

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"

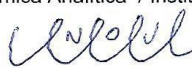
AUTORA: LAÍS RONCALHO DE LIMA
ORIENTADOR: SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO

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 MARIA 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.; PAULOVICH, 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 $\text{YVO}_4:\text{Ln}^{3+}$ 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 $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ 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 $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ 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 $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ em solução aquosa com concentração 12 mmol L^{-1}	50
Figura 20. Distribuição de tamanhos das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$, com diâmetro médio de 21 nm.	51
Figura 21. FT-IR das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ na faixa de absorção de $4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$	52
Figura 22. Espectro Raman das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ na faixa de absorção de $100 \text{ a } 4000 \text{ cm}^{-1}$	53
Figura 23. Espectros de excitação das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$) 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 $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$) 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 ($\lambda_{\text{exc.}} 280 \text{ nm}$) das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ conforme adição de Hyl-K0-W6 em solução tampão.	57
Figura 27. Espectros excitação ($\lambda_{\text{em.}} 620 \text{ nm}$) das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ conforme adição de Hyl-K0-W6 em solução tampão.	57
Figura 28. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc.}} 280 \text{ nm}$) dos filmes de SF/NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ (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 ($\lambda_{\text{em.}} 620 \text{ nm}$) dos filmes de SF/NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ (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 $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$	60
Figura 31. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc.}} 280 \text{ nm}$) 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 ($\lambda_{\text{em.}} 620 \text{ nm}$) 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 ($\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm) e excitação ($\lambda_{\text{em.}}$ 620 nm) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a.	73
Figura 50. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc.}}$ 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 LbL 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 LbL 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 aspartato 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
[θ]	Elipicidade 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</i> (LbL).....	28
1.4 Peptídeo antimicrobiano hylina - a1	30
1.5 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (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 metilicina (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

Key:
atomic number
Symbol
name
standard atomic weight

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]

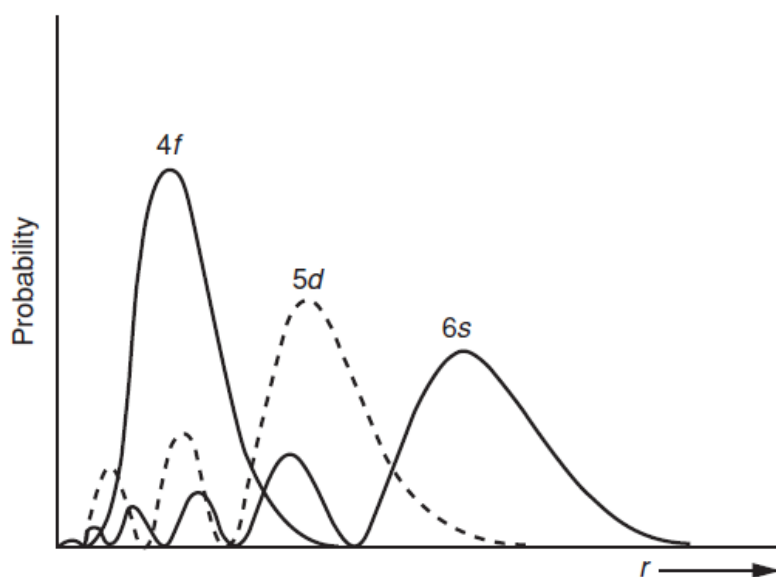


Figura 2. Distribuição radial das funções de onda hidrogenóides para os orbitais 4f, 5s e 6s.^[10]

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]

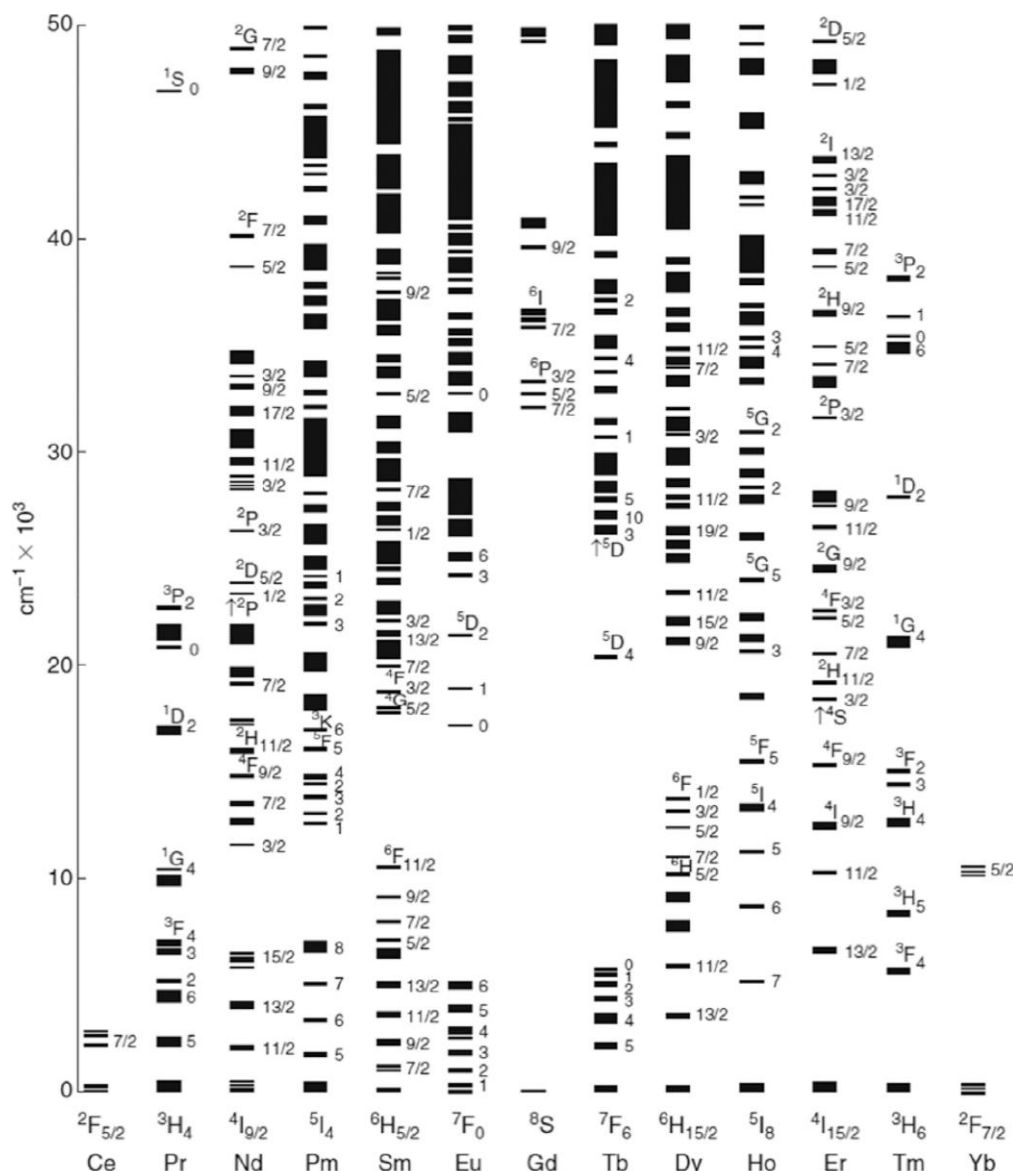


Figura 3. Níveis de energia das configurações $4f^n$ dos lantanídeos trivalentes.^[6]

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]

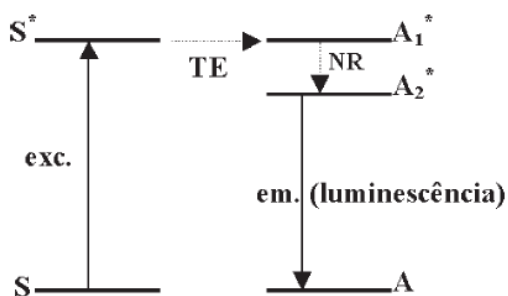


Figura 4. Mecanismo de transferência de energia de um centro sensibilizador (S) para um centro ativador (A). S é o sensibilizador no estado fundamental; S*, sensibilizador no estado excitado; TE, transferência de energia; NR, processo não radiativo; A1* e A2*, estados excitados do ativador; A, ativador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

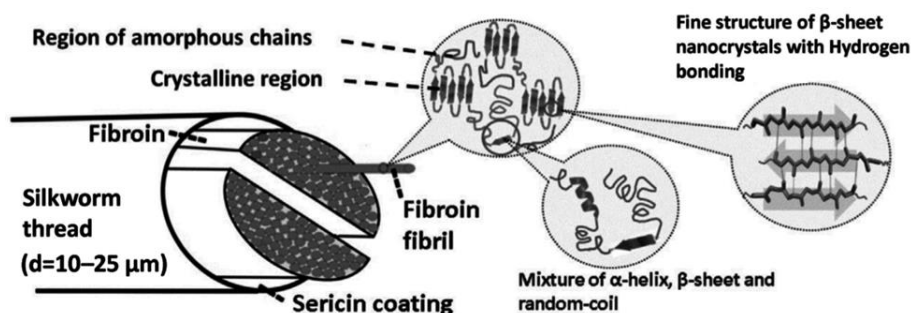


Figura 5. Representação esquemática da estrutura da fibroína da seda.^[42]

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.

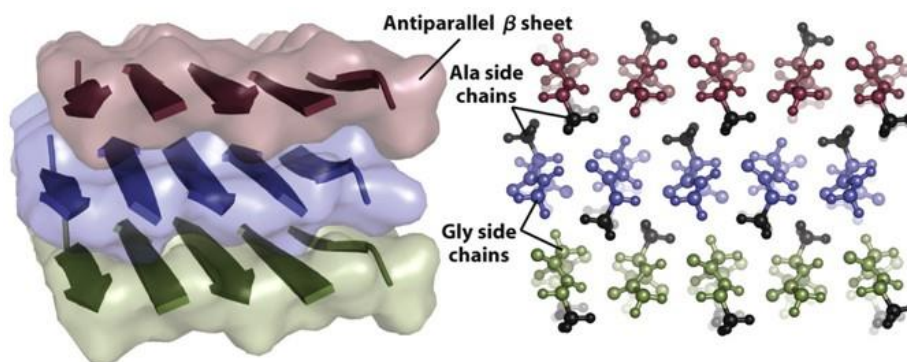


Figura 6. Estrutura da fibroína da seda produzida pelo bicho-da-seda (*Bombyx mori*).^[49]

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*.

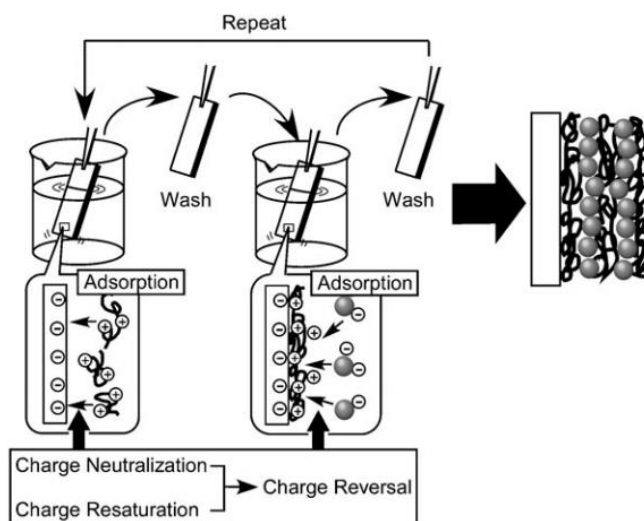


Figura 7. Representação esquemática do processo de automontagem de uma bicamada do filme *LbL*. Inicialmente há a adsorção de um polieletrólito, por exemplo catiônico e, em seguida, há a adsorção de um polieletrólito aniônico. Após cada adsorção os substratos são lavados. Ao final, temos a estrutura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

A deposição de filmes multicamadas a partir de soluções de policátions 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]

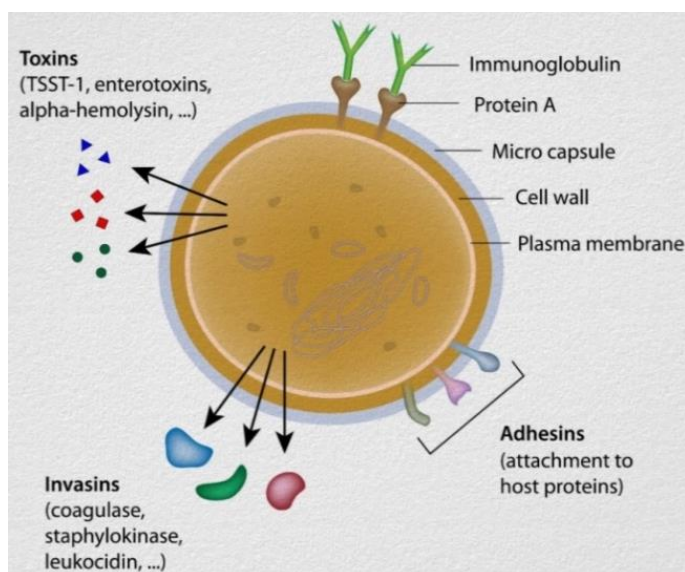


Figura 8. Representação esquemática da estrutura da *Staphylococcus aureus* contendo um envoltório, membrana de plasmática, parede celular e microcápsula com proteínas anexadas a ela.^[93]

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]

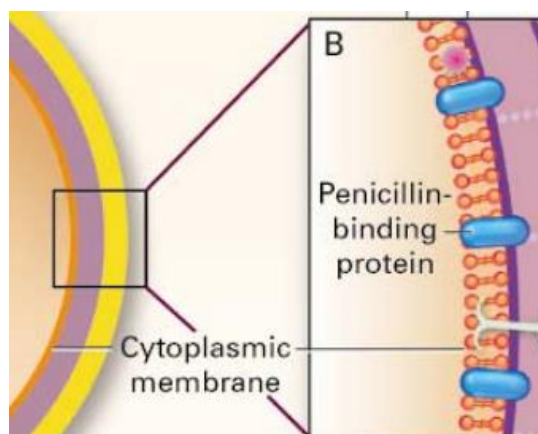


Figura 9. Representação esquemática das PBPs presentes na membrana plasmática da *Staphylococcus aureus*.^[92]

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*.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi a obtenção e caracterização de filmes automontados, via técnica de deposição camada por camada (*Layer-by-Layer*, *LbL*) contendo a fibroína da seda (SF), o peptídeo antimicrobiano hylina - a1 e nanopartículas (NPs) de vanadato de ítrio dopadas com o íon európio para estudos de transferência de energia, visando a aplicação deste sistema como um protótipo biossensor.

Para alcançar este objetivo as metas intermediárias foram:

- a) Síntese e caracterização dos peptídeos antimicrobianos hylinas modificados;
- b) Síntese e caracterização de NPs de vanadato de ítrio dopadas com íon európio;
- c) Estudo das NPs na presença dos peptídeos em solução e no estado sólido, através de filmes *LbL*;
- d) Análise da proteína ligante à penicilina (PBP2a) sobre filmes *LbL*;
- e) Aplicação do sistema como biossensor, através da detecção do extrato antigênico MRSA contendo a bactéria real.

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos propostos para este trabalho foram obtidos manualmente pelo método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) empregando a estratégia Fmoc^[96], sobre a resina Rink Amide AM (aminometil), de 0,68 mmol g⁻¹ de grau de substituição.

O protocolo de síntese utilizado consiste de passos cíclicos seriados de acoplamento e desproteção do aminogruppo alfa terminal, intercalados por lavagens para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos, Figura 10. Como protocolo padrão, os acoplamentos foram realizados mediante a ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido acoplante com N,N'-diisopropilcarbodiimida/N-hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt) durante duas horas de agitação utilizando como solvente 50% de dimetilformamida (DMF) em diclorometano (DCM). Nesta etapa foi usado excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 2 vezes em relação ao número teórico de sítios reativos existentes na resina

A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada por meio da reação com uma solução 20% piperidina em DMF durante 1 e 20 min. Entre cada passo foram efetuadas lavagens com os solventes orgânicos DMF e DCM. O acoplamento e desproteção de cada aminoácido foram monitorados por meio do teste de ninidrina.^[97]

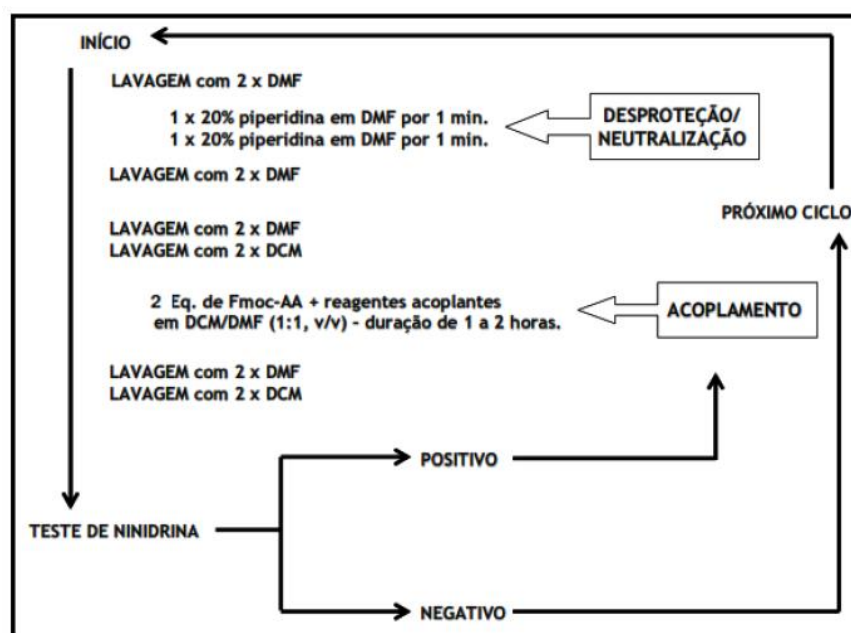


Figura 10. Protocolo geral da síntese de peptídeos em fase sólida.^[98]

Ao fim da síntese, para separar o peptídeo da resina e dos grupos protetores de cadeias laterais utilizados, foi realizada uma reação de clivagem utilizando uma solução (“coquetel”) contendo água deionizada, TIS (tioanisol) e TFA (ácido trifluoracético) na proporção de 5%, 5%, 90% respectivamente; v/v/v, mantendo a relação 1 mL de solução para cada 100 mg de resina.^[99] A reação de clivagem ocorreu durante 2 h à temperatura ambiente e sob agitação moderada.

Após esta etapa, foi adicionado éter etílico gelado para a precipitação do peptídeo e o precipitado foi separado por centrifugação para retirada dos subprodutos resultantes da clivagem. Ao precipitado contendo o peptídeo e a resina foi adicionada uma solução contendo 0,045% de TFA em água. A solução foi centrifugada, separando a resina insolúvel da solução peptídica, que foi liofilizada, obtendo-se um pó branco floculoso denominado de peptídeo bruto. Através de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em fase reversa realizou-se a purificação e caracterização dos peptídeos. A obtenção dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massas.^[98]

3.2 Obtenção das nanopartículas luminescentes de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$

As NPs luminescentes de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ e foram preparadas em duas etapas seguindo procedimento descrito na literatura.^[100,101] Na primeira etapa, o Na_2CO_3 foi misturado com o V_2O_5 no estado sólido para iniciar a preparação do Na_3VO_4 . A mistura foi levada ao forno até 700°C a uma taxa de aquecimento de $14^\circ\text{C min}^{-1}$. O meio reacional foi mantido a 700°C durante 4 h e depois resfriado a 200°C e mantido nessa temperatura por mais 10 h.^[100] O produto final foi dissolvido em água para utilização na segunda etapa, que consistiu em misturar sob agitação soluções de $\text{Y}(\text{NO}_3)_3$ e $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$. A essa mistura foram adicionados 7,5 mL de solução de citrato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Rapidamente foi formado um precipitado branco (citrato de lantanídeo) e ainda, sob agitação em um agitador magnético, foi adicionada a solução de Na_3VO_4 preparada na etapa anterior. O meio reacional ficou transparente e foi agitado e aquecido a 60°C por 45 min. Isto permitiu a formação das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ estabilizadas pelo citrato. Na sequência, a solução foi resfriada e dialisada contra água Milli-Q em membranas de acetato de celulose (Sigma-Aldrich) por 72 h.^[101]

A concentração final de európio contida nas NPs foi de 12 mmol L^{-1} . Esta concentração foi calculada a partir da concentração inicial de 10% de íon Eu^{3+} adicionado na segunda etapa da síntese. Para os estudos em solução e filmes utilizando as NPs, foi utilizado $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$.

3.3 Extração e obtenção da fibroína da seda

A fibroína foi extraída de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) fornecido pela BRATAC SA, Brasil. Para extração, 10 g de casulos foram fervidos durante 30 min em 2 L de solução de Na_2CO_3 $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ a fim de remover a sericina. Para cada 10 g de fio de seda restantes, 100 mL de solução $\text{CaCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2:8) foram adicionados e a mistura foi aquecida a $60\text{-}70^\circ\text{C}$ para dissolução. Em seguida, a solução foi dialisada com água Milli-Q, utilizando membranas de acetato de celulose (Sigma-Aldrich), à temperatura ambiente durante 48 h. Após este procedimento, a solução de fibroína foi centrifugada a 20000 rpm durante 30 min à temperatura ambiente, para remover impurezas e agregados. A solução foi mantida a aproximadamente $5^\circ\text{C}^{[102]}$ e a concentração de fibroína em solução foi calculada através da evaporação da água, restando apenas um filme formado pela fibroína, contendo 4% em peso (m/m). Para a preparação dos filmes, a fibroína foi utilizada com diluição em 0,25% (m/m).

3.4 Preparação dos filmes sobre substratos de sílica

Filmes *LbL* de SF, SF/peptídeos, SF/NPs e SF/peptídeos+NPs foram montados sobre substratos de sílica previamente tratados com uma solução 3% de KOH em etanol durante 30 min à temperatura ambiente e ultrassom.

O processo de deposição da SF sobre ela mesma foi realizado por imersão do substrato na solução de fibroína 0,25% (m/m), durante 10 min.

Para a montagem dos filmes *LbL* de SF/peptídeos foi realizada a imersão do substrato na solução de fibroína 0,25% (m/m), durante 10 min e em solução dos peptídeos $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente, durante 10 min.

A montagem dos filmes *LbL* de SF/NPs foi similar, com a imersão do substrato na solução de fibroína 0,25% (m/m), durante 10 min e em solução das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente, durante 10 min.

Os filmes *LbL* de SF/peptídeos+NPs foram preparados através da imersão do substrato na solução de fibroína 0,25% (m/m), durante 10 min e em solução $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ da mistura dos peptídeos e NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, respectivamente, durante 10 min.

Após cada deposição camada por camada, o substrato foi lavado com água Milli-Q para remoção das moléculas fracamente adsorvidas e, em seguida, foi seco suavemente com N_2 . O procedimento foi repetido até alcançar o número de 10 camadas de SF e 10 bicamadas

de SF/peptídeos, SF/NPs e SF/peptídeos+NPs. A Figura 11 apresenta um esquema do procedimento de montagem dos filmes. A formação das multicamadas foi monitorada a cada etapa de deposição por Espectroscopia UV-visível.

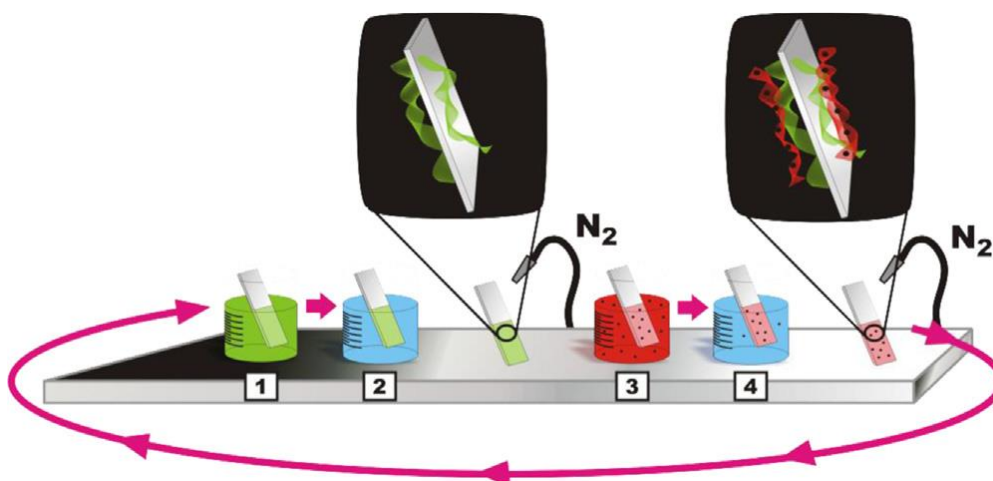


Figura 11. Esquema do procedimento de preparação dos filmes automontados via técnica *LbL* (camada por camada). As soluções 1 e 3 representam, respectivamente, a SF e os peptídeos, NPs ou peptídeo+NPs e 2 e 4 representam a água Milli-Q utilizada para lavagem e remoção de moléculas fracamente adsorvidas.^[4]

Medidas de Espectroscopia de Luminescência foram realizadas antes e após a exposição dos filmes de SF/NPs sobre diversas concentrações dos peptídeos. E como estratégia de aplicações em biossensores, medidas de Espectroscopia de Luminescência foram realizadas antes e após a exposição dos filmes SF, SF/peptídeos, SF/NPs, SF/peptídeos+NPs sobre diversas concentrações da proteína PBP2a, responsável pela resistência da bactéria MRSA à penicilina.

3.5 Preparação dos filmes sobre eletrodos impressos de carbono

Filmes automontados de SF, SF/peptídeos, SF/NPs e SF/peptídeos+NPs foram produzidos sobre eletrodos de carbono impressos contendo 3 camadas e/ou bicamadas como mostrado esquematicamente na Figura 12.

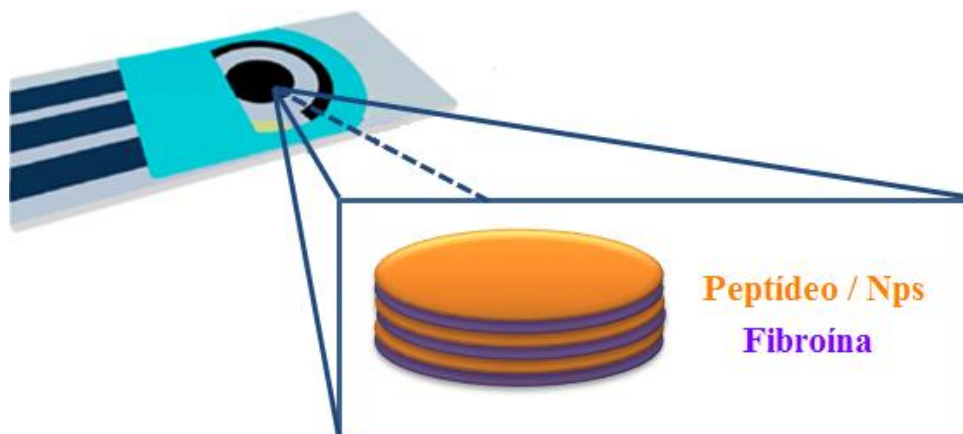


Figura 12. Representação esquemática dos filmes *LbL* montados sobre eletrodos impressos de carbono.

A preparação dos filmes via técnica *LbL* foi realizada depositando uma gota (50 μL) de cada respectiva solução sobre o eletrodo de trabalho, garantindo que as soluções não atingissem o eletrodo de referência. O tempo de adsorção de cada camada foi mantido em 10 min para todas as soluções e a cada camada depositada, o filme foi lavado com água Milli-Q para remover as moléculas fracamente adsorvidas, e seco à temperatura ambiente. As concentrações de SF em 0,25% (m/m), peptídeos e NPs, ambos em 0,1 mmol L⁻¹, também foram mantidas.

Como estratégia de detecção eletroquímica, medidas de Voltametria Cíclica (VC) foram realizadas antes e após a exposição dos filmes sobre diversas concentrações de PBP2a.

Após os resultados obtidos com a detecção da proteína PBP2a que foram satisfatórios para o filme de SF/Hyl-K0-W0+NPs, foram realizadas medidas de VC com um extrato antigênico MRSA, amostra real, visando aplicação deste sistema como um protótipo biossensor.

3.6 Técnicas Experimentais

3.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A purificação e caracterização dos peptídeos foram realizadas por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os materiais brutos foram previamente analisados em um sistema de CLAE analítico da Shimadzu, com detector na região do ultravioleta com dupla detecção utilizando comprimentos de onda de 220 nm e 280 nm, coluna analítica Atlantis C18, dimensões 150 X 4,6 mm e partícula de 5 μm . O programa geral de análise das frações brutas foi de 5% de Solvente A (0,045% de TFA em água) a 95%

de solvente B (0,036% de TFA em acetonitrila) durante 30 minutos. Após análise do cromatograma, o material foi purificado em um equipamento semipreparativo da marca Beckman, coluna Phenomenex C18, dimensões de 250 X 10 mm e partícula de 5 μm , detector Acme 9000 UV/Vis com detecção em 220 nm. As frações foram coletadas e analisadas no equipamento analítico. Amostras com o mesmo tempo de retenção e pureza foram compiladas, liofilizadas e novamente analisadas em CLAE em modo analítico. Os produtos finais com menos de 90% de pureza foram repurificados.

3.6.2 *Espectrometria de Massas*

A obtenção dos peptídeos foi verificada por meio de espectrometria de massas. As análises foram realizadas por injeção direta por bomba de infusão (fluxo 200 $\mu\text{L min}^{-1}$) e os espectros foram obtidos em modo de eletrospray positivo e negativo em um espectrômetro de massas do tipo Ion Trap Amazon SL, da marca Bruker. Esta técnica baseia-se em um analisador de massa quadrupolo que apresenta como resultado final a razão massa carga (m/z).

3.6.3 *Espectroscopia UV-visível*

A formação das multicamadas nos filmes foi monitorada por Espectroscopia de Uv-visível, utilizando um Espectrofotômetro UV-Vis-NIR, Varian, Cary 5000. As medidas de absorção foram realizadas diretamente sobre os substratos de sílica a cada camada depositada e o crescimento dos filmes foi analisado observando o comprimento de onda em 280 nm, característico da absorção dos aminoácidos aromáticos presentes na fibroína e peptídeos.

3.6.4 *Espectroscopia de Correlação de Fótons*

As medidas de Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS), utilizadas para caracterizar o tamanho médio das NPs, foram realizadas em um espectrofotômetro PCS-100 Brookhaven Instruments, com goniômetro modelo BI200SM, laser de 25 MW, comprimento de onda de 532 nm, índice de refração real igual a 2,0. Foram realizadas 10 medidas de 30 segundos, totalizando 5 minutos.

3.6.5 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do Infravermelho para as NPs foram obtidos no espectrômetro FT-IR Spectrum 2000 da Perkin Elmer em pastilhas de KBr. Os espectros das amostras foram realizados com acúmulo de 32 varreduras com resolução de 2 cm^{-1} na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , em porcentagem de transmitância (%T).

3.6.6 Espectroscopia de Espalhamento Raman

Os espectros de Raman das NPs luminescentes foram medidos em um equipamento microRaman Horiba Jobin Yvon modelo LabRAM HR 800, operando com um laser de He-Ne em $632,81\text{ nm}$ equipado de câmera CCD modelo DU420A-OE-325 do mesmo fabricante. A grade de difração utilizada foi de $600\text{ linhas mm}^{-1}$.

3.6.7 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A técnica de Dicroísmo Circular (CD) estuda a propriedade observada em cromóforos que apresentam diferenças na absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Este fenômeno é muito observado em proteínas, por elas possuírem diversos centros de assimetria (carbonos α) distribuídos ao longo da sua cadeia principal. Com isso, a espectroscopia de CD torna possível caracterizar e quantificar diferentes tipos de estruturas secundárias de macromoléculas, dentre elas: α -hélice, folhas- β (paralelas e antiparalelas), vários tipos de voltas e estruturas randômicas.^[103,104]

Esta técnica é amplamente utilizada em estudos das mudanças de conformação, vizinhanças locais, interações de ligantes com proteínas, desnaturação e renaturação de proteínas, além da possibilidade de realizar a estimativa do conteúdo das frações de seus componentes de estrutura secundária.^[63,103]

Os espectros de CD das amostras em solução aquosa foram obtidos com uma cubeta de quartzo com 1 milímetro de caminho óptico. Os espectros de CD dos filmes automontados foram obtidos diretamente dos substratos de sílica nos quais foram preparados.

As medidas de CD foram realizadas em um Espectrômetro de Dicroísmo Circular J-815 (Jasco Inc., Tóquio, Japão), com a largura de banda de 1 nm , tempo de resposta de $0,5\text{ s}$ e velocidade de varredura de 100 nm / min . Os espectros CD foram obtidos calculando a média de 6 medidas.

3.6.8 Espectroscopia de Luminescência

A espectroscopia de luminescência é uma técnica baseada na propriedade que algumas moléculas possuem de emitir luz devido às transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estados de menor energia.^[105]

É uma técnica de caracterização que apresenta grande sensibilidade, cerca de quase 100 vezes maior do que a espectroscopia UV-vis. Este método também é seletivo, considerando que nem todas as substâncias que absorvem radiação eletromagnética são capazes de emitir luz.^[106]

Para a obtenção de um espectro de emissão, a amostra deve ser irradiada com um comprimento de onda fixo e a intensidade de luz reemitida é medida em uma faixa espectral definida. A escolha do comprimento de onda de excitação ideal para o registro do espectro de emissão é feita com base no espectro de absorção e, comumente, corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção. Já os espectros de excitação são obtidos mantendo-se fixo o comprimento de onda de emissão e se faz variar o comprimento de onda de excitação, sobre toda a faixa do seu espectro de absorção.^[107]

As fontes de luz, utilizadas para excitação das amostras, podem variar de acordo com o tipo de espectrofluorímetro usado, sendo as mais utilizadas as lâmpadas de xenônio, mercúrio e LED. A fonte de luz utilizada pode ser descrita em termos de comprimento de onda (λ), dado em nanômetros (nm), frequência (ν) ou número de ondas, dado em cm^{-1} , dependendo do equipamento.^[108]

Neste trabalho, as medidas de Luminescência foram realizadas com excitação em 280 nm, que é a faixa do comprimento de onda de absorção dos resíduos de aminoácidos aromáticos presentes nos peptídeos e biomoléculas utilizados. Para os filmes contendo NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, a excitação foi mantida em 280 nm que é também um comprimento de onda próximo do máximo de absorção da matriz de YVO_4 (290 nm - 300 nm), que absorve e transfere energia para o íon lantanídeo.

Os espectros foram obtidos utilizando um Fluorímetro RF-5301PC da Shimadzu Scientific Instruments, Inc. e um Fluorímetro Horiba Jobin Yvon (Spex Fluorolog-3), medidos à temperatura ambiente. Como fonte de excitação das amostras foi utilizado lâmpada de Xenônio 400 W.

3.6.9 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, em uma cela eletroquímica constituída de três eletrodos, sendo um deles um microeletrodo (ou eletrodo de trabalho), um eletrodo usualmente chamado de eletrodo de referência e um outro eletrodo auxiliar. O potencial é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva corrente vs potencial obtida é chamada de voltamograma.^[109]

Como a área dos dois eletrodos é diferente, o microeletrodo se polarizará, isto é, assumirá o potencial aplicado a ele. O eletrodo de referência, por possuir uma área grande, não se polarizará, mantendo o seu potencial constante. O microeletrodo é comumente feito de um material inerte no meio estudado, como ouro, platina, carbono ou mercúrio.^[109]

Os voltamogramas deste trabalho foram obtidos utilizando um Bipotesiostato / Galvanostato PalmSens3 com software da PSTrace 4.6. Os eletrodos utilizados para estas medidas foram os eletrodos de carbono impresso e como solução eletrolítica foi utilizada solução de tampão PBS. A velocidade de varredura foi de $0,05 \text{ V s}^{-1}$, com intervalo potencial de -0,6 a 0,6 V.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Síntese e caracterização de peptídeos e nanopartículas

4.1.1 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos propostos neste trabalho são derivados do peptídeo bioativo isolado e identificado a partir da secreção cutânea da rã *Hypsiboas albopunctatus*, nomeado hylina - a1 (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂). Esta molécula possui atividade contra diversos tipos de bactérias *Gram-positivas*, *Gram-negativas*, fungos e eritrócitos, além de possuir comprovadamente atividades antibacterianas.^[84,110]

Desta forma, foram sintetizados dois peptídeos análogos a hylina - a1, promovendo a substituição da leucina (L) na posição 6 por triptofano (W) e a adição de diferentes cargas na região N-terminal, sendo estas: (1) um resíduo de aspartato (D) que contém uma carga negativa em sua cadeia lateral (Hyl-D0-W6; DIFGAIWPLALGALKNLIK-NH₂) e (2) um resíduo de lisina (K) que adiciona carga positiva na extremidade (Hyl-K0-W6; KIFGAIWPLALGALKNLIK-NH₂).^[111]

Os peptídeos foram sintetizados e analisados em sistema CLAE analítico, Figuras 13 e 14 (cromatogramas vermelhos). Os solventes utilizados foram os descritos anteriormente (A e B), em um programa de 5 a 95% de B em 30 minutos. A purificação foi realizada em sistema CLAE semi-preparativo. As frações foram coletadas e analisadas novamente no equipamento analítico. Após a purificação, foram obtidas massas próximas a 10 mg de peptídeo puro, com grau de pureza > 90%, de acordo com o perfil cromatográfico mostrado nas Figuras 13 e 14 (cromatogramas azuis).

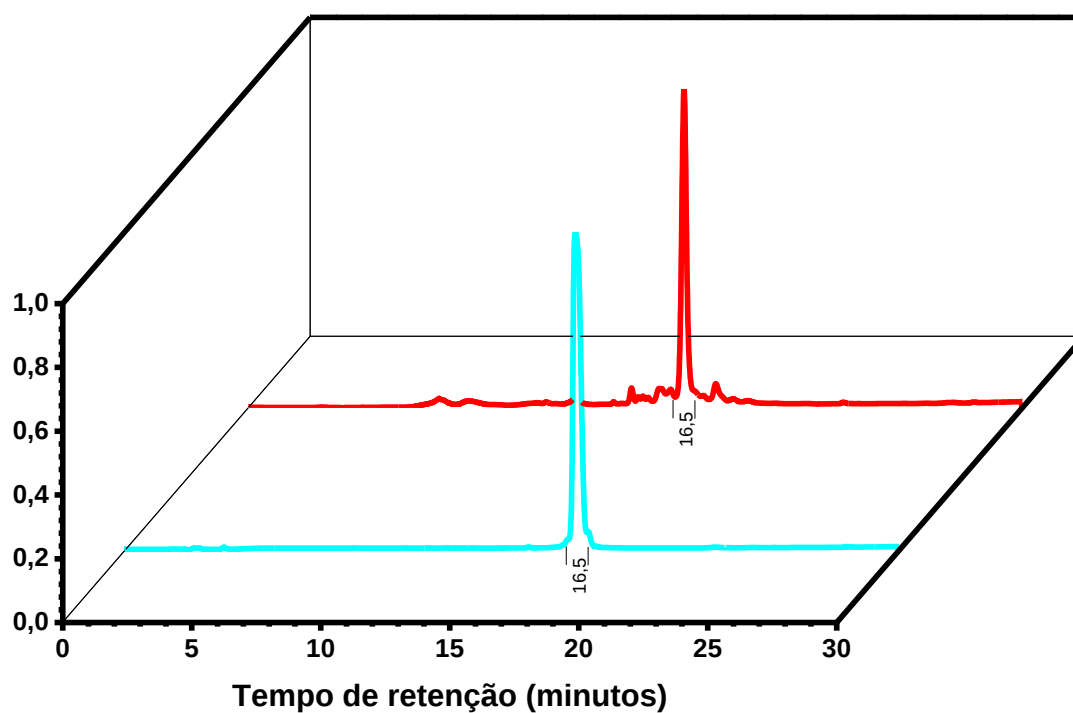


Figura 13. Cromatogramas referentes ao peptídeo Hyl-K0-W6 bruto com 76,1% de pureza (vermelho) e após purificação com 91%.

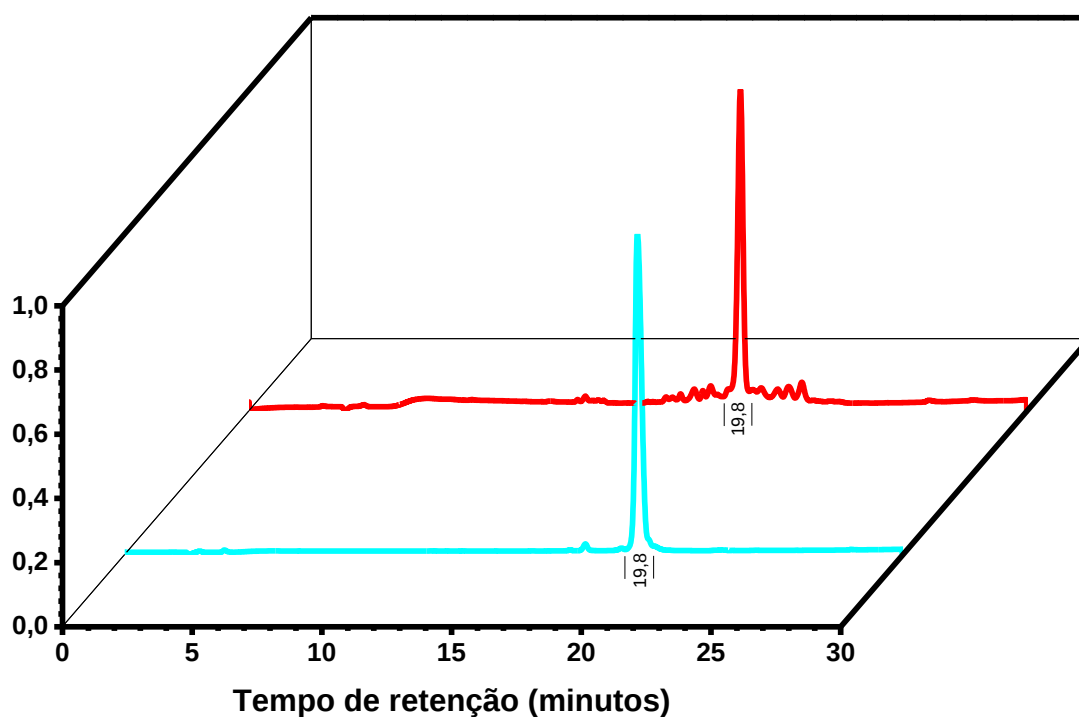


Figura 14. Cromatogramas referentes ao peptídeo Hyl-D0-W6 bruto com 74,7% de pureza (vermelho) e após purificação com 97% de pureza (azul).

Para confirmar o sucesso da síntese, os peptídeos purificados foram analisados por espectrometria de massas. Os resultados são mostrados na Tabela 1 e nas Figuras 15 e 16, confirmando a obtenção dos materiais desejados.

Tabela 1. Massas moleculares teóricas e experimentais obtidas para os peptídeos Hyl-K0-W6 e Hyl-D0-W6.

Peptídeos	MM teórica (g mol ⁻¹)	Experimental (m/z)
Hyl-K0-W6	2065,6	1033,7 (+2), 689,4 (+3), 517,7 (+4)
Hyl-D0-W6	2052,5	1027,2 (+2), 685,1 (+3)

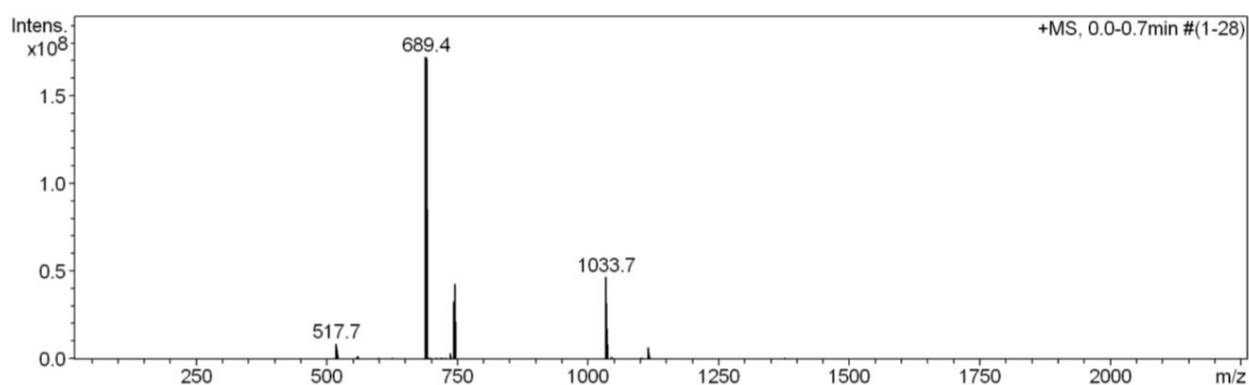


Figura 15. Espectro de massas correspondente ao peptídeo Hyl-K0-W6 purificado.

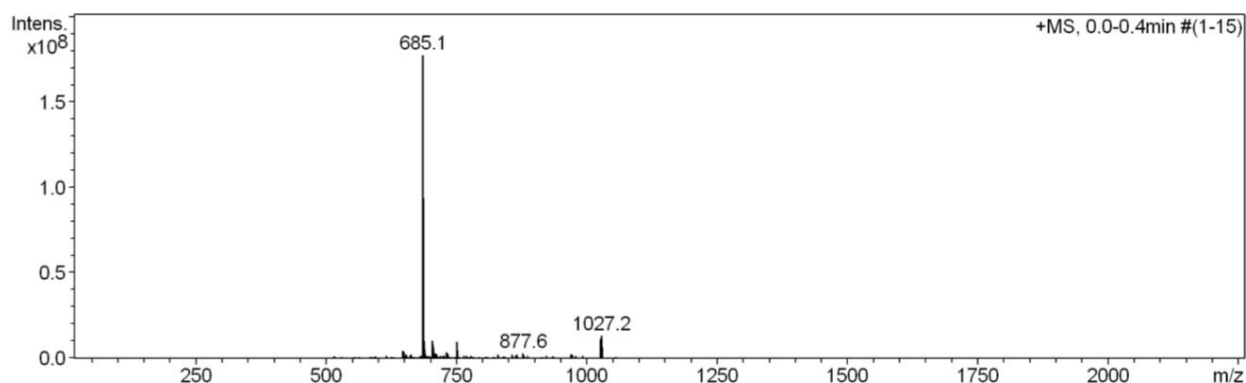


Figura 16. Espectro de massas correspondente ao peptídeo Hyl-D0-W6 purificado.

4.1.2 Análise por Dicroísmo Circular (CD)

Com o objetivo de confirmar as estruturas secundárias dos peptídeos e estudar o efeito destas estruturas na presença de NPs luminescentes, realizou-se a análise desses peptídeos por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) em tampão PBS, pH = 7,2 e na presença de TFE (trifluoetanol) 60% v/v em tampão PBS à temperatura ambiente.

Para analisar os espectros, inicialmente calculou-se a elipticidade molar $[\theta]$ dos peptídeos, através da Equação 1^[112]:

$$[\theta] = \frac{\text{valor (em milidegree)}}{10 * \ell * [\text{peptídeo}] * n^{\circ} \text{ de aa}}$$

onde o numerador é dado por cada valor obtido em milidegree pelo equipamento, ℓ é o caminho óptico utilizado na cubeta em centímetros (0,1 cm), $[\text{peptídeo}]$ é a concentração de peptídeo usada no experimento (80 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e n° de aa é a quantidade de resíduos de aminoácidos presentes em cada peptídeo (19 aa para ambos).

A elipticidade máxima em 222 nm foi calculada usando a fórmula $\text{máx}[\theta]_{222} = -40,000 \times [(1 - 2.5/n)] + (100 \times T)$, onde n é o número de resíduos de aminoácidos (19 resíduos) e T indica a temperatura em °C (25°C). A porcentagem de alfa-hélices presente nos peptídeos Hyl-K0-W6 e Hyl-D0-W6 em tampão PBS e em TFE foi obtida através da relação $100 \times [\theta]_{222}/\text{máx}[\theta]_{222}$ ^[113], Tabelas 2 e 3.

Os espectros de CD dos peptídeos em tampão PBS exibiram uma curva típica de estrutura desordenada (“*random coil*”), Figuras 17 e 18 (espectros pretos). Na presença de TFE, um solvente indutor de estrutura^[114], os espectros mostram que os peptídeos se estruturaram, passando de uma forma desordenada para alfa hélice. Isto foi indicado pelo aparecimento de duas bandas negativas em 208 e 222 nm,^[104] Figuras 17 e 18 (espectros vermelhos).

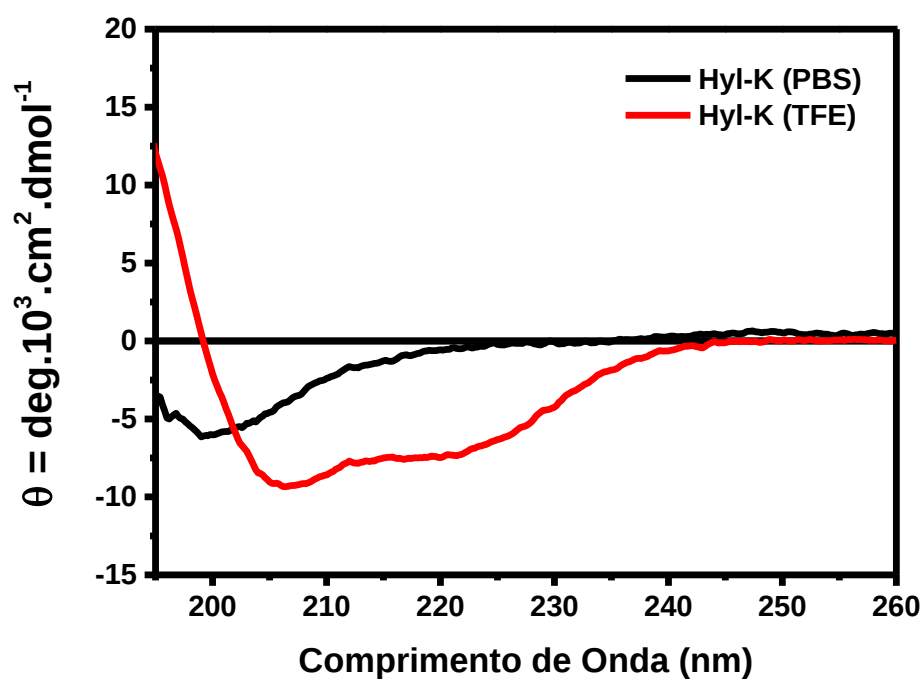


Figura 17. Espectros de Dicroísmo Circular correspondentes ao peptídeo Hyl-K0-W6 em solução de tampão PBS, pH = 7,2 (preto) e em TFE 60% v/v PBS (vermelho).

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.

Peptídeo	% de α -hélice
Hyl-K0-W6 em PBS	1,46
Hyl-K0-W6 em TFE	22,4

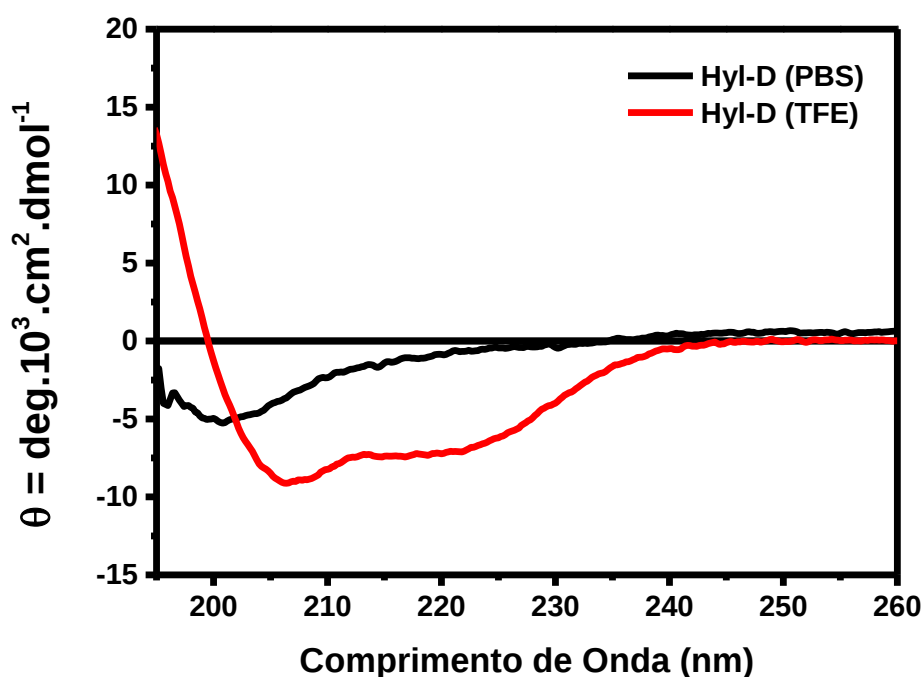


Figura 18. Espectros de Dicroísmo Circular correspondentes ao peptídeo Hyl-D0-W6 em solução de tampão PBS, pH = 7,2 (preto) e em TFE 60% v/v PBS (vermelho).

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.

Peptídeo	% de α -hélice
Hyl-D0-W6 em PBS	2,06
Hyl-D0-W6 em TFE	21,9

Deste modo, é possível observar e confirmar que o solvente TFE 60% induz organização estrutural de ambos os peptídeos em aproximadamente 20% de conformação secundária α -hélice, ou seja, a síntese dos peptídeos foi realizada com sucesso tanto em relação a sua estrutura primária, como observado pelos resultados de CLAE e Espectrometria de Massas, quanto a sua estrutura secundária, confirmado pelos espectros CD. A conformação secundária para os peptídeos é fator fundamental para que eles exerçam sua atividade antimicrobiana contra microorganismos como bactérias e fungos.

4.1.3 Síntese das Nanopartículas Luminescentes de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$

A Figura 19 apresenta os espectros de excitação e emissão obtidos para as nanopartículas de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ em solução aquosa com concentração 12 mmol L^{-1} . O espectro de emissão das NPs contendo európio apresenta bandas em torno de 595, 620 e 700 nm referentes à luminescência do európio. O espectro de excitação referente apresenta as linhas finas e fracas referentes a transições ff do Eu^{3+} em 394 e 465 nm e uma banda larga em aproximadamente 339 nm atribuída à transição de transferência de carga do grupo vanadato para o íon Eu^{3+} . A intensidade relativa da banda de transferência de carga e as bandas ff mostra a eficiência do processo de transferência de energia via este estado excitado.

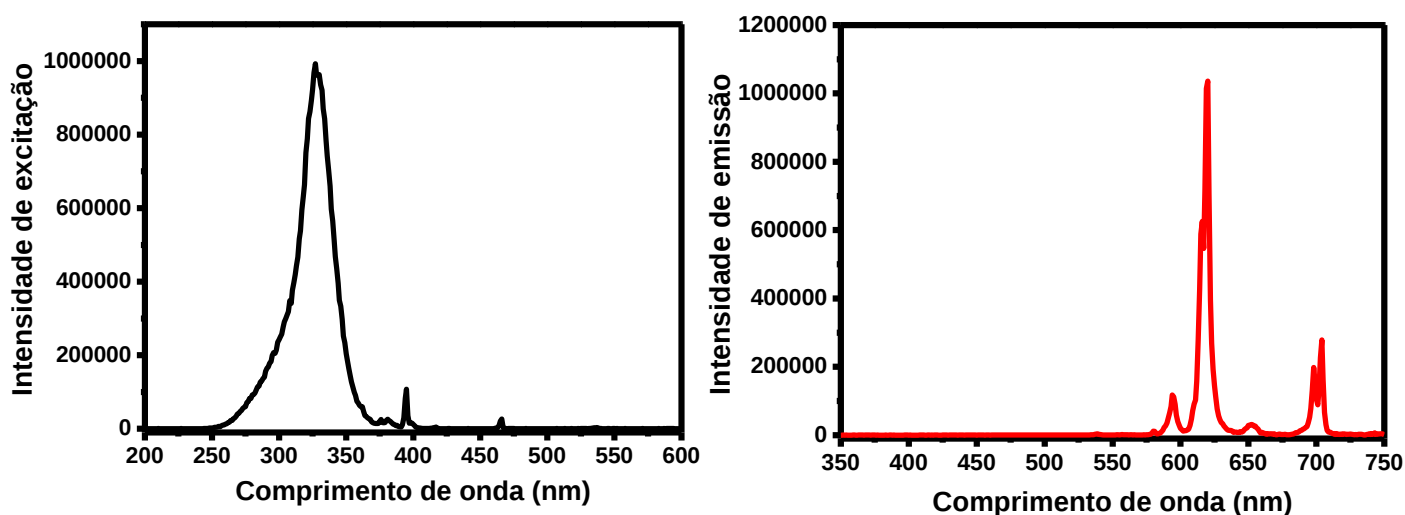


Figura 19. Espectros de excitação e de emissão das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ em solução aquosa com concentração 12 mmol L^{-1} .

A Figura 20 apresenta o histograma de Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS) das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$. O histograma foi obtido pelo espalhamento de luz causado pelas partículas suspensas em solução aquosa. O gráfico mostra a distribuição de tamanhos referente ao diâmetro das NPs. O diâmetro médio obtido foi de 21 nm e estas distribuições estão nas regiões de dimensões de acordo com às encontradas na literatura.^[115,116]

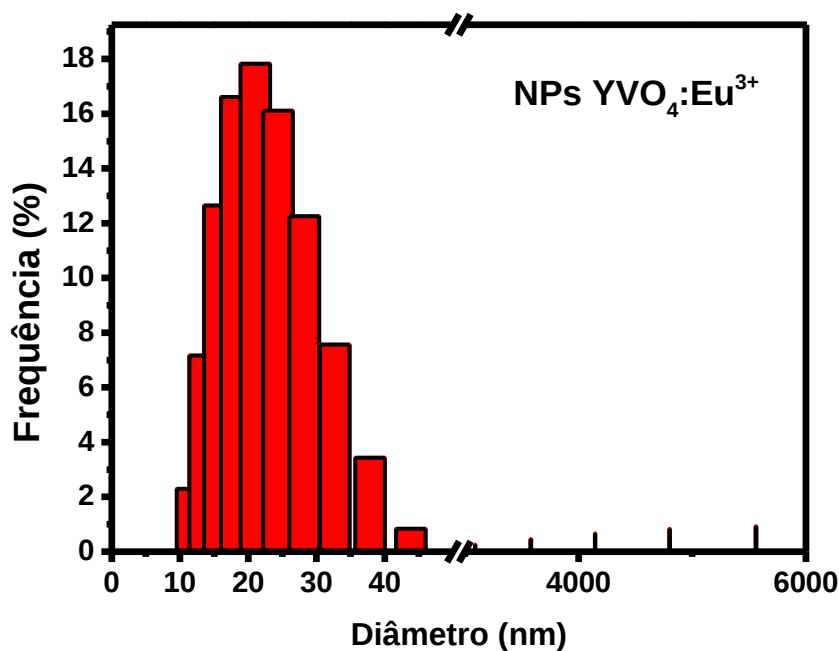


Figura 20. Distribuição de tamanhos das NPs de YVO₄:Eu³⁺, com diâmetro médio de 21 nm.

A Figura 21 mostra os resultados da Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho para as NPs de YVO₄:Eu³⁺. A principal atribuição que caracteriza as NPs é a banda em 792 cm⁻¹, característica do VO₄³⁻, e apresenta forte absorção no infravermelho entre 780-920 cm⁻¹.^[117] A banda em 3250 cm⁻¹ é referente ao estiramento OH, devido à presença de moléculas de água absorvidas pelas NPs. E as bandas em 1390 cm⁻¹ e 1557 cm⁻¹ são, respectivamente, atribuídas a vibrações simétricas e assimétricas de grupos COO⁻, devido às NPs de YVO₄:Eu³⁺ estarem cercadas por grupos citratos que não foram removidos por tratamento térmico. Os dois pequenos picos em 1076 cm⁻¹ e 1256 cm⁻¹ correspondem ao estiramento CO que confirmam claramente a presença do citrato ligado à superfície das NPs.^[117]

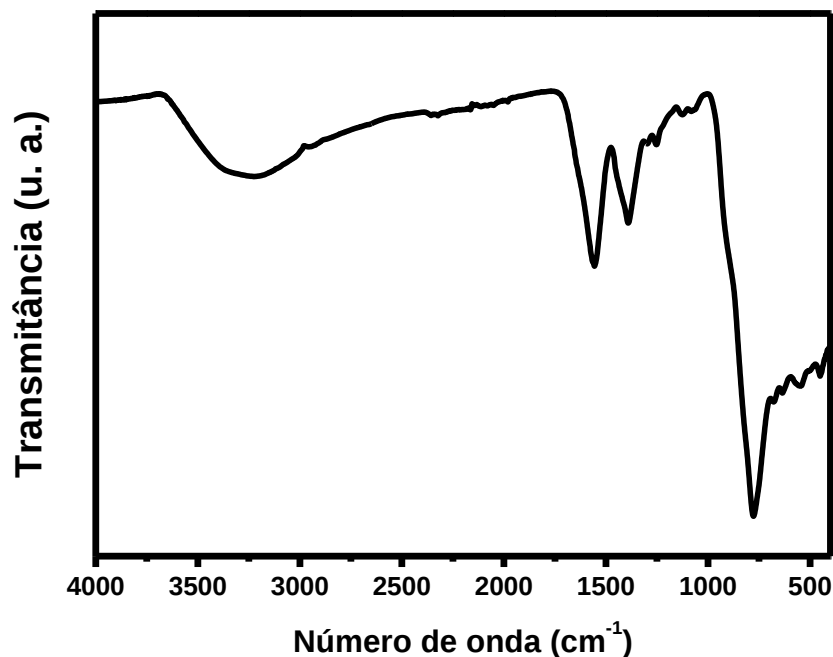


Figura 21. FT-IR das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ na faixa de absorção de 4000 a 400 cm^{-1} .

A fim de complementar as informações fornecidas por FT-IR, foram realizadas medidas de Espectroscopia Raman. Se uma molécula possui um centro de simetria, esta vibração corresponde a um modo de vibração ativo no Raman e inativo para FT-IR. O espectro Raman na região de 100-1000 cm^{-1} das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ é apresentado na Figura 22. Observa-se um pico intenso por volta de 880 cm^{-1} , atribuído ao estiramento simétrico do V – O, e um ombro próximo a 800 cm^{-1} atribuído ao estiramento assimétrico do V – O. Os picos em torno de 390 cm^{-1} e 480 cm^{-1} são característicos de dobramentos do grupo VO_4^{3-} . Os picos em 150 cm^{-1} e 264 cm^{-1} podem ser atribuídos aos modos externos de vibração (fônons).^[118]

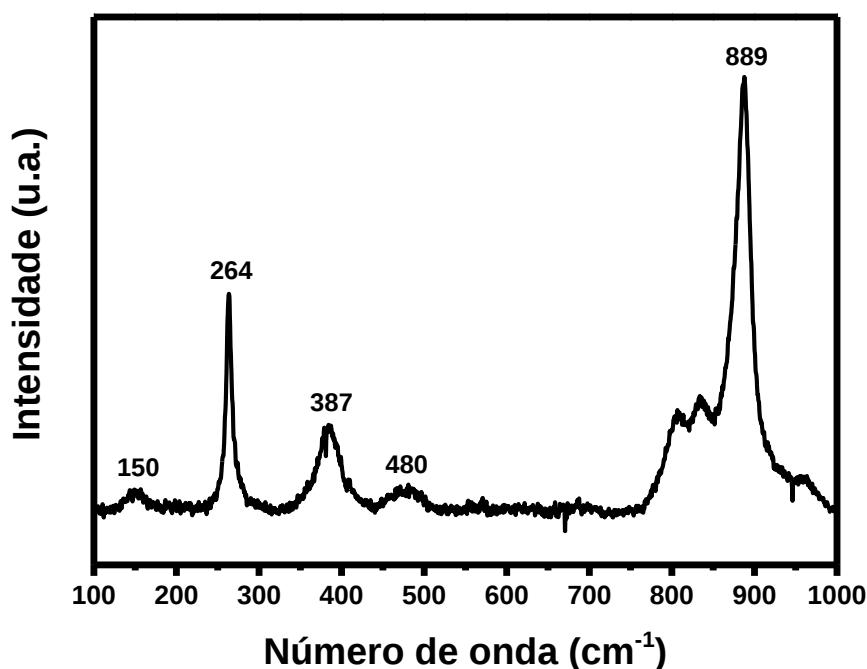


Figura 22. Espectro Raman das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ na faixa de absorção de 100 a 4000 a cm^{-1} .

A Figura 23 apresenta os espectros de excitação ($\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$) de soluções de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ com diferentes concentrações. Um efeito significativo no máximo da banda larga de absorção referente à transferência de energia dos grupos VO_4^{3-} para o íon európio foi observado conforme foram realizadas diluições a partir da concentração de 12 mmol L^{-1} das NPs. O máximo dessas bandas se desloca para menores comprimentos de onda conforme a concentração das NPs é diminuída em solução, ou ainda, o aumento da concentração das NPs descola o máximo da excitação para comprimentos de onda em direção ao vermelho. A explicação para esse deslocamento da banda de excitação está no fato de que, com o aumento da concentração de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ em solução, dois fatores devem ser considerados: (1) movimento Browniano, ou seja, aumenta o impacto frequente das NPs e (2) provavelmente alguns agregados são formados. Com isso, à medida que a energia de excitação transfere de um grupo VO_4^{3-} a outro grupo VO_4^{3-} , uma parte da energia de será perdida devido à liberação de um ou vários fônons. Desta forma, a transferência de energia do VO_4^{3-} para o íon Eu^{3+} diminuirá, levando ao deslocamento da banda para o vermelho nos espectros de excitação.^[116]

Nota-se ainda uma grande diferença na intensidade relativa entre a banda de absorção do VO_4^{3-} e as linhas finas referentes às transições ff do íon lantanídeo como, por exemplo, em 394 nm e 465 nm. Esse efeito é causado por uma “armadilha experimental”, já que os espectros de excitação estão normalizados e a absorção é dada pela lei de Lambert Beer ($A =$

$\varepsilon \ell c$), onde a absorvância (A) é diretamente proporcional ao coeficiente de absorção molar (ε), ao caminho óptico da cubeta (ℓ) e à concentração do material (c). Aparentemente as linhas finas características da excitação do íon európio desaparecem devido ao aumento da intensidade da banda larga característica da excitação dos grupos VO_4^{3-} , entretanto, com um zoom, é possível observá-las e confirmar que o efeito da concentração apenas mascara a exibição destas linhas.^[119]

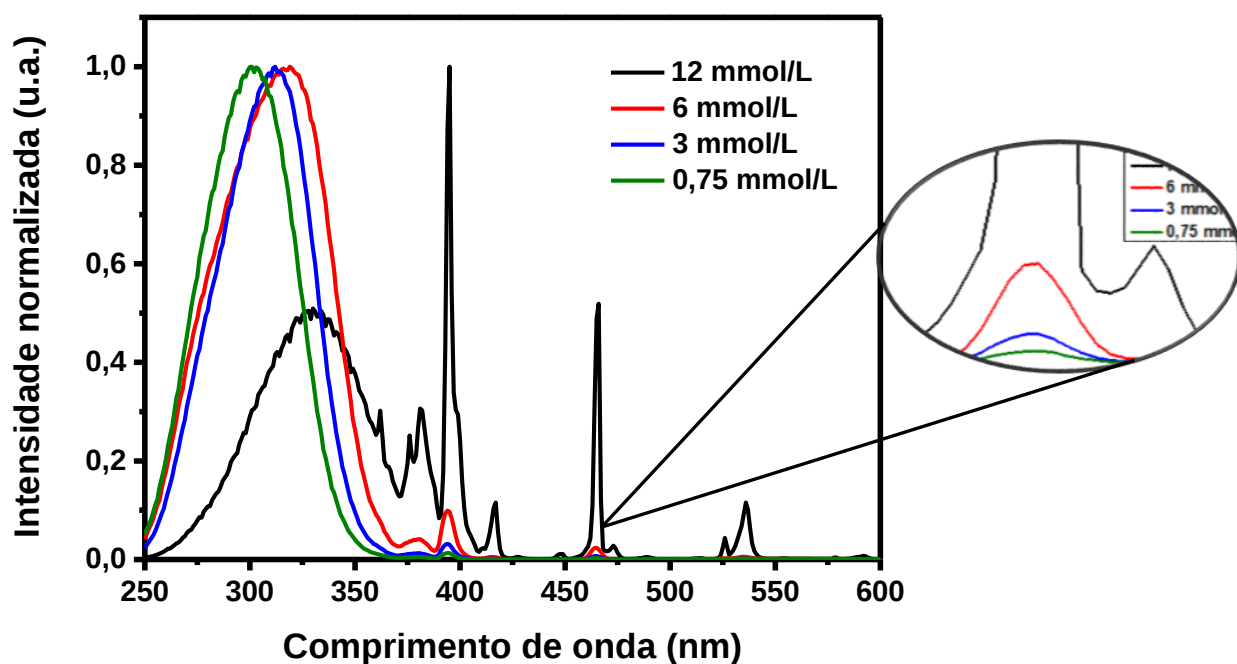


Figura 23. Espectros de excitação das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$) com diferentes concentrações em solução. Zoom: linhas de excitação características do íon Eu^{3+} em 465 nm.

Já para os espectros de emissão, Figura 24, as transições $^5\text{D}_0\text{-}^7\text{F}_j$ (transições J de 1 – 4) do íon Eu^{3+} podem ser claramente observadas e as configurações espectrais em diferentes concentrações de soluções não mudam, apenas diminuem em intensidade.

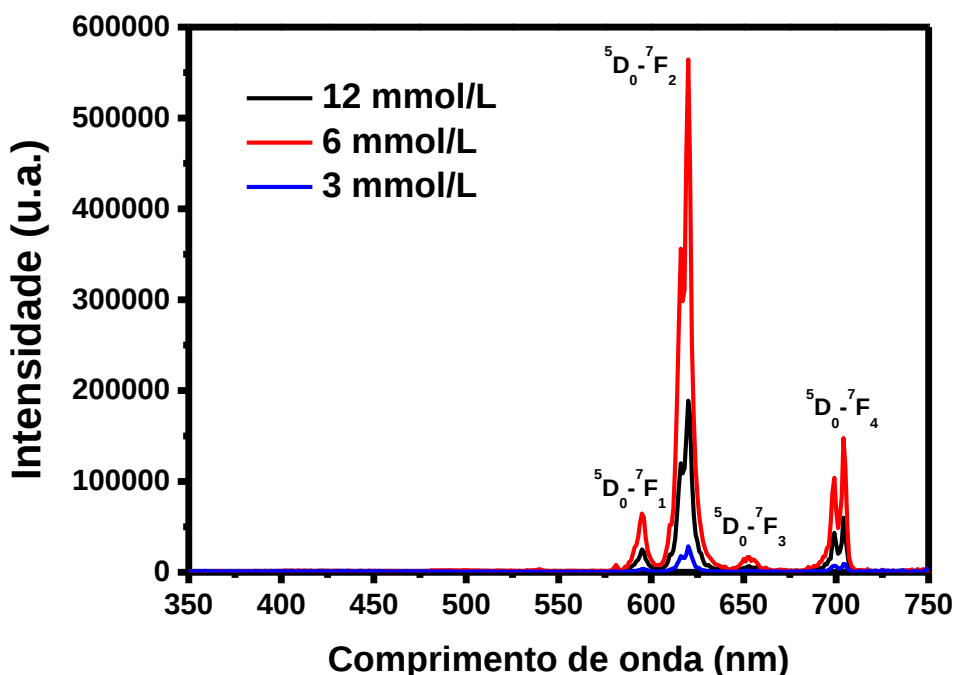


Figura 24. Espectros de emissão das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$) com diferentes concentrações em solução.

Esse efeito da diluição em relação ao deslocamento da banda de excitação do vanadato com a concentração das NPs, foi essencial para este trabalho, já que foi possível utilizar uma concentração ideal das NPs, visando a sobreposição com as bandas de excitação das proteínas e peptídeos, que possuem uma banda característica em 280 - 300 nm, referente à absorção pelos resíduos de aminoácidos aromáticos, tais como o triptofano (W), tirosina (Y) e fenilalanina (F). A concentração ideal das NPs utilizada para todos os estudos posteriores foi de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.2 Estudo da interação entre peptídeos e NPs em solução e filmes

Segundo a literatura, o anel indol de resíduos de triptofano (W), estrategicamente posicionado nas cadeias peptídicas, age como sensibilizador de íon térbio (Tb^{3+}) sob excitação em 280 nm.^[120] Ambos os peptídeos possuem um resíduo de W na posição 6 da cadeia e cada um destes resíduos admite um posicionamento diferente na estrutura secundária. Quando os peptídeos são estruturados, por exemplo na presença de um solvente indutor de estrutura (TFE), como visto nos resultados anteriores, o W6 de um peptídeo está na estrutura em hélice-alfa e no outro peptídeo não, Figura 25.

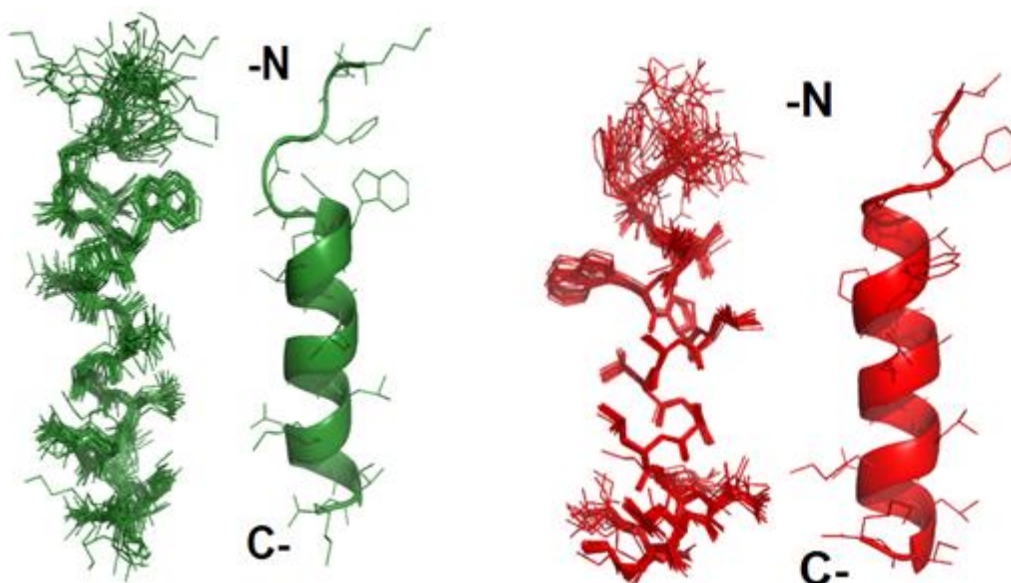


Figura 25. Estrutura secundária adquirida pelos peptídeos quando na presença de um solvente indutor (TFE). À esquerda, representação do peptídeo Hyl-K0-W6 (verde) e à direita Hyl-D0-W6 (vermelho), respectivamente.

Com o intuito de estudar a influência do resíduo de W presente nos peptídeos Hyl-K0-W6 e Hyl-D0-W6 sobre a luminescência das NPs de lantanídeos em solução, foram realizadas medidas de Espectroscopia de Luminescência. As Figuras 26 e 27 apresentam os espectros representativos dos resultados de emissão e de excitação das soluções das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ com a adição gradual de pequenos volumes (“titulação”) de ambos os peptídeos dispersos em solução tampão, ou seja, sem estrutura secundária definida. O comportamento de supressão de luminescência foi o mesmo tanto com a adição do peptídeo Hyl-K0-W6 quanto para a adição do Hyl-D0-W6. A cada volume adicionado, foi observado diminuição da banda característica da emissão do európio, em 620 nm. O mesmo foi observado nos espectros de excitação, onde a banda em 280-300 nm foi diminuindo a cada adição peptídica.

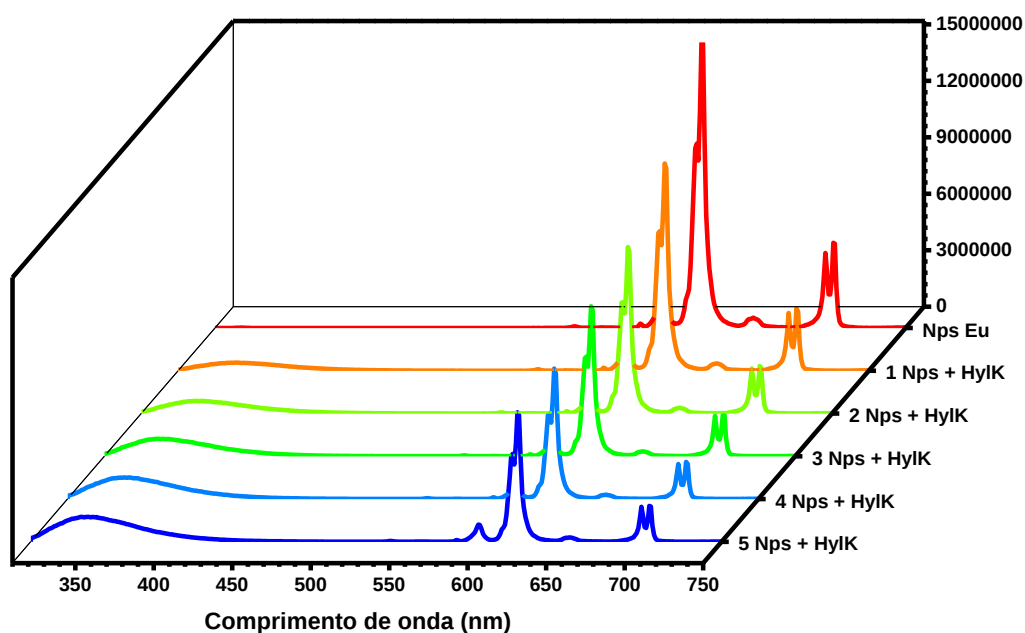


Figura 26. Espectros emissão ($\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm) das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ conforme adição de Hyl-K0-W6 em solução tampão.

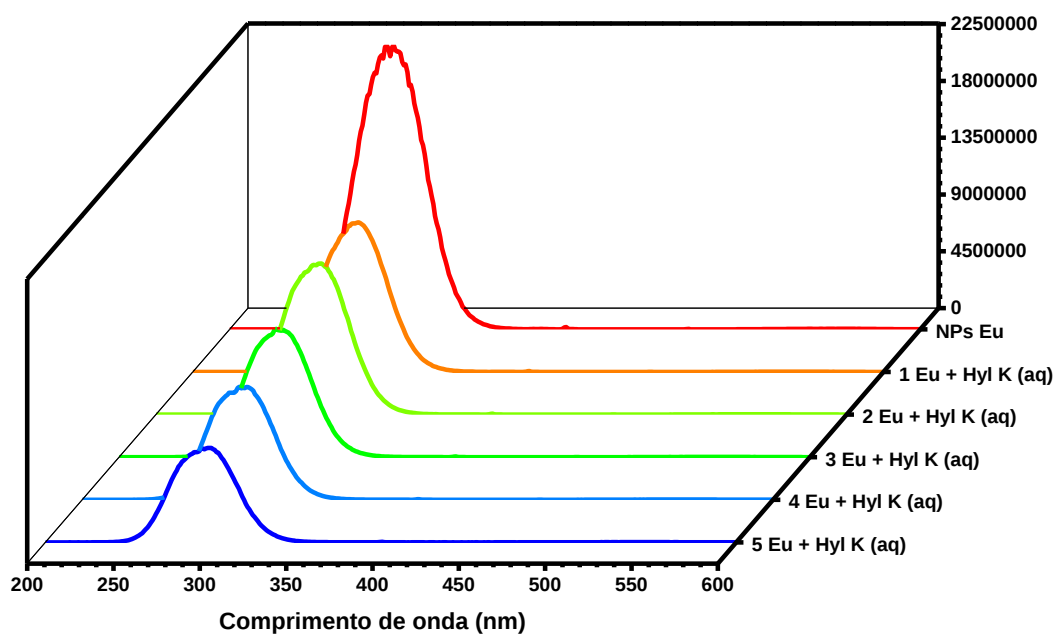


Figura 27. Espectros excitação ($\lambda_{\text{em.}}$ 620 nm) das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ conforme adição de Hyl-K0-W6 em solução tampão.

O estudo foi também realizado com os peptídeos dispersos em solução TFE 60% para analisar a influência que a estrutura secundária dos peptídeos teria em relação à luminescência das NPs. Porém, com a adição gradual de pequenos volumes (“titulação”) dos peptídeos dispersos em TFE, ou seja, com a adição dos peptídeos estruturados em α -hélice, foi observado também a supressão da luminescência do európio em 620 nm, além da diminuição da banda de excitação em 280-300 nm em ambas as NPs.

Mudanças no pH e na concentração dos peptídeos foram realizadas para estudar o efeito na presença das NPs, porém para todos os estudos, os resultados levaram-nos a concluir que o W presente nos peptídeos Hyl-K0-W6 e Hyl-D0-W6, em solução, não possui eficiência quanto à transferência de energia para a matriz vanadato das NPs. Isso ocorre provavelmente devido ao efeito de diluição após a adição dos peptídeos sobre as NPs.

Para haver uma eficiência na transferência de energia entre os níveis ressonantes, a distância entre os átomos influencia muito, por isso é realmente muito difícil de ser obtida entre compostos em solução quando não há fortes interações entre as espécies. Com isso, e a partir dos resultados obtidos em solução, estudou-se a influência destes mesmos peptídeos no estado sólido, em forma de filmes, contendo estas NPs. Os filmes foram preparados pela técnica de deposição *LbL*, contendo a SF como matriz de imobilização das NPs, e foram caracterizados por Espectroscopia de Luminescência.

As Figuras 28 e 29 apresentam os espectros de emissão e excitação dos filmes de SF/YVO₄:Eu³⁺ na presença de uma camada dos peptídeos adicionada sobre as superfícies. Há aumento na intensidade característica do európio em 620 nm para os filmes somente na presença do Hyl-K0-W6. A análise dos espectros de excitação destes filmes indica uma possível transferência de energia, que foi realmente maior para o filme formado com o peptídeo Hyl-K0-W6. Para os filmes analisados com formação de uma camada sobre a superfície contendo as NPs, utilizando os peptídeos dispersos em solução TFE 60%, houve mudanças físicas aparentes nos filmes, como turbidez e a supressão de luminescência foi observada para todos eles, o que fez com que o estudo dos peptídeos dispersos neste solvente fosse também descartado nas análises posteriores. Provavelmente o TFE reage com a SF, fazendo com que o sistema perca sua estabilidade, ou seja, o TFE pode inibir a imobilização adequada das NPs à camada de fibroína.

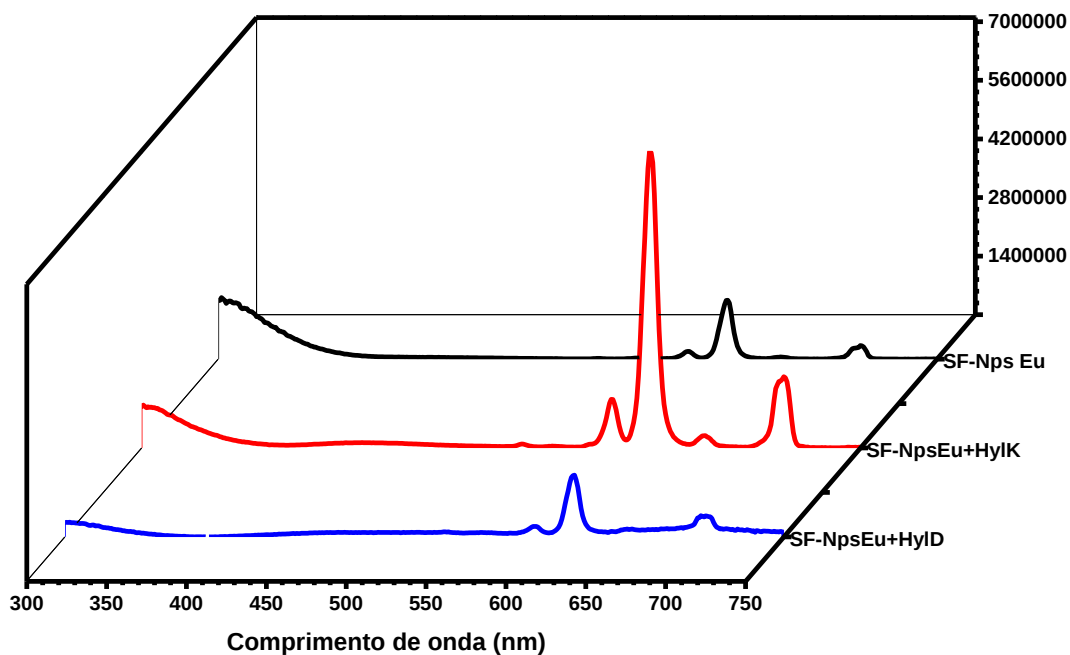


Figura 28. Espectros de emissão ($\lambda_{exc.}$ 280 nm) dos filmes de SF/NPs de $YVO_4:Eu^{3+}$ (preto), SF/NPs+Hyl-K0-W6 (vermelho) e SF/NPs+Hyl-D0-W6 (azul) formados a partir da evaporação da solução tampão dos peptídeos.

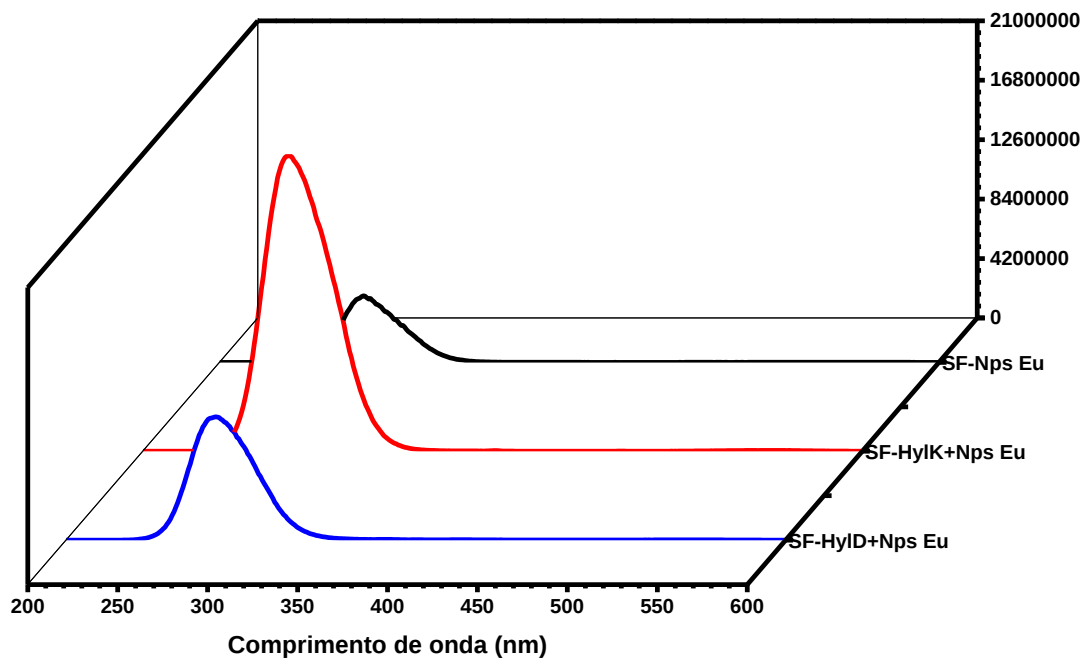


Figura 29. Espectros de excitação ($\lambda_{em.}$ 620 nm) dos filmes de SF/NPs de $YVO_4:Eu^{3+}$ (preto), SF/NPs+Hyl-K0-W6 (vermelho) e SF/NPs+Hyl-D0-W6 (azul) formados a partir da evaporação da solução tampão dos peptídeos.

Como a intensidade de emissão foi significativamente maior para o filme SF/YVO₄:Eu³⁺+Hyl-K0-W6, medidas de Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) foram realizadas com o intuito de observar se as NPs induzem alguma estrutura secundária aos peptídeos em solução, Figura 30. Observa-se, de fato, que as NPs de YVO₄:Eu³⁺ podem ser consideradas como possíveis indutoras da estrutura secundária para o peptídeo Hyl-K0-W6, que apresenta espectro CD muito próximo de uma estrutura característica de α -hélice, com máximo em 195 nm e um mínimo em 208 nm. O mesmo não ocorre para o peptídeo Hyl-D0-W6, na qual as NPs não induzem estrutura a este peptídeo.

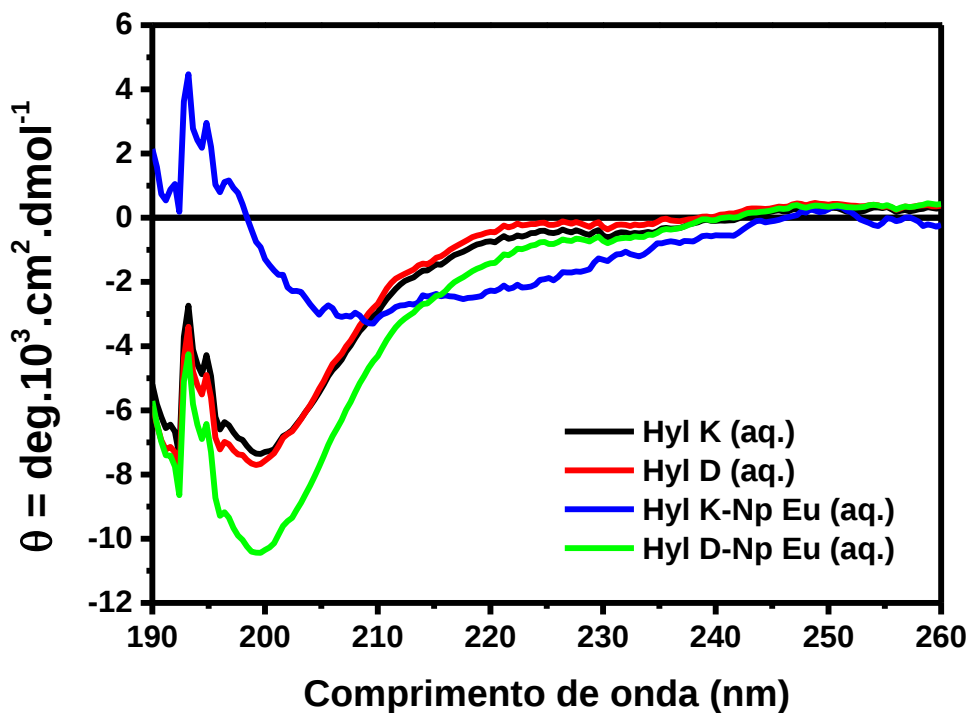


Figura 30. Espectros de Dicroísmo Circular (CD) dos peptídeos Hyl-K0-W6 e Hyl-D0-W6 em solução tampão PBS, pH 7,2 e na presença de NPs de YVO₄:Eu³⁺.

Os resultados de CD levam a concluir que, provavelmente, o aumento da luminescência do Eu³⁺ observada após a adição do Hyl-K0-W6 sobre o filme automontado de SF/YVO₄:Eu³⁺ ocorre devido à possível indução do peptídeo quando em contato com as NPs.

Para elucidar tais resultados, foi realizado um estudo minucioso referente à interação e influência do peptídeo Hyl-K0-W6, variando suas concentrações, sobre as NPs de YVO₄:Eu³⁺. Novos filmes *LbL* foram preparados contendo 10 bicamadas de SF/YVO₄:Eu³⁺ e o peptídeo Hyl-K0-W6 foi adsorvido sobre os filmes, camada por camada, em diferentes concentrações.

Os espectros de emissão e excitação (em. 620 nm) do filme de SF/NPs antes e após a adição do peptídeo Hyl-K0-W6 em diferentes concentrações, são apresentados nas Figuras 31 e 32. Após a primeira adsorção do peptídeo, com concentração 10^{-6} mg mL⁻¹ há um moderado aumento na intensidade de emissão característica do íon Eu³⁺. Após as seguintes adsorções, com diferentes concentrações de Hyl-K0-W6, a intensidade de emissão do Eu³⁺ passa a ter comportamento aleatório. A banda de emissão em 320 nm característica dos resíduos de W também apresenta comportamento aleatório, além de apresentar um leve deslocamento a partir da adsorção do peptídeo em maior concentração. Os espectros de excitação referentes à emissão em 320 nm, Figura 33, corroboram com os resultados de emissão observados.

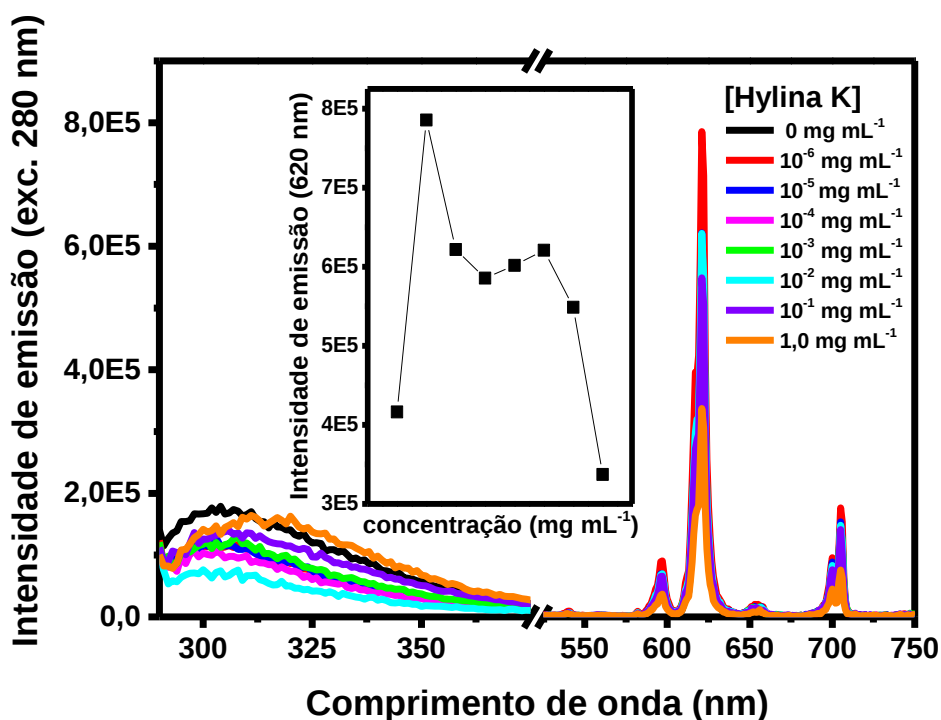


Figura 31. Espectros de emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 620 nm.

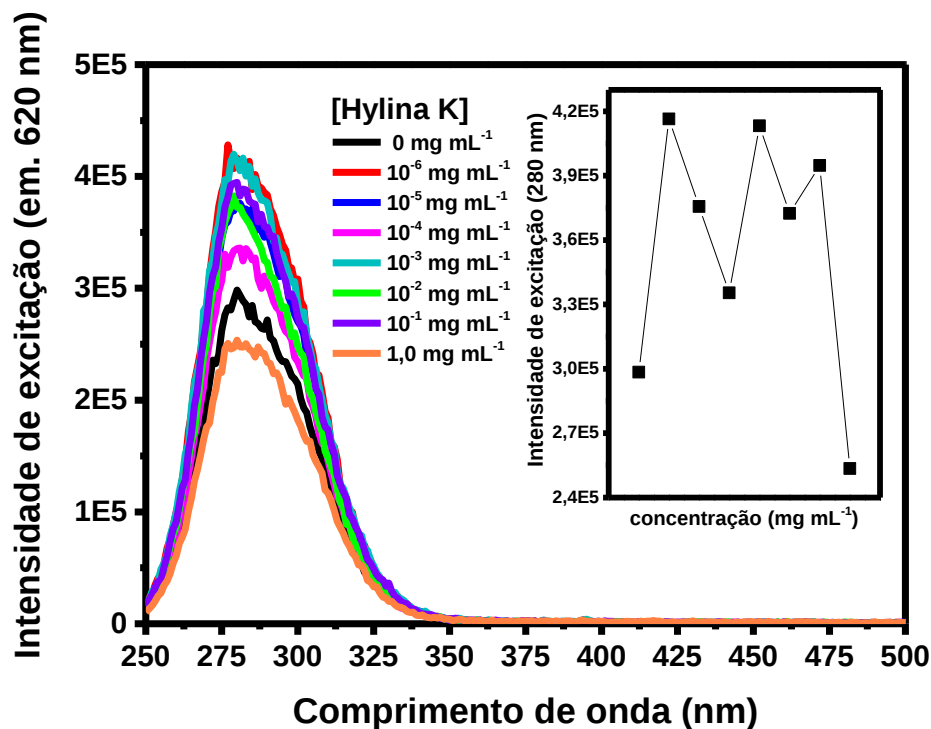


Figura 32. Espectros de excitação (λ_{em} 620 nm) do filme de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 280 nm.

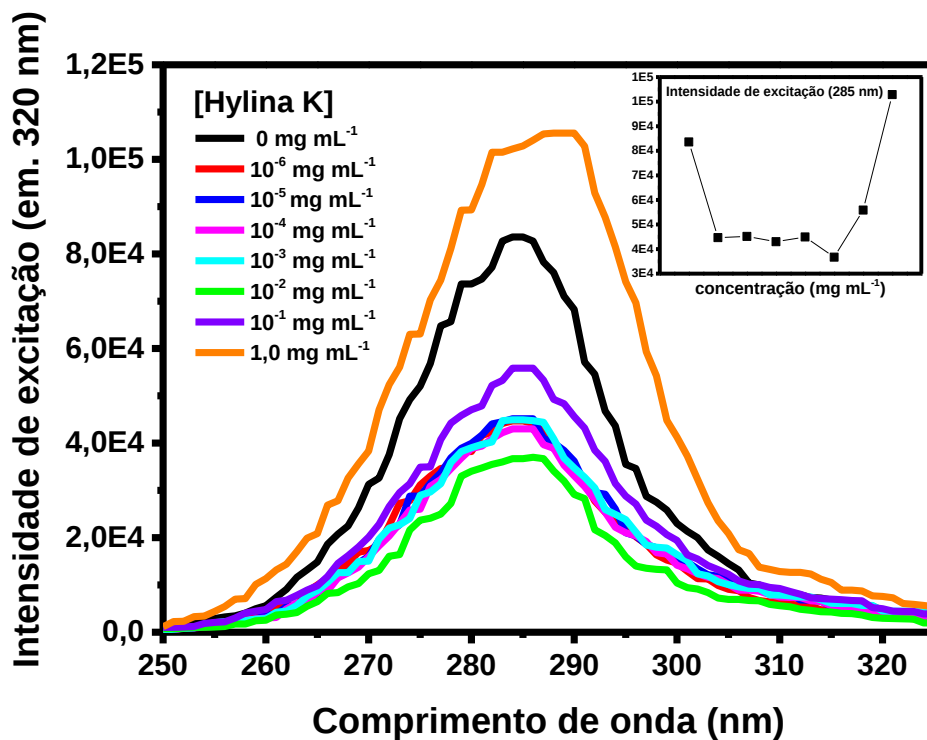


Figura 33. Espectros de excitação (λ_{em} 320 nm) do filme de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 285 nm.

A partir destes resultados, foi observado que há uma possível e eficiente transferência de energia somente após a primeira deposição de peptídeo sobre o filme. Isso pode ocorrer devido ao preenchimento completo da camada após a adsorção, fazendo com que as próximas deposições tenham os resíduos de aminoácidos aromáticos mais distantes das NPs, o que leva a uma menor interação com a matriz de vanadato, e consequentemente diminui a eficiência de transferência de energia entre eles. O caso foi então investigado adicionando-se diversas concentrações do peptídeo, porém sobre filmes preparados em diferentes substratos de sílica, já que a primeira adsorção do peptídeo é que se faz aparentemente mais eficiente.

A Figura 34 mostra os espectros de emissão para cada filme de SF/YVO₄:Eu³⁺, desde um padrão, ou seja, sem adsorção do peptídeo, na qual o espectro apresentado é uma média de todos os filmes antes da adsorção do Hyl-K0-W6 (todos os filmes apresentaram intensidades de emissão muito próximas) e os filmes após adsorção do Hyl-K0-W6 com as respectivas concentrações: A: 10⁻⁶ mg; B: 10⁻⁵ mg mL⁻¹; C: 10⁻⁴ mg mL⁻¹; D: 10⁻³ mg mL⁻¹; E: 10⁻² mg mL⁻¹; F: 10⁻¹ mg mL⁻¹ e G: 1,0 mg mL⁻¹. Foi observado para cada filme, que há aumento da luminescência característica da banda ⁵D₀ → ⁷F₂ do Eu³⁺, e esse aumento ocorre de forma linear em relação à concentração de peptídeo. É evidente, portanto, que há uma possível transferência de energia proveniente dos aminoácidos aromáticos para a matriz vanadato, que consequentemente transfere mais eficientemente para o íon Eu³⁺, e essa transferência depende da concentração de peptídeo adicionado. Isso ocorre, provavelmente, devido aos filmes *LbL* possuírem provavelmente as mesmas quantidades de material adsorvidas e ao fato de, após secagem da camada de peptídeo sobre a superfície dos filmes, a quantidade dos aminoácidos aromáticos ser suficiente para que ocorra os mecanismos de transferência de energia entre os níveis ressonantes.

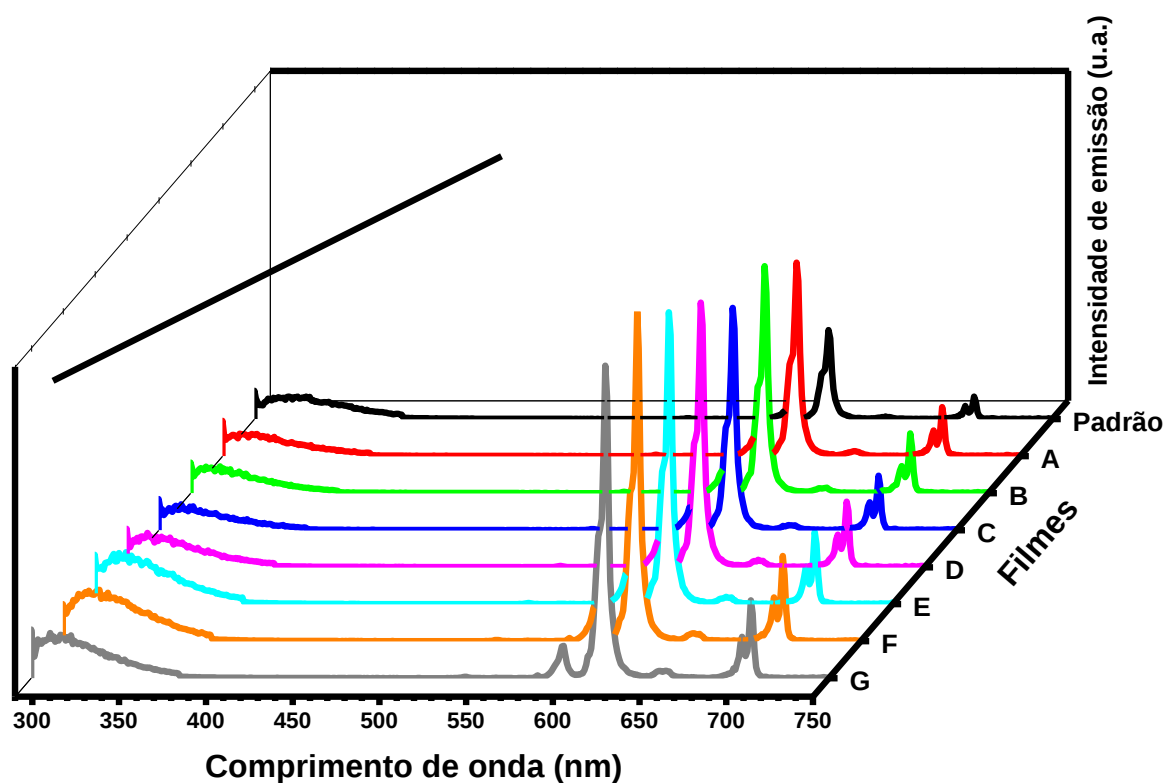


Figura 34. Espectros de emissão ($\lambda_{exc.}$ 280 nm) e excitação dos filmes de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas.

Os espectros de excitação (em. 620 nm e em. 320 nm) são apresentados nas Figuras 35 e 36 e corroboram com os resultados observados pelos espectros de emissão, confirmando que a concentração do peptídeo interfere linearmente nos mecanismos de transferência de energia entre os níveis ressonantes dos aminoácidos aromáticos e os níveis da matriz vanadato, preferencialmente quando a emissão é fixa na emissão característica do íon lantanídeo em 620 nm.

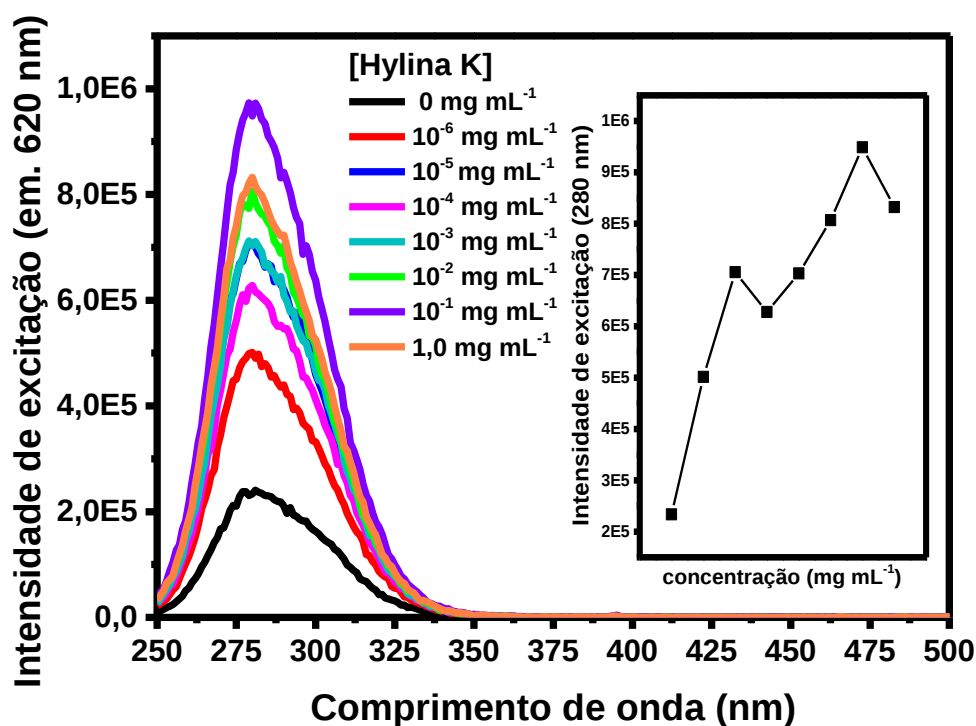


Figura 35. Espectros de excitação (λ_{em} . 620 nm) dos filmes de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 280 nm para os espectros.

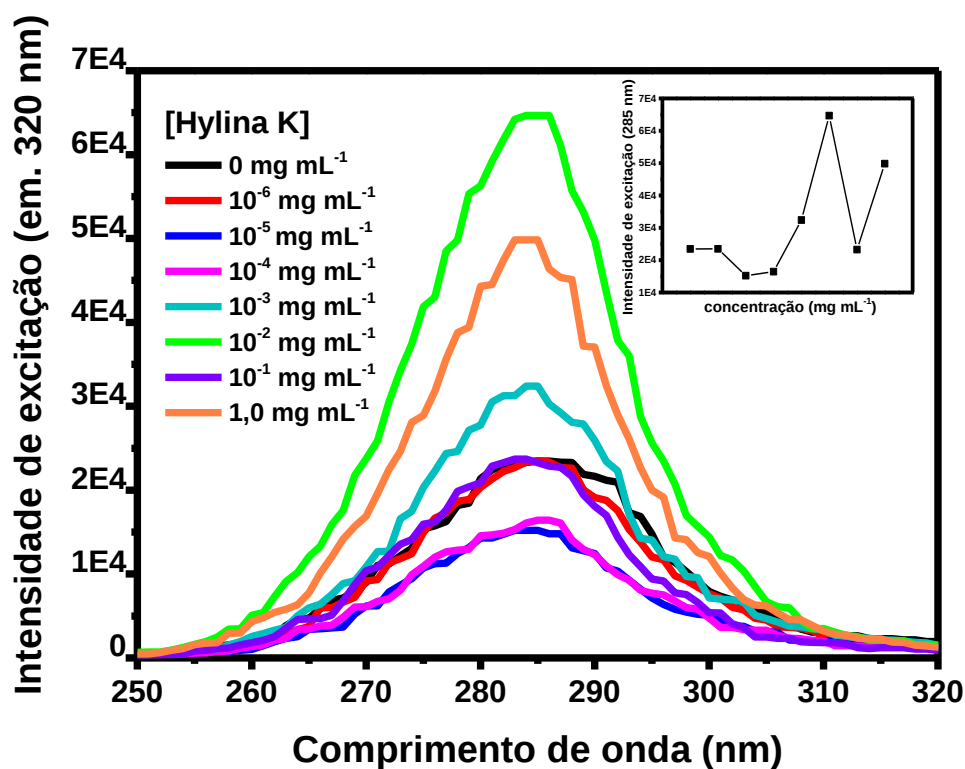


Figura 36. Espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) dos filmes de SF/NPs na presença de diferentes concentrações de Hyl-K0-W6 adsorvidas. Inserção: comportamento referente aos máximos das intensidades em 280 nm para os espectros.

4.3 Filmes de SF/peptídeos/YVO₄:Eu³⁺ na presença da proteína PBP2a visando a detecção da bactéria MRSA

Os peptídeos Hyl-K0-W6 e Hyl-D0-W6, propostos neste trabalho para os estudos espectroscópicos, apresentam atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente (MRSA). A partir disso, e como estratégia de aplicá-los em biossensores, foram preparados filmes *LbL* contendo fibroína como matriz de imobilização na ausência e presença destes peptídeos com e sem NPs luminescentes de YVO₄:Eu³⁺ para estudar o efeito causado pela adsorção da proteína PBP2a sobre eles.

O crescimento desses filmes foi monitorado por Espectroscopia de UV-vis a cada camada depositada. As Figuras 37 a 39 mostram os espectros de absorção referentes aos filmes de SF, SF/Hyl-D0-W6, SF/Hyl-K0-W6, SF/NPs, SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs, respectivamente. As inserções em cada gráfico mostram aumento linear do máximo de absorção por volta de 280 nm em função do número de camadas ou bicamadas depositadas. Este comprimento de onda é característico da absorção dos resíduos de aminoácidos aromáticos. Para o filme de SF, o aumento linear foi quase máximo ($R^2 = 0,98$), indicando que a cada camada de fibroína depositada há adsorção de material, ou seja, as camadas de fibroína crescem umas sobre as outras. Para os filmes contendo bicamadas de SF/peptídeos e SF/peptídeos+NPs os aumentos lineares observados foram $R^2 \geq 0,95$ e o crescimento quase linear indica que a mesma quantidade dos peptídeos e/ou peptídeos+NPs foi provavelmente adsorvida em cada deposição sobre a fibroína, confirmando o sucesso do crescimento dos filmes, bem como da SF ser uma excelente matriz de imobilização para as biomoléculas e NPs.

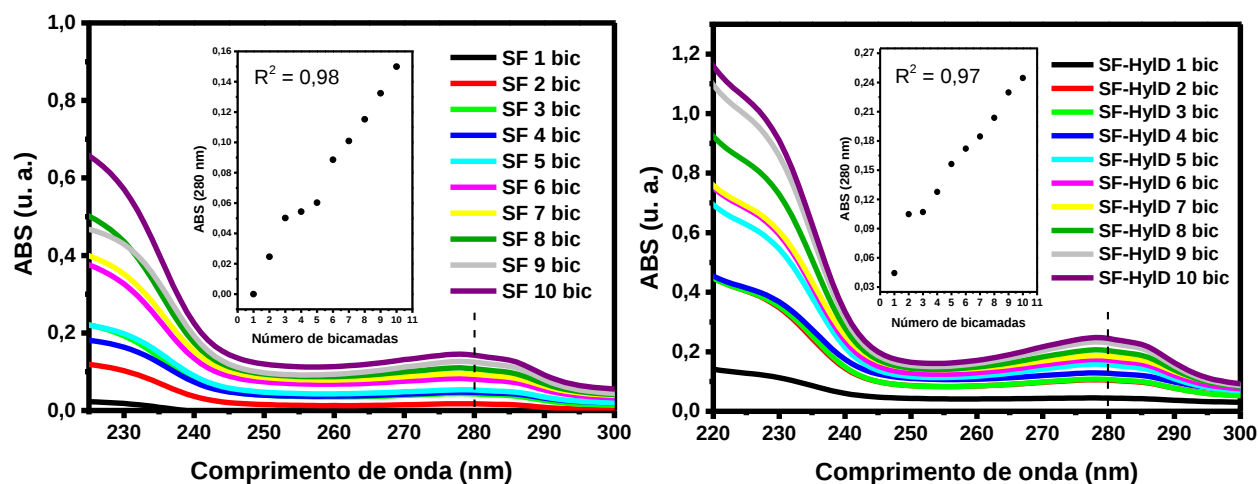


Figura 37. Espectros UV-vis. dos filmes de SF e SF/Hyl-D0-W6 contendo diferentes números de camadas e bicamadas, respectivamente. *

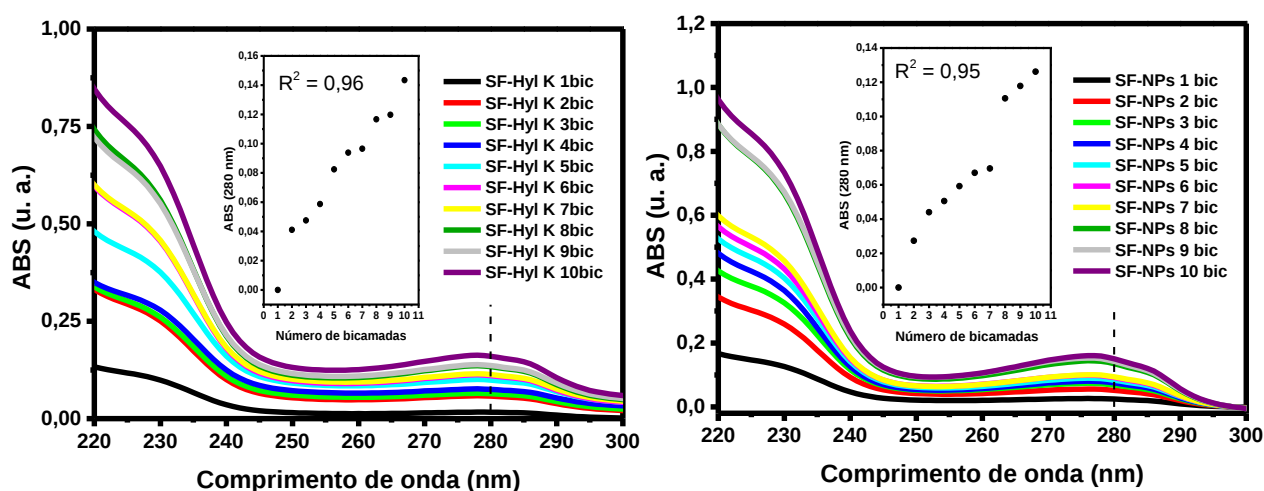


Figura 38. Espectros UV-vis. dos filmes de SF/Hyl-K0-W6 e SF/NPs, respectivamente. *

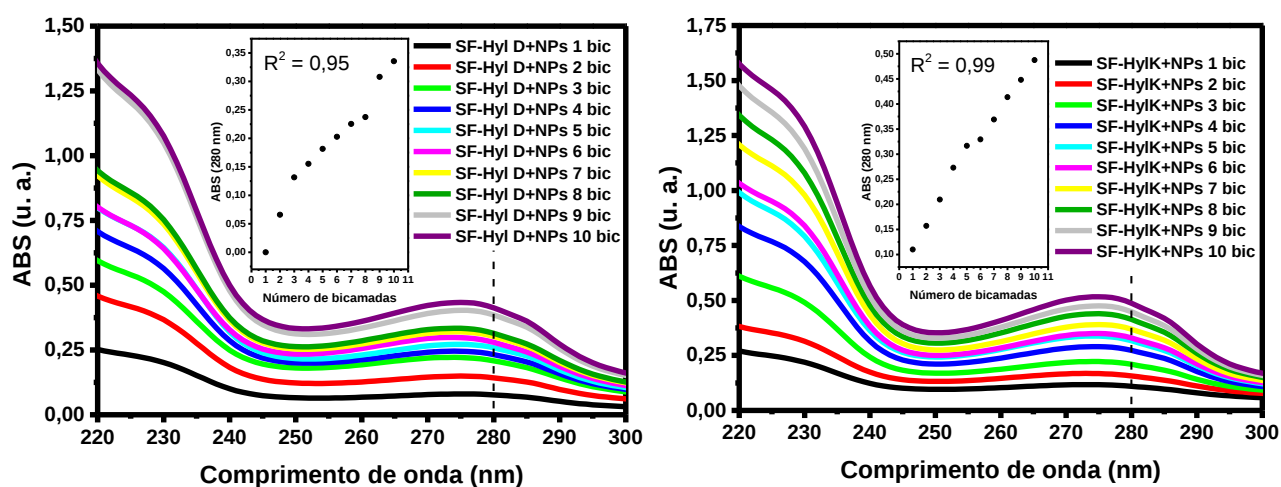


Figura 39. Espectros UV-vis. dos filmes de SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs, respectivamente.*

*Inserções: aumento na absorção a 280 nm em função do número de camadas/bicamadas depositadas.

4.3.1 Estudo dos filmes na presença da PBP2a por Espectroscopia de Luminescência

Os filmes foram também analisados através de medidas de Espectroscopia de Luminescência antes e após a adsorção da PBP2a. A Figura 40 mostra os espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) e emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de fibroína antes e após a interação com a proteína resistente à penicilina. Observa-se que a banda de excitação em 285 nm característica da absorção dos resíduos dos aminoácidos aromáticos diminui em intensidade, quase 50%, após adição da PBP2a sobre o filme. Como consequência, a intensidade de emissão também diminui, indicando que, após a lavagem do substrato, não há adsorção efetiva da proteína PBP2a sobre o filme contendo apenas a SF.

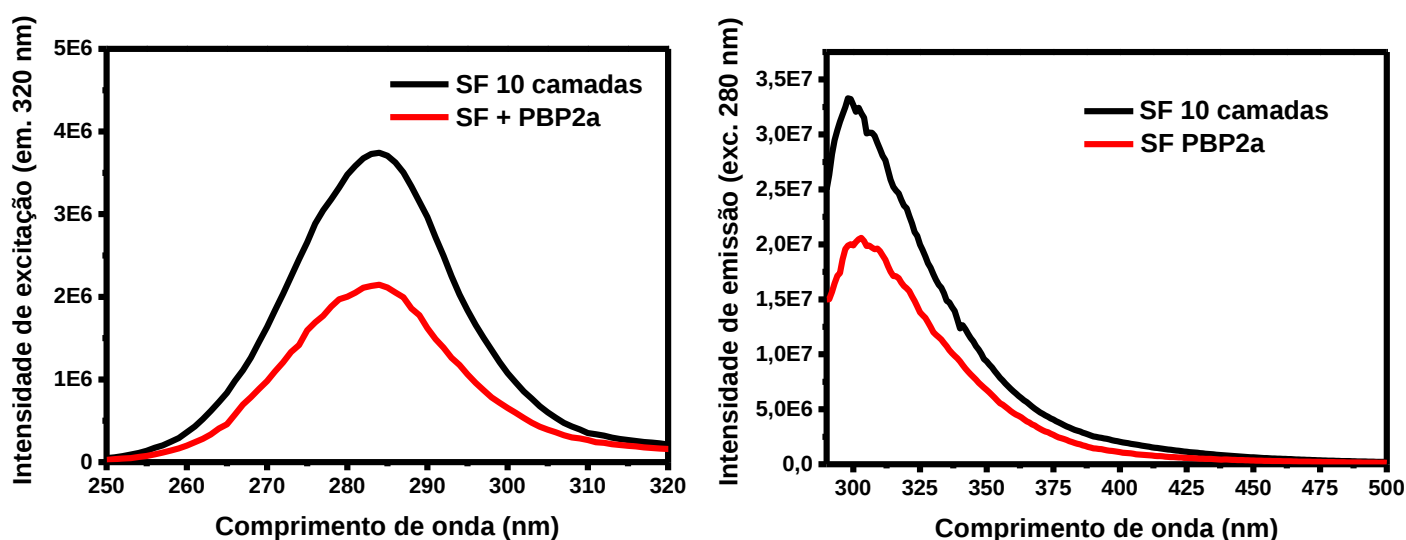


Figura 40. Espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) e emissão (λ_{exc} . 280 nm) do filme de SF na ausência e presença da proteína PBP2a.

A Figura 41 apresenta os espectros de excitação (λ_{em} . 320 nm) e emissão (λ_{exc} . 280 nm) referentes ao filme de SF/Hyl-D0-W6 antes e após a adsorção da PBP2a. Neste caso, ao contrário do que foi observado somente para o filme de SF puro, após adição de PBP2a, há aumento na intensidade da banda de excitação e consequente aumento na intensidade da banda de emissão, indicando que provavelmente houve adsorção da PBP2a sobre o filme de SF/Hyl-D0-W6, mesmo após a lavagem do substrato. A presença da PBP2a sobre o filme faz com que haja mais resíduos de aminoácidos aromáticos, o que consequentemente favorece a intensidade de fluorescência característica das proteínas.

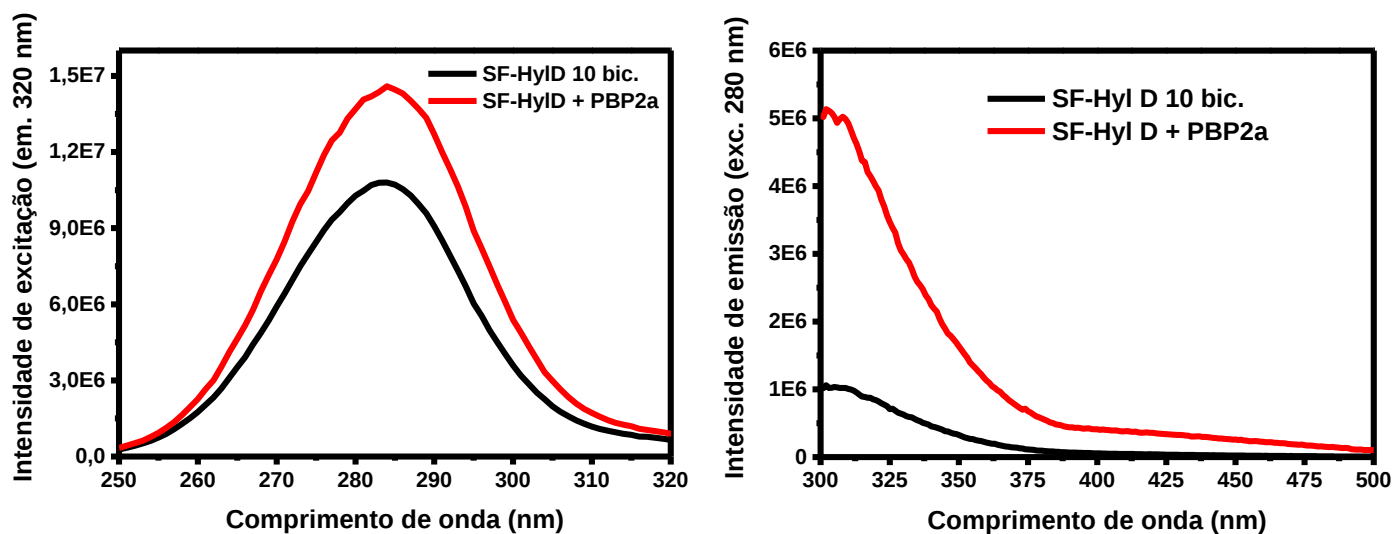


Figura 41. Espectros de excitação (λ_{em} , 320 nm) e emissão (λ_{exc} , 280 nm) do filme de SF/Hyl-D0-W6 na ausência e presença da proteína PBP2a.

Já para o filme de SF/Hyl-K0-W6, após a adsorção da PBP2a as intensidades das bandas de excitação e emissão também aumentam, porém, o máximo da emissão se desloca para menores comprimentos de onda, Figura 42, diferente do que ocorreu com o filme contendo SF e SF/Hyl-D0-W6. Neste caso houve provavelmente alguma interação diferente e talvez a formação de novas espécies a partir da adsorção da PBP2a sobre o filme de SF/Hyl-K0-W6.

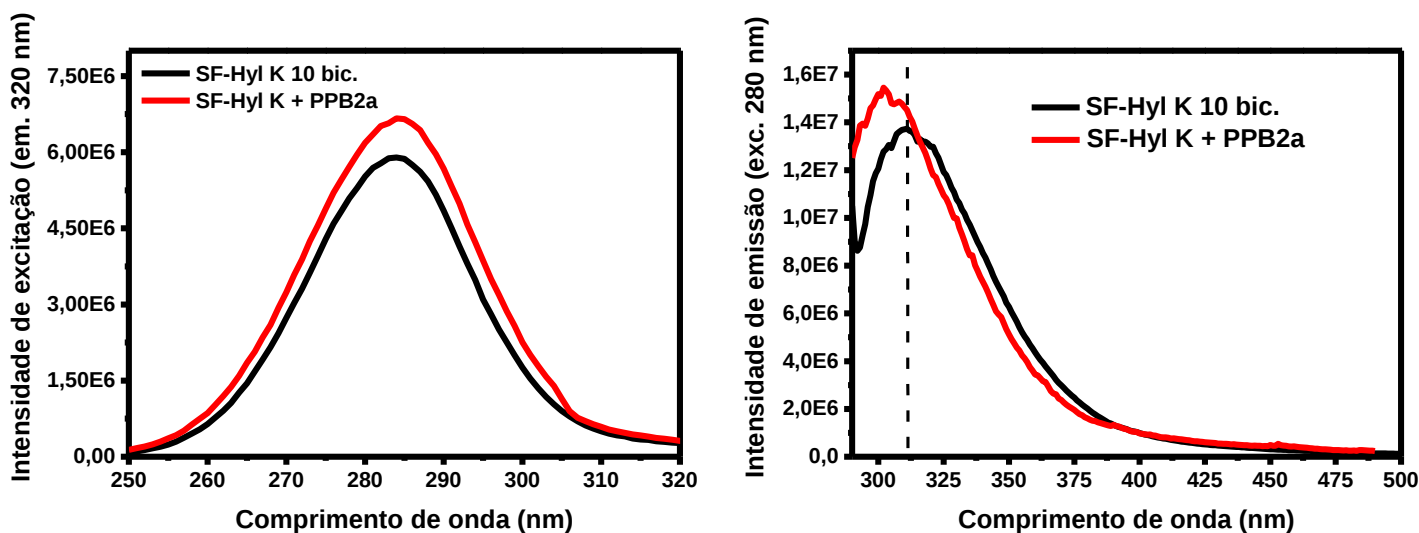


Figura 42. Espectros de excitação (em. 320 nm) e emissão (exc. 280 nm) do filme de SF/Hyl-K0-W6 na ausência e presença da proteína PBP2a.

Para o filme de SF/NPs, observa-se que após adicionar a PBP2a, a banda característica da emissão dos resíduos de aminoácidos aromáticos presentes em proteínas, por volta de 320 nm, aumenta, confirmando que provavelmente a PBP2a também se adere ao filme contendo as NPs. Porém, a intensidade de emissão característica do íon Eu^{3+} , em 620 nm, diminui sutilmente com a presença da proteína, mostrando que não há, portanto, transferência de energia da PBP2a para as NPs, Figura 43. Os espectros de excitação do filme de SF/NPs para emissão fixa em 620 nm e 340 nm, respectivamente, apresentados na Figura 44, corroboram com o que foi observado nos espectros de emissão.

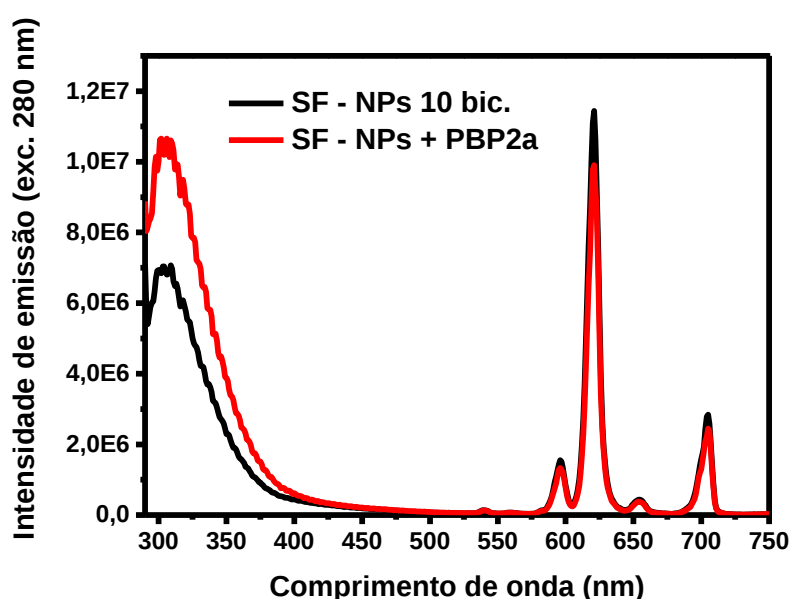


Figura 43. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm) do filme de SF/NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.

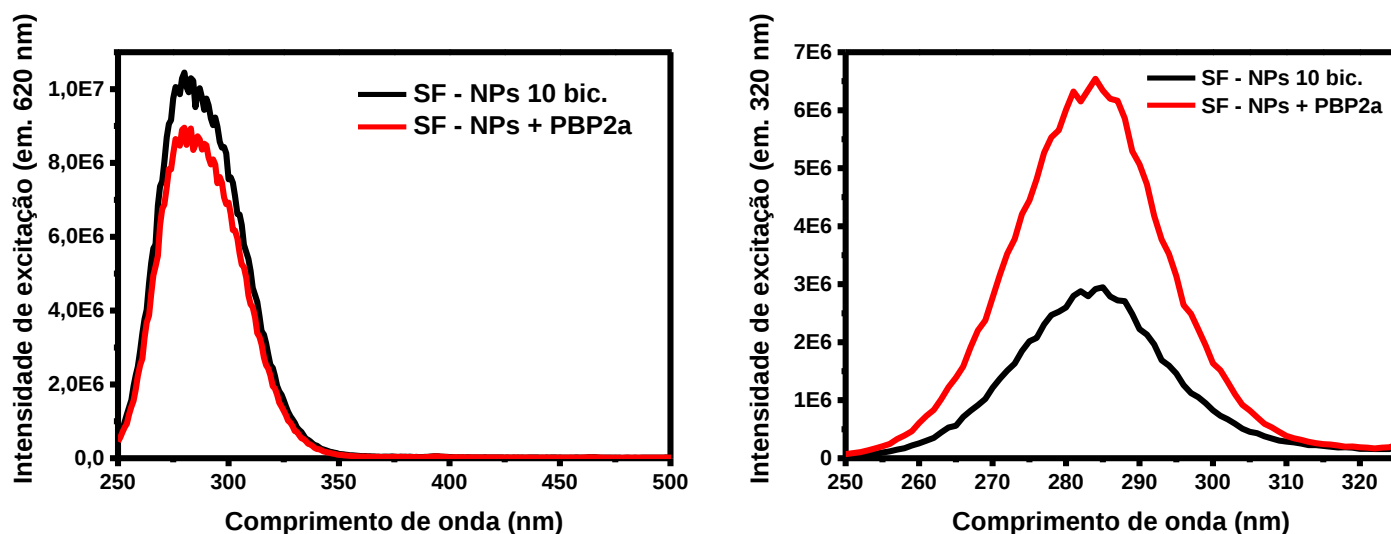


Figura 44. Espectros de excitação ($\lambda_{\text{em.}}$ 620 nm e $\lambda_{\text{em.}}$ 320 nm, respectivamente) do filme de SF/NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.

A Figura 45 mostra que não houve nenhuma mudança significativa nos espectros de emissão referentes ao filme de SF/Hyl-D0-W6+NPs na ausência e na presença de PBP2a. Este resultado sugere que provavelmente a adsorção da proteína sobre o filme ocorre fracamente e não influencia na luminescência das NPs, já que não há diminuição significativa da banda característica do íon Eu^{3+} e também nenhuma mudança na intensidade de emissão característica das proteínas. Ou ainda, é possível que a PBP2a, após a lavagem do filme, possa ter sido removida, e consequentemente não se aderiu com sucesso sobre as NPs. Os espectros de excitação estão apresentados na Figura 46, e observa-se que houve diminuição tanto nas bandas com emissão fixa em 620 nm quanto nas bandas com emissão em 320 nm, respectivamente.

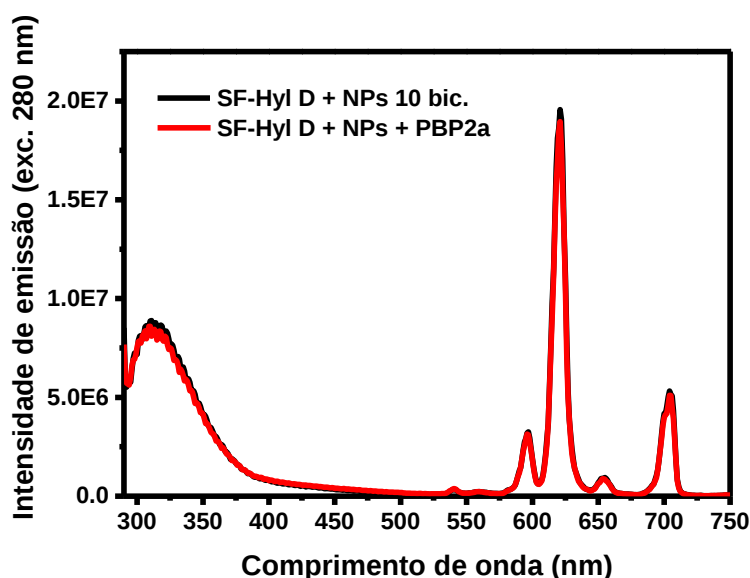


Figura 45. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm) do filme de SF/Hyl-D0-W6+NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.

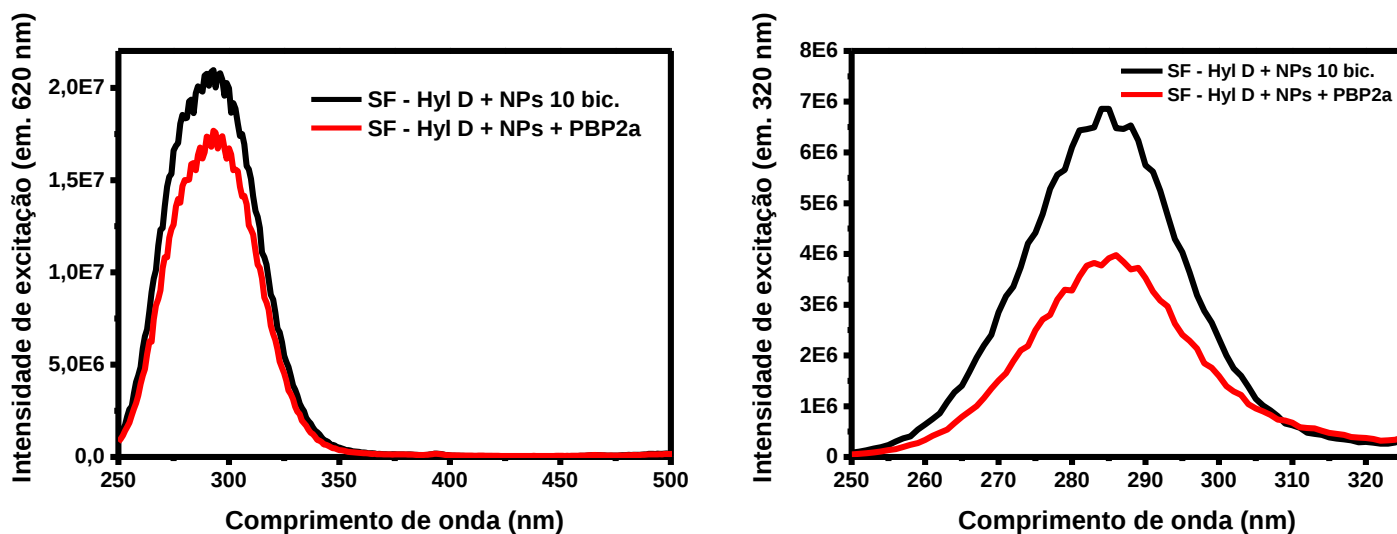


Figura 46. Espectros de excitação ($\lambda_{\text{em.}}$ 620 nm e $\lambda_{\text{em.}}$ 320 nm, respectivamente) do filme de SF/Hyl-D0-W6+NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.

A Figura 47 apresenta os resultados referentes aos espectros de emissão do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na ausência e presença da PBP2a. Observa-se, após a adição da PBP2a, há uma diminuição da banda em 320 nm característica da fluorescência das proteínas e aumento significativo na banda de emissão característica do íon Eu^{3+} em 620 nm, indicando uma possível transferência de energia da PBP2a para as NPs. Provavelmente houve adsorção da proteína sobre o filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs, levando ao aumento de resíduos de W e/ou outros resíduos aromáticos como a Y e F, o que provocou um aumento da absorção em 280 nm, como mostra os espectros de excitação fixando a emissão em 620 nm, Figura 48. Já os espectros de excitação com emissão fixa em 320 nm mostram que houve diminuição da intensidade, o que corrobora com os espectros de emissão referentes a esta excitação. Estes resultados mostram que a transferência de energia entre os estados excitados dos aminoácidos e o estado de transferência da carga do vanadato é de certo modo eficiente.

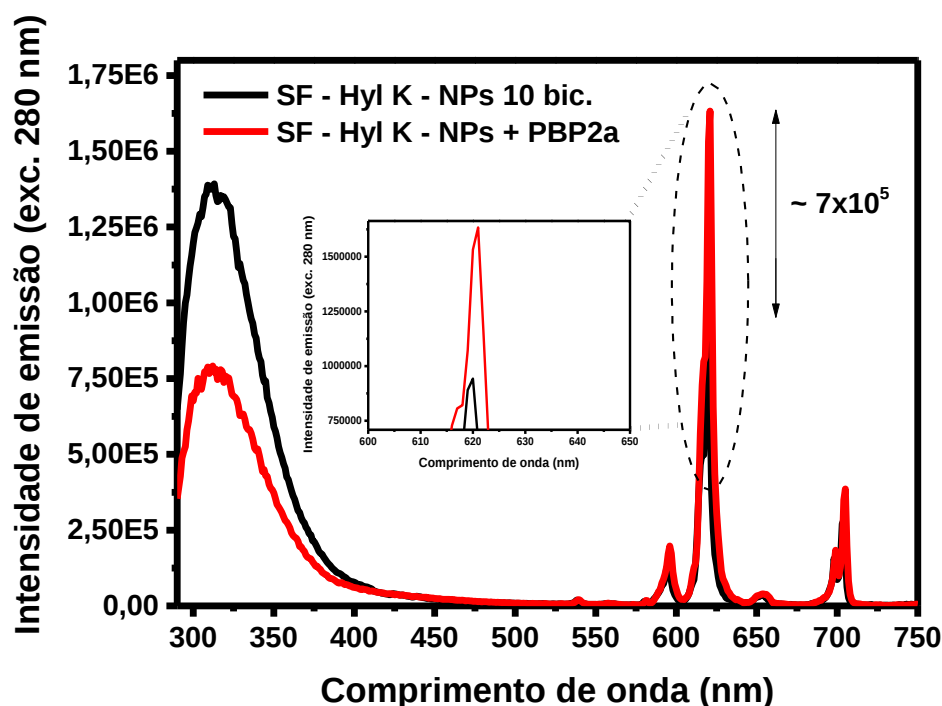


Figura 47. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc. 280 nm}}$) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.

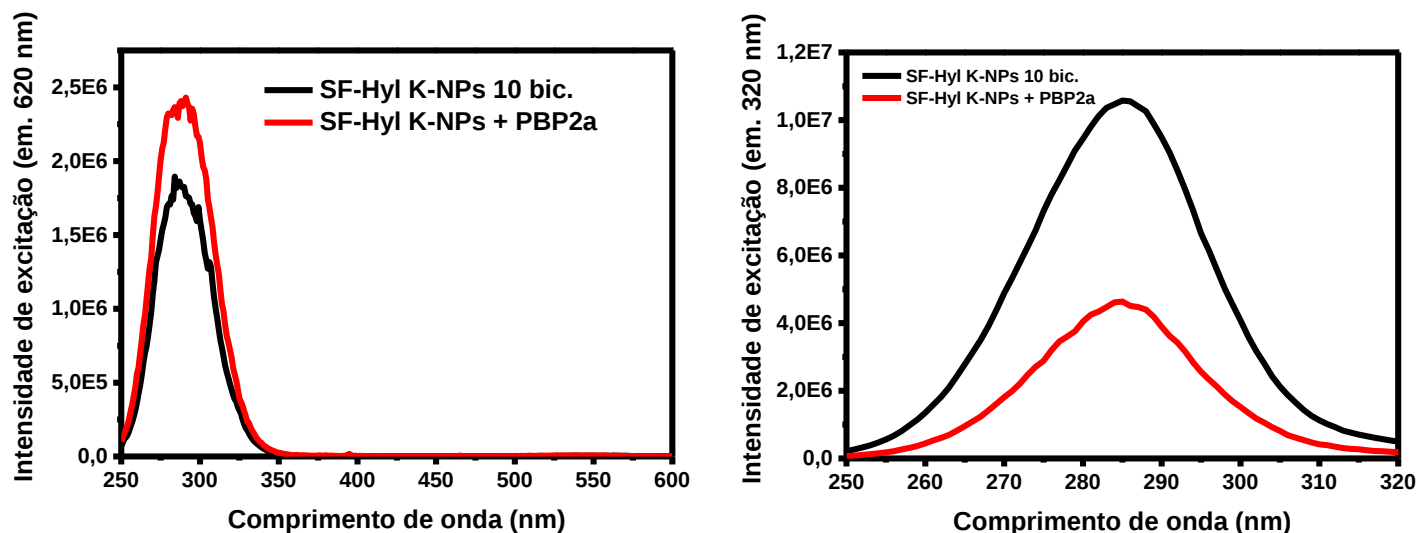


Figura 48. Espectros de excitação ($\lambda_{em.} 620 \text{ nm}$ e $\lambda_{em.} 320 \text{ nm}$, respectivamente) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na ausência e presença da proteína PBP2a.

A partir destes resultados, foi realizado o estudo variando as concentrações de PBP2a sobre um novo filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs. Adicionando as diferentes concentrações da proteína sempre sobre o mesmo filme não foi observado transferência de energia linear entre a PBP2a e as NPs. Os máximos das emissões e excitações comportam-se aleatoriamente, e não há nenhuma adsorção que apresente uma eficiente transferência de energia com aumento da emissão da banda 02 característica do Eu^{3+} , Figura 49. A partir disso, outra estratégia para reproduzir o resultado foi adicionar variadas concentrações de PBP2a sobre diferentes substratos de sílica contendo o filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs. Foram utilizadas concentrações de $10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$, $10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$, $10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$, $10^{-1} \text{ mg mL}^{-1}$, $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e 10 mg mL^{-1} . Apenas o filme em que foi adicionado $10^{-1} \text{ mg mL}^{-1}$ foi observado um aumento na intensidade característica do íon Eu^{3+} , Figura 50, com ordem de grandeza muito semelhante ao primeiro resultado, Figura 47. Isso significa que a reprodutibilidade do filme ocorreu somente nas mesmas concentrações de PBP2a, levando a supor que provavelmente a adsorção da proteína sobre o filme e a transferência de energia entre ela e as NPs, observada por Espectroscopia de Luminescência, seja mais efetiva somente em certos intervalos de concentração.

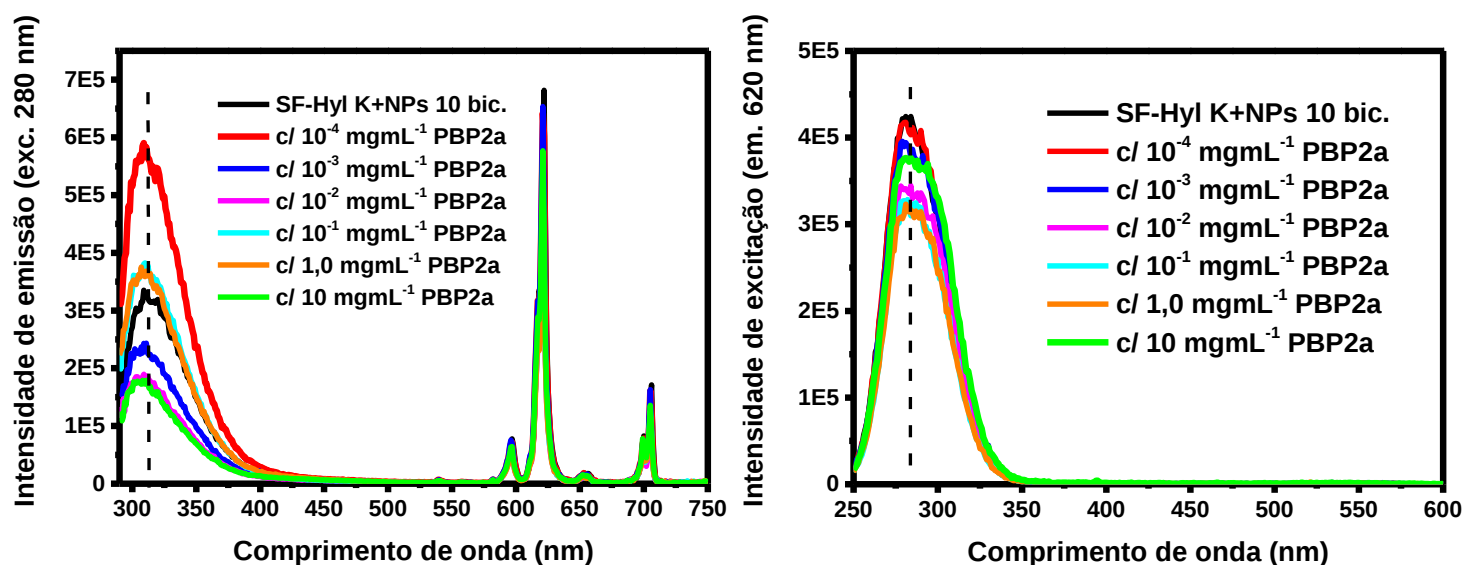


Figura 49. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm) e excitação ($\lambda_{\text{em.}}$ 620 nm) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a.

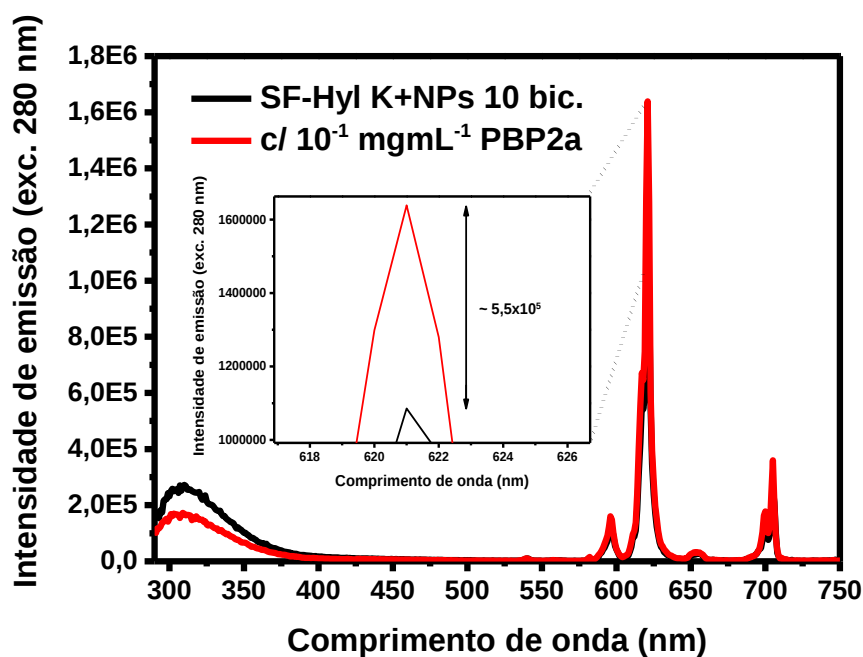


Figura 50. Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc.}}$ 280 nm) do filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença da proteína PBP2a a 10^{-1} mg mL⁻¹.

4.3.2 Estudo dos filmes na presença da PBP2a por Dicroísmo Circular

A investigação do motivo pelo qual este fenômeno ocorre apenas com o filme contendo SF/Hyl-K0-W6+NPs foi realizada estudando a interação da PBP2a sobre os filmes através da técnica de Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), que permite caracterizar e

quantificar diferentes tipos de estruturas secundárias de macromoléculas tais como α -hélice, folha- β (paralela e antiparalela), vários tipos de voltas e estruturas randômicas.^[103]

As Figuras 51 e 52 apresentam os espectros de CD dos filmes SF e SF/Hyl-D0-W6, SF/Hyl-K0-W6 e SF/NPs, respectivamente, antes e após a adição de PBP2a. Todos os filmes apresentaram um mínimo em aproximadamente 220 nm, o que é característico de uma conformação folha- β . Já é conhecido na literatura que a fibroína, na forma de filmes, tem esta conformação. Foi confirmado, portanto, que a presença dos peptídeos Hyl-D0-W6 e Hyl-K0-W6, bem como das NPs e da PBP2a sobre a fibroína, não interferem em sua estrutura secundária.

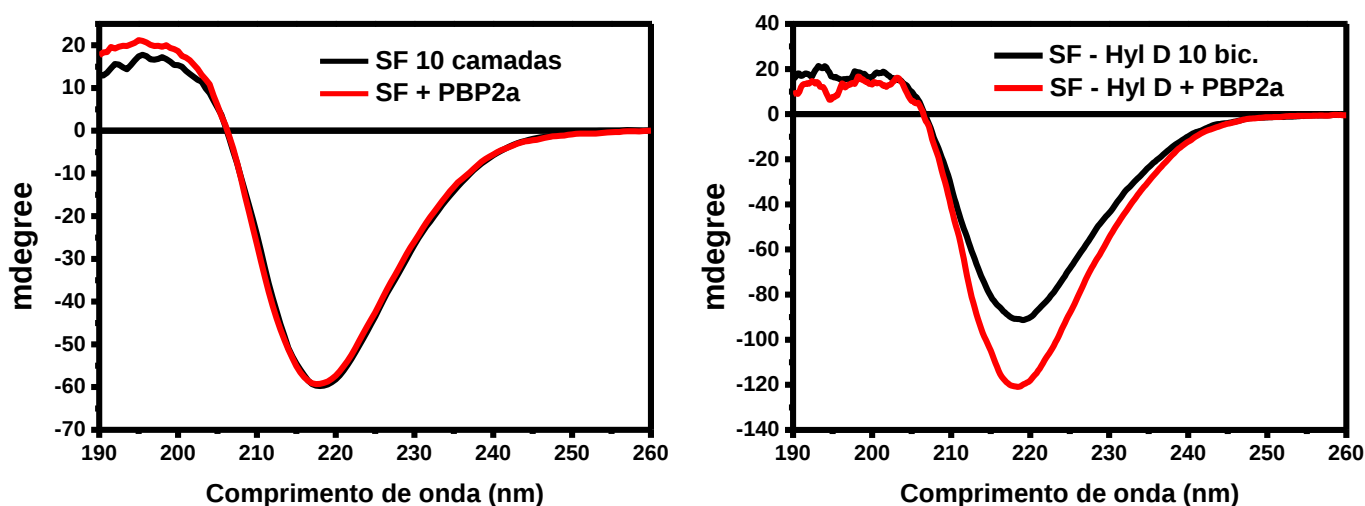


Figura 51. Espectros de Dicroísmo Circular dos filmes de SF e SF/Hyl-D0-W6 na ausência e na presença da proteína PBP2a.

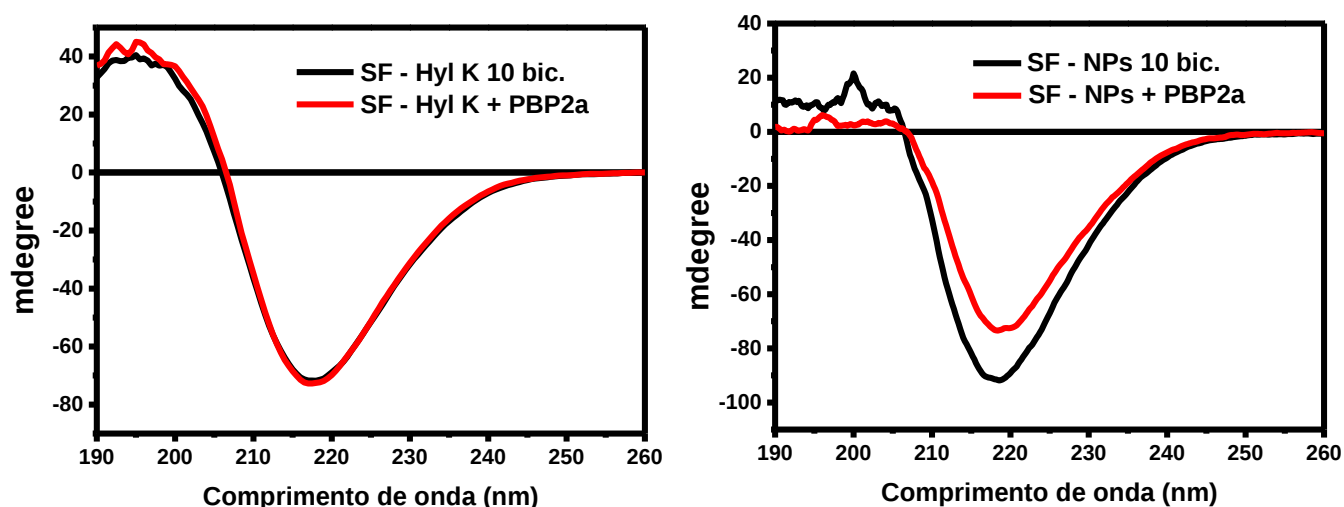


Figura 52. Espectros de Dicroísmo Circular dos filmes de SF/Hyl-K0-W6 e SF/NPs na ausência e na presença da proteína PBP2a.

A Figura 53 apresenta os espectros de CD dos filmes de SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs na ausência e presença da PBP2a. Para o primeiro filme, foram observados os mínimos próximos a 220 nm e nenhuma mudança significativa entre os espectros, levando à mesma suposição sobre os resultados de Espectroscopia de Luminescência, onde a PBP2a pode não ter aderido ao filme, ou seja, que ela tenha sido removida após a lavagem com água MilliQ, ou então que a adsorção tenha sido muito fraca, o que não causa nenhum efeito significativo com sua presença. Já para o segundo filme, foram observados os mínimos também característicos da estrutura folha- β , porém é nítido um leve deslocamento para maiores comprimentos de onda após a adição da PBP2a, o que confirma sua adsorção sobre o filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs.

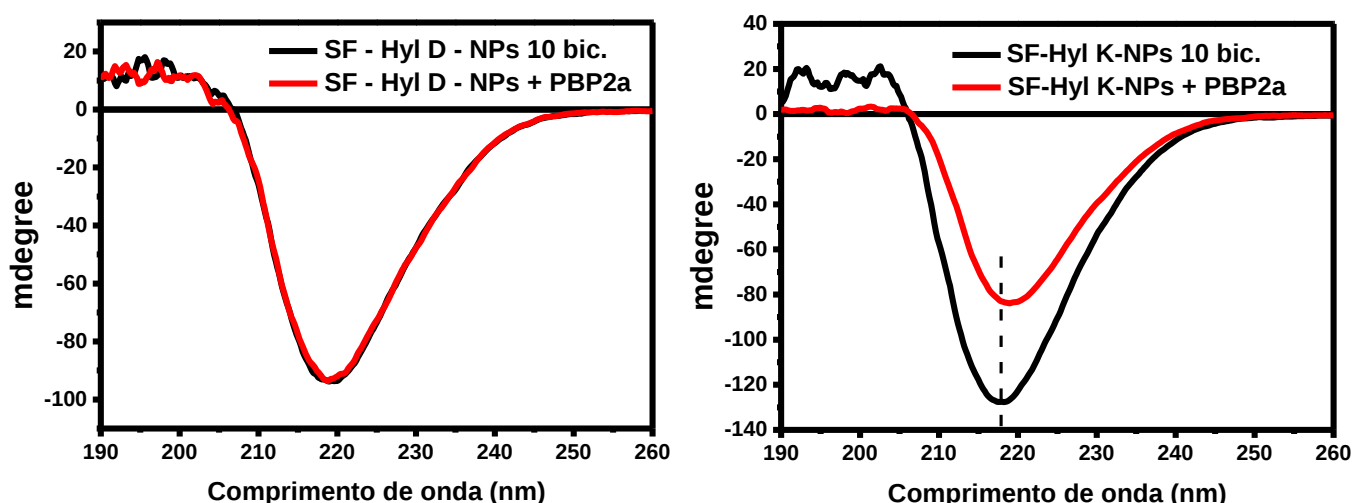


Figura 53. Espectros de Dicroísmo Circular dos filmes de SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs na ausência e na presença da proteína PBP2a.

Ao analisar novamente os espectros de CD das soluções de Hyl-D0-W6 e Hyl-K0-W6 na presença das NPs de $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$, foi observado que as NPs de alguma forma agem realmente como estruturadores somente do peptídeo Hyl-K0-W6, Figura 4. Como discutido na sessão 4.1 desta tese, estes peptídeos em solução aquosa ou em solução tampão PBS não apresentam estrutura secundária, o que pelos espectros de CD é observado através do mínimo em 200 nm característico de estruturas aleatórias. Confirma-se, portanto, que este seja o motivo mais adequado à explicação pelo qual há transferência de energia da PBP2a para as NPs somente no filme que contém Hyl-K0-W6. A atividade dos peptídeos contra a bactéria MRSA ocorre somente quando estes estão estruturados em α -hélice, portanto a interação com a PBP2a provavelmente acontece mais efetivamente quando o peptídeo está em sua

conformação secundária, o que pelos resultados obtidos neste trabalho ocorre somente com os filmes contendo Hyl-K0-W6 e na presença das NPs. Ao observar o primeiro gráfico da Figura 54, é observado que a presença das NPs não induz o peptídeo Hyl-D0-W6 à estrutura secundária. E já em relação ao segundo gráfico, é possível observar que ao adicionar as NPs sobre o peptídeo Hyl-K0-W6, o espectro de CD se aproxima muito de uma estrutura α -hélice, que apresenta dois mínimos em aproximadamente 205 nm e 222 nm, respectivamente. Estes resultados são reproduzíveis aos resultados de CD observados anteriormente na sessão 4.2 desta tese.

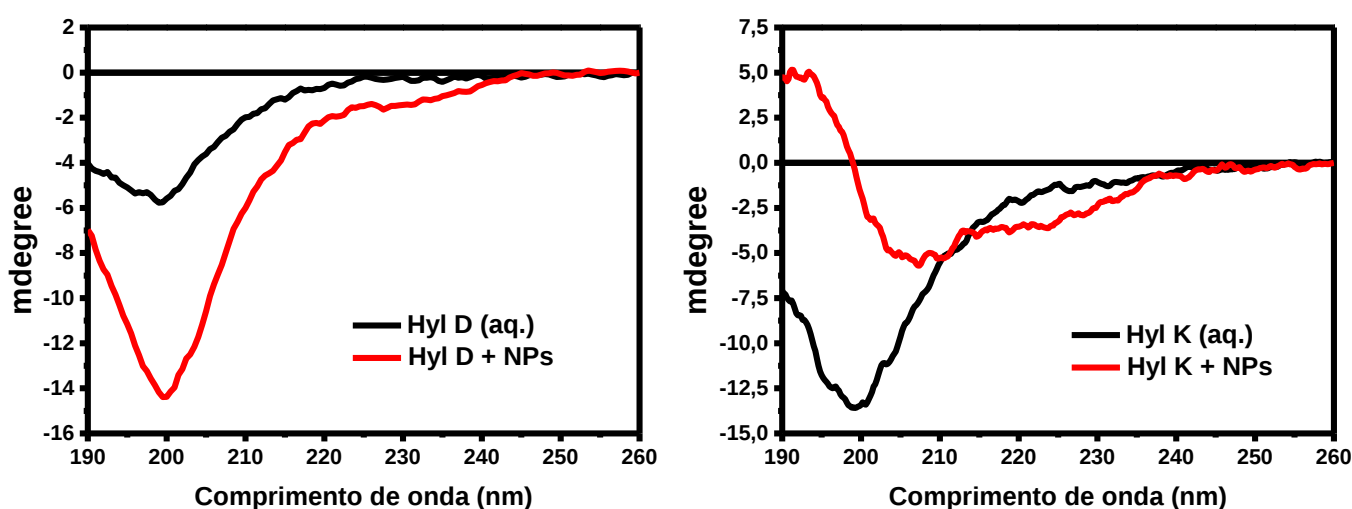


Figura 54. Espectros de Dicroísmo Circular das soluções de Hyl-D0-W6 e Hyl-K0-W6 em solução PBS e na presença das NPs de $\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$.

4.3.3 Estudo dos filmes na presença da PBP2a por Voltametria Cíclica

A partir de todo estudo realizado por Espectroscopia de Luminescência e Dicroísmo Circular com a proteína responsável pela resistência à penicilina das bactérias *Staphylococcus aureus*, o mesmo foi realizado com filmes automontados de SF, SF/Hyl-D0-W6, SF/Hyl-K0-W6, SF/NPs, SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs produzidos sobre eletrodos impressos de carbono contendo 3 camadas (SF puro) ou bicamadas. Estes filmes foram todos submetidos a medidas de Voltametria Cíclica (VC), uma técnica muito utilizada para aplicações na área de sensores devido à resposta eficiente de sinal eletroquímico quando há interação entre as espécies presentes no eletrodo. A Figura 55 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em tampão PBS na presença e na ausência da proteína PBP2a para os filmes *LbL* contendo 3 camadas de SF e 3 bicamadas de SF/Hyl-D0-W6. Os voltamogramas

mostraram alterações insignificantes com quase nenhuma alteração na corrente, o que indica que a PBP2a não interage com estes filmes.

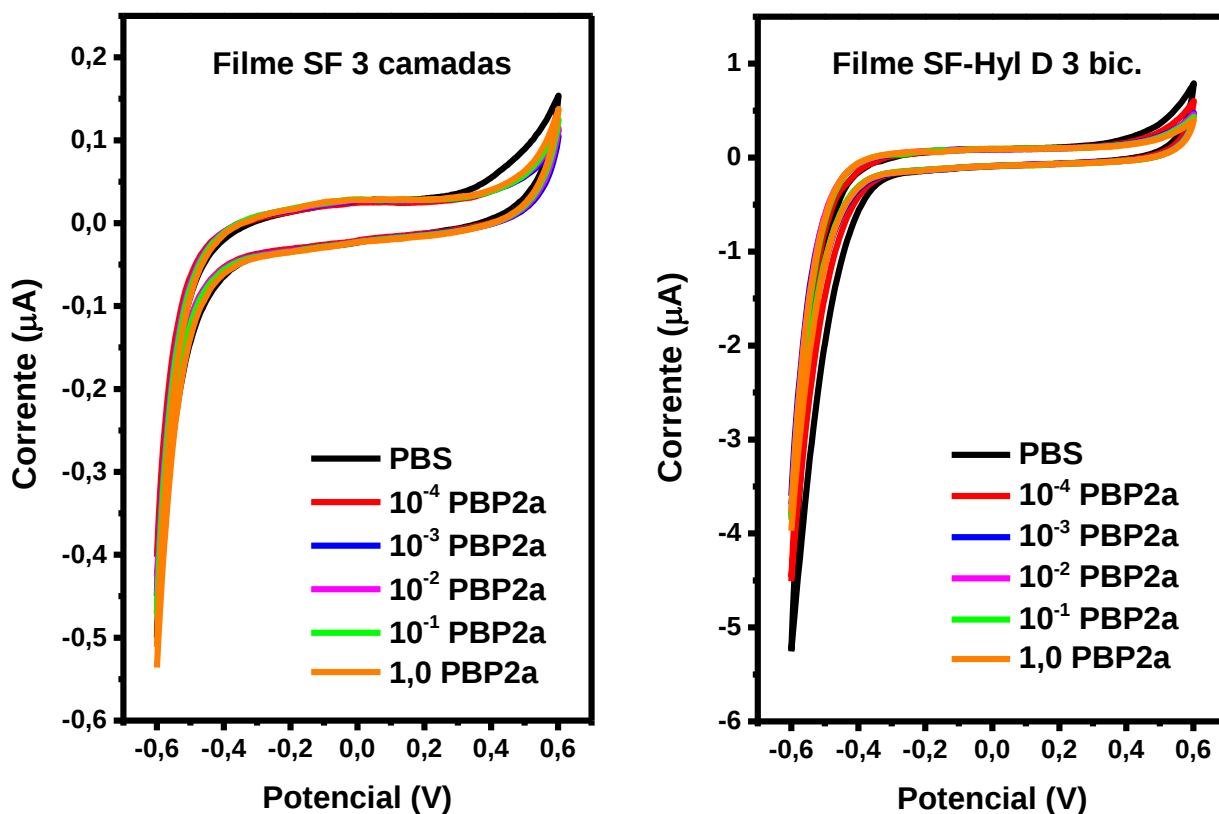


Figura 55. Voltamogramas Cíclicos dos filmes *LbL* de SF e de SF/Hyl-D0-W6, respectivamente, em tampão PBS na ausência e presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a.

Em contraste, para o filme automontado de SF/Hyl-K0-W6, o voltamograma exibiu uma diminuição de corrente de aproximadamente 1,5 μA quando a PBP2a foi adicionada, como observado na Figura 56. Ainda nesta Figura, para os filmes de SF/NPs e SF/Hyl-D0-W6+NPs, é observado que não há mudança significativa entre os voltamogramas após a adição da PBP2a. Já o filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs, após a adsorção da primeira concentração de PBP2a, um pico de oxidação irreversível em torno de 0,1 V de potencial foi observado. E com o aumento da concentração de PBP2a, há aumento deste sinal, além de um sutil deslocamento do seu máximo para maiores potenciais.

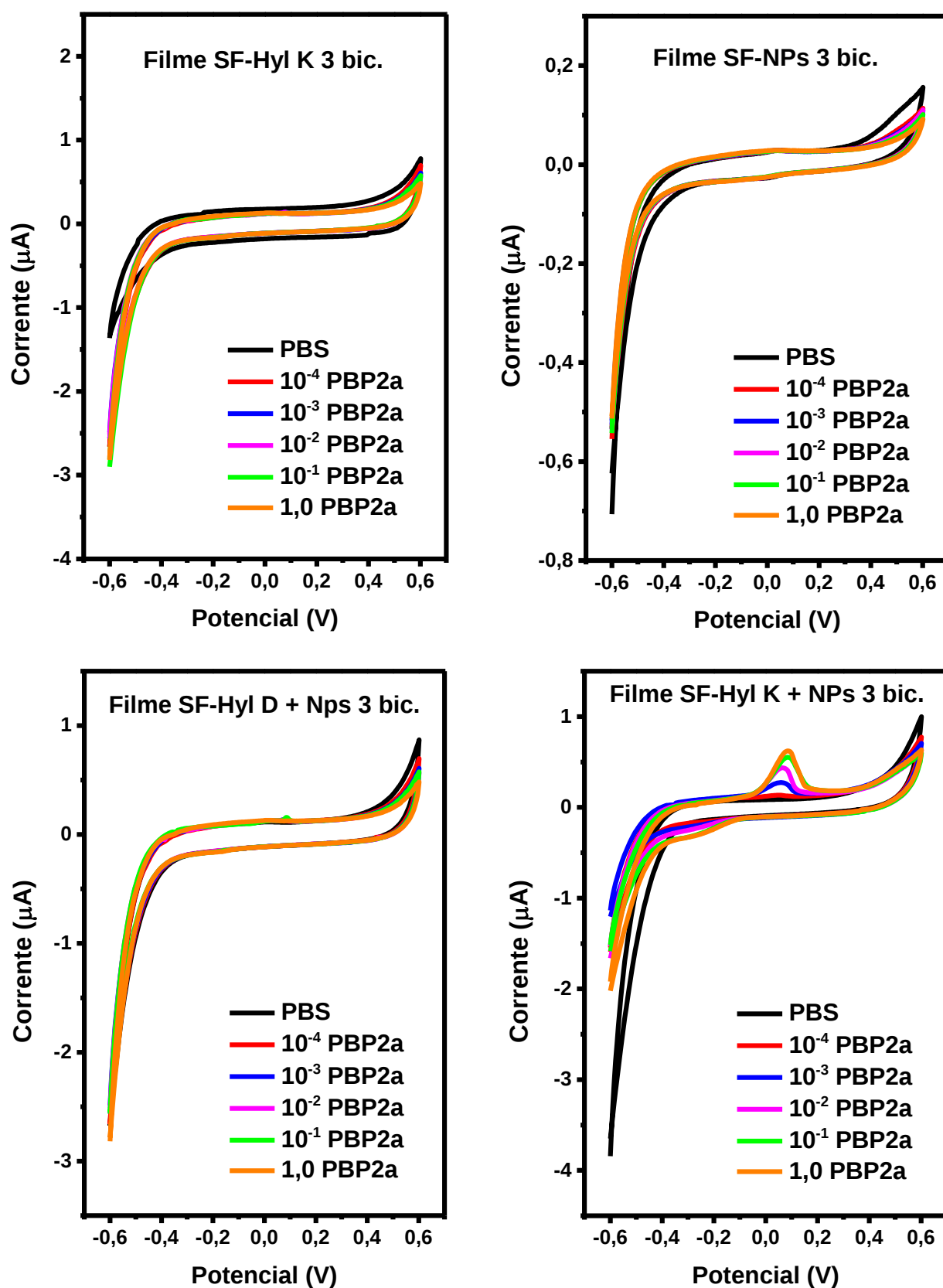


Figura 56. Voltamogramas Cíclicos dos filmes *LbL* de SF/Hyl-K0-W6, SF/NPs, SF/Hyl-D0-W6+NPs e SF/Hyl-K0-W6+NPs, respectivamente, em tampão PBS na ausência e presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a.

O mecanismo da interação entre a proteína PBP2a com o filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs ainda não é claro, mas é evidente que estes resultados corroboram com o estudo realizado por Espectroscopia de Luminescência e Dicroísmo Circular. Como o peptídeo Hyl-K0-W6 provavelmente adquire sua estrutura secundária em α -hélice na presença das NPs e, com isso, interage com a PBP2a, provavelmente há a formação de novas espécies que possuem interações fracas entre si, como as interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, pontes salinas e forças hidrofóbicas, por exemplo, entre os aminoácidos presentes tanto no peptídeo quanto na proteína e também entre as moléculas de citrato presentes nas NPs.

A Figura 57 apresenta a corrente máxima em função de cada concentração, em escala logarítmica, da PBP2a adicionada e adsorvida sobre o filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs. Foi observada alta linearidade para todos os pontos, ou seja, a resposta do sistema aumenta de acordo com a concentração da PBP2a adicionada em cada medida, o que provavelmente indica que o peptídeo antimicrobiano presente no filme consegue interagir com a proteína e detectá-la em grandes intervalos de concentração.

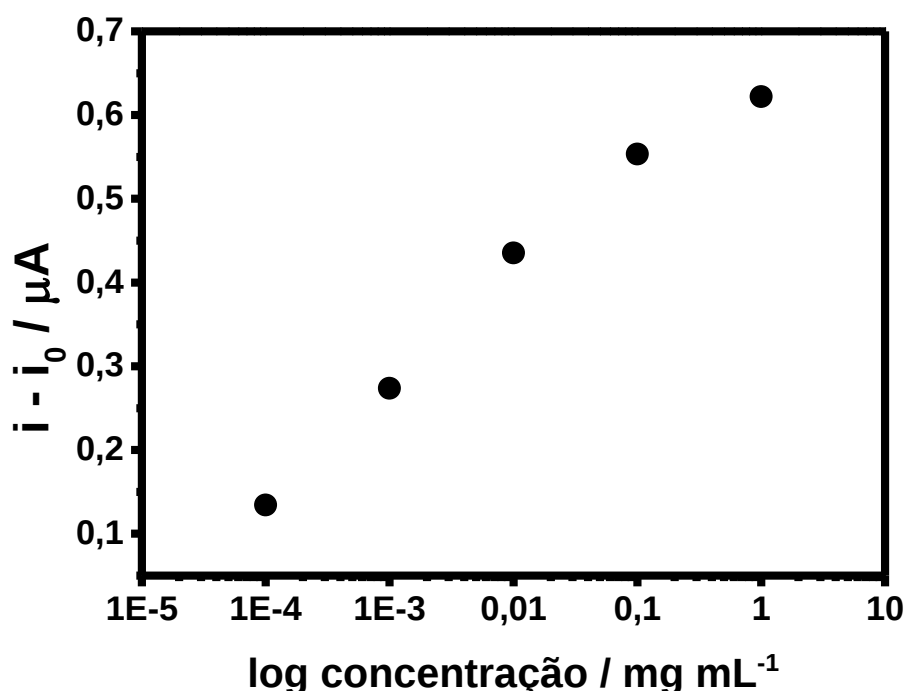


Figura 57. Curva analítica da variação de corrente com potencial fixo em 0,1V, em escala logarítmica, do filme automontado de SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença de diferentes concentrações da proteína PBP2a (diluições: 10^{-4} mg mL⁻¹, 10^{-3} mg mL⁻¹, 10^{-2} mg mL⁻¹, 10^{-1} mg mL⁻¹, e 1,0 mg mL⁻¹).

4.3.4 Estudo de filmes LbL SF/Hyl-K0-W6+NPs na presença de antígenos MRSA

Com base nos estudos eletroquímicos para o filme de SF/Hyl-K0-W6+NPs, que apresentou sinais satisfatórios pela técnica de VC na presença da proteína PBP2a, foi realizado o estudo da adição do extrato antigênico da MRSA, amostra real, em diferentes concentrações sobre filmes contendo 3 bicamadas de SF/Hyl-K0-W6+NPs.

A Figura 58 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em tampão PBS do filme após a adição do extrato da MRSA em diversas concentrações (diluições: $0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) por um tempo de 10 min de adsorção seguido pela lavagem com PBS.

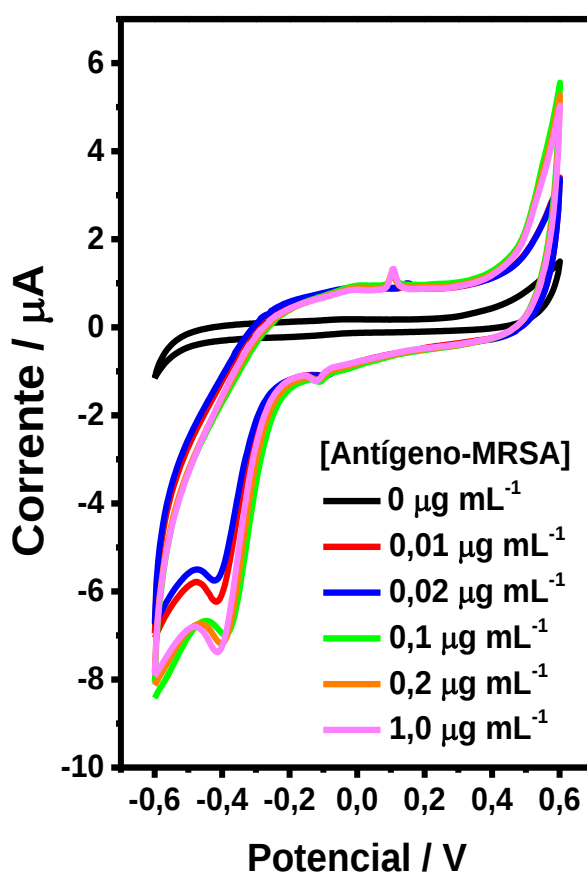


Figura 58. Voltamogramas Cíclicos do filme LbL de SF/Hyl-K0-W6+NPs contendo diversas concentrações do antígeno MRSA.

A respectiva curva analítica é apresentada na Figura 59, na qual é nitidamente observado um aumento da corrente (com potencial fixo em 0,1V) e a linearidade para os

pontos, ou seja, para todas as adsorções, indicando que a resposta aumenta de acordo com a concentração do extrato MRSA.

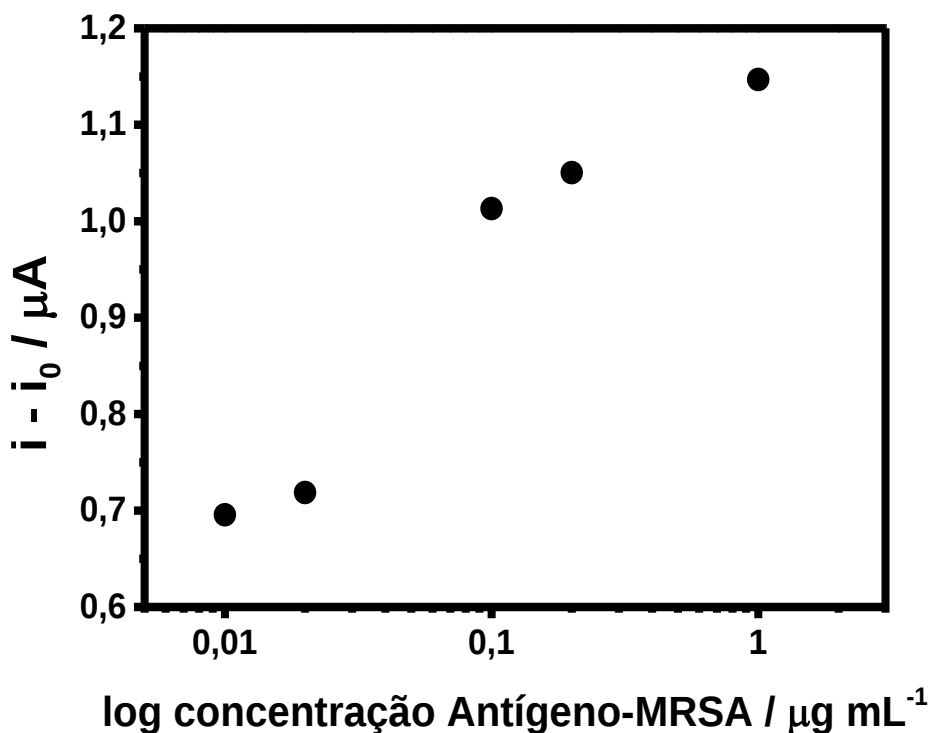


Figura 59. Curva analítica da variação de corrente com potencial fixo em 0,1V em função do logaritmo de diversas concentrações (diluições: 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato antigênico MRSA adsorvido sobre o filme.

Este resultado indica a possível aplicação em amostras de cepa da bactéria MRSA, isto é, detecção eletroquímica do extrato antigênico MRSA através da técnica de VC. Esse método de detecção é interessante para futuras aplicações em sensores desta bactéria, já que o antígeno pode ser encontrado em diversos locais, como em ambientes hospitalares por exemplo, bem como na corrente sanguínea de pacientes infectados por ela.

O estudo ainda precisa ser investigado minuciosamente, além da tentativa de reprodutibilidade dos resultados em numerosas análises e diferentes tipos de amostras reais, diferentes cepas da bactéria, visando a validação do método como possível protótipo biossensor para detecção de MRSA.

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 $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ 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 $\text{YVO}_4\text{:Eu}^{3+}$, 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.; GACON, 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.; HVASTKOV, 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 IZADPANAH, 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.; SEBBEN, 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.; GACON, 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 ATVARS, 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.; GACON, 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.