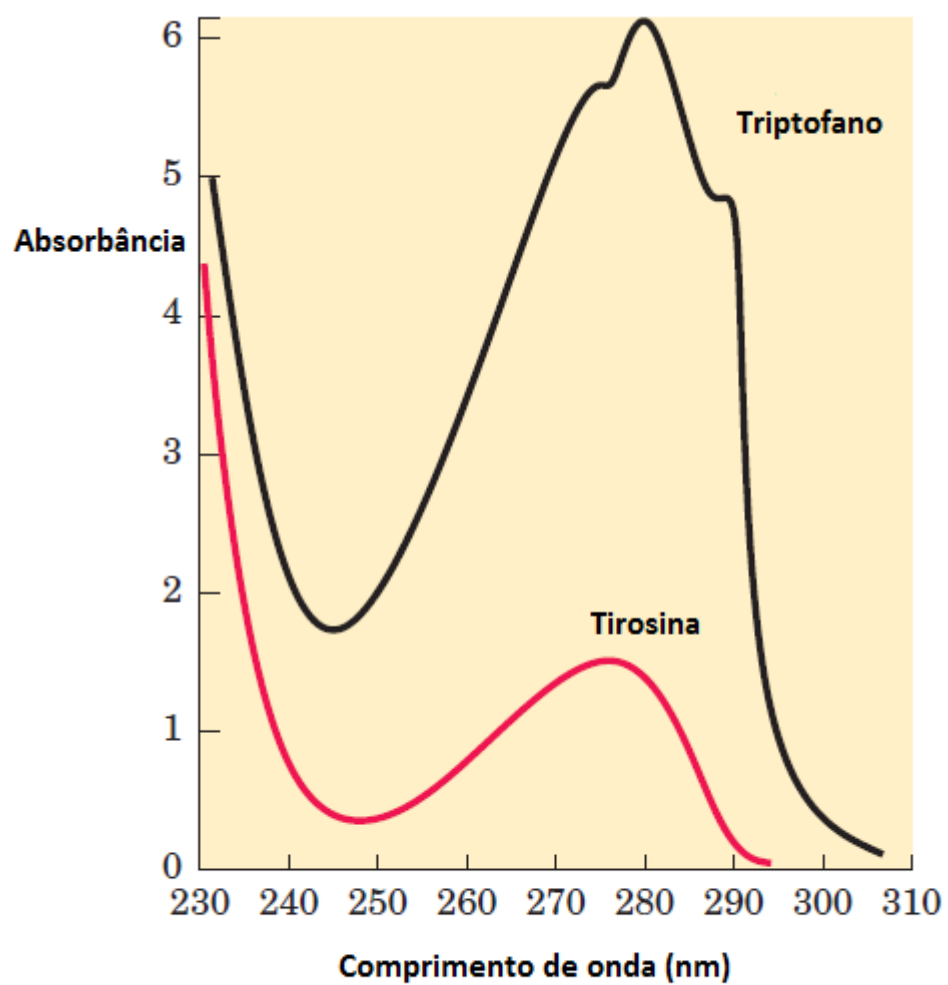


Figura 11 - Espectro de absorção dos aminoácidos triptofano (W) e tirosina (Y)⁷⁰.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi construir um imunossensor para anticorpos anti-A β 40 com transdução tanto eletroquímica quanto óptica. Para isso, a proteína A β 40 seria imobilizada juntamente com a SF pela técnica LbL. Para a transdução óptica seriam adicionadas nanopartículas de YVO $_4$:Eu $^{3+}$ ao filme.

Para que esse objetivo fosse alcançado, foram traçados objetivos intermediários, que consistiam em:

- 1) Extração da SF a partir de casulos de *Bombyx mori*
- 2) Preparação das nanopartículas de YVO $_4$:Eu $^{3+}$
- 3) Acompanhar o crescimento dos filmes SF + A β 40 e SF + A β 40 + nanopartículas de YVO $_4$:Eu $^{3+}$;
- 4) Verificar se há indução conformacional nos componentes do filme por Dicroísmo Circular;
- 5) Verificar a detecção da solução de anticorpos anti-A β 40 por Voltametria Cíclica
- 6) Verificar a detecção da solução de anticorpos anti-A β 40 por Espectroscopia de Fluorescência

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e métodos

Os peptídeos A β 40 (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV) e A β 40 modificado (DAEFRHDSGWEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV) foram adquiridos em PhtdPeptides Co.,Ltda (Zhengzhou, China), com 90% de pureza confirmada por HPLC e espectroscopia de massa, segundo informações do fabricante. Uma solução estoque de concentração 10 mg.mL⁻¹ em DMSO foi feita para evitar agregação das proteínas⁷² e posteriormente diluída em água purificada em sistema MilliQ na concentração 0,5 mg.mL⁻¹ para utilização.

O anticorpo monoclonal anti-A β 40 humano foi adquirido na Santa Cruz Biotechnology Inc. em solução 200 μ g.mL⁻¹ e foi diluído em tampão fosfato salino (PBS) nas concentrações utilizadas.

A fibroína de seda foi extraída de casulos de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) fornecido pela BRATAC, SA (Brasil) seguindo protocolo descrito por Rockwood e colaboradores⁷³, em que 10g de casulos são fervidos por 30 minutos em 2L de solução Na₂CO₃ 0,02 mol.L⁻¹ para remover a sericina. Obtém-se fibras de fibroína que, a cada 10g, foram dissolvidos em 100 mL solução CaCl₂:CH₃CH₂OH:H₂O (1:2:8) à quente (60-70°C). Em seguida, essa solução foi dialisada por 48h em água MilliQ e centrifugada por 30 minutos à 20000 rpm. O sobrenadante foi mantido em geladeira e a concentração de SF é de aproximadamente 3% (m/m).

As nanopartículas de YVO₄:Eu³⁺ foram sintetizadas em duas etapas, seguindo a literatura^{74; 75}. Na primeira etapa, Na₂CO₃ e V₂O₅ em estado sólido foram misturados e levados ao forno à 700°C com taxa de aquecimento de 14°C/minuto e mantido na temperatura máxima por 4h, em seguida foi resfriado à 200°C e deixado nessa temperatura por mais 10h, resultando em Na₃VO₄ em estado sólido. A segunda etapa consistiu em misturar-se sob agitação 1 mmol de Y(NO₃)₃ e 1 mmol de EuCl₃.6H₂O com 0,75 mmol de citrato de sódio, formando-se um precipitado branco (citrato de lantanídeo) que foi dissolvido adicionando-se 0,75 mmol de Na₃VO₄ que foi preparado anteriormente. Essa mistura foi aquecida à 60°C por 30 minutos, obtendo-se a solução de nanopartículas de YVO₄:Eu³⁺ estabilizadas por citrato.

Os eletrodos de carbono impresso foram adquiridos da DropSens (Oviedo, Espanha), o eletrodo de trabalho possuía 4mm de diâmetro, com contra eletrodo de carbono e eletrodo referência de prata.

3.2. Preparação de filmes em substrato de quartzo

Os substratos de quartzo foram previamente lavados em solução de KOH em etanol (3% m/m) e deixados em banho de ultrassom por 30 minutos; após esse tempo foram enxaguados com água MilliQ abundante e guardados. Esse processo foi para a lavagem do substrato.

Para depositar o filme, uma gota de solução de SF 0,1% m/m foi colocada no substrato e deixada por 30 minutos, e depois foi lavado com água MilliQ e seco em fluxo de N₂ para retirada de moléculas fracamente adsorvidas. Em seguida, uma gota de solução de A β 40 0,5 mg.mL⁻¹ foi colocada sob o substrato e esperou-se mais 30 minutos, depois lavado e seco. Esse procedimento foi repetido formando-se um filme de SF e A β 40 de camadas alternadas.

Para a detecção óptica uma dispersão de NPs de YVO₄:Eu³⁺ foi misturada à solução de A β 40. A concentração de peptídeo após a mistura foi 0,5 mg.mL⁻¹.

O crescimento do filme também foi feito colocando-se uma gota de SF 0,1% m/m no substrato por 30 minutos, seguido de lavagem e secagem. Após isso, a mistura de A β 40 com as NPs foi colocada no substrato por mais 30 minutos.

A proteína A β 40 modificada com um resíduo triptofano foi utilizada na literatura para observar o comportamento dela em lipossomos⁷⁶. Como o triptofano possui transferência de energia para os íons terras-rara, foi utilizada para verificar se a inclusão desse aminoácido ajudaria na emissão do íon Eu³⁺ ao haver reconhecimento antígeno-anticorpo.

3.3. Preparação de filmes em eletrodos de carbono impresso

Os filmes depositados em eletrodo de carbono impresso seguiram o método descrito anteriormente, com uma gota dos componentes do filme sendo depositadas apenas no eletrodo de trabalho. A secagem foi feita ao ar, ao invés de ser usado N₂.

3.4. Verificação do recobrimento do eletrodo

A verificação do recobrimento do eletrodo pela SF, utilizou-se o par redox ferrocianeto e ferricianeto de potássio. Deixou-se uma camada de SF ser adsorvida variando-se o tempo. Registrou-se o voltamograma do par redox de cada um desses eletrodos e verificou-se a diferença entre eles.

3.5. Técnicas experimentais

3.5.1. Espectroscopia UV-Vis

O crescimento dos filmes foi acompanhado por espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), as medidas foram feitas em um espectrofotômetro Cary® 50 de Varian, Inc. As varreduras foram feitas de 190nm até 350nm com fendas espectrais de 1nm.

3.5.2. Espectroscopia de fluorescência

As nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ foram utilizadas para detecção óptica da solução de anticorpos a partir da luminescência do íon európio.

Foi utilizado um Fluorímetro Horiba Jobin Yvon (Spex Fluorolog-3), com uma lâmpada de Xenônio 400 W. As condições dos espectros de excitação foram o comprimento de onda de emissão 619 nm, tempo de integração 0,1 s, fendas espectrais 5 nm. Para os espectros de emissão o comprimento de onda de excitação foi 280 nm e fendas espectrais de 5 nm.

3.5.3. Dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) fornece informações acerca da conformação de biomoléculas que não é diretamente obtido com outras técnicas, como fluorescência⁷⁷. Ela é baseada na propriedade que centros quirais possuem de absorver com intensidades diferentes a luz circularmente polarizada para a direita ou para a esquerda⁷⁸.

As estruturas secundárias de proteínas (α -hélice, folhas β e randômica) possuem um espectro de CD característico^{77; 78; 79}, por isso é possível determinar a conformação de proteínas baseado nesses espectros.

Os espectros de CD foram obtidos em um Espectrômetro de Dicroísmo Circular J-815 (Jasco Inc., Tóquio, Japão), com tempo de resposta 2s, largura de banda 5,00nm, data pitch 0,2nm e velocidade de varredura 50nm.min⁻¹. Para

as soluções foi utilizada cubeta de caminho óptico 0,1mm. Os espectros são resultantes de 3 acumulações.

3.5.4. Voltametria cíclica

A voltametria é a técnica eletroquímica em que se utiliza curvas de corrente *versus* potencial, chamadas voltamogramas, para obter informações sobre o analito. Nela, o eletrodo de trabalho assume o valor de potencial aplicado ao sistema e registra-se a corrente obtida; o potencial é variado em forma triangular, ou seja, aumenta até um certo valor e volta ao inicial⁸⁰.

Em voltametria cíclica, o potencial é varrido em forma triangular, ou seja, escolhe-se dois potenciais que serão os extremos e a varredura se dá indo e voltando desses potenciais^{41; 80}.

Para os experimentos de voltametria cíclica foi utilizado um Bipotesiostato/galvanostato μ Stat 400 com software da DropView DropSens (Oviedo, Espanha). O intervalo de potencial foi de -0,6V à 0,6V, com velocidade de varredura 50 mV.s⁻¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1. Crescimento do filme

A imobilização da A β 40 sobre a fibroína foi acompanhada a cada camada depositada por espectroscopia de UV-vis e voltametria cíclica. Os espectros de absorção na região do ultra-violeta e visível apresentam uma banda pouco intensa na região de 275 e 280 nm (**Figura 12**), referente aos resíduos de aminoácidos tirosina e triptofano, respectivamente, presentes na SF e uma pequena contribuição da fenilalanina presente no A β 40. Outra banda mais intensa pode ser observada em 230 nm, que deve ser atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ das ligações peptídicas de ambos, SF e A β 40^{81; 82}. O aumento de intensidade da absorção em 230 nm em função do número das camadas está representado na **inserção da figura 12**. Nota-se uma tendência ao aumento da intensidade com o aumento do número de camadas, ou seja, há mais material depositado à cada camada.

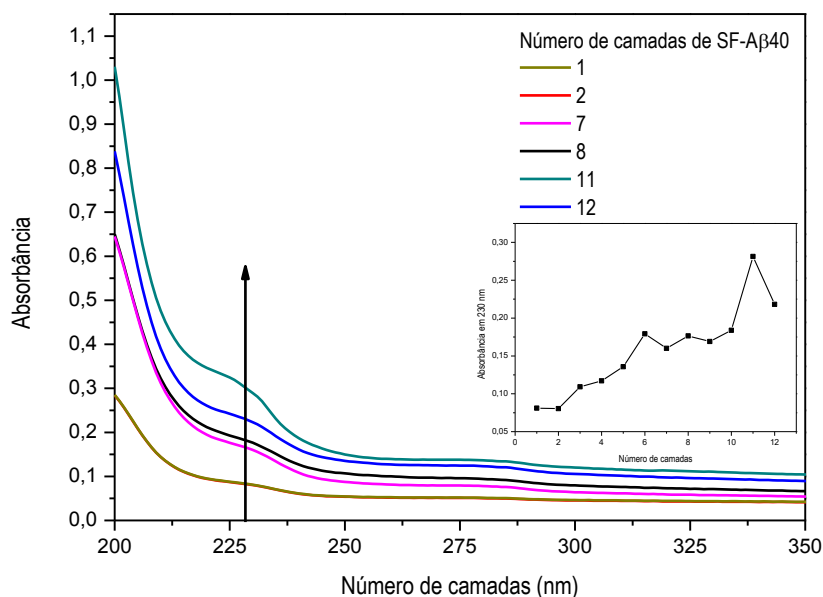


Figura 12 - Espectros de absorção na região UV-Vis da adsorção de camadas de SF e de A β 40. Inserção: absorção em 230 nm versus número de camadas adsorvidas.

A técnica de voltametria cíclica também foi utilizada para caracterização do crescimento dos filmes puros de SF e dos filmes de SF-A β 40. Os voltamogramas obtidos para os filmes automontados contendo somente SF e SF associada com a A β 40, estão apresentados nas **figuras 13 e 14**.

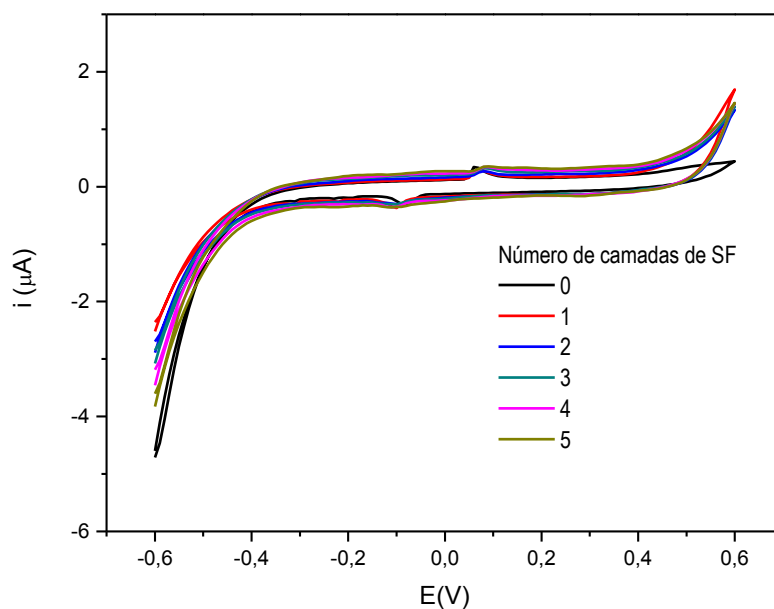


Figura 13 - Voltamogramas cíclicos da adsorção de camadas SF.

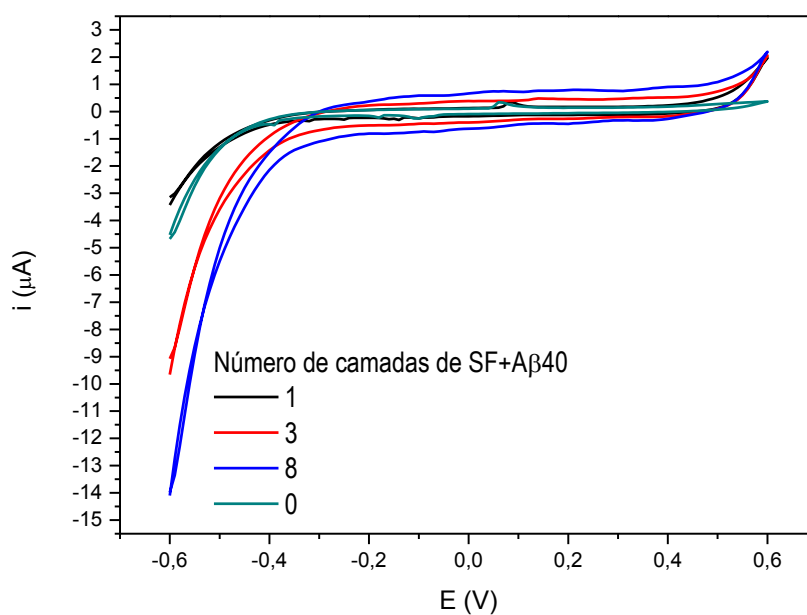


Figura 14 - Voltamogramas cíclicos da adsorção de camadas SF e de A β 40.

A partir desses resultados, foram construídas curvas da área dos voltamogramas *versus* o número de camadas depositadas. A **Figura 15** mostra que a área dos voltamogramas do sistema contendo apenas SF é menor quando comparada com as áreas dos voltamogramas das camadas contendo SF e A β 40, indicando um aumento da densidade eletrônica no filme contendo SF e A β 40. Nessa figura há a tendência da contínua adsorção de material no eletrodo para os dois sistemas, nota-se também que a inclinação do sistema com o peptídeo é mais acentuada, indicando que há mais depósito de material quando há a presença de ambas as biomoléculas, resultado de suas cargas serem opostas. Esses resultados contribuem com os resultados de UV-vis confirmando a adsorção do peptídeo sobre a SF.

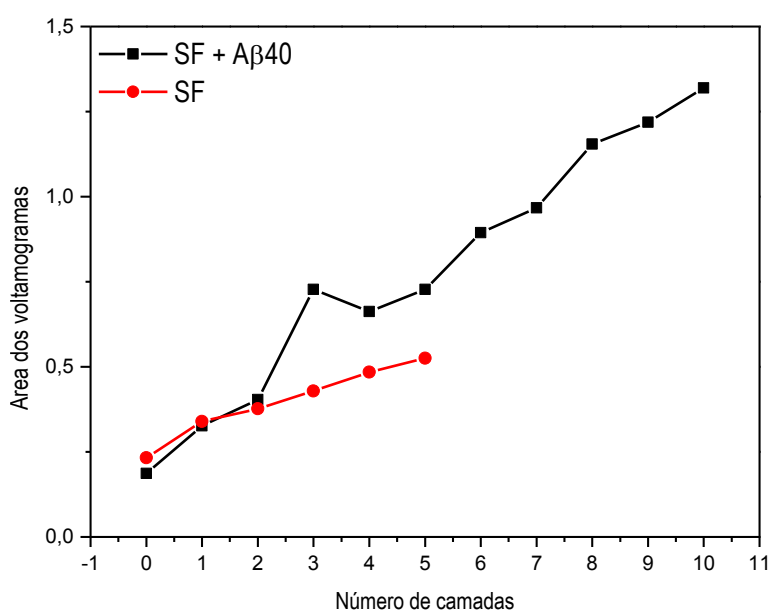
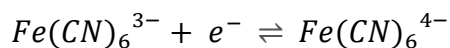


Figura 15 - Área dos voltamogramas versus número de camadas para os sistemas contendo apenas SF e contendo SF + A β 40.

4.2. Recobrimento do eletrodo

Os voltamogramas obtidos com diferentes tempos de adsorção da fibroína na superfície dos eletrodos estão apresentados na **figura 16**. O primeiro voltamograma foi varrido em um eletrodo sem a adsorção de fibroína, e pode-se observar os picos anódico e catódico em 0,22V e 0,08V respectivamente. Estes picos são característicos da oxidação e redução dos íons ferri/ferrocianato, que seguem a seguinte equação:



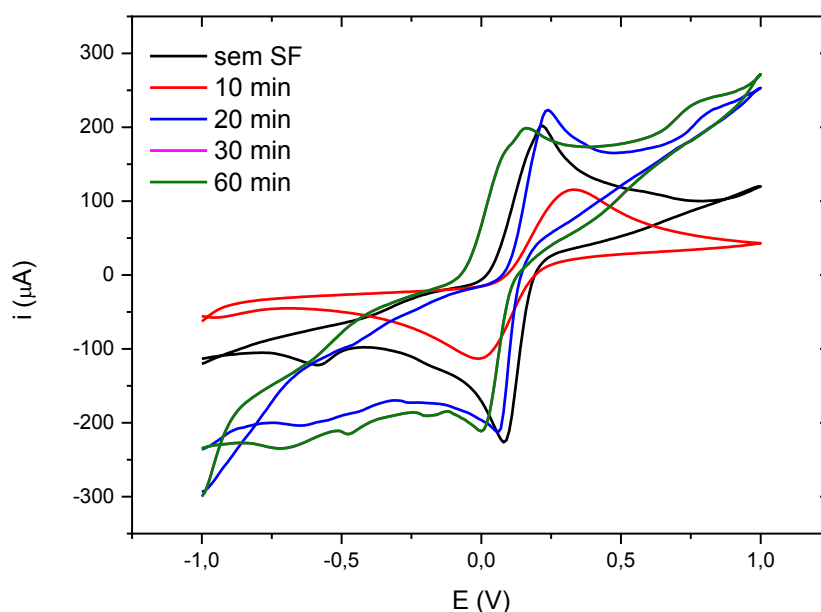


Figura 16 - Voltamogramas do par redox ferri/ferrocianato de potássio.

Nos eletrodos que possuíam a fibroína adsorvida em sua superfície, houve uma alteração no perfil do voltamograma. Com 10 minutos de adsorção, os picos diminuíram a corrente lida nos picos de oxidação e redução, indicando que a superfície do eletrodo estava sendo ocupada pela fibroína.

Quando se utilizou um tempo maior de adsorção, a distorção foi ainda maior, porém a corrente lida nos picos foi maior, que pode ser justificado por uma influência da SF como transportadora de elétrons para a superfície do eletrodo por meio de seus aminoácidos que são carregados, entretanto, por terem distorcido ainda mais os voltamogramas, considerou-se que houve mais adsorção de SF.

Nos tempos de 30 minutos e 60 minutos os voltamogramas foram exatamente coincidentes, por isso o tempo de 30 minutos foi considerado como sendo equivalente à uma cobertura total do eletrodo.

4.3. Estruturação das proteínas

Para definir se a inclusão da A β 40 nos filmes possui algum efeito na estruturação do peptídeo, foi feito um estudo com seus espectros de CD.

A solução aquosa do peptídeo em questão possui um espectro característico de α -hélice^{78; 79} (**figura 17**), com dois mínimos distintos, um em 226 nm e outro em 190 nm e um máximo já próximo à 190 nm. De fato, estudos

de RMN⁸ evidenciam que há contribuição de α -hélice na estrutura da A β 40 em solução aquosa.

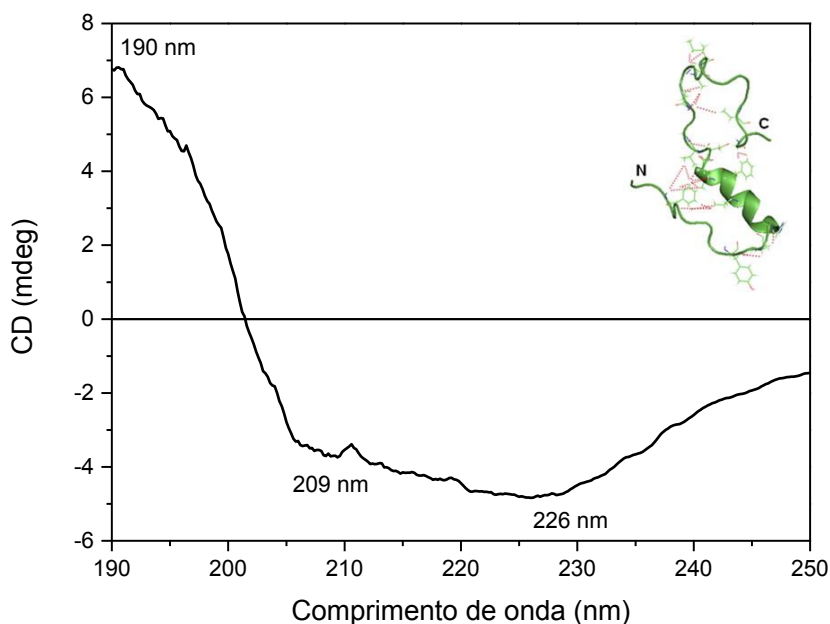


Figura 17 - Espectro de CD da solução aquosa de A β 40.

Comparando-se os filmes nanoestruturados de A β 40 juntamente com SF com filme contendo apenas a SF (**figura 18**), há uma grande mudança na intensidade do sinal, indicando que o espectro conta com a contribuição dos dois componentes do filme. O filme *LbL* de SF+A β 40 possui um mínimo em 218 nm, característico de estrutura de folhas- β ^{74;75}. Portanto, conclui-se que tanto a SF quanto o peptídeo A β 40 estão estruturados na forma de folhas- β .

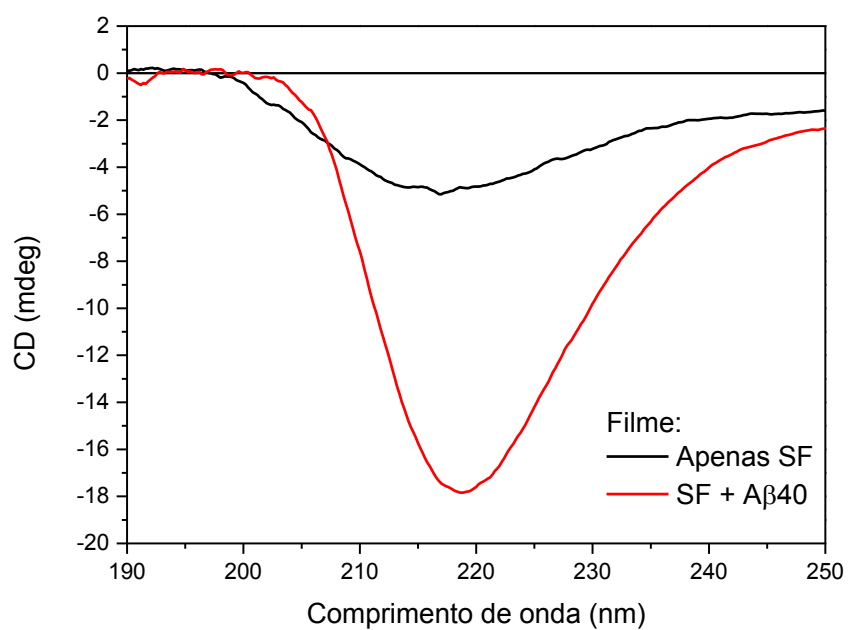


Figura 18 - Espectro de CD do filme SF + A β 40 com 5 bicamadas.

4.4. Detecção eletroquímica

Na detecção de solução de anticorpos anti A β -40 em eletrodos com uma bicamada foram obtidos os voltamogramas apresentados na **figura 19**.

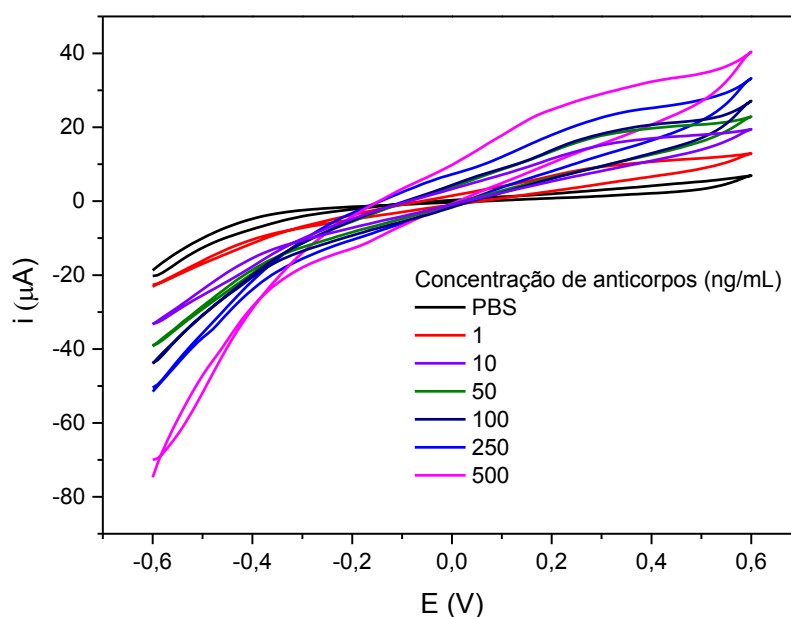


Figura 19 - Voltamogramas obtidos para a detecção eletroquímica de solução de anticorpos anti-A β 40 em eletrodos com uma bicamada.

Há uma tendência de aumento da corrente obtida à medida que se aumenta a concentração da solução de anticorpos em toda a região de varredura em potenciais positivos, pois a interação entre antígeno e anticorpo pode fazer com que haja maior transporte de cargas para a superfície do eletrodo por intermédio dos aminoácidos carregados que possivelmente estão presentes nos anticorpos.

Para eliminar os possíveis efeitos que a SF pode ter na ligação entre o antígeno e anticorpo, foi feito o mesmo procedimento para um eletrodo contendo apenas a SF, cujos voltamogramas estão na **figura 20**.

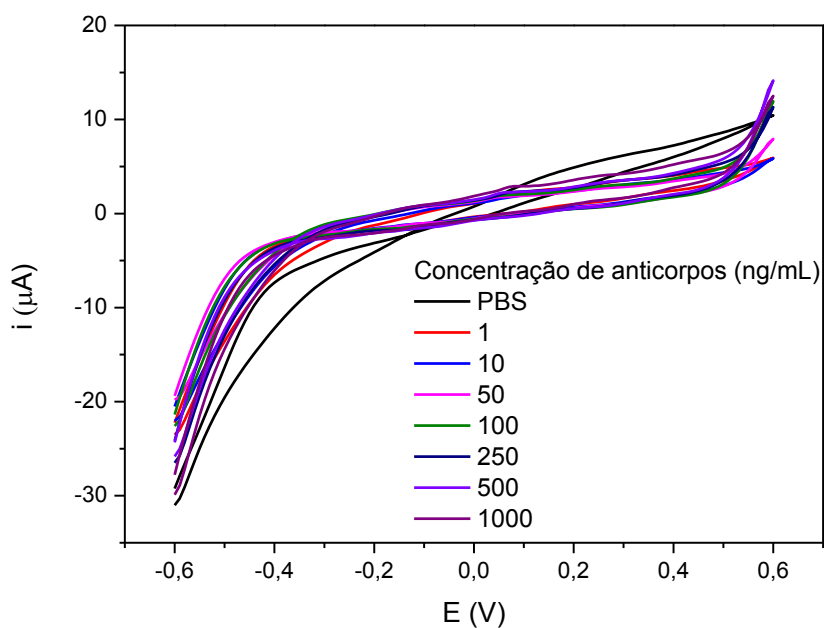


Figura 20 - Voltamogramas obtidos para um eletrodo contendo apenas SF para a detecção do anticorpo anti-A β 40.

Não é observado um aumento da corrente obtida nos voltamogramas em função da concentração de anticorpos, pois não há interação entre eles e a SF.

Comparando-se as respostas dos dois eletrodos com a concentração da solução, fica ainda mais clara a diferença do aumento da corrente. Não há interações não específicas entre a SF e os anticorpos anti-A β , mas na presença do peptídeo ocorre um aumento significativo da corrente (**figura 21**).

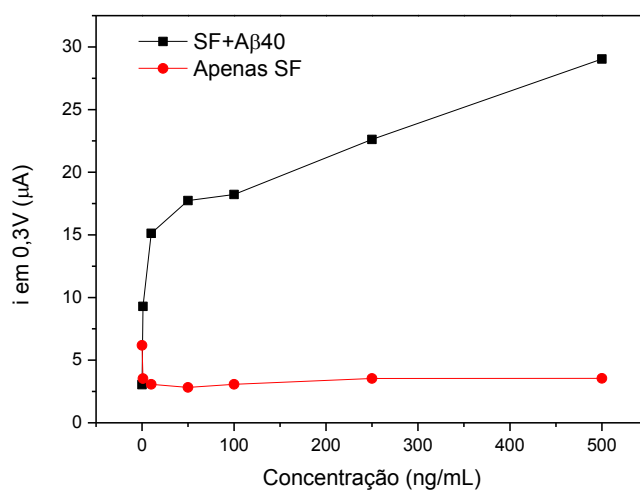


Figura 21 - Respostas dos eletrodos com filme apenas de SF e contendo os dois componentes em função da concentração de anticorpos.

O mesmo procedimento foi repetido também para filmes que continham 3 bicamadas, ou seja, 3 camadas de SF e 3 camadas de A β alternadas. Como mostrado na **figura 22**, os voltamogramas não tiveram a mesma diferença apresentada no experimento com apenas 1 bicamada; nesse caso, a corrente lida teve uma pequena diminuição.

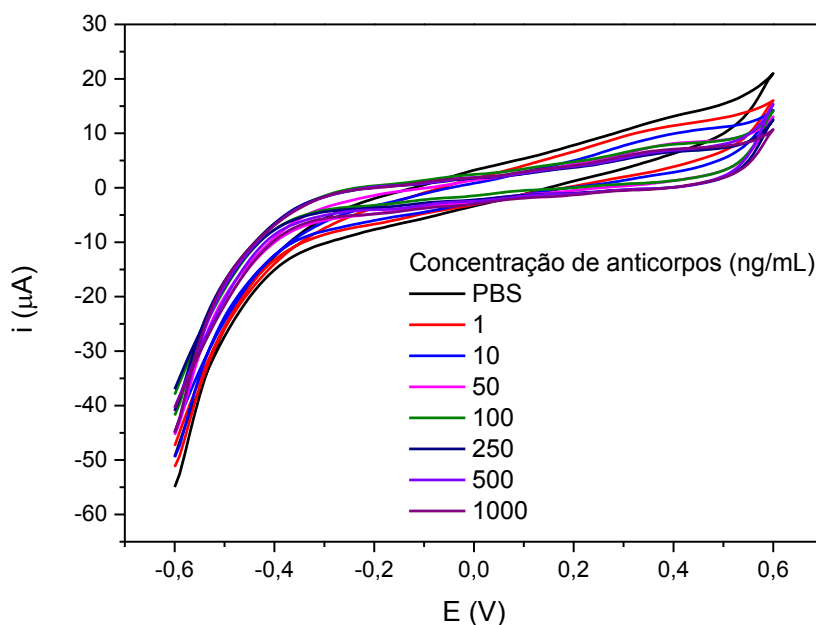


Figura 22 - Voltamogramas obtidos para a detecção de solução de anticorpos anti-A β 40 em eletrodo contendo 3 camadas de SF e 3 camadas de A β 40.

Não há um claro aumento da corrente obtida em função da concentração como foi obtido para o eletrodo contendo uma bicamada, isso pode ser atribuído ao bloqueio pela SF de alguns possíveis sítios de ligação entre A β 40 e anticorpo no crescimento do filme.

Entretanto, ainda se vê necessária a comparação com o sistema contendo apenas SF, apresentado na **figura 23**. Nesses voltamogramas é possível observar que o eletrodo teve uma resposta, podendo ser atribuída a uma interação entre SF e os anticorpos.

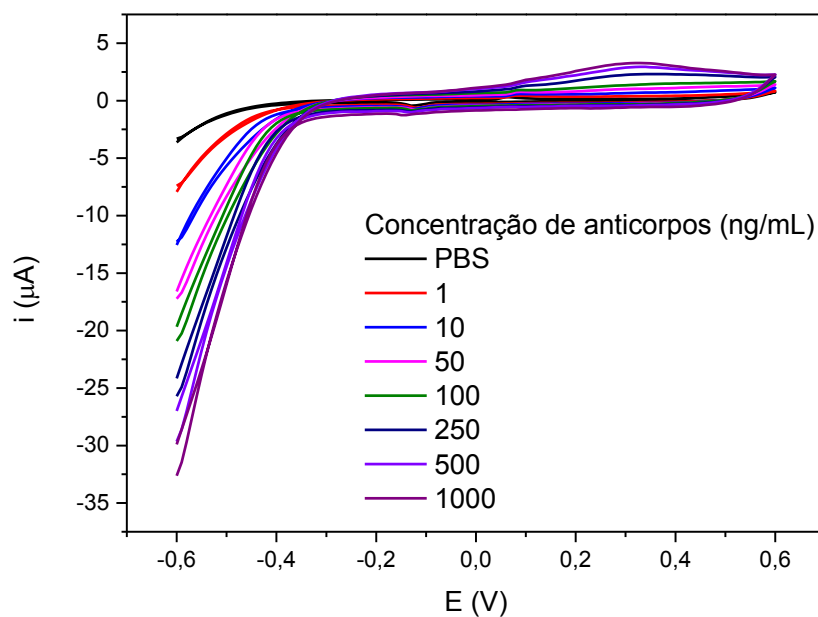


Figura 23 - Voltamogramas obtidos para a detecção de solução de anticorpos anti-A β 40 em eletrodo contendo 3 camadas de SF.

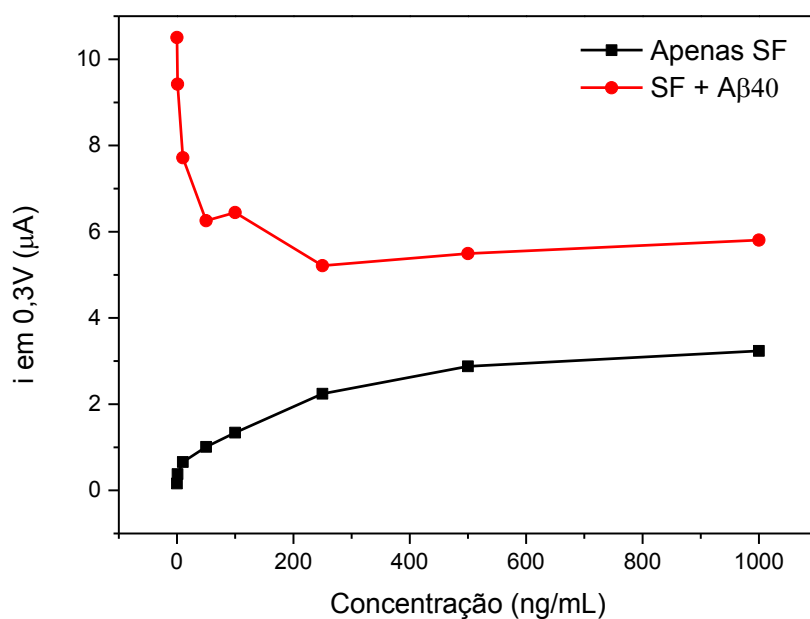


Figura 24 - Comparação entre a resposta do eletrodo contendo apenas SF e o eletrodo contendo o antígeno para 3 camadas.

Na **figura 24** compara-se a resposta dos eletrodos com 3 bicamadas (SF + A β 40) e contendo apenas SF. Nota-se que as correntes obtidas para o filme

contendo o antígeno são maiores, entretanto diminuem em função da concentração adicionada.

Como teste final de eletrodos, foi utilizado um eletrodo contendo 5 bicamadas, sendo 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40. Na **figura 25** estão os voltamogramas obtidos, e neles é possível observar um pequeno aumento de corrente na região de 0,3V, porém é um aumento menos pronunciado do que na **figura 19**.

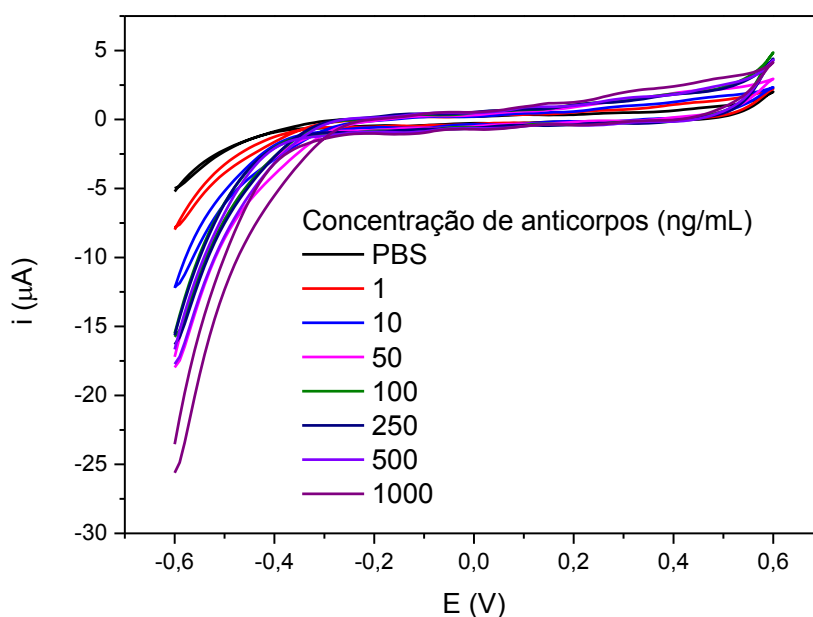


Figura 25 - Voltamogramas obtidos para um eletrodo contendo apenas SF para a detecção do anticorpo anti-A β 40 em eletrodo contendo 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40.

Novamente a resposta é menos pronunciada com o aumento de camadas depositadas, assim como observado para o eletrodo de 3 bicamadas. Isso corrobora a conclusão anterior de que há maior dificuldade no transporte de cargas até a superfície do eletrodo.

O formato dos voltamogramas das **figuras 22 e 25** é muito semelhante, e comparando-se as respostas dos eletrodos da **figura 24** com a **figura 27**, vê-se um perfil similar, principalmente na faixa inicial analisada, o que impede a diferenciação entre eles.

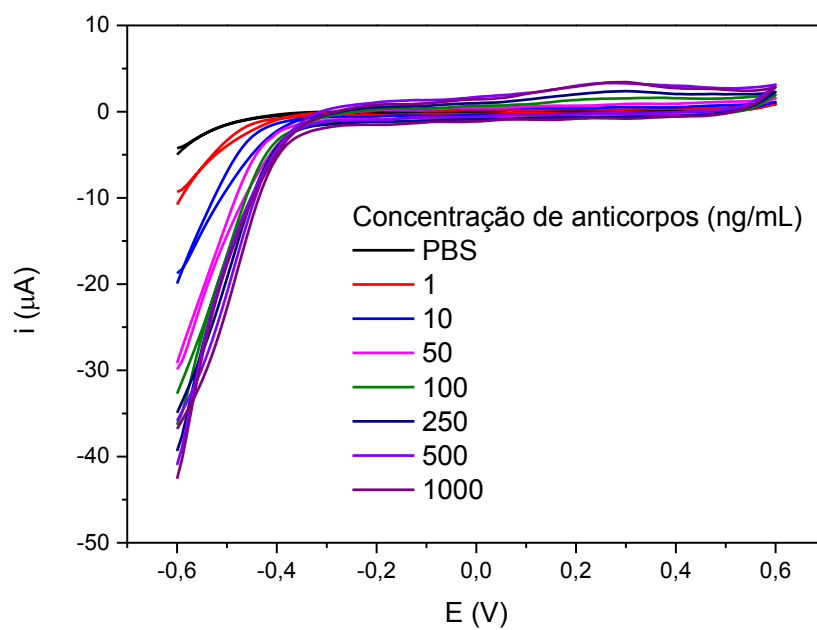


Figura 26 - Voltamogramas obtidos para um eletrodo contendo apenas SF para a detecção do anticorpo antiA β -40 em eletrodo de 5 camadas.

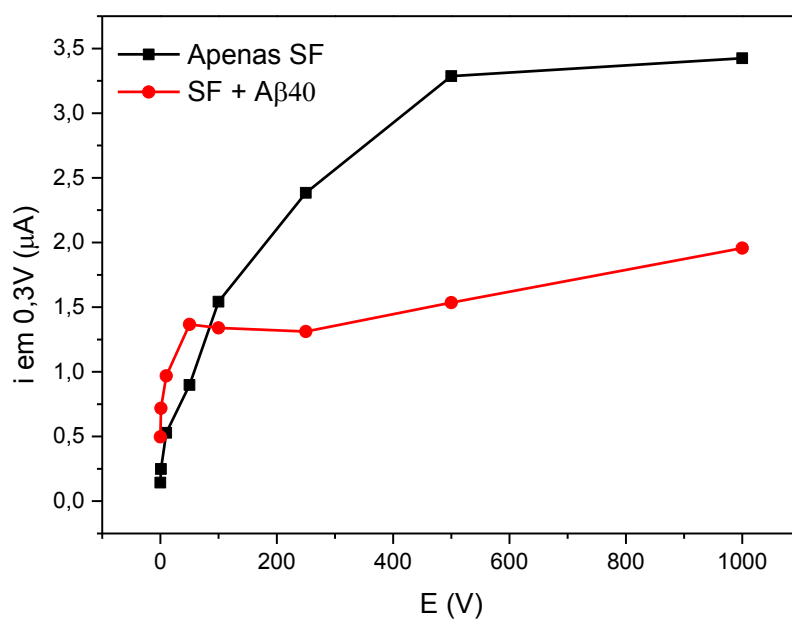


Figura 27 - Resposta do eletrodo contendo somente SF e do eletrodo de SF e antígeno.

Esse estudo permitiu a escolha do eletrodo com apenas 1 bicamada para continuidade do trabalho; por possuir maior diferenciação entre a resposta dos eletrodos, repetiu-se o experimento, dessa vez em triplicata.

A **figura 28** apresenta os voltamogramas selecionados para três concentrações diferentes da solução de anticorpos. Observa-se que, na região próxima de 0,3V há um aumento de corrente, assim como observado anteriormente.

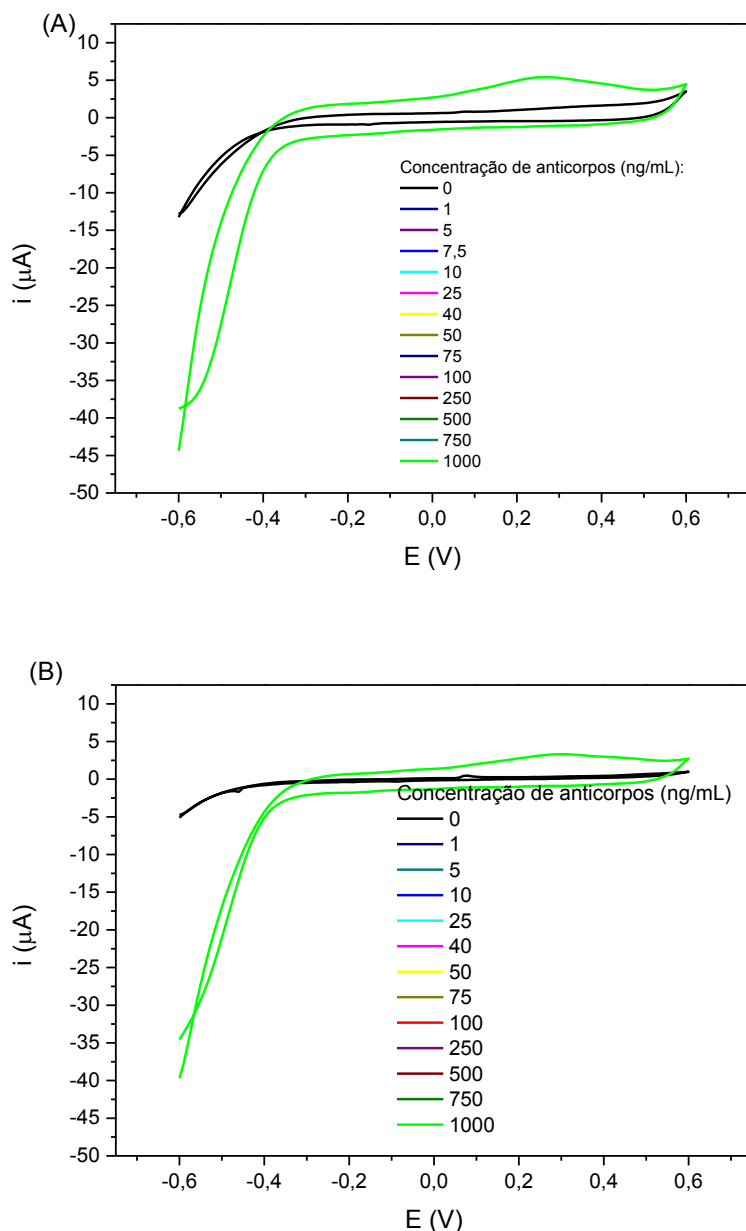


Figura 28 - Voltamogramas selecionados da resposta do eletrodo com a adição de solução de anticorpos anti A β 40. (A) Eletrodo contendo SF + A β 40 e (B) Eletrodo contendo apenas SF.

Comparando-se a resposta dos dois eletrodos em função da concentração de anticorpos (**figura 29A**), nota-se uma região linear nas menores concentrações (**Figura 29B**), seguido de saturação dos sítios de ligação.

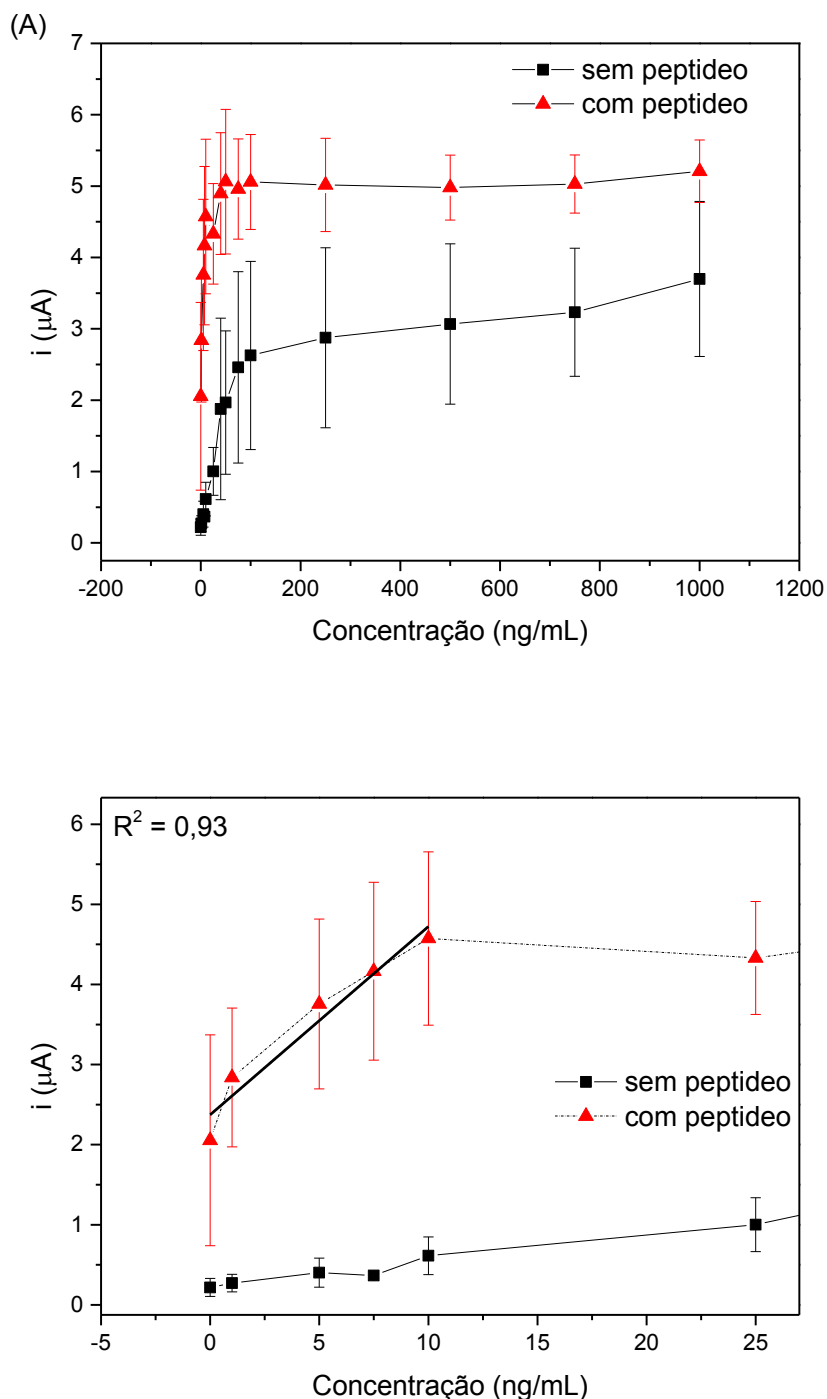


Figura 29 - Resposta dos eletrodos em função da concentração da solução de anticorpos. (A) Todo o intervalo estudado e (B) Ampliação da região até 25 ng/mL . $n=3$

Fez-se também a resposta do eletrodo com a área dos voltamogramas *versus* concentração da solução de anticorpos (**Figura 30A**) e é possível notar que a diferença entre a resposta do eletrodo que continha o antígeno em relação ao eletrodo apenas com SF é ainda maior que quando compara-se a corrente em 0,30V.

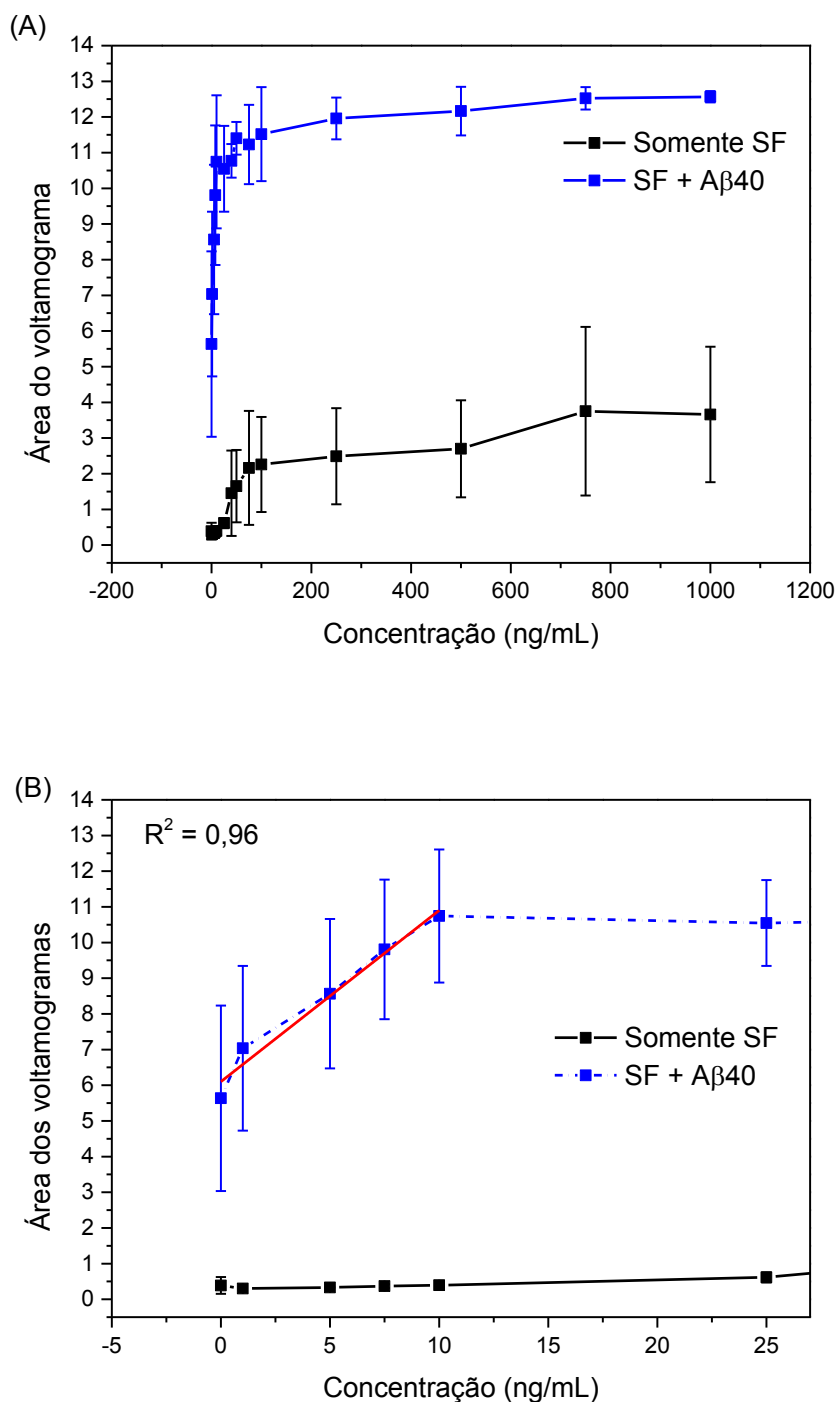


Figura 30 - Área dos voltamogramas em função da concentração da solução de anticorpos. (A) Toda a região analisada e (B) Ampliação da região até 25 ng/mL. n=3.

Ainda é possível observar que há uma resposta linear do eletrodo que contém o antígeno até a concentração de 10 ng/mL e, após isso, o eletrodo é saturado, ou seja, todos os sítios de ligação antígeno-anticorpo estão ocupados.

Com estes resultados, é possível concluir que a detecção eletroquímica de anticorpos anti-A β 40 foi possível com eletrodos contendo uma bicamada de SF juntamente com A β 40 e utilizando a área dos voltamogramas para análise.

4.5. Detecção óptica

Foram feitos os filmes com 5 bicamadas para posterior adição das soluções dos anticorpos. O recobrimento completo do substrato de quartzo era necessário para que os anticorpos não tivessem interações não específicas com ele.

O espectro do filme contendo apenas SF e as NPs (**figura 31**) teve a banda de excitação centrada em 270 nm, atribuído tanto à excitação da SF quanto das NPs; era necessária a proximidade da excitação de ambos para que a transferência de energia fosse conseguida.

A emissão do íon Eu^{3+} pode ser observada também na **figura 31**. A emissão mais intensa corresponde à transição $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ e está centrada em 619 nm, que está de acordo com a literatura⁷¹. Essa emissão teve sua intensidade acompanhada após a adição de anticorpos para observar uma possível alteração no espectro. Há uma banda em 300 nm que foi atribuída à emissão dos aminoácidos triptofano e tirosina presentes na SF.

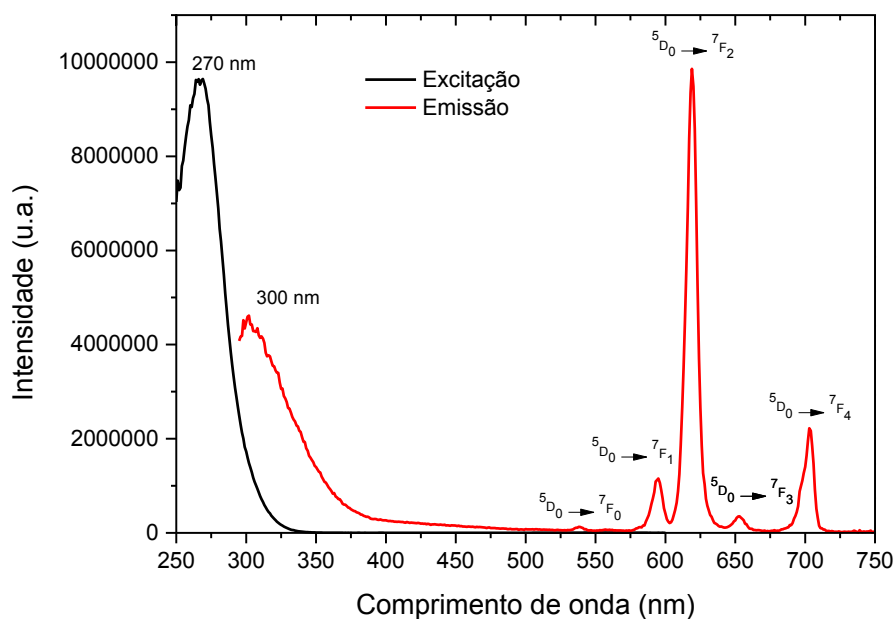


Figura 31 - Espectros de excitação e emissão do filme de 5 camadas de SF e 5 camadas de NPs.

Quando adicionada a solução de anticorpos no filme SF+NPs, houve um aumento na intensidade de emissão do Eu^{3+} , indo de 1334064 para 2133450 (aumento de 60%) e uma diminuição da banda atribuída à proteína, de 615671 para 367427 (diminuição de 40%); estes espectros estão apresentados na **Figura 32**. Tal efeito nas bandas de emissão foi atribuído à adsorção dos anticorpos no filme, facilitando a transferência de energia da SF para o íon európio.

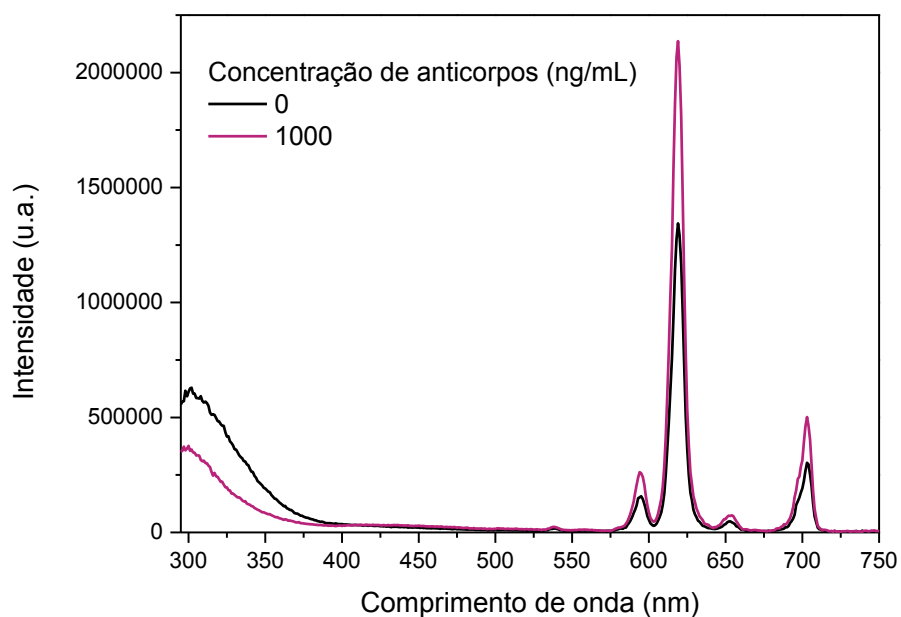


Figura 32 - Espectro de emissão de filme com 5 camadas de SF e 5 camadas de NPs antes e após adição de anticorpos.

O mesmo procedimento foi seguido para filmes compostos por SF, A β 40 e NPs. O espectro desses filmes não houve diferença na posição das bandas quando comparados aos filmes contendo SF e NPs, entretanto, a intensidade da banda atribuída aos componentes proteicos (300 nm) é maior que do Eu³⁺, como observado na **figura 33**, devido a presença de mais aminoácidos aromáticos, nesse caso, a fenilalanina do peptídeo A β 40. Devido à sua baixa intensidade, a transição $^5D_0 \rightarrow ^7F_0$ não é observada, e as intensidades absolutas da emissão do európio são menores do que as observadas no filme contendo apenas SF + NPs.

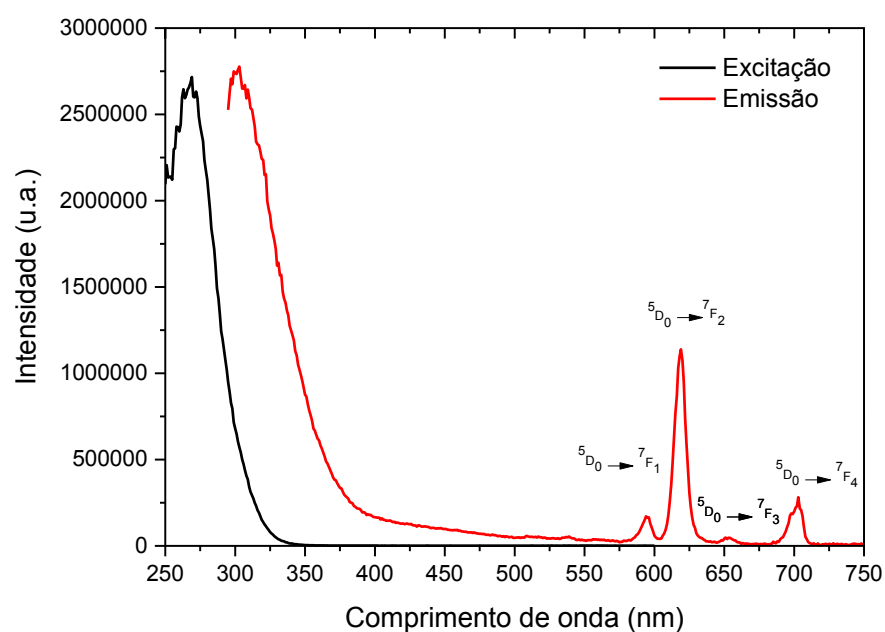


Figura 33 - Espectros de excitação e emissão de filme contendo 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40 e NPs.

Ao adicionar-se os anticorpos, observa-se novamente o aumento da emissão do európio e diminuição da banda das proteínas até que a intensidade das bandas se invertesse, ou seja, a emissão do $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ do Eu^{3+} fosse mais intensa que da SF e peptídeo (**figura 34**).

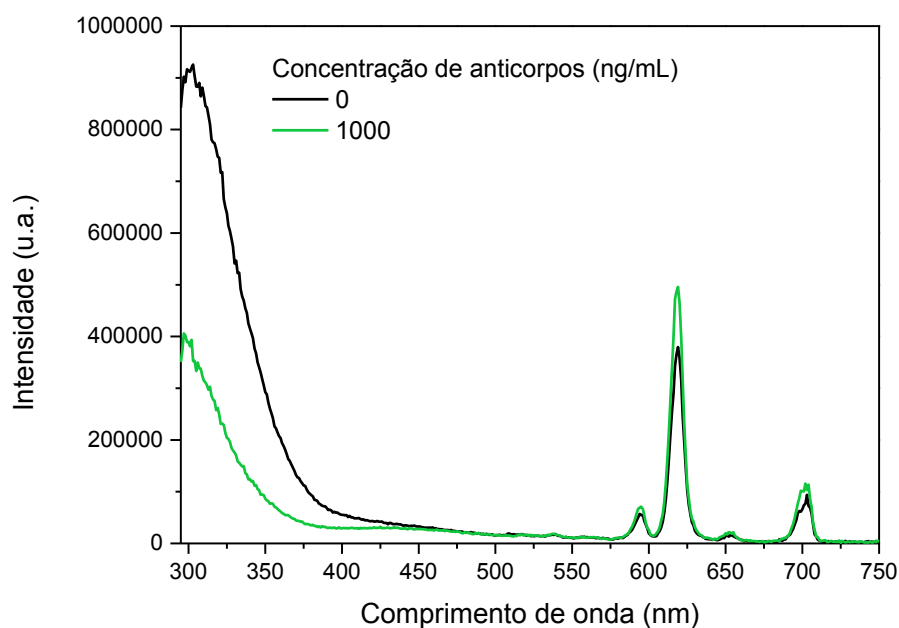


Figura 34 - Espectros de emissão de filme de 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40 antes e após adição de anticorpos.

Nesse caso, houve um aumento de 24% na emissão do európio, enquanto a diminuição da banda da proteína diminuiu 58%. Esperava-se que com a interação antígeno com o anticorpo a transferência de energia fosse facilitada e, portanto, a emissão do Eu^{3+} fosse aumentada mais do que no caso da **Figura 32**. A não ocorrência disso pode indicar que o anticorpo está adsorvendo mais facilmente ao substrato de quartzo do que ao antígeno.

Com o filme contendo a A β 40W novamente não houve alteração na posição das bandas de excitação e emissão, porém a intensidade da banda atribuída às proteínas é muito maior do que a do íon Eu^{3+} , efeito devido à presença aminoácido aromático triptofano, além da fenilalanina também presente. Não são observadas as transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ e nem $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$, que são as com mais baixa intensidade (**figura 35**).

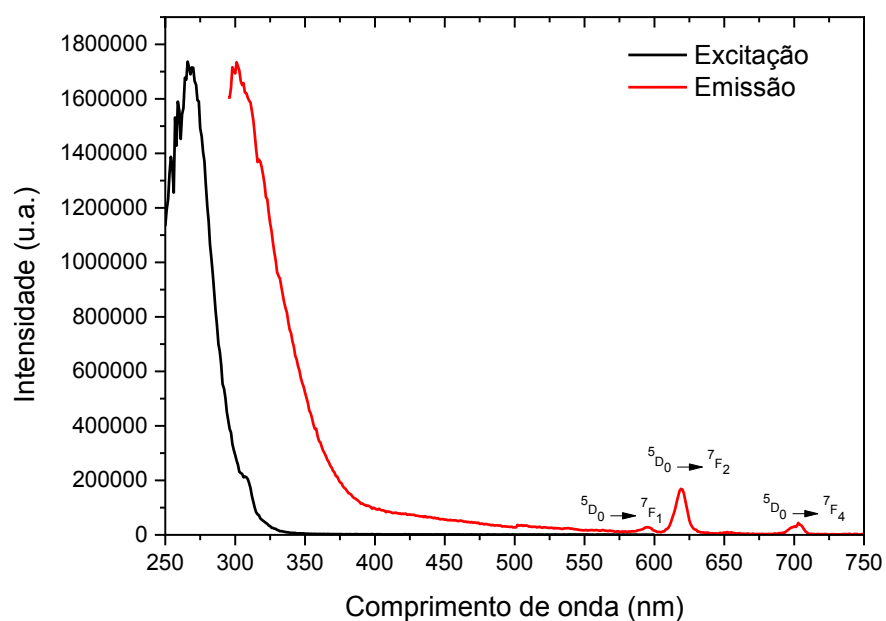


Figura 35 - Espectros de excitação e emissão de filme contendo 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40W e NPs.

Com a adição dos anticorpos observou-se o mesmo que foi observado para os dois filmes anteriores; uma diminuição da banda de emissão das proteínas e um aumento da emissão do európio, como pode ser observado na **figura 36**.

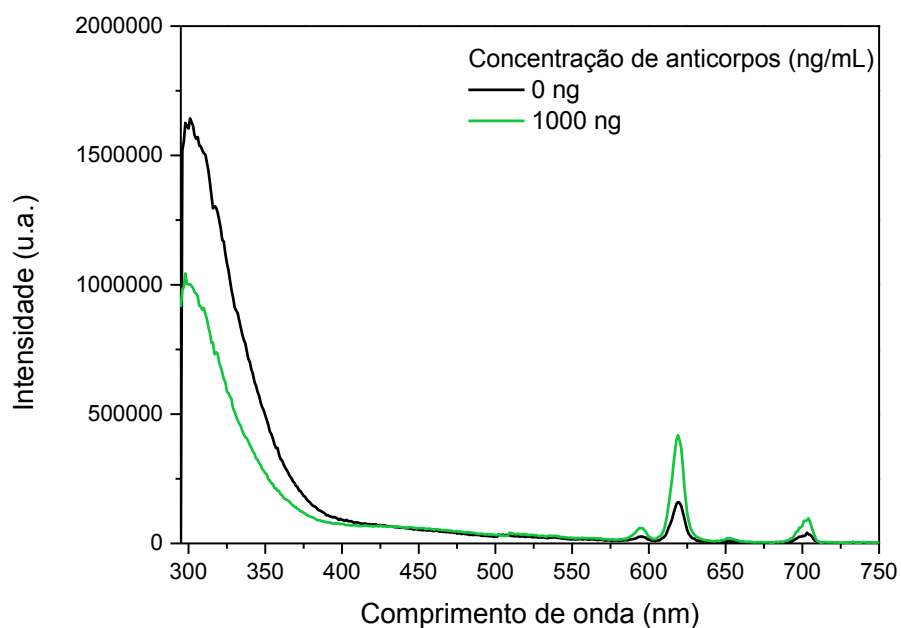


Figura 36 - Espectros de emissão de filme de 5 camadas de SF e 5 camadas de A β 40W antes e após adição de anticorpos.

O aumento da emissão do Eu^{3+} foi de 63%. O resíduo triptofano presente nesse peptídeo pode facilitar a transferência de energia entre o anticorpo para as nanopartículas emissoras.

Em todos os casos foi observado um aumento da emissão do Eu^{3+} em detrimento da emissão em 300 nm, atribuído à uma transferência de energia entre os componentes protéicos (SF, A β 40) quando há a presença dos anticorpos anti A β 40. Entretanto, esses anticorpos foram incorporados ao filme mesmo sem a presença do peptídeo A β 40, devido à uma interação não específica entre o substrato de quartzo e a solução de anticorpos, impossibilitando sua aplicação em imunossensores; portanto mais estudos são necessários para diminuir essa interação não específica.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a possível aplicação de filmes LbL de SF e A β 40 para aplicação em imunossensores eletroquímicos e ópticos.

Verificou-se que a adsorção alternada entre os dois componentes sugeridos foi positiva tanto pelo aumento sistemático da absorção em 230 nm em substrato de quartzo quanto pela área dos voltamogramas em eletrodo de carbono impresso.

Em seguida, o tempo de adsorção da SF foi variado para observar o recobrimento do eletrodo utilizando o par redox ferricianeto e ferrocianeto de potássio, que possuem sinais voltamétricos característicos. Foi possível observar que a superfície do eletrodo não foi bloqueada pois o sinal não desapareceu, possivelmente pela SF poder transportar espécies eletroquímicas para a superfície do eletrodo. Mudanças não foram mais observadas a partir de 30 minutos de adsorção, chegando-se a conclusão que a partir desse tempo não há mais adsorção de SF no eletrodo.

Ainda foi estudado o efeito de indução de conformação que é conhecida dos filmes LbL por CD. O espectro de CD da solução de A β 40 teve sua corroboração de artigos da literatura que utilizaram RMN para estudar sua conformação. Foi possível também observar a estruturação desse peptídeo quando adicionado nos filmes juntamente com SF.

A detecção dos anticorpos por VC foi testada em eletrodos com uma, três e cinco bicamadas, obtendo a melhor resposta com apenas uma bicamada, que foi utilizado para verificar a reprodutibilidade do sensor. Foram feitas triplicatas das medidas e a resposta do eletrodo foi positiva apenas para o eletrodo contendo A β 40, evidenciando o reconhecimento específico do anticorpo. Obteve-se uma resposta linear para as concentrações de anticorpo de 1 à 10 ng.mL⁻¹, seguida de uma saturação dos sítios de ligação.

Já a detecção óptica foi realizada monitorando bandas de emissão atribuídas às proteínas na região de 300 nm e também a emissão do európio em 619 nm. Com a adição de anticorpos houve uma supressão da emissão das proteínas e um aumento da emissão do európio para todos os filmes estudados, independente da presença da A β 40. Foi concluído que a presença dos anticorpos facilitou a transferência de energia entre os componentes proteicos, a matriz vanadato e o íon európio, entretanto, por sua adsorção sem a necessidade de seu antígeno, foi impossibilitado de ser aplicado como um imunossensor óptico.

6. ATIVIDADES FUTURAS

6.1. Reprodutibilidade do sensor

É necessário verificar a reprodutibilidade do sensor eletroquímico, aumentando o número de eletrodos analisados visando a diminuição das barras de erro obtidas.

6.2. Especificidade do sensor

Também precisa ser verificada a especificidade do sensor, onde os experimentos serão repetidos adicionando-se um anticorpo que não seja específico para A β 40.

6.3. Ajustes experimentais para o sensor óptico

Alterar parâmetros para otimizar a detecção óptica pode ser possível, destaca-se o tempo de adsorção das camadas e do tempo em que se deixa o anticorpo interagindo com o filme para minimizar a possibilidade de acontecerem interações não específicas.

REFERÊNCIAS

- 1 ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 10, n. 2, p. e47-e92, 2014.
- 2 BROOKMEYER, R. et al. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, n. 3, p. 186-191, 2007.
- 3 WIMO, A. et al. The worldwide economic impact of dementia 2010. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2013.
- 4 FELDMAN, H. H. **Atlas of Alzheimer's disease**. Boca Raton: Informa Healthcare, 2007. 166 p.
- 5 GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 120, n. 3, p. 885-890, 1984.
- 6 MASTERS, C. L. et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 12, p. 4245-4249, 1985.
- 7 VIVEKANANDAN, S. et al. A partially folded structure of amyloid-beta(1-40) in an aqueous environment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 141, n. 2, p. 312-316, 2011.
- 8 HARDY, J. A.; HIGGINS, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184-185, 1992.
- 9 BROECKHOVEN, C. V. et al. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). **Science**, v. 248, n. 4959, p. 1120-1122, 1990.
- 10 LEVY, E. et al. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. **Science**, v. 248, n. 4959, p. 1124-1126, 1990.
- 11 HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.
- 12 GOLDE, T. E. Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 1, p. 11-18, 2003.
- 13 LEE, H.-G. et al. Amyloid- β in Alzheimer disease: the null versus the alternate hypotheses. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 3, p. 823-829, 2007.
- 14 LEE, H.-G. et al. Challenging the amyloid cascade hypothesis: senile plaques and amyloid- β as protective adaptations to Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, p. 1-4, 2004.

- 15 CLEARY, J. P. et al. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 79-84, 2005.
- 16 TERRY, R. D. et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. **Annals of Neurology**, v. 30, n. 4, p. 572-580, 1991.
- 17 PIMPLIKAR, S. W. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 6, p. 1261-1268, 2009.
- 18 DAHLGREN, K. N. et al. Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 35, p. 32046-32053, 2002.
- 19 CLEARY, J. P. Natural oligomers of the amyloid-[beta] protein specifically disrupt cognitive function. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 79-84, 2005.
- 20 ALBERTA, M. S. et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer & Dementia**, v. 7, n. 3, p. 270-279, 2011.
- 21 WANG-DIETRICH, L. et al. The amyloid- β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 34, n. 4, p. 985-994, 2013.
- 22 HÖLTTÄ, M. et al. Evaluating amyloid- β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
doi:10.1371/journal.pone.0066381.
- 23 WILTFANG, J. et al. Amyloid β peptide ratio 42/40 but not A β 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A β 40 load. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 4, p. 1053-1059, 2007.
- 24 BLENNOW, K.; HAMPEL, H. CSF biomarkers for incipient Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 10, p. 605-613, 2003.
- 25 HAMPEL, H. et al. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 7, p. 560-574, 2010.
- 26 HAES, A. J. et al. A localized surface plasmon resonance biosensor: first steps toward an assay for Alzheimer's disease. **Nano Letters**, v. 4, n. 6, p. 1029-1034, 2004.
- 27 KLEIREN, E. et al. Development of a quantitative and conformation-sensitive ATR-FTIR biosensor for Alzheimer's disease: the effect of deuteration on the detection of A β peptide. **Spectroscopy**, v. 24, n. 1/2, p. 61-66, 2010.
- 28 CHIKAE, M. et al. Amyloid- β detection with saccharide immobilized gold nanoparticle on carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 1, p. 118-123, 2008.

- 29 PRABHULKAR, S. et al. Microbiosensor for Alzheimer's disease diagnostics: detection of amyloid beta biomarkers. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, n. 1/2, p. 374-381, 2012.
- 30 THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1/2, p. 121-131, 2001.
- 31 KARA, P. et al. Aptamers based electrochemical biosensor for protein detection using carbon nanotubes platforms. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1715-1718, 2010.
- 32 MORAES, M. L. et al. 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.
- 33 LENIGK, R. et al. Enzyme biosensor for studying therapeutics of Alzheimer's disease. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 9/10, p. 541-547, 2000.
- 34 LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors: principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, n. 1/2, p. 1-26, 2001.
- 35 SHENG, Q. et al. Ultrasensitive electrochemical cocaine biosensor based on reversible DNA nanostructure. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 191-194, 2014.
- 36 YU, C. et al. Mid-IR biosensor: detection and fingerprinting of pathogens on gold island functionalized chalcogenide films. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 2500-2506, 2006.
- 37 MEDINA-SÁNCHEZ, M. et al. On-chip magneto-immunoassay for Alzheimer's biomarker electrochemical detection by using quantum dots as labels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 279-284, 2014.
- 38 MORRIS, D. R. P. et al. Real-time monitoring of airborne cat allergen using a QCM-based immunosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 190, p. 851-857, 2014.
- 39 MOHAMMAD, R.; AHMAD, M.; HENG, L. Y. Chilli hotness determination based on optical capsaicin biosensor using stacked immobilisation technique. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 190, p. 593-600, 2014.
- 40 RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMANB, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.
- 41 SKOOG, D. A. et al. Voltametria. In: _____. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson, 2006. Cap. 23, p. 627-666.
- 42 ZHAO, W.; XU, J.-J.; CHEN, H.-Y. Electrochemical biosensors based on layer-by-layer assemblies. **Electroanalysis**, v. 18, n. 18, p. 1737-1748, 2006.
- 43 FAN, X. et al. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. **Analitica Chimica Acta**, v. 320, n. 1/2, p. 8-26, 2008.

- 44 CHAN, W. C. W. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 40-46, 2002.
- 45 BORISOV, S. M.; WOLFBEIS, O. S. Optical biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 423-461, 2008.
- 46 SCOUTEN, W. H.; LUONG, J. H. T.; BROWN, R. S. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 178-185, 1995.
- 47 TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1530-1543, 2008.
- 48 MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- 49 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.
- 50 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- 51 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.
- 52 WU, B.-Y. et al. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayers films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 6, p. 838-844, 2007.
- 53 WANG, X. et al. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. **Langmuir**, v. 21, n. 24, p. 11335-11341, 2005.
- 54 ALTMAN, G. H. et al. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 401-416, 2003.
- 55 MONDAL, M.; TRIVEDI, K.; KUMAR, S. N. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 63-76, 2007.
- 56 VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as biomaterial. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8/9, p. 991-1007, 2007.
- 57 ZHOU, C.-Z. et al. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 44, n. 2, p. 119-122, 2001.

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

59 HE, Y.-X. et al. 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.

60 HEY, L.; NATANZ, M. J. Nanoparticles for bioanalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 5, p. 609-615, 2003.

61 LUO, X. et al. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis**, v. 18, n. 4, p. 319-326, 2006.

62 THAXTON, C. S.; ROSI, N. L.; MIRKIN, C. A. Optically and chemically encoded nanoparticle materials for DNA and protein detection. **MRS Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 376-380, 2005.

63 LEE, Y.-E. K.; RAOUL, K. Optical nanoparticle sensors for quantitative intracellular imaging. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 1, p. 98-110, 2009.

64 ESCOSURA-MUÑIZ, A. de la; PAROLO, C.; MERKOÇI, A. Immunosensing using nanoparticles. **Materials Today**, v. 13, n. 7/8, p. 24-34, 2010.

65 SASTRI, V. S. et al. **Modern aspects of rare earths and their complexes**. Amsterdam: Elsevier, 2003. 1006 p.

66 BLASSE, G.; GRABMEIER, B. C. **Luminescent materials**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. 232 p.

67 COTTON, S. **Lanthanide and actinide chemistry**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2006. 263 p.

68 DIAMANDIS, E. P. Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: principles and applications. **Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 139-150, 1988.

69 YE, Z. et al. Novel fluorescent europium chelate-doped silica nanoparticles: preparation, characterization and time-resolved fluorometric application. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 851-856, 2004.

70 NELSON, D. L.; COX, M. M. Amino acids, peptides and proteins. In: _____. **Lehninger principles of Biochemistry**. New York: W. H. Freeman, 2004. Chap. 3, p. 75-115.

71 HUIGNARD, A. et al. Synthesis and characterizations of YVO₄:Eu colloids. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 5, p. 2264-2269, 2002.

72 SNYDER, S. W. et al. Amyloid- β aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. **Biophysical Journal**, v. 67, n. 3, p. 1216-1228, 1994.

- 73 ROCKWOOD, D. N. et al. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. **Nature Protocols**, v. 6, n. 10, p. 1612-1631, 2011.
- 74 BARKER, M. G.; HOOPER, A. J. Preparation and X-ray powder diffraction patterns of the sodium vanadates NaVO₃, Na₄V₂O₇, and Na₃VO₄. **Journal of the Chemical Society: Dalton Transactions**, n. 15, p. 1513-1517, 1973.
- 75 GIAUME, D. et al. Emission properties and applications of nanostructured luminescent oxide nanoparticles. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 33, n. 2/4, p. 99-106, 2005.
- 76 WONG, P. T. et al. Amyloid- β membrane binding and permeabilization are distinct processes influenced separately by membrane charge and fluidity. **Journal of Molecular Biology**, v. 386, n. 1, p. 81-96, 2009.
- 77 MARTIN, S. R.; SCHILSTRA, M. J. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. **Methods in Cell Biology**, v. 84, p. 263-293, 2008.
- 78 WALLACE, B. A.; JANES, R. W. **Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy**. Amsterdam: IOS Press, 2009. 231 p.
- 79 BRAHMS, S.; BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, n. 2, p. 149-178, 1980.
- 80 ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. **Chemkeys: Liberdade para Aprender**, 2003. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/03/25/voltametria-conceitos-e-tecnicas/>>. Acesso em: 27 maio 2015.
- 81 GOLDFARB, A. R.; SAIDEL, L. J.; MOSOVICH, E. The ultraviolet absorption spectra of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 397-404, 1951.