UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JULIANA PEREIRA DE AGUIAR

INFLUÊNCIA DA VISCOSIDADE E ÍONS DE HOFMEISTER NA INTERAÇÃO DNA-NANOPORO UNITÁRIO DA ALFATOXINA

Recife

2014

JULIANA PEREIRA DE AGUIAR

INFLUÊNCIA DA VISCOSIDADE E ÍONS DE HOFMEISTER NA INTERAÇÃO DNA-NANOPORO UNITÁRIO DA ALFATOXINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. CLÁUDIO GABRIEL RODRIGUES

Recife

2014

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Aguiar, Juliana Pereira de
Influência da viscosidade e íons de Hofmeister na interação DNA-nanoporo unitário da alfatoxina/ Juliana Pereira de Aguiar– Recife: O Autor, 2016.

112 folhas : il., fig., tab.
Orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Nanoporos 2. Biossensores 3. Íons I. Rodrigues, Cláudio Gabriel (orientador) II. Título

620.5 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2016-084

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Profº Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profº. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profº. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª Drª. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª Drª. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profº. Dr. César Augusto Souza de Andrade

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profº Dr. Prof. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: AGUIAR, J.P

Título: Influência da viscosidade e íons de Hofmeister na interação DNA-nanoporo unitário da alfatoxina.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Em: 24/07/2014

Banca Examinadora

Drª. DIJANAH COTA MACHADO

Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Assinatura:_____

Dra. PALOMA LYS DE MEDEIROS

Instituição: Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE

Assinatura:_____

Dr. CLÁUDIO GABRIEL RODRIGUES

Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE

Assinatura:_____

Dr. THIAGO DE SALAZAR E FERNANDES

Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE

Suplente

Assinatura:_____

Dr. EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO

Departamento de Bioquímica da UFPE

Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Maria (*in memorian*) duplamente mãe, amiga e conselheira. Ao meu avô Luiz pelo incentivo e carinho de sempre. E as pequenas, Thayane, Isabelly e Maria Clara por preencher de alegria meus dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me guiar e permitir que meus sonhos se concretizem.

Ao meu orientador, Professor Cláudio Gabriel Rodrigues, agradeço enormemente pela oportunidade, confiança, atenção, orientação e tempo dedicado. Por todos os ensinamentos e paciência durante esse tempo.

Ao Professor Doutor Oleg V. Krasilnikov (*in memorian*), por ser uma inspiração e por ter me ensinado tanta coisa em tão pouco tempo. Seus ensinamentos sempre serão lembrados.

À minha família, principalmente, à minha mãe, por ser minha direção, meu apoio e por me incentivar em todos os momentos da minha vida. À minha irmã Elaine Aguiar, por sempre estar comigo, por seus conselhos, pela maneira que toma meus problemas como seus, pela amizade e apoio incondicional. E à Karen Mendes pela cumplicidade e carinho.

Agradeço ao meu namorado, Rafael Miranda, por ser meu apoio e acreditar em mim, muitas vezes, mais do que eu mesma. Por entender, por ter paciência e acima de tudo incentivar às minhas escolhas.

À Janilson Silva e a Dijanah Machado, pela amizade, por todo apoio, pela ajuda na realização dos experimentos, pela paciência em ensinar, e acima de tudo por serem pessoas sem igual!

Às minhas amigas de Laboratório e da vida, Carolina Melo (Nina), Sheila Barros, Gisely Albertim, Layse Malgueta pela grande amizade e companheirismo. Cada uma tem um lugar especial em meu coração. Agradeço a Daniel e a Alex pela amizade, pelas palavras de apoio por me ajudarem sempre!

A todos os membros do Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco – Dr. Oleg Krasilnikov.

Ao seu Fredson, por sempre nos alegrar com suas histórias de vida.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio sempre que solicitada.

A Paulo pela disponibilidade em auxiliar na resolução de pendências burocráticas no decorrer desta tarefa.

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

“O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria”. (Isaac Asimov)

RESUMO

AGUIAR, JULIANA PEREIRA. Influência da Viscosidade e Íons de Hofmeister na Interação DNA-Nanoporo Unitário da Alfatoxina, 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O nanoporo protéico unitário formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus* pode ser empregado como elemento de reconhecimento molecular no desenvolvimento de biossensores, espectrômetro de massas e seqüenciadores de DNA. Genericamente o processo de reconhecimento molecular ocorre com a interação analito-nanoporo devido à entrada ou permeação de moléculas unitárias no lume aquoso do nanoporo. A presença de uma molécula do analito no interior do nanoporo provoca alterações discretizadas na corrente iônica. A análise da série temporal funciona como "impressão digital" da molécula ocupante ou permeante do nanoporo. A altíssima velocidade de translocação do DNA através do nanoporo ainda é uma dificuldade para o sequenciamento preciso e confiável destas moléculas. Neste trabalho avaliou-se como o aumento da viscosidade e a presença de íons da série de Hofmeister no meio aquoso influenciam na interação DNA-nanoporo, visando encontrar as condições adequadas que favoreçam a detecção diferencial de cada uma das bases nucleotídicas. A confecção da bicamada lipídica plana e a inserção do nanoporo unitário na membrana, bem como os registros de correntes iônicas através dos poros foram obtidas em condições de fixação de voltagem. Todos os experimentos foram realizados a 25^{O}C. Na solução banhante do nanoporo utilizou-se alguns ânions da família VIIA, juntamente com o K^{+}, e alguns dos cátions da família IA juntamente com o Cl^{-}, todos na concentração de 4M e em pH 7,5. A interação do ssDNA (50b-poliA) foi detectada pelo nanoporo através de bloqueios na corrente iônica. As constantes cinéticas de interação ssDNA-nanoporo foram determinadas da análise de pelo menos um milhão de bloqueios de corrente. A adição de glicerol no meio aquoso do nanoporo diminuiu significativamente a condutância do nanoporo e condutividade da solução dos íons de Hofmeister. Por outro lado aumentou a viscosidade das soluções dos íons de Hofmeister, principalmente no caso do fluoreto de potássio. O fluoreto de potássio aumentou em aproximadamente 15%, o tempo de residência do ssDNA no nanoporo. Deste modo o aumento na viscosidade juntamente com os íons de Hofmeister, especificamente o fluoreto de potássio, aumenta a sensibilidade do nanoporo, porém ainda não o suficiente para discriminação adequada das bases nucleotídicas.

Palavras-Chave: Alfatoxina, Biossensor, Nanoporo, Glicerol, Sequenciador.

ABSTRACT

AGUIAR, N. Influence of Viscosity and Hofmeister ions in DNA-single nanopore interaction. 2014 Qualifying exam (Dissert). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The single protein nanopore formed by alpha-toxin of *Staphylococcus aureus* may be used as molecular recognition element in the development of biosensors, mass spectrometer and DNA sequencers. Generally the process of molecular recognition occurs through analyte-nanopore interaction due to input or permeation of single molecules in the aqueous lumen of the nanopore. The presence of a molecule inner of the nanopore causes changes in the ionic current. The analysis of the time series comprises the changes discretized functions as "imprint" of the occupier or permeant molecule in nanopore. The high speed of DNA translocation through the nanopore is still a difficulty for accurate and reliable sequencing of these molecules. In this study was evaluated how the increase in viscosity and the presence of ions of the Hofmeister series in the aqueous environment influence the DNA–nanopore interaction, aiming to find better conditions that favor to detect of each nucleotides. Solvent-free planar bilayer lipid membranes, with a capacitance of 40pF, were formed by the lipid monolayer apposition technique, using DPhPC in hexane. The elevated KCl concentrations considerably improve single molecule identification by unitary protein nanopores, in this study membrane-bathing solutions contained 4M halide in 5mM TRIS adjusted to pH 7.5 with citric acid. The addition of glycerol in the aqueous environment of the nanopore significantly decreased the channel conductance and conductivity of the solution of Hofmeister ions. Furthermore, the increased viscosity of solutions of the Hofmeister ions, especially in the case of potassium fluoride. The potassium fluoride was increased by approximately 15% of the residence time the ssDNA into nanopore. Thus, the increase in viscosity with Hofmeister ions, especially potassium fluoride, increases the sensitivity of the nanopore, but still not enough for adequate discrimination of nucleotide bases.

Keywords: Alpha-toxin. Biosensor, Glycerol, Nanopore ,Sequencer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pág.

FIGURA 1. Esquema geral de funcionamento de um biossensor. **Fonte: Adaptado de Rustagi & Kumar, 2013**..... **28**

FIGURA 2. Etapas gerais da formação de poros transmembrana gerados a partir de toxinas bacterianas. **Fonte: Adaptado de PARKER & FEIL, 2005.** As toxinas são secretadas como monômeros solúveis que ao atingir a célula hospedeira se oligomerizam e formam poros..... **31**

FIGURA 3. Estrutura do poro Antrax. **Fonte: Retirado do Protein Data Bank (pdb), código 7AHL**. O poro heptamérico formado pela toxina do *Bacillus anthracis*.Uma visão lateral é apresentada em A e uma visão do topo do nanoporo é mostrada em B..... **32**

FIGURA 4. Representação esquemática do poro da aerolisina (A) e a alfatoxina (B) incorporados em bicamadas lipídicas planas com peptídeos atravessando os canais. **Fonte: Adaptado de Nestorovich & Bezrukov, 2012**..... **33**

FIGURA 5. Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina. **Fonte: Adaptado do Protein Data Bank (pdb), código 7AHL.** À direita visão superior com cada subunidade representada em diferentes cores. À esquerda visão lateral com cada domínio representado em três cores. Na área central, os retângulos empilhados em três cores específicas correspondem a espessura aproximada de cada domínio. A região troncular se insere completamente na membrana lipídica, e fica posicionada com a entrada convencionalmente denominada TRANS no mesmo plano da superfície da membrana. A região copal não se insere na membrana lipídica e a entrada CIS do nanoporo fica distante (~50 Å) da superfície da membrana. A região anelar (parte inferior da copa) fica ancorada na membrana. As barras verticais indicam o comprimento de cada região e o diâmetro do nanoporo..... **35**

FIGURA 6. Modelo esquemático do funcionamento do nanoporo de alfatoxina como biossensor. **Fonte: Adaptado de WANG et al.,2013.** A interação dos analitos com um único nanoporo em uma bicamada lipídica plana banhada por solução iônica induz uma modulação da corrente iônica, diminuindo a amplitude (bloqueio parcial)..... **36**

FIGURA 7. Exemplos de nanoporos de α-hemolisina de *Staphylococcus aureus* adaptado. **Fonte: Adaptado de BAYLEY & JAYASINGHE, 2004.** Em (A) o poro geneticamente adaptado, com um anel de 14 resíduos de arginina localizado próximo à região mais estreita do lúmen do poro; (B) poro contendo uma cadeia polimérica (PEG) fixada covalentemente no interior do nanoporo; (C) poro contendo um adaptador molecular (ciclodextrina) dentro do lume..... **39**

FIGURA 8. Representação gráfica molecular do nanoporo proteico formado pela alfatoxina. **Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2009.** Em (a) As três posições de mutação (113, 145 e 147), utilizadas para detecção de peptídeos estão indicadas em vermelho, azul e roxo, respectivamente. Os poros modificados receberam a denominação de (WT)7, (M113F)7, (2FN)7 de acordo com a localização da mutação (b) registros elétricos típicos, bem como a corrente residual da interação do peptídeo Y6 com os três poros (WT)7, (M113F)7, (2FN). E em (c) a detecção simultânea de quatro peptídeos: Y6, YPFW, YWPF, e YPWG..... **40**

FIGURA 9. Modelo estrutural da ligação da β-ciclodextrina (anel central) com o nanoporo heptamérico mutante da alfatoxina. **Fonte: do Protein Data Bank (pdb), código 3M3R.** O poro foi modificado na posição 113, onde foi trocada uma metionina por uma asparagina (M113N). Cada subunidade do nanoporo é mostrada em cores diferentes..... **41**

FIGURA 10. Demonstração da propriedade multianalítica do biossensor baseado no poro protéico formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus* inserido em bicamada lipídica plana. **Fonte: Adaptado de KANG et al., 2006.** Em (a) Registro dos bloqueios na corrente iônica característica do (S)-ibuprofeno; b) Registro dos bloqueios na corrente iônica característica do enantiômero (R)-ibuprofeno; e, c) Registro dos bloqueios da corrente iônica de ambas as moléculas simultaneamente, com seus respectivos histogramas de amplitude de corrente..... **42**

FIGURA 11 Nanoporo da alfatoxina como espectrômetro de massas. Fonte: **Adaptado de Robertson et al., 2007.** Espectro de massa (superior) para o polietilenoglicol (PEG 1500, Mr=1500 g/mol) polidisperso obtido com o nanoporo unitário comparado ao espectro de massa (inferior) obtido pelo MALDI-TOF. Os histogramas representam o valor médio da corrente para cada amplitude de bloqueio referente a cada molécula do polímero. Os números na parte superior em cada "pico" do histograma indicam a quantidade de monômeros do etilenoglicol em cada molécula do polímero. Os maiores valores de I/I*open* correspondem às moléculas de PEG de menor massa molecular. O I indica o valor de corrente iônica através do nanoporo quando este é ocupado pelo polietilenoglicol, e I*open* é o valor de corrente quando não há moléculas de PEG no interior do nanoporo da alfatoxina. O "pico" indicado pelo número 28 corresponde a análise da amostra de polietilenoglicol (PEG 1294) monodisperso. No MALDI-MS devido ao processo de desorção e ionização, cada molécula do PEG perde um O ou OH..... **43**

FIGURA 12. Modelo estrutural do nanoporo formado pela alfatoxina e a representação dos registros de bloqueios na corrente iônica característicos da detecção de dois tipos de microcistinas. **Fonte: Retirado de PAT WO2013026123, 2013).** Em (A). microcistina YR em (B) microcistina RR pelo nanoporo proteico formado pela alfatoxina, inserido em uma bicamada lipídica plana..... **45**

FIGURA 13. Estrutura e conformação da Molécula de DNA. **Fonte: Retirado de Martin, 2011.** A estrutura molecular de uma cadeia simples de DNA é mostrada no lado esquerdo, com os grupos de fosfato, o açúcar desoxirribose (verde), a base adenina (vermelho claro) e a citosina (amarelo). A conformação da dupla-hélice é mostrada à direita..... **46**

FIGURA 14. Evolução do custo de sequenciamento por megabase. **Fonte:** Disponível em: http://www.genome.gov/sequencingcosts/. Acesso em 01/03/2014..... **49**

FIGURA 15. Gravação de um único canal da alfatoxina mostrando os bloqueios característicos dos nucleotídeos ao passar pelo interior do nanoporo. **Fonte: Adaptado de CLARKE et al, 2009**. O valor da corrente residual de cada nucleotídeo é demonstrado nas quatro faixas de cores (T- vermelho, A- verde, C-azul e G-cinza)..... **51**

FIGURA 16. Sequência dos ânions e cátions da Série de Hofmeister. **Fonte :Adaptado de Müller & Faude, 2008.** Íons classificados de acordo com as suas atuações (ou propriedades) na camada de hidratação em íons cosmotrópicos ou caotrópicos e alguns exemplos dos efeitos específicos promovidos por estes íons..... **55**

FIGURA 17. Representação esquemática das três camadas de hidratação de uma molécula de proteína e da interação de íons cosmotrópicos e caotrópicos com essas camadas. **Fonte: Adaptado de Lo Nostro, 2012.** A camada L_1 ou camada de solvatação; camada L_2 ou de transição e L_3 camada mais externa (bulk layer). O círculo verde representa um íon cosmotrópico, enquanto que o círculo laranja representa um íon caotrópico..... **56**

FIGURA 18. Efeitos de forças sobre os íons perto de uma superfície. **Fonte: Adaptado De Parsons & Ninham, 2011**As forças eletrostáticas (esquerda) e forças dissipativas (direita) atuam nos cátions e ânions. As forças dissipativas podem ser repulsivas ou atrativas dependendo do íon presente na solução..... **58**

FIGURA 19. Gráfico que relaciona o limite de detecção versus concentração do KCl em molar (M) com as concentrações do analito (PEG 2000). **Fonte: Adaptado de Rodrigues et al., 2008**. Os menores valores de detecção do PEG ocorrem quando utilizado o KCl como solução banhante em concentração de 4M..... **60**

FIGURA 20. Gráfico que relaciona o limite de detecção versus concentração do analito (PEG). **Fonte: Adaptado de Rodrigues et al., 2011.** Para facilitar a determinação da concentração do analito (setas horizontais), a frequência dos eventos da interação do nanoporo com analito dever ser 60igual ou maior do que 1 Hz (linha vertical). A solução banhante da membrana foi composta por sais de potássio com os ânions F-, Cl-, Br- e I- (4 M), tamponado com Tris (5mM) em pH 7,5. O modelo de analito polimérico utilizado foi o polietilenoglicol de peso molecular 1294 (PEG 1294)..... **61**

FIGURA 21. Bloqueio da corrente e tempo de translocação do DNA em função do aumento da viscosidade gerado pela adição de glicerol (0-50%). **Fonte: Adaptado de Fologea et al., 2005.** Solução de KCl 1,5 M e voltagem aplicada de 120 mV..... **64**

FIGURA 22. Tempo (a) velocidade (b) de translocação de uma fita de DNA poli-A 50 pb em função da viscosidade da solução. **Fonte: Adaptado de Kawano et al., 2009**Os dados correspondem a 0, 12,5%, 25% , 40% e 63% de glicerol em soluções mistas contendo 1,0 M de KCl, 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA. Todas as medições foram realizadas a -120 mV (lado cis negativo) em 24±1 ° C. O tempo de translocação de uma fita de DNA 50pb na solução de glicerol a 63% é mais do que 20 vezes mais lenta do que a da solução aquosa..... **65**

FIGURA 23. Sistema de simulação do nanoporo sintético SiO_2 de 4nm de diâmetro (cinza) na presença da fita simples de DNA (fita colorida), glicerol (verdes) e água (bolas vermelhas). Fonte: **Retirado de Luan et al., 2012**..... **66**

FIGURA 24. Representação da sistema experimental. **Fonte:** Elaborada pela autora. Foto da câmara de Teflon® e esquema representativo do processo de construção e da monitoração da bicamada lipídica plana. **A)** Câmara de Teflon® com indicação dos lados *cis* e *trans*, e eletrodos de conexão da solução aquosa (verde e amarelo) ao sistema eletrônico de monitoramento e aquisição. **B)** Etapas da formação: (1) filmes lipídicos sobre as superfícies das soluções, (2) deposição do segundo filme lipídico e (3) bicamada lipídica plana completamente formada. As setas indicam o sentido da elevação do nível da solução; **C)** Etapas da monitoração: (1) onda triangular aplicada ao sistema e (2) resposta de corrente capacitiva do sistema..... **67**

FIGURA 25. Equipamentos. **Fonte: Elaborado pela autora.** Em **A.** Condutivímetro de alta precisão (Radiometer analytical, Modelo: CDC 230 **B**. Reômetro oscilatório Digital (Anton Paar, Physica MCR 301)..... **69**

FIGURA 26. Sistema de aquisição eletrônica do biossensor formado pela alfatoxina. **Fonte: Adaptado de Stefureac, 2012**. A) Modelo da câmara de Teflon. B) Canal de alfatoxina incorporado na bicamada lipídica. (C) Diagrama da interface eletrônica de aquisição dos registros de corrente..... **70**

LISTA DE TABELAS

Pág.

TABELA 1. Comparação das plataformas de seqüenciamento. **Fonte: Adaptado de Braütigam & Gowik, 2010; Michael L. Metzker, 2010.....** **50**

TABELA 2: Valores dos coeficientes B de viscosidade Jones-Dole (*B*) e dos ADHN (*apparent dynamic hydration numbers*– números de hidratação dinâmica aparente) para diversos cátions e ânions. Fonte: tabela **adaptada de Collins, 2006; Sinhg, 2007.....** **63**

LISTA DE DADOS DO SHORT COMMUNICATION

Pág.

Table 1. Viscosity, ionic conductivity the solution of the ions Hofmeister and alpha-toxin nanopore conductance…… **75**

Figure 1. Registration typical ionic current through the nanopore of alpha-toxin in the solutions (4 M) of KBr, KCl, CsCl or KF, pH 7.5, in the presence of 300 nM ssDNA 50bpoliA. Applied potential 120 mV…….. **76**

Figure 2. Influence of anion type on the kinetic parameters of ssDNA-nanopore interaction. The residence time of the ssDNA in the nanopore increased due to potassium fluoride solution…… **76**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO

Pág.

Figura 1. Evolução dos estudos visando à aplicação de poros no desenvolvimento de ferramentas analíticas. O counter Coulter foi o primeiro dispositivo prático baseado em um microporo empregado para contagem de partículas de dimensões micrométricas. A primeira demonstração experimental do fluxo de íons através de um poro como uma "entidade molecular" inserida em uma bicamada lipídica ocorreu com o antibiótico peptídico gramicidina, uma vez que este poro é formado a partir de duas moléculas isoladas, uma em cada monocamada lipídica, que ao se acoplarem adquirem a funcionalidade de via de permeação à íons. Na década de 80 ocorreu não somente a descoberta do gene da alfatoxina, bem como os primeiros experimentos demonstrando sua atividade formadora de poros em biomembranas e em bicamadas lipídicas artificiais. No ínicio da década de 90 foi mensurado o valor do diâmetro do nanoporo da alfatoxina. A elucidação da estrutura cristalográfica da alfatoxina na metade da década de 90, foi decisiva para corroborar algumas observações experimentais da ação hemolítica da alfatoxina. Neste mesmo período demonstrou-se pioneiramente que o nanoporo da alfatoxina é permeável e apenas detecta DNA de fita simples. Esta descoberta juntamente com a demonstração eletrofisiológica da aglomeração de sete subunidades proteicas para formação do nanoporo da alfatoxina impulsionaram significativamente a partir do ano 2000, a utilização desse nanoporo como elemento sensor para detecção de outros espécimes químicos, e além disso se introduziu a terminologia molecular counter Coulter, sensoriamento estocástico, sensores estocásticos. Em 2006 realizou-se a produção de alfatoxina mutante, portanto, ocorre a primeira melhoria genética no nanoporo da alfatoxina, a qual permitiu sua utilização como ferramenta para discriminação de moléculas enantioméricas. Neste mesmo ano demonstrou-se que o aumento da força iônica torna máxima a interação polietilenoglicol(PEG)-nanoporo e favorece o particionamento deste polímero no lume aquoso do nanoporo, propiciando melhorias na capacidade de detecção do nanoporo da alfatoxina; resultando no ano seguinte com a primeira demonstração deste nanoporo como espectrômetro de massa. Em 2008 demonstrou-se que o aumento na concentração de um mesmo sal (KCl de 1 mol L-*1* para 4 mol L-*1*) aumenta em aproximadamente 200 vezes a sensibilidade do nanoporo da alfatoxina. Três anos depois se corroborou que não somente o aumento de concentração do sal, bem como a composição da solução iônica, influenciam na sensibilidade do nanoporo; com a demonstração que os sais da série de Hofmeister, especificamente a substituição do KI pelo KF aumentou em aproximadamente 100 vezes a sensibilidade do nanoporo da alfatoxina. A partir de 2010 diversos relatos demonstram academicamente que o nanoporo da alfatoxina pode ser usado para detectar armas químicas, drogas ilícitas, cianotoxinas, porém, somente no final de 2012 ocorre o primeiro anúncio comercial de um sequenciador de DNA baseado neste nanoporo. Devido aos relevantes resultados obtidos na última década propiciaram nos últimos três anos a utilização de simulação de dinâmica molecular para aumentar o entendimento da interação analito-nanoporo da alfatoxina..... **81**

Figura 2. Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina. A direita visão superior com cada subunidade representada em diferentes cores. A esquerda visão lateral com cada domínio representado em três cores. Na área central, os retângulos empilhados em três cores específicas correspondem a espessura aproximada de cada domínio. A região troncular se insere completamente na membrana lipídica, e fica posicionada com a entrada convencionalmente denominada TRANS no mesmo plano da superfície da membrana. A região copal não se insere na membrana lipídica e a entrada CIS do nanoporo fica distante (~50 Å) da superfície da membrana. A região anelar (parte inferior da copa) fica ancorada na membrana. As barras verticais indicam o comprimento de cada região e o diâmetro do nanoporo. Adaptado do Protein Data Bank (pdb), código 7AHL..... **83**

Figura 3. Esquema da montagem experimental do nanoporo da alfatoxina como biossensor estocástico. (A) Desenho da câmara experimental formada por duas hemicâmaras separadas por uma película de Teflon® com um orifício (aproximadamente 40 μm de diâmetro) para a formação da bicamada lipídica plana. (B) Primeira etapa de montagem da monocamada lipídica ocorre com acréscimo de mais solução em um dos compartimentos da câmara experimental. (C) Montagem da segunda monocamada lipídica. A deposição de cada uma das monocamadas lipídicas ocorre com a introdução de mais solução em cada um dos respectivos compartimentos da câmara. Na região central demonstra-se a mesa de amortecimento com a câmara experimental acoplada através de eletrodos à interface eletrônica de aquisição dos registros de corrente iônica. Esta interface é composta por amplificador e filtro passa-baixa conectados ao conversor analógico-digital acoplado a um microcomputador. Na parte inferior encontra-se um quadro da membrana lipídica com um único nanoporo inserido. A entrada e passagem da molécula de analitos (bolinha vermelha) através do nanoporo induzem bloqueios característicos na corrente iônica. A análise das amplitudes e durações dos bloqueios permite a identificação dos analitos; a análise da frequência dos bloqueios permite a quantificação dos analitos. A aquisição, armazenamento e análise das séries temporais (impressão digital) são processadas por um programa dedicado e a identificação do analito é realizada por comparação em um banco de dados de impressões digitais. Este banco de dados é montado com a calibração do sistema e registro de corrente iônica com analitos de alto grau de pureza..... **84**

Figura 4. Influência da concentração e composição da solução na sensibilidade do nanoporo da alfatoxina. **A)** O valor da concentração do polietilenoglicol (PEG 2000) é menor (0,7 μmol L-*1*) na presença da solução iônica de elevada concentração de KCl (4 mol L-*1*), portanto, o aumento da concentração do KCl de 1 para 4 mol L-*1*, aumentou a sensibilidade do nanoporo em aproximadamente 214 vezes. Adaptado da Ref. 98. **B)** O valor da concentração do polietilenoglicol (PEG 1294) é menor (0,05 μmol L-*1*) na presença da solução iônica de fluoreto de potássio (4 mol L-*1*), portanto, a substituição do iodeto pelo fluoreto aumentou a sensibilidade do nanoporo em aproximadamente 130 vezes. As setas horizontais indicam o menor valor de concentração do analito (PEG), considerando a frequência dos bloqueios na corrente iônica, maior ou igual a 1 Hz como indicado pela linha vertical. Adaptado da Ref. 100..... **86**

Figura 5. Capacidade do nanoporo da alfatoxina em detectar íons divalentes. (A) Representação esquemática do sítio de ligação introduzido por mutação no interior do nanoporo da alfatoxina. As setas indicam a interação de um íon (círculo cheio ou vazio) com o sítio de ligação. (B) Registros de bloqueios da corrente iônica, característicos de cada íon (Zn^{+2}, Co^{+2}, Cd^{+2}). Cada registro resulta de um experimento em que apenas um dos íons foi adicionado à solução eletrolítica. (C) Registros da corrente iônica na presença de apenas íons de Co^{+2} na solução eletrolítica (primeiro traçado). Os três traçados inferiores representam sequencialmente os registros da corrente iônica à medida que se aumentou a concentração do Zn^{+2} para 35, 110 e 231 nmol L-*1*, respectivamente. As linhas cheias e tracejadas indicam o perfil de bloqueio na corrente, característico do Co^{+2} ou Zn^{+2}, respectivamente. Adaptado da Ref. 25..... **86**

Figura 6. Capacidade do nanoporo da alfatoxina na discriminação de moléculas enantioméricas. A b-ciclodextrina (bCD) foi acoplada na região mais estreita do nanoporo da alfatoxina mutante, diminuindo ainda mais seu diâmetro, portanto, reduz a corrente iônica que passa através do nanoporo como indicado pela linha contínua nos registros. **a)** Registro dos bloqueios na corrente iônica característica do (S)-ibuprofeno. A linha tracejada indica a amplitude dos bloqueios; **b)** Registro dos bloqueios na corrente iônica característica do (R)-ibuprofeno; **c)** Registro dos bloqueios da corrente iônica de ambas as formas enantioméricas do ibuprofeno. Ao lado direito de cada registro, os respectivos histogramas de amplitude dos bloqueios da corrente iônica. Nota-se claramente que o nanoporo é capaz de discriminar as formas enantioméricas do ibuprofeno. Adaptado da Ref. 27..... **87**

Figura 7. Nanoporo da alfatoxina como espectrômetro de massas. Espectro de massa (superior) para o polietilenoglicol (PEG 1500, Mr=1500 g/mol) polidisperso obtido com o nanoporo unitário comparado ao espectro de massa (inferior) obtido pelo MALDI-TOF. Os histogramas representam o valor médio da corrente para cada amplitude de bloqueio referente a cada molécula do polímero. Os números na parte superior em cada "pico" do histograma indicam a quantidade de monômeros do etilenoglicol em cada molécula do polímero. Os maiores valores de I/I*open* correspondem às moléculas de PEG de menor massa molecular. O I indica o valor de corrente iônica através do nanoporo quando este é ocupado pelo polietilenoglicol, e I*open* é o valor de corrente quando não há moléculas de PEG no interior do nanoporo da alfatoxina. O "pico" indicado pelo número 28 corresponde a análise da amostra de polietilenoglicol (PEG 1294) monodisperso. No MALDI-MS devido ao processo de desorção e ionização, cada molécula do PEG perde um O ou OH. Adaptado da Ref. 18..... **88**

Figura 8. Nanoporo da alfatoxina como sequenciador de DNA. Representação esquemática do padrão de bloqueios na corrente iônica através do nanoporo da alfatoxina durante a translocação de ss-DNA. Observe que a amplitude dos bloqueios indicados pelas faixas coloridas é característica de cada base nucleotídica, representadas por: T=timina, A=adenina, C=citosina, G=guanina. Adaptado da Ref. 2..... **88**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO MATERIAL SUPLEMENTAR

Pág.

Figura 1S. Estrutura do nanoporo Antrax. O nanoporo formado pela toxina do Bacillus anthracis é formado por sete subunidades. Uma visão lateral é apresentada em A e uma visão do topo do nanoporo é mostrada em B. Retirado do Protein Data Bank (pdb), código 1TZN..... **92**

Figura 2S. Representação esquemática do nanoporo da aerolisina (A) e da alfatoxina (B) incorporados em bicamadas lipídicas planas. Ambos os nanoporos apresentam diâmetro que permite a translocação de peptídeos. Adaptado da Ref. 4..... **92**

Figura 3S. Exemplos de nanoporos da alfatoxina adaptados: (A) poro geneticamente modificado. Os resíduos dos aminoácidos são inseridos próximo à região mais estreita do poro (resíduos em azul); (B) poro contendo uma b-ciclodextrina como adaptador molecular próximo à região de constrição..... **93**

Figura 4S. (a) Representação molecular do nanoporo proteico da alfatoxina. As três posições de mutação (113, 145 e 147), utilizadas para detecção de peptídeos estão indicadas em vermelho, azul e roxo, respectivamente. Os nanoporos modificados receberam a denominação de (WT)7, (M113F)7, (2FN)7 de acordo com a localização da mutação **(b)** Registros típicos, bem como a corrente residual da interação do peptídeo Y6 com os três nanoporos (WT)7, (M113F)7, (2FN). E em **(c)** o perfil de bloqueios na corrente iônica através do nanoporo na presença simultânea de quatro peptídeos: Y6, YPFW, YWPF, e YPWG. Adaptado da Ref. 8..... **93**

Figura 5S. Representação esquemática do nanoporo da alfatoxina incorporada em um suporte resistivo à esquerda. Representação dos registros de bloqueios na corrente iônica características da detecção de dois tipos de microcistinas (A) microcistina YR em (B) microcistina RR. Adaptado da Ref. 9)..... **94**

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

α- HL	alfa-hemolisina (do inglês alpha-hemolysin)
ssDNA	fita simples do Ácido Desoxirribonucleico (do inglês single-stranded Deoxyribonucleic Acid)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)
nm	Nanômetro
ds	dupla-fita (do inglês double-stranded)
ss	fita-simples (do ingles single- stranded)
PFTs	Proteínas formadoras de poros (do inglês Pore-forming protein toxins)
EF	Fator de Edema (do inglês Edema Factor)
LF	Fator Letal (do inglês Lethal Factor)
PA	Antígeno Protetor (do inglês Protective Antígen)
kDa	kiloDalton
f	Frequência
PEG	Polietilenoglicol
CDs	Ciclodextrinas
µg/ L	micrograma por litro
HGP	Projeto Genoma Humano (do inglês Human Genome Project)
NHGRI	Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano **(***do inglês National Human Genome Research Institute).*
PGM	Personal Genome Machine
pb	pares de base
µs	Microssegundos
ms	Milissegundos
pA	pico ampere
Eq	Equação
ADHN	Número de hidratação dinâmica aparente (do inglês *apparent dynamics hydration numbers)*
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethytenediamine tetraacetic

	acid)
mv	Milivolts
DPHPC	Diftanoilglicerofosfocolina (do inglês 1,2-diphytanoil-sn-glicero-3-phosphocholine)
LMNano	Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
$C_{analito}$	Concentração do analito
mS/cm	milisimens por centímetro
b	Bases
MSPA	*Mycobacterium smegmatis* porina A (do inglês *Mycobacterium smegmatis* porin A*)*

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstron
T_{on}	Tempo de interação entre os bloqueios
T_{off}	Tempo de residência
k_f	Constante de formação.
k_{off}	Constante de dissociação
k_{on}	constante de associação
C	Concentração do analito
k_{off}	Constante de dissociação;
Δg	Condutância
K_{off}	Constante de dissociação
H^+	Hidrogênio
™	Trademark
T	Timina
A	Adenina
G	Guanina
C	Citosina
SCN^-	Tiocianato
ClO_4^-	Perclorato
I^-	Iodeto
NH_4^+	Amônio
SO_4^{2-}	Sulfato
F^-	Fluoreto
Ca^{+2}	Cálcio
Mg^{+2}	Magnésio
HPO_4^{-2}	Hidrogenofosfato
Br^-	Bromo
NO_3^-	Nitrato

K^+	Potássio
Rb^+	Rubídio
Na^+	Sódio
Cs^+	Césio
Li^+	Lítio
Hz	Hertz
^oC	Grau Celsius
M	Molar
μM	micromolar
H	Viscosidade
η_0	Viscosidade da água pura
C	Concentração
PO_4^{-3}	Fosfato
$H_2PO_4^{-2}$	Dihidrigênio fosfato
CH_3CO_2	Acetato
HO-	Hidroxila
HCO_2^-	Ácido carbônico
KCl	Cloreto de Potássio
SiO_2	Dióxido de silício
Kf	Constante de formação
Pa. s	Pascal por segundo
D	Coeficiente de difusão
R	Constante dos gases
T	Temperatura
u	Coeficiente de mobilidade de partículas carregadas

SUMÁRIO

Pág.

1. INTRODUÇÃO 24

2. OBJETIVO 26

3. REVISÃO DA LITERATURA 27

3.1 Nanoporos proteicos como ferramenta no biossensoriamento..... 27

***3.1.1 Biossensor*..... 27**

***3.1.2 Biossensoriamento com canais iônicos*..... 28**

3.2 Nanoporos proteicos formado por toxinas bacterianas..... 30

3.3 Alfatoxina..... 33

3.3.1 *Estrutura*..... **33**

***3.3.2 Nanoporo proteico da alfatoxina como elemento de reconhecimento molecular*..... 35**

***3.3.3 Limitações do nanoporo sensor da alfatoxina*..... 37**

***3.3.4 Otimização e adequação do nanoporo proteico formado pela alfatoxina*..... 38**

3.4 Aplicações do nanoporo da alfatoxina..... 41

3.4.1 *Detecção de enantiômeros*..... **41**

3.4.2 *Espectrômetro de massa*..... **42**

3.4.3 *Monitoramento de toxinas na água*..... **44**

3.4.4 *Sequenciador molecular*..... **45**

3.5 Influência dos íons de Hofmeister na interação DNA..... 53

***3.5.1 Série de Hofmeister*..... 53**

***3.5.2 Efeito específico dos íons*..... 54**

3.5.3 Influência dos sais em sistemas confinados..... **59**

3.6 Viscosidade..... **62**

4. METODOLOGIA..... **67**

4.1 Construção das bicamadas lipídicas planas..... **67**

4.2 Sistema de monitoração e aquisição em tempo real das "assinaturas moleculares"..... **69**

5. RESULTADOS..... **72**

5.2 MANUSCRITO SHORT COMMUNICATION..... **72**

5.3 ARTIGO..... **79**

6. CONCLUSÕES..... **95**

7. PERSPECTIVAS..... **96**

8. REFERÊNCIAS..... **97**

9. ANEXOS..... **109**

1. INTRODUÇÃO

Na última década poros em escala nanométrica têm demonstrado capacidade para detecção, identificação e caracterização de diversas moléculas. Este método de medição pode fornecer soluções para diferentes segmentos das áreas de saúde e as ciências básicas. No entanto, essa mudança de paradigma requer uma melhoria na compreensão da física e da química, que governam as interações entre o nanoporo e os analitos (KASIANOWICZ, 2012).

Em particular a alfatoxina do *Staphylococcus aureus*, também conhecida por alfa-hemolisina (α-HL) tem sido amplamente utilizada para a detecção, caracterização e análise de várias moléculas, por ser altamente reprodutível e versátil em diversas condições experimentais (MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012).

Outros nanoporos proteicos, também, estão sendo aplicados na detecção de inúmeras moléculas como, por exemplo, o poro formado pela toxina do *Bacillus anthracis* que foi utilizado para detectar e quantificar proteínas (KASIANOWICZ et al., 2012), o poro formado pela aerolisina uma toxina sintetizada pela *Aeromonas hydrophila* que tem sido utilizada como elemento sensor na detecção de proteínas (PASTORIZA-GALLEGO et al., 2011). Mais recentemente, num esforço de substituir os nanoporos proteicos, surgiram as plataformas de detecção mais robustas, que utilizam nanoporos sintéticos em estado sólido, para detecção de DNA fita dupla, polinucleotídeos e proteína (REINER et al., 2011). Estes nanoporos sintéticos visam eliminar algumas limitações inerentes ao sistema com nanoporos biológicos, mas ainda não atingiram o grau de precisão e caracterização física que seus homólogos proteicos (ROBERTSON et al., 2007; CLARKE et., 2009; KASIANOWICZ et al., 2012).

Dentre os nanoporos biológicos até então descritos, o nanoporo formado pela alfatoxina do *Staphylococcus aureus* ainda é o mais utilizado, por apresentar as seguintes vantagens: estrutura cristalográfica conhecida, receptividade à engenharia molecular e alta condutância iônica. Além disso, este poro permanece aberto durante longos períodos de tempo, em condições experimentais bem definidas, como pH, força iônica, temperatura, elevado potencial transmembrana e até em diversas concentrações de agentes químicos desnaturantes (KRASILNIKOV et al., 2006; PASTORIZA-GALLEGO et al., 2007; MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012).

Devido a essas propriedades, o nanoporo da alfatoxina pode se tornar uma tecnologia barata e rápida para sequenciamento de ssDNA (RINCON-RESTREPO et al., 2011). Um dos

maiores desafios para implementação desta tecnologia, surge a partir da baixa resolução de amplitude da corrente entre as bases enquanto o ácido desoxirribonucleico de fita simples (ssDNA) transloca-se através do lume aquoso do nanoporo. A alta velocidade do movimento eletroforético do ssDNA, juntamente com a eletrônica disponível, não permitem fornecer uma relação sinal-ruído alta o suficiente, para alcançar a identificação de um único nucleotídeo (NA AN et al., 2011). Neste contexto, os pesquisadores têm procurado métodos que retardem a velocidade de translocação molecular, através de variações nas condições experimentais e modificações no nanoporo, visando melhorar a resolução e sensibilidade desse sensor proteico (WANG et al., 2013).

Assim sendo, o presente trabalho buscou alterar as condições físico-químicas da solução banhante do nanoporo, para estudar como osmólitos que aumentam a viscosidade do meio juntamente com íons da série de Hofmeister, que são alteradores do grau de estruturação da água (HOFMEISTER, 1888), podem influenciar na interação DNA-nanoporo, objetivando encontrar as condições adequadas, que possam favorecer à detecção diferencial de cada uma das bases nucleotídicas, em meio aquoso.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar os mecanismos que interferem na velocidade de translocação do DNA através do nanoporo da alfatoxina de *Staphylococcus aureus* visando prever as condições adequadas para sua detecção e contribuir para o desenvolvimento de um sensor para sequenciamento molecular.

2.2 Específicos

- Estudar a influência de osmólitos no aumento da viscosidade e na interação de moléculas do DNA com o nanoporo da alfatoxina;

- Analisar a influência dos ânions do grupo dos halogênios (Cl^-, F^- e Br^-) e cátions do grupo dos metais alcalinos (K^+ e Cs^+) na interação do DNA com o nanoporo;

- Estabelecer um algoritmo para prever as condições ótimas da utilização dos poros nanoscópicos como seqüenciadores moleculares.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Nanoporos proteicos como ferramenta no biossensoriamento

3.1.1 Biossensor

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico, que integra um elemento biológico a um transdutor físico que é capaz de converte uma resposta biológica em um sinal mensurável, proporcional à concentração do analito (SU et al.2011; KUMAR & RANI, 2013). As aplicações dos bissensores nas áreas de saúde, de alimentos, no meio ambiente e no controle do bioterrorismo, são extraordinárias (LIU et al., 2010).

De um modo geral, um biossensor incorpora um elemento biológico – biorreceptor, que pode ser uma proteína (ex: enzimas, anticorpos), ácidos nucleicos (DNA ou RNA), estruturas proteicas como canais iônicos ou ainda células inteiras. O biorreceptor é o agente responsável pelo reconhecimento específico do analito, isto é, o que se pretende analisar, que pode ser, por exemplo, DNA, RNA, genes, proteínas ou metabólitos (INPI, 2010).

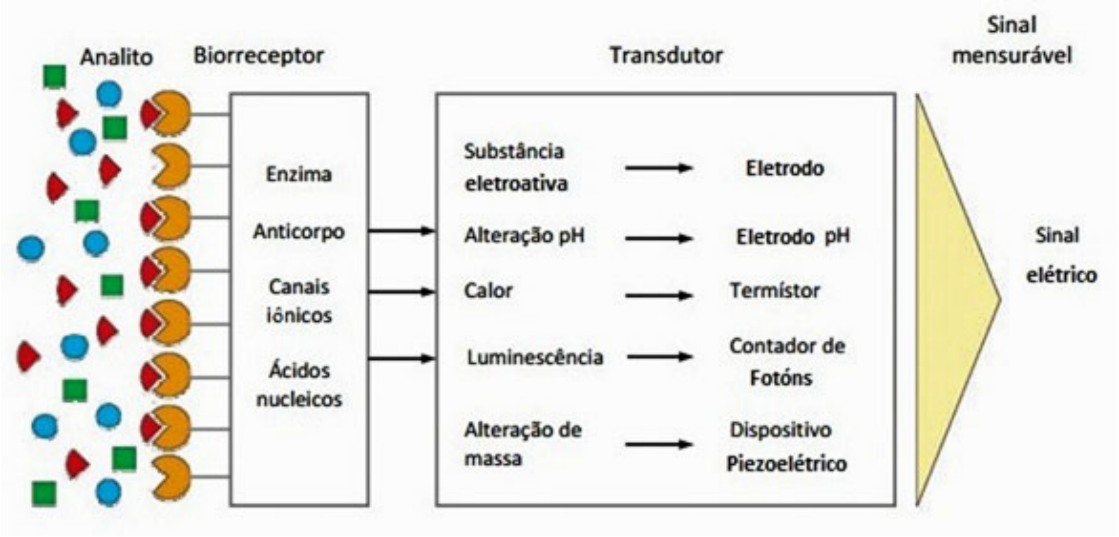
A interação do biorreceptor com o analito desencadeia uma resposta ou reação fisiológica que produz uma perturbação bioquímica no biossensor, que pode em seguida ser convertida – por um transdutor – num sinal detectável e mensurável, principalmente um sinal elétrico como visto na Figura 1.

De maneira geral, de acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como: eletroquímico (amperométrico, potenciométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência), piezoelétrico (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezoelétricos com a variação da massa), ou termométrico (KUMAR & RANI, 2013).

Os biossensores amperométricos têm sido preferidos pela fácil manipulação e pelo fato da concentração do analito ser proporcional à alteração na corrente elétrica. Os biossensores amperométricos são baseados na medida de corrente elétrica, resultante de alterações de oxidação, ou redução de espécies eletroativas. Durante as análises, o potencial é mantido constante, as alterações de corrente verificadas são correlacionadas diretamente com a concentração das espécies eletroativas presentes, com a sua produção, ou com a taxa de consumo na camada biocatalítica (FURTADO et al., 2008).

Dependendo do tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, o biossensor pode ser classificado como catalítico ou de afinidade (GARCÍA-MARTINEZ et al., 2011).

FIGURA 1. Esquema geral de funcionamento de um biossensor.



Fonte: Adaptado de Rustagi & Kumar, 2013

3.1.2 Biossensoriamento com canais iônicos

O estudo da estrutura das proteínas de membrana constitui uma área de investigação biomédica muito promissora, uma vez que de 20-35% das proteínas codificadas pelo genoma são proteínas integrais da membrana (canais iônicos, transportadores e receptores) (ROBERTSON et al., 2012). Os canais iônicos são talvez, os mais bem conhecidos, porque eles constituem a base molecular da atividade muscular e da propagação do impulso nervoso (HILLE, 2001). Além disso, atuam controlando o transporte de íons, água e macromoléculas para dentro e fora das células, organelas e do núcleo (REINER et al., 2012).

O crescente interesse em torno dos nanoporos proteicos (canais iônicos) surgiu devido às funções essenciais que desempenham em muitos processos fisiológicos em organismos vivos (BEHRENDS, 2012). Muitas das propriedades de transporte dos canais iônicos biológicos não são bem compreendidas, logo investigar essas propriedades pode muitas vezes ser um desafio com sistemas biológicos, devido à sua natureza frágil (BEZANILLA, 2000). A

construção de dispositivos artificiais com propriedades de transporte semelhantes às de canais iônicos biológicos poderia dar uma nova visão sobre os princípios físicos e químicos de operações desses canais (HARREL, 2004).

A propriedade mais importante, dos canais iônicos como via para a passagem de matéria através das membranas, é que eles são os poros através dos quais, os íons se movem por eletrodifusão (BEHRENDS, 2012). Estes poros são formados por proteínas de membrana que abrangem toda a espessura da membrana celular (~ 4 nm) e são considerados o dispositivo primário, utilizado pelas células para comunicar-se com outras células (HILLE, 2001).

Os primeiros relatos da proposta de utilização de canais iônicos independentes de ligantes, porém dependentes de voltagem, como elementos de reconhecimento em biossensores surgiram em meados da década de 90 (WALKER et al, 1994; SACKMANN, 1996; CORNELL et al, 1997; TURNER, 1997).

Conceitualmente do ponto de vista biofísico e fisiológico, a análise da ligação de uma substância com o canal iria fazer este alterar a sua conformação e condutância. No entanto, esse tipo de biomimetismo não é fácil, por várias razões. Em alguns casos, a ligação dos analitos nos canais faz com que o canal altere a sua conformação padrão, um processo difícil de manter controle experimental. Adicionalmente, muitos canais tendem espontaneamente a variar entre diferentes estados condutores, em resposta a um potencial aplicado (REINER et al., 2012). Esse problema foi resolvido, com a descoberta do canal formado pela exotoxina bacteriana do *Staphylococcus aureus*, a alfatoxina, possibilitando a sua utilização para uma vasta gama de aplicações no biossensoriamento (KASIANOWICZ et al., 2008; ZHAO, 2008; WANG et al., 2013).

Há um grande interesse na utilização de nanoporos formados pela alfatoxina como o principal elemento de reconhecimento no sensoriamento estocástico (BAYLEY & CREMER, 2001). Esse tipo de sensor pode detectar moléculas unitárias que se aproximam do nanoporo por difusão e ocupam temporariamente o lume aquoso do nanoporo (RHEE & BURNS, 2007). Esta ocupação altera a quantidade de íons que cruza o nanoporo, gerando um evento de bloqueio. Esse perfil de bloqueio é caracterizado pelo tempo de duração (tempo de residência ou permanência) da interação do analito com o nanoporo, juntamente com a amplitude do bloqueio. As moléculas unitárias usualmente se aproximam do nanoporo por difusão

(fenômeno probabilístico, estocástico, randômico), permitindo a aplicação da terminologia, detecção estocástica ou sensor estocástico (KANG et al., 2007; MULERO et al., 2010).

O nanoporo da alfatoxina tem sido amplamente caracterizado como uma plataforma potencial para o sequenciamento de DNA. O nanoporo da alfatoxina contém uma constrição de aproximadamente 1,5 nm, o que evita a passagem de fita dupla (ds) de ácidos nucléicos, mas permite a passagem da fita simples (ss) dos oligonucleotídeos. Além disso, ele é passível de modificação por engenharia genética, e por ter a sua geometria bem definida permite a introdução de funcionalidades químicas. Ambas as formas, do tipo selvagem e mutante do nanoporo da alfatoxina inserem-se facilmente em bicamadas lipídicas e mantém a integridade estrutural sob temperaturas elevadas, várias concentrações de sais, e até na presença de alguns agentes químicos desnaturantes (ZHAO, 2008; CRACKENELL et al., 2013).

3.2 Nanoporos proteicos formado por toxinas bacterianas

Diversas espécies vivas evoluíram dotadas com inúmeras toxinas, com seletividade para alguns canais iônicos de células excitáveis (DUTERTRE & LEWIS, 2010). Essa descoberta foi muito importante, para melhor compreensão das características estruturais e funcionais de vários canais iônicos (NESTOROVICH & BEZRUKOV, 2012).

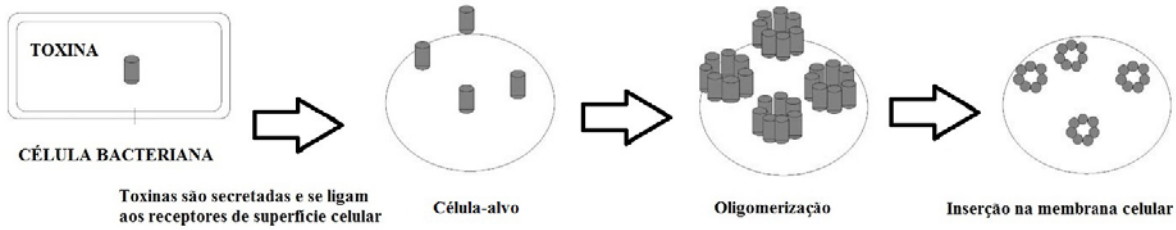
Por outro lado, há um grupo bastante significativo de toxinas, que em vez, de bloquear os canais, são capazes de formar poros condutores nas membranas das células alvo. Essas toxinas são denominadas, “toxinas formadoras de poros” ou PFT_S (BARTH et al., 2004; PARKER & FEIL, 2005).

As toxinas bacterianas podem ser divididas em dois grupos funcionais distintos: endotoxinas e exotoxinas. No contexto proposto, as exotoxinas são as que apresentam maior importância, uma vez, que são capazes de existir em dois estados. Uma conformação solúvel em água e outra mais estável, inseridas em membranas lipídicas de células eucarióticas (PARKER & FEIL, 2005).

As toxinas com capacidade para formar poros representam aproximadamente 1/3 das toxinas proteicas identificadas até o momento (NESTOROVICH & BEZRUKOV, 2012). Estudos com essas toxinas, *in vitro*, vêm fornecendo informações importantes a cerca das propriedades biofísicas de vários canais, como por exemplo, condutância de um único canal e seletividade iônica (FELD et al., 2010).

A maioria das exotoxinas bacterianas age em nível de superfície celular. Elas são secretadas como proteínas individuais (monômeros), solúveis em água, que ao atingir as células eucarióticas, incorporam na membrana celular e formam grandes poros permeáveis à água e aos íons como visto na Figura 2 (BERUBE & WANDENBURG, 2013).

FIGURA 2. Etapas gerais da formação de poros transmembrana gerados a partir de toxinas bacterianas.



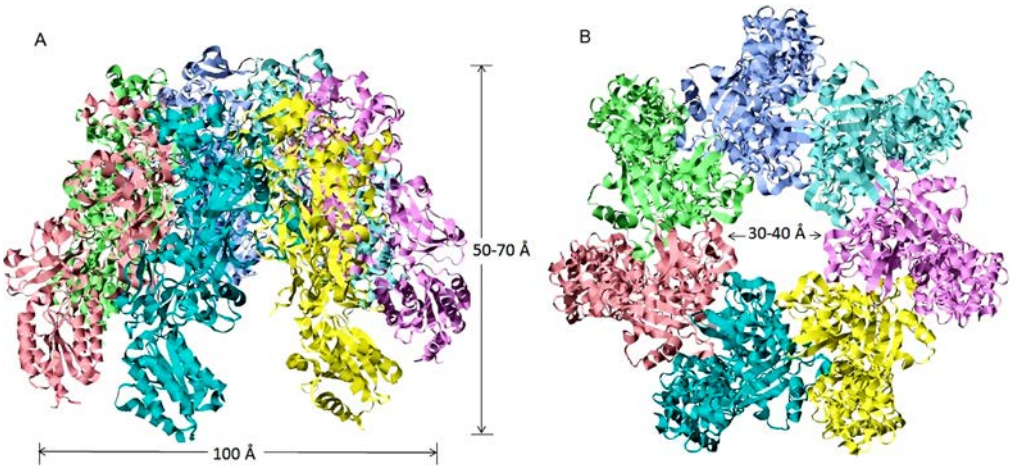
Fonte: Adaptado de PARKER & FEIL, 2005. As toxinas são secretadas como monômeros solúveis que ao atingir a célula hospedeira se oligomerizam e formam poros.

Alguns nanoporos proteicos unitários formados por exotoxinas estão sendo utilizadas como elemento de reconhecimento para detecção unitária de diversas moléculas, inclusive para o sequenciamento de DNA, como por exemplo:

Anthrax: A toxina Antraz, secretada pelo *Bacillus anthracis*, é composta por três exotoxinas, o fator de edema (*Edema Factor*- EF), o fator letal (*Lethal Factor*- LF) e o antígeno protetor (*Protective Antigen*- PA), sendo o PA o mais imunogênico.

As exotoxinas não têm atividade tóxica quando administradas separadamente, mas as combinações binárias que incluem o PA são extremamente tóxicas. O PA liga-se a um receptor da superfície celular, uma proteína de membrana de cerca de 90 kDa que é encontrada em várias linhagens celulares de mamíferos. Após isso, é submetida a uma clivagem proteolítica e os fragmentos ativados formam um poro heptamérico (Figura 3) que se liga a LF e ~~/~~ou EF. Esse poro também tem sido utilizado como elemento sensor na detecção de proteínas, quando inserido em membranas lipídicas planas (LIU et al., 2012);

FIGURA 3. Estrutura do poro Antrax.



Fonte: Retirado do Protein Data Bank (pdb), código 7AHL. O poro heptamérico formado pela toxina do *Bacillus anthracis*.Uma visão lateral é apresentada em A e uma visão do topo do nanoporo é mostrada em B

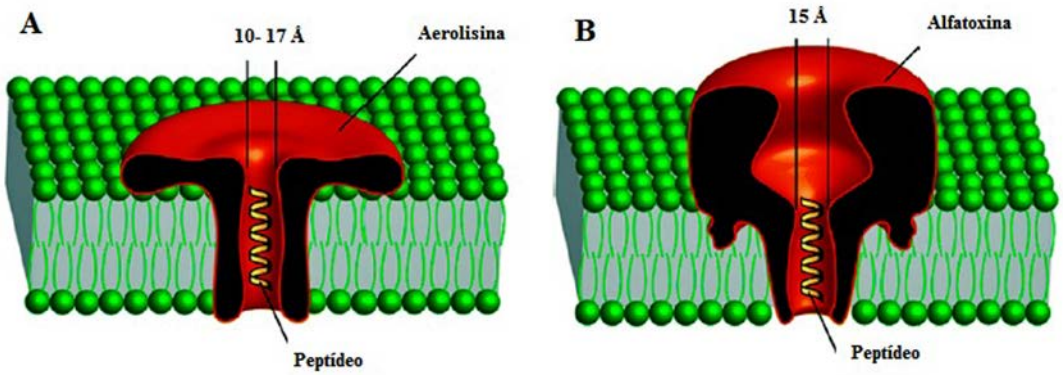
Aerolisina: É uma toxina derivada de *Aeromonas hydrophila* que também sido utilizada como elemento sensor na detecção de proteínas. A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria Gram-negativa, patogênica para certo número de animais (peixes, anfíbios, moluscos) e causam doenças gastrointestinais em seres humanos (PARKER & FEIL, 2005). Ela foi identificada em 1974 por Bernheimer e Avigag, alguns anos depois foi purificada (HOWARD & BUCKLEY, 1985) e finalmente o gene da aerolisina foi sequenciado por Howard e colaboradores em 1987. Essa toxina é secretada como pro-aerolisina, que é um precursor inativo de 470 aminoácidos com um peso molecular de 52 kDa. O monômero ativado da aerolisina se oligomeriza na superfície da membrana, formando um poro heptamérico (Figura 4A) (PASTORIZA-GALLEGO et al., 2011; NESTOROVICH & BEZRUKOV, 2012).

Embora a estrutura heptamérica da aerolisina ainda não esteja bem estabelecida, a estrutura determinada por microscopia eletrônica indica semelhanças estruturais com o nanoporo formado pela alfatoxina (HOWARD et al., 1987). O poro da aerolisina tem um formato de cogumelo com um domínio extramembranar que varia entre 10-17Å (PARKER & FEIL, 2005). O comprimento desses dois nanoporos é o mesmo, mas o diâmetro dos poros é menor na aerolisina do que na alfatoxina, muito provavelmente pela ausência do domínio vestibular no poro formado pela aerolisina, resultando em um modelo semelhante a um rebite

("rivet-like") do canal como pode ser visto na Figura 4 (PASTORIZA-GALLEGO et al., 2011);

Alfatoxina: A maioria das aplicações mais notáveis, com estudos de toxinas e canais envolve o uso da alfatoxina (Figura 4B) de *Staphylococcus aureus* como sensor para diferentes analitos (KANG et al., 2007; GURNEV et al., 2009;MULERO et al., 2010;AYUB et al., 2013;ERVIN et al., 2014). O nanoporo proteico formado por essa toxina é o elemento sensor que utilizamos nesse estudo. A seguir, descrevemos a estrutura e as características funcionais desse poro como elemento sensor.

FIGURA 4. Representação esquemática do poro da aerolisina (A) e a alfatoxina (B) incorporados em bicamadas lipídicas planas com peptídeos atravessando os canais.



Fonte: Adaptado de Nestorovich & Bezrukov, 2012.

3.3 ALFATOXINA

3.3.1 *Estrutura*

O gene que codifica a alfatoxina foi descoberto em 1980 (BERUBE & WANDENBURG, 2013). A atividade da alfatoxina em formar canais em bicamadas lipídicas planas foi relatada pela primeira vez por KRASILNIKOV e colaboradores em 1981. Ela é uma exotoxina proteica de 33 kDa produzida pelo *Staphylococcus aureus*, liberada na forma

de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos solúveis em água (GRAY & KEHOE, 1984).

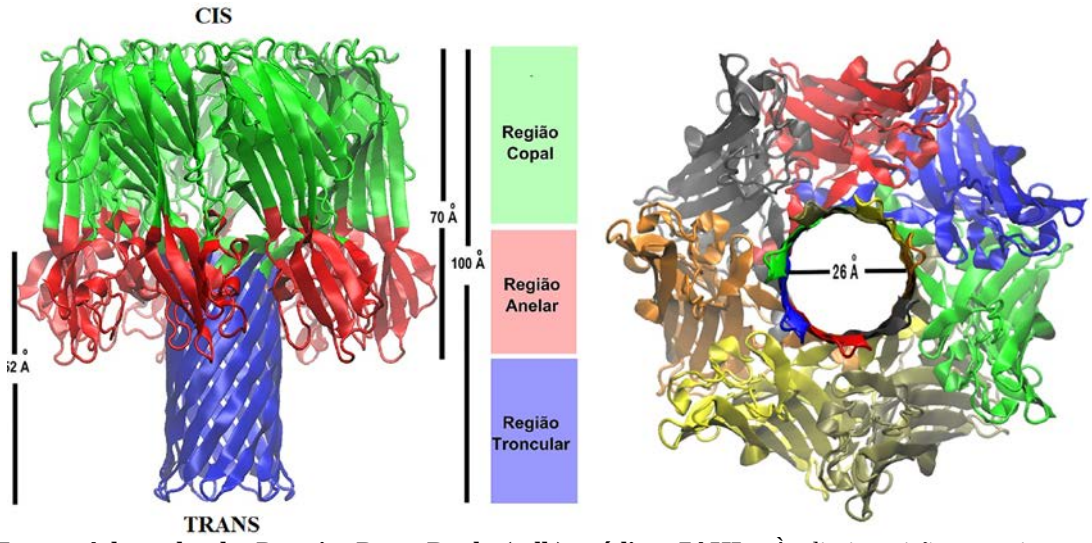
A geometria do poro aquoso e o seu posicionamento assimétrico em relação ao plano da membrana já foram elucidados em condições dinâmicas com não-eletrólitos (KRASILNIKOV et al., 1988; MERZLYAK et al., 1999). Estudos de dicroísmo circular revelaram que a toxina é composta quase que inteiramente por β-folhas com pouca estrutura em α- hélice (BERUBE & WANDENBURG, 2013).

A estrutura cristalográfica tridimensional deste poro foi elucidada (SONG et al., 1996) e os dados cristalográficos denotam a existência de sete monômeros delimitando o nanoporo aquoso, os quais se inserem em membranas e então se oligomerizam para formar o poro heptamérico transmembranar, permitindo a passagem de água e de diversas moléculas pelo seu interior (GU et al., 1999; NOSKOV et al., 2004).

O nanoporo da alfatoxina é formado por três diferentes domínios (extramembranar ou copal, intramembranar ou troncular e o anelar), onde somente os dois primeiros participam da formação do poro (MERZLYAK et al., 2005). O domínio extramembranar (convencionalmente denominado lado “cis”), possui uma entrada de maior diâmetro (~ 4,6 nm) que possibilita a entrada de macromoléculas. Por outro lado, o domínio intramembranar é completamente inserido na bicamada lipídica (lado trans) apresenta uma entrada (convencionalmente denominado lado “trans”) de menor diâmetro (~ 2 nm), sendo composto por 14 folhas β-barril (Figura 5) (BERUBE & WANDENBURG, 2013).

A parte terminal do domínio “trans” é formada por um anel composto de aminoácidos ácidos e básicos, os quais se encontram separados por uma pequena distância de ~ 4 nm, constituída de aminoácidos neutros (MERZLYAK et al., 2005). Estes dois domínios estão separados por uma constrição de 1,4 nm de diâmetro, o que torna esse poro, uma ferramenta altamente promissora para biotecnologia (BAYLEY & CREMER, 2001; HOWORKA & SIWY, 2009; AKSIMENTIEV, 2010).

FIGURA 5. Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina.



Fonte: Adaptado do Protein Data Bank (pdb), código 7AHL. À direita visão superior com cada subunidade representada em diferentes cores. À esquerda visão lateral com cada domínio representado em três cores. Na área central, os retângulos empilhados em três cores específicas correspondem a espessura aproximada de cada domínio. A região troncular se insere completamente na membrana lipídica, e fica posicionada com a entrada convencionalmente denominada TRANS no mesmo plano da superfície da membrana. A região copal não se insere na membrana lipídica e a entrada CIS do nanoporo fica distante (~50 Å) da superfície da membrana. A região anelar (parte inferior da copa) fica ancorada na membrana. As barras verticais indicam o comprimento de cada região e o diâmetro do nanoporo.

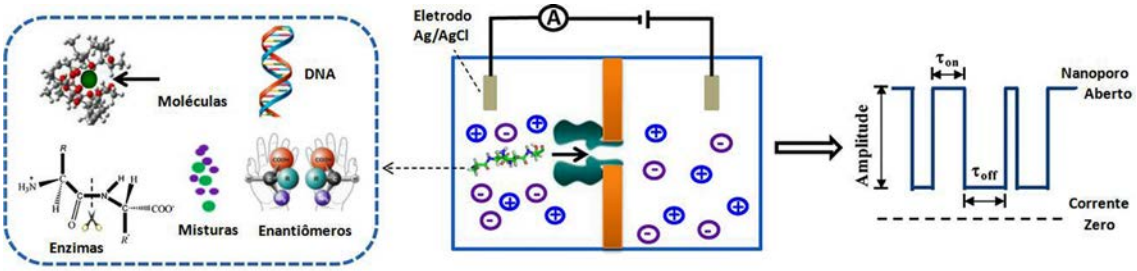
3.3.2 Nanoporo proteico da alfatoxina como elemento de reconhecimento molecular

O funcionamento do nanoporo como sensor consiste na inserção de um único poro em uma bicamada lipídica plana que separa dois compartimentos com solução iônica. Quando um potencial é aplicado, uma corrente iônica máxima flui através do poro carreada pelos íons da solução salina banhante de ambos os lados da bicamada como esquematizado na Figura 6. O nanoporo contém um sítio de interação para o analito, e toda vez que o analito ocupa o lume, induz uma modulação, diminuindo a corrente máxima (bloqueio parcial) (Figura 6) **(**MOVILEANU, 2009; WANG et al.,2013.;WOLNA et al., 2013).

Na situação mais simples, o elemento sensor tem dois estados - ocupado (pelo analito) e não-ocupado - e uma saída característica associada a cada um dos respectivos estados como

visto na Figura 6. Deste modo, está técnica permite monitorar os eventos individuais de interação, como um contador de moléculas semelhante ao contador Coulter (COULTER, 1953; BEZRUKOV, et al, 2004).

FIGURA 6. Modelo esquemático do funcionamento do nanoporo de alfatoxina como biossensor.



Fonte: Adaptado de WANG et al.,2013. A interação dos analitos com um único nanoporo em uma bicamada lipídica plana banhada por solução iônica induz uma modulação da corrente iônica, diminuindo a amplitude (bloqueio parcial).

As moléculas unitárias usualmente se aproximam do nanoporo por difusão (fenômeno probabilístico, estocástico, randômico), daí então a denominação sensor estocástico. Devido à natureza estocástica, as durações dos bloqueios individuais diferem entre si, porém, estatisticamente, seguem uma distribuição exponencial. A constante de ajuste da distribuição exponencial é definida como o tempo médio do bloqueio, τ_{off}. A mudança na amplitude da condutância (Δg) juntamente com o valor da τ_{off} representam a assinatura de identificação do analito. Com τ_{off}, podemos calcular a constante de dissociação, k_{off}, do complexo analito-nanoporo: $k_{off} = 1/\tau_{off}$. Adicionalmente, ao determinar a frequência de eventos de interação (bloqueios na corrente), pode-se quantificar o analito medindo o intervalo entre dois bloqueios adjacentes. Semelhante ao tempo médio de bloqueio, os intervalos estocásticos também seguem uma distribuição exponencial e a constante τ_{on} é o intervalo médio interbloqueio. O inverso do valor de τ_{on} é a frequência de ocorrência dos eventos ($f = 1/\tau_{on}$) que é proporcional à concentração do analito ([T]), usando este coeficiente como a constante de associação analito-nanoporo (k_{on}), por exemplo: $f = k_{on}[T]$ (GU & SHIM, 2010).

Os biossensores estocásticos apresentam algumas vantagens óbvias em relação aos sensores baseados em outros princípios de detecção, dentre elas podemos destacar: detecção praticamente simultânea de mais de um analito (multianalito), elevada sensibilidade, rapidez

de análise e o analito não precisa, necessariamente, ser marcado (por exemplo, sonda fluorescente) para ser detectado como uma entidade unitária (KASIONOWICZ et al.,2007; WANG et al., 2010). Em particular, a poro proteico da alfatoxina têm sido amplamente utilizado para a detecção, caracterização e análise de diversas moléculas, porque este nanoporo é altamente reprodutível e versátil em diversas condições experimentais (MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012).

3.3.3 Limitações do nanoporo sensor da alfatoxina

Algumas limitações dificultam o desenvolvimento de dispositivos comerciais baseados na detecção estocástica por nanoporo proteico. Elas têm sido alvo de diversos estudos que visam transpor esses problemas e aperfeiçoar o nanoporo sensor, melhorando a sua capacidade analítica. São três as limitações mais importantes:

1- Miniaturização do sistema experimental: Talvez seja considerada a maior barreira a ser ultrapassada nos próximos anos. O objetivo é tornar a aparelhagem experimental - composta por amplificador, conversor analógico-digital, câmara de detecção, mesa de amortecimento – em um único dispositivo portátil (OUKHALED et al., 2012);

2- Detecção de moléculas com dimensões muito diferentes do lume do nanoporo: A razão entre o diâmetro da molécula do analito e o diâmetro do nanoporo deve apresentar valores entre 0,1 e 1, para sua possível análise. Moléculas muito pequenas, do mesmo tamanho ou maiores que o nanoporo não conseguem interagir adequadamente, o que impede a sua detecção e quantificação adequada pelo sensor. Nesses casos, é comum a utilização de adaptadores moleculares e engenharia genética na tentativa de melhorar as características do biossensor (BAYLEY & JAYASINGHE, 2004; REINER et al., 2012);

3- Rápida velocidade de translocação de algumas moléculas pelo interior do nanoporo: Essa problemática tem sido abordada, principalmente, na utilização do nanoporo sensor como sequenciador de DNA que é a mais promissora aplicação desse dispositivo. Diversas alternativas estão sendo propostas na tentativa de resolver esse problema, uma delas é a alteração da viscosidade da solução banhante, o que teoricamente induz a diminuição da velocidade de translocação (KAWANO et al, 2009; DING et al, 2010).

3.3.4 Otimização do nanoporo proteico formado pela alfatoxina

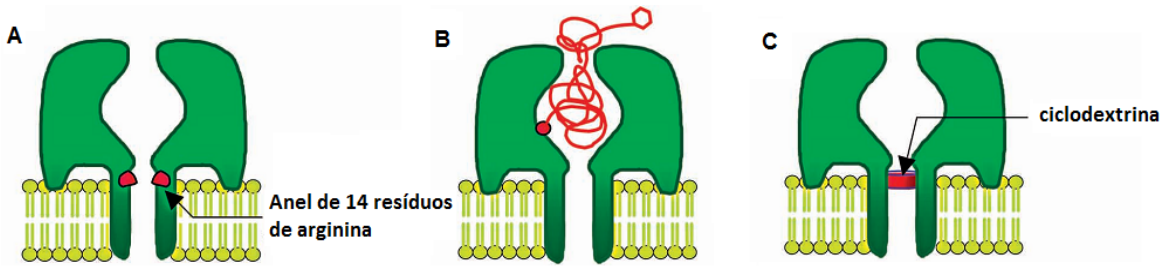
São muitos os esforços para aperfeiçoar e adequar o nanoporo proteico, a fim de aplicá-lo aos mais diversos fins. Poros funcionalizados apresentam várias potencialidades em biotecnologia, incluindo a sua capacidade de agir como um detector em sensoriamento estocástico, no sequenciamento de DNA e para atuar como um componente na construção de nano e microdispositivos (BANERJEE et al., 2010).

A molécula da alfatoxina oferece condições de alterações em sua estrutura molecular, gerando mutantes e possibilitando o seu remodelamento para produzir nanoporos adaptados à detecção de analitos com características físico-químicas diversas, dando origem aos chamados nanoporos protéicos funcionalizados ou "adaptados" como mostrado na Figura 7 (BANERJEE et al., 2010; MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012). Eles podem ser produzidos utilizando a técnica de mutagênese, na qual é introduzido, geneticamente, algum dos vinte aminoácidos naturais no poro proteico gerando uma variedade de cadeias laterais de diferentes tamanhos, formas, polaridade e reatividade química. Também pode ser realizada mutagênese introduzindo aminoácidos com configuração não usualmente encontrados nos seres vivos (MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012).

Os nanoporos também podem ser modificados quimicamente, onde um aminoácido da cadeia lateral, geralmente cisteína, é seletivamente modificado com um reagente químico permitindo uma diversidade de funcionalidades que podem ser incorporados dentro do poro. Uma delas é a adição covalente da extremidade de uma cadeia polimérica, o polietilenoglicol (PEG), no interior do nanoporo. Na outra extremidade do polímero é adicionado covalentemente um ligante. Esse ligante fica livre na parte externa do nanoporo, a interação do polipeptídeo com esse ligante gera um sinal no interior do nanoporo a fim de que a corrente iônica seja alterada e o analito detectado (BAYLEY& JAYASINGHE, 2004; ROTEM et al., 2012) (Figura 7).

Os nanoporos protéicos adaptados são utilizados na detecção estocástica de uma ampla variedade de moléculas em solução aquosa e constituem uma potencial plataforma ultra-rápida e de baixo custo para o sequenciamento de material genético, RNA e DNA (MAITRA et al., 2012; ROTEM et al, 2012).

FIGURA 7. Exemplos de nanoporos de α-hemolisina de *Staphylococcus aureus* adaptado.

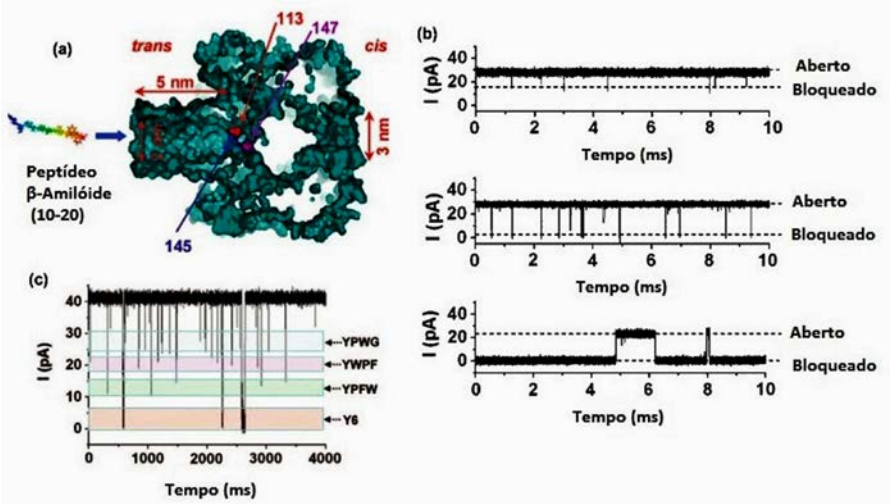


Fonte: Adaptado de BAYLEY & JAYASINGHE, 2004. Em (A) o poro geneticamente adaptado, com um anel de 14 resíduos de arginina localizado próximo à região mais estreita do lúmen do poro; (B) poro contendo uma cadeia polimérica (PEG) fixada covalentemente no interior do nanoporo; (C) poro contendo um adaptador molecular (ciclodextrina) dentro do lume.

Como exemplo, Zhao e colaboradores (2009) demonstraram que nanoporos modificados com resíduos aromáticos apresentaram uma maior afinidade de interação na detecção de peptídeos curtos, incluindo aqueles diferentes em apenas um aminoácido (ZHAO et al., 2009).

Esta modificação permitiu aos nanoporos funcionalizados, diferenciar e simultaneamente quantificar diversos peptídeos estruturalmente muito similares (Figura 8). Além disso, há estudos para modular a seletividade do poro, com o uso de adaptadores moleculares introduzidos no interior do poro formado da α-HL tornando ainda mais estreita a sua constrição, e desse modo, favorecendo uma seletividade específica com intuito de facilitar a identificação e a quantificação do analito, incluindo a detecção de bases de DNA e RNA (GU et al., 1999,AYUB et al., 2013).

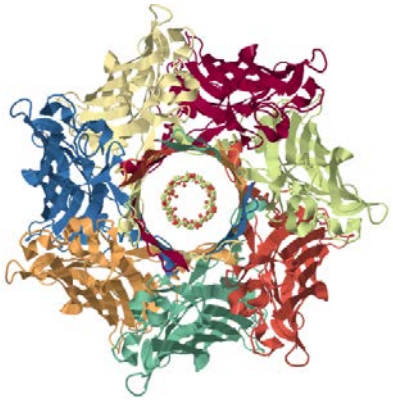
FIGURA 8. Representação gráfica molecular do nanoporo proteico formado pela alfatoxina.



Fonte: Adaptado de ZHAO et al., 2009. Em (a) As três posições de mutação (113, 145 e 147), utilizadas para detecção de peptídeos estão indicadas em vermelho, azul e roxo, respectivamente. Os poros modificados receberam a denominação de (WT)7, (M113F)7, (2FN)7 de acordo com a localização da mutação (b) registros elétricos típicos, bem como a corrente residual da interação do peptídeo Y6 com os três poros (WT)7, (M113F)7, (2FN). E em (c) a detecção simultânea de quatro peptídeos: Y6, YPFW, YWPF, e YPWG.

Um exemplo desses adapatadores é a β-ciclodextrina (Figura 9) que apesar de ser muito utilizada (BANERJEE ET AL., 2010), não apresenta seletividade específica para moléculas pequenas por isso, para sua melhor utilização é necessário também à mutação do nanoporo proteico, o que torna essa interação (ciclodextrina-nanoporo) aproximadamente 10^4 vezes maior do que com a toxina do tipo selvagem. (KAWANO et al, 2011). Outra possibilidade de aperfeiçoar o nanoporo proteico é a modificação das propriedades físico-químicas da solução banhante do nanoporo. Este tipo de abordagem sugere que mudanças em alguns parâmetros da solução, tais como, viscosidade (FOLOGEA et al., 2005; KAWANO et al., 2009), grau de estruturação da água, tipo de íon dissolvido (RODRIGUES, et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011), dentre outros, pode alterar a intensidade da interação entre o analito e o nanoporo, favorecendo a capacidade de detecção do elemento sensor. Um maior aprofundamento destas propriedades será abordado posteriormente na Seção 3.5.3.

FIGURA 9. Modelo estrutural da ligação da β-ciclodextrina (anel central) com o nanoporo heptamérico mutante da alfatoxina.



Fonte: Protein Data Bank (pdb), código 3M3R. O poro foi modificado na posição 113, onde foi trocada uma metionina por uma asparagina (M113N). Cada subunidade do nanoporo é mostrada em cores diferentes.

3.4 Aplicações do nanoporo da alfatoxina

Um nanoporo proteico formado pela alfatoxina incorporado em uma bicamada lipídica plana possui aplicabilidade em diversas áreas, principalmente pela sua capacidade multianalítica e pela ampla variedade de adaptações em sua estrutura molecular (uso de mutantes, adaptadores moleculares), que podem ser feitas para adequá-lo às mais diversas aplicações.

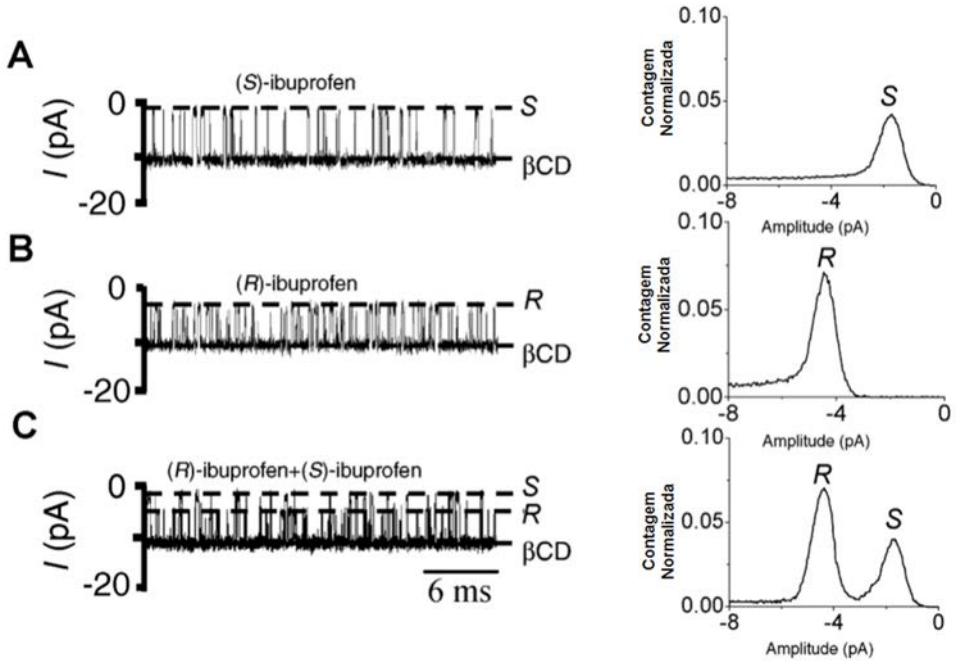
3.4.1 Detecção de enantiômeros

KANG e colaboradores em 2006 relataram a propriedade que o nanoporo da alfatoxina possui em detectar simultaneamente mais de um analito em meio aquoso. Para isso, foi utilizada uma alfatoxina mutante acoplada a uma β-ciclodextrina, na tentativa de aumentar a especificidade do nanoporo, na detecção das formas enantioméricas do ibuprofeno (KANG et al., 2006) (Figura 10).

Essa capacidade em detectar mais de um analito é explicada pela interação mutuamente exclusiva do analito, graças à restrição de confinamento ao lume aquoso do nanoporo. Deste modo, mesmo que dois analitos interajam em um mesmo local, apenas um deles terá acesso por vez, e podem ser identificados por gerarem “assinaturas moleculares” específicas.

A propriedade multianalítica garante vantagens ao nanoporo da alfatoxina em relação a outros tipos de sensores como, por exemplo, os imunossensores e os sensores enzimáticos, pois nestes últimos a especificidade limita sua utilização na detecção de mais de um analito, já que, por exemplo, para cada anticorpo, há um antígeno diferente (KASIANOWICZ et al., 2001).

FIGURA 10. Demonstração da propriedade multianalítica do biossensor baseado no poro protéico formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus* inserido em bicamada lipídica plana.



Fonte: Adaptado de KANG et al., 2006. Em (a) Registro dos bloqueios na corrente iônica característica do (S)-ibuprofeno; b) Registro dos bloqueios na corrente iônica característica do enantiômero (R)-ibuprofeno; e, c) Registro dos bloqueios da corrente iônica de ambas as moléculas simultaneamente, com seus respectivos histogramas de amplitude de corrente

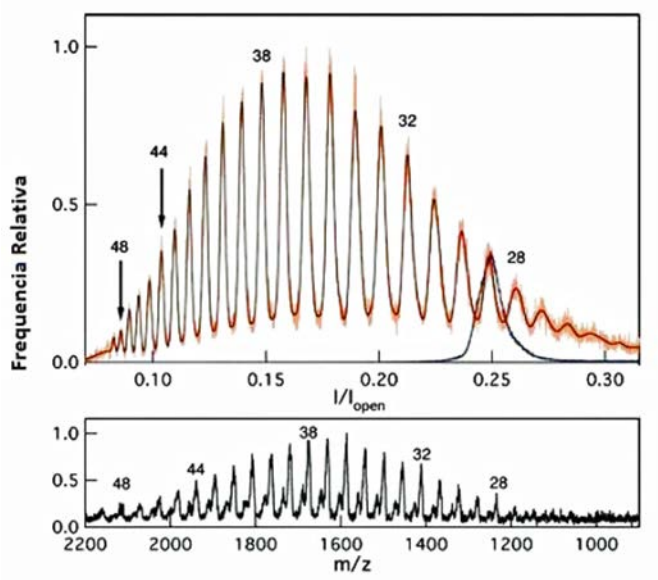
3.4.2 *Espectrômetro de massa*

A determinação da massa, tamanho e concentração de moléculas ou analitos em amostras é de grande interesse científico e tecnológico. A técnica padrão atual para determinação da massa de moléculas é a espectrometria de massa (MALDI-TOF), que apesar de amplamente empregada apresenta como desvantagens: ser um ensaio destrutivo e de

dificílima miniaturização à escala nanométrica, portanto, inviabilizando seu emprego nos sistemas LAB-ON-A-CHIP (ABONNENC et al., 2010).

Em 2007 nosso grupo juntamente com pesquisadores do National Institute of Health, demonstraram pioneiramente a utilização de nanoporos proteicos unitários, atuando como um espectrômetro de massas de moléculas poliméricas (polietilenoglicol) de tamanhos variados em solução aquosa (Figura 11).

FIGURA 11 Nanoporo da alfatoxina como espectrômetro de massas.



Fonte: Adaptado de Robertson et al., 2007. Espectro de massa (superior) para o polietilenoglicol (PEG 1500, Mr=1500 g/mol) polidisperso obtido com o nanoporo unitário comparado ao espectro de massa (inferior) obtido pelo MALDI-TOF. Os histogramas representam o valor médio da corrente para cada amplitude de bloqueio referente a cada molécula do polímero. Os números na parte superior em cada "pico" do histograma indicam a quantidade de monômeros do etilenoglicol em cada molécula do polímero. Os maiores valores de I/I*open* correspondem às moléculas de PEG de menor massa molecular. O I indica o valor de corrente iônica através do nanoporo quando este é ocupado pelo polietilenoglicol, e I*open* é o valor de corrente quando não há moléculas de PEG no interior do nanoporo da alfatoxina. O "pico" indicado pelo número 28 corresponde a análise da amostra de polietilenoglicol (PEG 1294) monodisperso. No MALDI-MS devido ao processo de desorção e ionização, cada molécula do PEG perde um O ou OH

As assinaturas moleculares características, são capazes de promover a distinção destes compostos com base na modulação da corrente iônica em função das massas molares das cadeias do polietilenoglicol (PEG) (ROBERTSON et al.,2007;STANFORD et al., 2010). Na aplicação espectrométrica, o nanoporo apresentou alta sensibilidade, uma vez que foi capaz de discriminar as diferentes cadeias poliméricas da amostra de PEG polidisperso diferindo entre elas, apenas, em uma única unidade monomérica neutra do etilenoglicol (STANFORD et al., 2010).

3.4.3 M*onitoramento de toxinas na água*

Uma das aplicações mais recentes foi a utilização do nanoporo como elemento sensor, na detecção de cianotoxinas na água, mais especificamente as microcistinas. Este trabalho de pesquisa, realizado pioneiramente por nosso grupo de pesquisa resultou em uma patente (PAT WO2013026123, 2013).

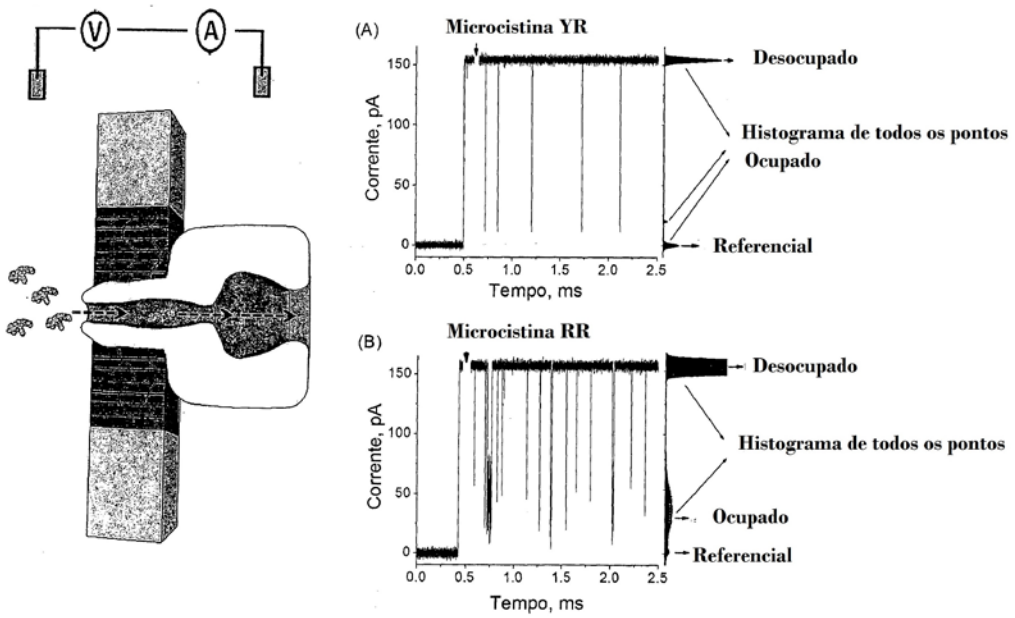
As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos produzidos por diversas espécies do gênero *Microcystis*, e sua presença em concentração superior a 1 µg/L inviabiliza o uso d'água para o consumo humano e prejudica toda cadeia produtiva dependente de água de boa qualidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Existem aproximadamente 80 diferentes variantes estruturais de microcistinas, mas, todas apresentam alguns aminoácidos na configuração D, ausente nas proteínas presentes no organismo humano (SHENG et al., 2007). A grande variabilidade estrutural das microcistinas representa um empecilho a mais para o monitoramento, quantificação e identificação confiável destas moléculas em meio aquoso, exigindo atualmente o emprego de diversos métodos analíticos (SILVA, 2011).

Na tentativa de melhorar a identificação dessas cianotoxinas, o método baseado no biossensor proteico foi desenvolvido para detecção, quantificação e caracterização dessas microcistinas em meios aquosos (Figura 12).

Este método é dotado de elevada sensibilidade, possibilitando o monitoramento dessas moléculas em tempo real.

FIGURA 12. Modelo estrutural do nanoporo formado pela alfatoxina e a representação dos registros de bloqueios na corrente iônica característicos da detecção de dois tipos de microcistinas.



Fonte: Retirado de PAT WO2013026123, 2013). Em (A). microcistina YR em (B) microcistina RR pelo nanoporo proteico formado pela alfatoxina, inserido em uma bicamada lipídica plana

3.4.4 *Sequenciador molecular*

Os polinucleotídeos na natureza existem em duas classes: o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). O DNA armazena a informação genética para o desenvolvimento e função da maioria dos organismos vivos e alguns vírus. O RNA é transcrito a partir de DNA por enzimas para a produção de proteínas, e a maioria dos vírus mantém a sua informação genética sob a forma de RNA (MARTIN, 2011).

O DNA é encontrado em bactérias, no núcleo das células eucarióticas e nas mitocôndrias (BARRETT et al., 2013).

A determinação da estrutura do DNA foi realizada por Watson e Crick em 1953, com base em estudos de difração de raios X (BORGES-OSÓRIO, 2013). A estrutura da molécula de DNA é formada por monômeros chamados nucleotídeos (Figura 13).

FIGURA 13. Estrutura e conformação da Molécula de DNA.

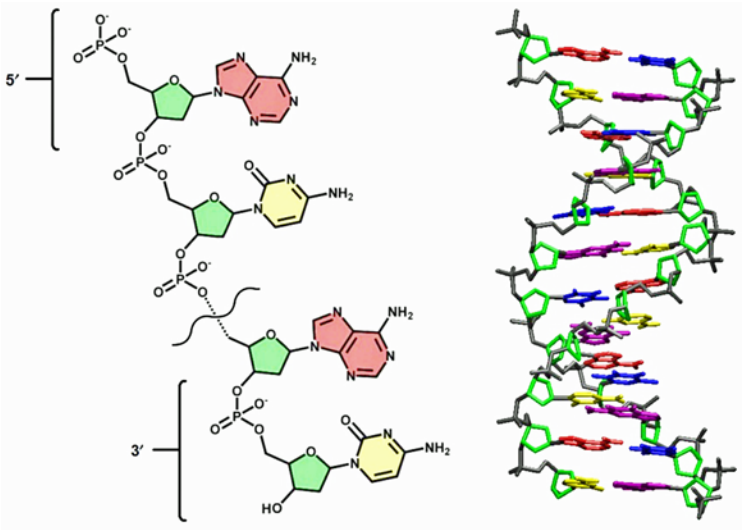


FIGURA 13. Estrutura e conformação da molécula de DNA. A estrutura molecular de uma cadeia simples de DNA é mostrada no lado esquerdo, com os grupos de fosfato, o açúcar desoxirribose (verde), a base adenina (vermelho claro) e a citosina (amarelo). A conformação da dupla-hélice é mostrada à direita. **RETIRADO DE MARTIN, 2011.**

Cada nucleotídeo na cadeia polimérica é composto por uma base, um açúcar e um grupo fosfato. O açúcar (desoxirribose) e o grupo fosfato formam a unidade de repetição da estrutura dos polinucleotídeos, cada monômero se une a outro através de uma ligação fosfodiéster. O grupo fosfato liga-se ao carbono 3’ do açúcar de um nucleotídeo e ao carbono 5’ do açúcar do nucleotídeo seguinte (VOET & VOET, 2013).

A forma na qual as subunidades nucleotídicas estão ligadas confere uma polaridade química à fita de DNA. Cada açúcar forma uma protuberância (o fosfato 5’) em um lado e uma cavidade (a hidroxila 3’) no outro, cada cadeia completa, forma protuberâncias e cavidades entrelaçados, assim todas as subunidades estão alinhadas na mesma orientação. Essa polaridade na cadeia de DNA é indicada pela denominação das extremidades 3’ e extremidade 5’ (ALBERTS et al, 2013).

As bases nitrogenadas são assim designadas, pois são formadas por anéis de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Há quatro tipos de bases: citosina e timina, que são as pirimidinas; e adenina e guanina, que são as purinas (ALBERTS et al., 2013).

As bases de nucleotídeos podem formar ligações de hidrogênio com bases complementares. Essa interação é devido às estruturas moleculares correspondentes e ao padrão de ligação de hidrogênio entre guanina e citosina ou adenina e timina. Logo, cada molécula de DNA é uma dupla hélice formada a partir de duas fitas simples e complementares de nucleotídeos (Figura 13) (MARTIN, 2011).

Devido a sua fundamental importância para a biologia um dos maiores desafios científicos do século XX foi o desvendamento da sequência de nucleotídeos. As técnicas de seqüenciamento de DNA vêm beneficiando um grande número de áreas científicas, incluindo genética, biologia computacional, ciências biomédicas, medicina diagnóstica, biologia molecular, antropologia, arqueologia e ciências forenses. Apesar da grande quantidade de informações que se tornou disponível a partir do método de seqüenciamento de Sanger, empregado no Projeto Genoma Humano (HGP), está claro que o futuro demanda por outras técnicas, rápidas e de menor custo (RHEE & BURNS, 2007; MUTHUKUMA, 2007; AYUB et al.,2013).

Em 1977, surgiu o método de determinação de cadeia de Sanger que se tornou o método mais popular de sequenciamento de DNA. O primeiro sequenciador automático foi lançado em 1986 (ABI 370) e em 1998 surgiu o primeiro sequenciador de eletroforese capilar, o ABI 3700. Com a automatização foi possível realizar grandes projetos de sequenciamento, como o genoma humano (VARUZZA, 2011).

Vários esforços acadêmicos e comerciais estão desenvolvendo novas tecnologias de seqüenciamento que visam reduzir o custo do sequenciamento de DNA em várias ordens de magnitude, uma vez que, a capacidade de sequenciar rapidamente o genoma humano (por exemplo, em 15 minutos) e a um preço acessível (por exemplo, EUA $ 1000) seria um marco na medicina (MUTHUKUMA, 2007; RINCON-RESTREPO et al., 2011). A esse preço e velocidade, a maioria das pessoas poderia ter seu genoma sequenciado possibilitando um tratamento médico personalizado. Graças aos avanços nas técnicas de segunda geração de sequenciamento de DNA, o custo de sequenciamento de um genoma humano inteiro é de aproxidamente $50,000 dólares americanos (BRANTON et al., 2008; DRMANAC et al., 2010; RINCON-RESTREPO et al., 2011;WOLNA et al., 2013).

O sequenciamento de nova geração – Next Generation Sequencing, em inglês, ou simplemente NGS– são processos de sequenciamento de DNA que utilizam metodologias diferentes da de Sanger, com o objetivo de acelerar e baixar o custo deste processo. Apesar

de se diferenciarem entre si todos os sequenciadores de NGS se baseiam no processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA. Enquanto que um sequenciador de eletroforese processa, no máximo, 96 fragmentos por vez, os sequenciadores de nova geração podem ler até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo (VARUZZA, 2011).

Cada tecnologia de sequenciamento possui uma estratégia diferente, mas em geral apresentam etapas comums como: preparo da amostra, amplificação da biblioteca e sequenciamento (VARUZZA, 2011). Por muitos anos, o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI) tem monitorado os custos associados com sequenciamento de DNA realizado nos centros de sequenciamento financiados pelo Instituto. Esta informação serviu como um ponto de referência importante para avaliar melhorias em tecnologias de sequenciamento de DNA e para o estabelecimento da capacidade de sequenciamento de DNA do Programa de Sequenciamento do Genoma NHGRI (SPG) (NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2014).

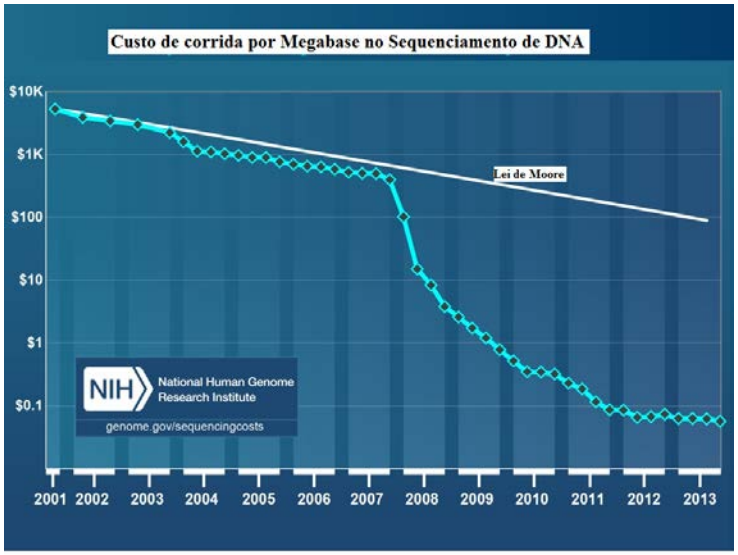
Em 2004, o NHGRI iniciou um esforço coordenado para apoiar o desenvolvimento de tecnologias para reduzir drasticamente o custo do sequenciamento do DNA, um movimento que visa ampliar as aplicações da informação genômica em pesquisa médica e de saúde. Na Figura 14 é possível identificar a evolução do custo por megabase sequenciada e o valor por genoma.

Nota-se um primeiro decréscimo em 2004, ano do lançamento do sequenciador 454 da Roche® e um decréscimo mais acentuado a partir de 2006 e 2007, anos em que foram lançados os sequenciadores de nova geração da Illumina® e da Life Technologies®.

No gráfico também é mostrado qual seria a redução de custo, se a tecnologia de sequenciamento tivesse evoluído segundo a lei de Moore. A Lei de Moore descreve uma tendência em longo prazo na indústria de hardware de computador que preconiza a duplicação do “poder computacional” a cada dois anos.

No final de 2010, foi lançado o Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM®), o primeiro sequenciador a detectar a incorporação dos nucleotídeos através de um semicondutor, reduzindo, dessa forma, a complexidade do equipamento e o custo da reação de sequenciamento.

FIGURA 14. Evolução do custo de sequenciamento por megabase.



Fonte: Disponível em: http://www.genome.gov/sequencingcosts/. Acesso em 01/03/2014

Este é o primeiro sequenciador NGS que não é baseado no princípio de emissão e detecção de luz. Neste caso, o sequenciamento ocorre em um chip contendo milhões de poços conectados a semicondutores capazes de detectar variações de potencial do meio reacional em função da liberação de um íon de hidrogênio (H^+) durante a incorporação de um nucleotídeo. Os chips possuem um sistema multicamadas de circuitos com muitas interconexões. O Ion Torrent® é diferente, pois a detecção é feita diretamente. A reação de polimerização gera naturalmente um H^+, ou seja, um próton, que altera o pH do meio. Essa alteração do pH é detectada por um transistor e convertida em um sinal elétrico(ALSEQ, 2014).

Apesar de diminuir o custo do sequenciamento, as tecnologias de segunda geração, no entanto, como as implementadas pela 454 Life Sciences (Roche®), Solex® (Illumina) e Applied Biosystems SOLiD ™ (Life Technologies), contam com um lento ciclo de processamento enzimático e de imagem.

Neste contexto, os candidatos mais prováveis para atingir o sequenciamento do genoma humano em 15 minutos no valor dos mil dólares americanos serão as plataformas de sequenciamento de terceira geração como, por exemplo, o Pacífic Bioscience® que utiliza moléculas unitárias e faz sequenciamento em tempo-real, o sequenciamento por síntese (SMRT ™) ou o sequenciamento por nanoporo que se baseiam na determinação contínua de

sequências de moléculas de DNA individuais em tempo real e que constituem a grande aposta de pesquisadores (BRANTON et al, 2008). Na Tabela 1 é possível fazer a comparação, do comprimento médio de leitura, do custo do equipamento, do tipo de método empregado e a precisão das leituras dessas plataformas mais modernas de sequenciamento.

Tabela 1. Comparação das plataformas de sequenciamento de nova-geração. **Adaptado De Braütigam & Gowik, 2010; Michael L. Metzker, 2010.**

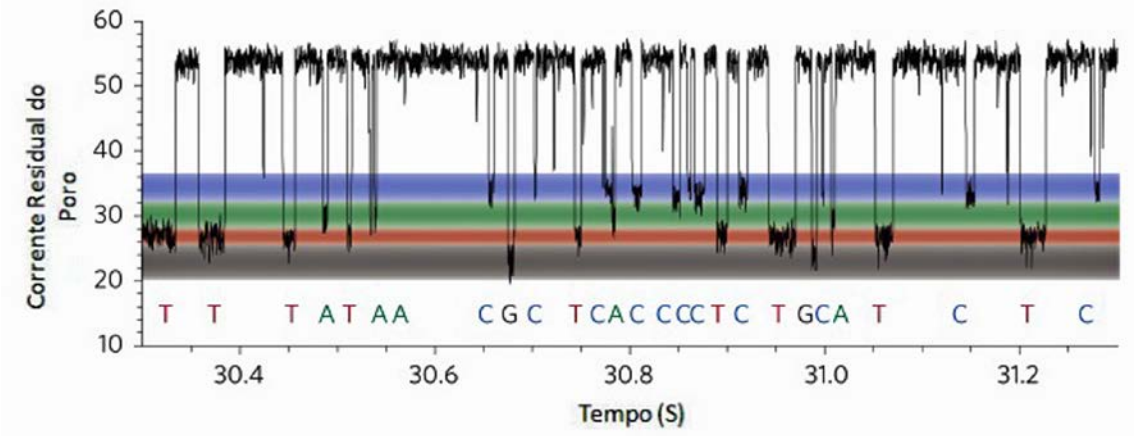
Plataforma	Preparação da Amostra	Comprimento de Leitura (pb)	Custo do equipamento (US$)	Gb por Corrida	Método de Sequenciamento	Precisão
Roche/454's GS FLX Titanium	Emulsão em PCR	250 ou 400 bases	500,000	0.45	Pirosequenciamento	99%
Illumina/ Solexa's GAI	PCR em fase sólida	35-76 bases	540,000	18‡ 35	Sequenciamento por síntese	>98,5%
Life/APG's SOLiD 3	Emulsão em PCR	até 50 bases	595,000	30‡ 50	Sequenciamento por ligação	99,94%
Helicos BioSciences HeliScope	Fragmento único	32	999,000	37	Fragmento único	≥97-99,8%
Pacific Biosciences (target release: 2010	Fragmento único	964	NÃO AVALIADO	NÃO AVALIADO	Tempo-real	≥98-99%

O uso de nanoporos para o sequenciamento de biopolímeros foi proposto há mais de uma década. A primeira prova experimental de translocação de moléculas de DNA foi relatada em 1996 usando nanoporo proteico da alfatoxina (KASIANOWICZ et al, 1996). Uma potencial vantagem dessa abordagem em relação aos métodos atuais de sequenciamento por síntese, é que além de ser uma metodologia muito mais direta, apresenta uma capacidade inerente de leitura bidirecional, um verdadeiro sequenciamento *de novo* (ERVIN et al., 2014). Essa tecnologia do nanoporo possibilitará um sequenciamento de ácidos nucléicos, com maior rapidez de análise e sem a necessidade de marcação ou amplificação (BAYLEY,2006; CLARKE et al.,2009; WOLNA et al,. 2013; WANG, et al., 2013), com medidas da estrutura

dos ácidos nucleicos, com uma precisão a nível de Angstrom (Å) (DEAMER, 2010; MAGLIA et al., 2010; STODDART et al., 2010).

O sequenciamento ocorre da seguinte maneira: a fita simples de DNA transloca-se, eletroforeticamente, através do nanoporo unitário; as quatro bases nitrogenadas do DNA (adenina, guanina, citosina e timina) interagem individualmente e de forma específica com uma parte do nanoporo produzindo modulações características na corrente iônica; deste modo, a sequência das modulações na corrente reflete a sequência das bases nitrogenadas do ácido nucléico. Esse processo é mostrado na Figura 15.

FIGURA 15. Gravação de um único canal da alfatoxina mostrando os bloqueios característicos dos nucleotídeos ao passar pelo interior do nanoporo.



Fonte: Adaptado de CLARKE et al, 2009. O valor da corrente residual de cada nucleotídeo é demonstrado nas quatro faixas de cores (T- vermelho, A- verde, C-azul e G-cinza).

Apesar dos esforços notáveis nos últimos anos, ainda não há um dispositivo comercial disponível, baseado nessa tecnologia, pois existem muitos problemas experimentais que devem ser superados, até que o complexo nanoporo/bicamada lipídica se torne um dispositivo "sequenciador real". Em 2008, foi criado um projeto, financiado pela União Européia, intitulado: "Abordagens Revolucionárias e Aparelhos para Análise de Ácidos Nucléicos" do inglês " The Revolutionary Approaches and Devices for Nucleic Acid (READNA). Esse consórcio, inclui projetos para acelerar novas tecnologias de sequenciamento de DNA e métodos avançados para melhorar a análise dos dados, mas tinha como objetivo final, desenvolver tecnologias que permitam um sequenciamento do genoma humano inteiro, no valor total de até mil dólares americanos (1000$), em menos de um dia. Um exemplo disso, é o sequenciamento de terceira geração desenvolvido pela Oxford Nanopore Technologies

dentro do READNA, que também se baseia na utilização de nanoporos biológicos, mais especificamente o nanoporo da alfatoxina. Pretendia-se comercializar essas plataformas entres os anos de 2012 e 2013, mas apesar de muitos desafios tecnológicos já terem sido resolvidos, esses produtos ainda não chegaram no mercado. Outras empresas, do mesmo projeto, também desenvolvem plataformas de sequenciamento baseados em nanoporos biológicos, como por exemplo, a Genia Technologies Inc. com previsão de lançamento de seu produto no ano de 2014 e também as baseadas em nanoporos sintéticos, como a IBM/Roche e a NaBsys Inc. que ainda não têm previsão de lançamento de suas plataformas (MCGINN& GUT, 2013).

O maior problema, inerente às plataformas de sequenciamento baseadas em nanoporo, é o insuficiente nível de reconhecimento das bases durante a passagem da molécula do DNA através do poro, isto se deve a altíssima velocidade de translocação da molécula de DNA através do poro (≤10μs por base) (KASIANOWICZ et al, 1996;KOWALCZYK et al, 2011). Este valor está no limite atingível experimentalmente e insuficiente para detectar individualmente, cada nucleotídeo. A velocidade desejável para o sequenciamento com o nanoporo é 1 ms por base, quando será possível deduzir a sequencia de nucleotídeos com precisão, por meio da análise da corrente residual (KING & GOLOVCHENKO, 2005).

Como foi observado por Deamer em 2010, a velocidade que uma fita de ssDNA passa através do poro, sob uma tensão de 120mv, é muito rápida e impede a discriminação entre as bases individuais. Considerando a translocação em ~2 μs e que a corrente iônica é normalmente reduzida a 10 pA, isso equivale a 62 milhões de íons por segundo. Conclui-se que em 2 μs, apenas 124 íons estariam disponíveis para estabelecer a identidade de uma base durante a translocação. O número real é ainda menor, porque, em média, há apenas uma diferença de ~2 pA entre purinas e pirimidinas quando ocupando o poro. Este número minúsculo de íons não pode fornecer uma relação sinal-ruído suficiente para identificar uma única base em escala temporal de microssegundos (DEAMER et al., 2010).

Para solucionar esses problemas de sequenciamento do DNA, diversos pesquisadores têm se voltado para o estudo de estratégias que potencialmente possam modificar alguns parâmetros tais como, a viscosidade, o grau de estruturação da água, tipo de íon dissolvido, modificação genética do poro, uso de enzimas, dentre outros, que venham a alterar a intensidade da interação entre o analito e o nanoporo (energia de interação), diminuindo a velocidade de translocação destas moléculas durante o seu curso pelo interior do nanoporo e aumentando a sensibilidade e resolução para as etapas de caracterização molecular (KANG et

al., 2007; GURNEV et al., 2009;MULERO et al., 2010). Nesse trabalho abordamos duas dessas estratégias, o grau de estruturação da água e a modificação da viscosidade buscando a melhora na detecção do ssDNA, como descrito nos próximos tópicos.

3.5 Influência dos íons de Hofmeister na interação DNA

3.5.1 Série de Hofmeister

Em 1887, Franz Hofmeister, professor da Universidade de Praga realizou estudos preliminares sobre os efeitos alguns sais sobre a globulina, além de estudos sobre a precipitação de com outras proteínas. Em um artigo publicado em 1888, considerado pioneiro, Hofmeister observou o efeito desnaturante dos sais, que o permitiu classificar esses sais de acordo com sua "capacidade de ordenar as moléculas de água" (LO NOSTRO apud HOFMEISTER)

Com seus achados, Hofmeister concluiu que a eficácia dos sais em precipitar as proteínas aumenta com a sua capacidade em "ordenar" a água ao seu redor e classificou um primeiro grupo de sais conforme sua eficiência em precipitar proteínas (salting-out) e um segundo grupo de sais de acordo com sua eficácia em solubilizar proteínas (salting-in) originando a Série de Hofmeister ou série liotrópica (HOFMEISTER, 1888; NINHAM & YAMINSKY, 1997; SCHWIERZ et al., 2010, LO NOSTRO & NINHAM, 2012). Desde então, esta série tem sido aplicada a diversos fenômenos que envolvem especificidade iônica.

A sequência de Hofmeister é dividida em duas classes de acordo com sua capacidade de estruturar as moléculas de água ao seu redor do íon. Os íons induzem efeitos na estrutura da água alterando a formação natural das ligações de hidrogênio, consequentemente, as moléculas de água se ordenam de forma diferente ao redor de cada íon. Assim, dependendo da quantidade de moléculas de água que se ordenam ao redor do íon podemos classificá-lo em caotrópico (fracamente hidratado) ou em cosmotrópico (fortemente hidratado). Como exemplos de íons caotrópicos, temos: tiocianato (SCN^-), perclorato (ClO_4^-), iodeto (I^-), amônio (NH_4^+), entre outros; e de cosmotrópicos temos: sulfato (SO_4^{2-}), fluoreto (F^-), cálcio (Ca^{+2}), magnésio (Mg^{+2}), entre outros. De modo geral, os cosmotrópicos possuem a capacidade de estruturar as moléculas de água e estabilizar proteínas, enquanto que, os

caotrópicos desestruturaram as moléculas de água e desestabilizam proteínas (ZHANG & CREMER, 2006).

Quando um íon é adicionado a um dado volume de água, ele liga-se às moléculas mais próximas do solvente deste modo, causa uma reorientação dos dipolos moleculares ao redor do seu campo elétrico. Os íons cosmotrópicos possuem interação mais forte com moléculas de água do que às moléculas de água entre si, já os caotrópicos no contrário, interagem com a água mais fracamente do que às moléculas de água entre si (LO NOSTRO et al., 2006).

A sequência dos íons de Hofmeister representa a influência dos íons na água. Porém, esta sequência não é fixa e depende do sistema em estudo, alguns íons podem mudar a sua posição na série ou até mesmo invertê-la. Por exemplo, um dado íon pode interagir com apenas moléculas de água ou com uma macromolécula podendo apresentar um comportamento caotrópico ou cosmotrópico a depender das condições do sistema experimental (LEMAY, 2009; KUNZ, 2010).

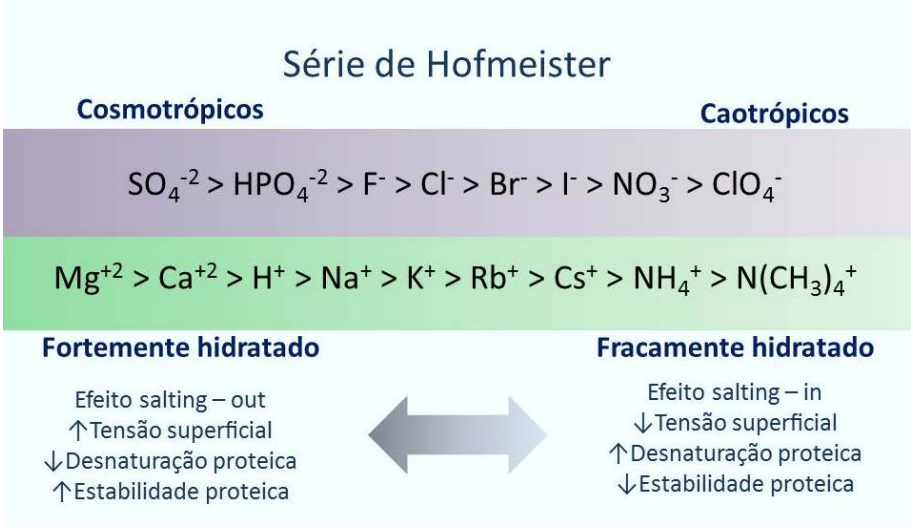
3.5.2 Efeito específico dos íons

Os efeitos específicos dos íons ou efeitos de Hofmeister (Figura 16) são conhecidos desde o final do século XIX. Os efeitos dos íons dessa série são observados em várias situações como na estabilidade de proteínas (TADEO et al., 2009), interações proteína-proteína, cristalização de proteínas (COLLINS, 2006), atividade enzimática (NISHIMURA et al., 1999), estruturação e desnaturação de macromoléculas biológicas (ZHANG & CREMER, 2006), crescimento bacteriano (LO NOSTRO et al., 2006).

Além disso, a Série de Hofmeister é observada em muitos fenômenos físico-químicos como tensão superficial (PEGRAM & RECORD, 2007), concentração micelar crítica (WANG & SATOH, 2009) e estabilidade coloidal (LÓPEZ-LÉON et al., 2005).

Esses efeitos específicos dos íons também ocorrem em soluções aquosas simples de eletrólitos. Propriedades tais como a viscosidade, densidade, índice de refração, elevação do ponto de ebulição, a pressão osmótica dentre outras, se mostram alteradas dependendo da composição e concentração de sal adicionado (ELBERLING et al., 2003).

FIGURA 16. Sequência dos ânions e cátions da Série de Hofmeister. Fonte :**Adaptado de Müller & Faude, 2008.**



Fonte : Adaptado de Müller & Faude, 2008. Íons classificados de acordo com as suas atuações (ou propriedades) na camada de hidratação em íons cosmotrópicos ou caotrópicos e alguns exemplos dos efeitos específicos promovidos por estes íons

Sais e, fundamentalmente, íons determinam a estrutura e função das principais moléculas (proteínas, carboidratos, lipídeos, DNA) indispensáveis na manutenção dos seres vivos. Eles participam da regulação osmótica das células e nos principais processos vitais. Qualquer sistema biológico vai sofrer um estresse significativo quando concentrações específicas de sal são variadas ou um é substituído por outro (ZHANG & CREMER,2010).

Os mecanismos moleculares responsáveis pelo o efeito da adição de sais em soluções de não-eletrólitos é muito complexo, devido aos diferentes tipos de interações intermoleculares que envolvem os íons, o solvente e as moléculas de soluto (KUNZ ET AL., 2004).

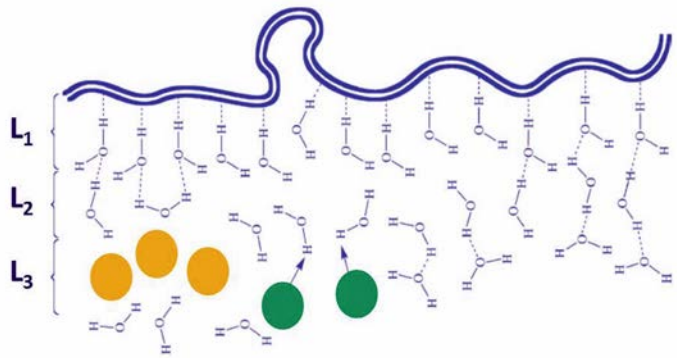
Diversos pesquisadores discutem esses efeitos baseado em diferentes teorias (LO NOSTRO & NINHAM, 2012):

Teoria da hidratação: Nessa teoria, os íons atraem as moléculas do solvente formando camadas de hidratação. Neste processo íons e moléculas de não-eletrólito, incluindo moléculas de gás dissolvidas, competem pelas mesmas moléculas do solvente, o que pode provoca a precipitação do composto a partir da solução. Em geral os ânions são mais hidratados do que os cátions (pelo menos, em termos de números de hidratação padrão). Aos ânions é atribuído a responsabilidade pelo efeito salting-out e aos cátions o efeito salting-in, e

o efeito de salting de um eletrólito líquido depende do equilíbrio destas duas tendências opostas de hidratação.

As moléculas de água confinados na camada de hidratação são fortemente influenciadas pelo campo iônico e flutuam continuamente. A Figura 17 mostra a interação dessas três camadas interdependentes com uma macromolécula, neste caso uma proteína. A primeira e a terceira camada competem pelas ligações de hidrogênio com a segunda camada. Se íons ou solutos neutros são adicionados na solução banhante interagindo, inicialmente, com a camada externa, eles irão afetar a capacidade da camada de transição em solvatar a superfície da proteína (PARSEGIAN & ZEMB, 2011; LO NOSTRO & NINHAM, 2012;).

FIGURA 17. Representação esquemática das três camadas de hidratação de uma molécula de proteína e da interação de íons cosmotrópicos e caotrópicos com essas camadas.



Fonte: Adaptado de Lo Nostro, 2012. A camada L_1 ou camada de solvatação; camada L_2 ou de transição e L_3 camada mais externa (bulk layer). O círculo verde representa um íon cosmotrópico, enquanto que o círculo laranja representa um íon caotrópicos

Em particular, um íon cosmotrópico presente na camada mais externa irá "desviar" as moléculas de água da segunda camada que participam da hidratação protéica, deste modo à solução fica mais “pobre” de solvente para hidratar a proteína, que, eventualmente, minimiza a área de exposição ao solvente, aumentando sua rigidez tornando-se uma molécula mais compacta.Por outro lado, a presença de íons caotrópicos na terceira camada promove a

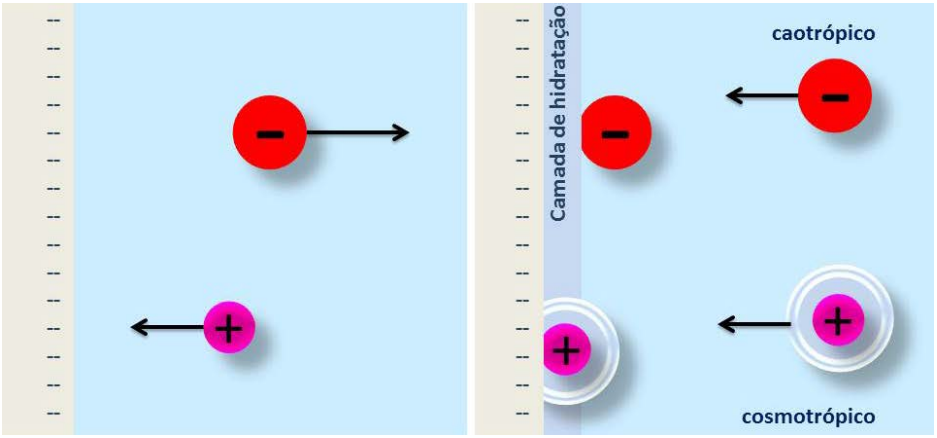
solvatação da superfície da proteína pela camada de transição; a solução torna-se um melhor solvente para a proteína, que se desenrola, expondo mais a sua superfície para o solvente (LO NOSTRO & NINHAM, 2012;).

Teoria Dipolo-Água: Essa teoria considera que as moléculas do solvente da camada de hidratação ao redor de um íon são orientados: os cátions atraem o átomo de oxigênio parcialmente negativo, enquanto que os ânions atraem o hidrogênio parcialmente positivo. Por conseguinte, os íons podem desempenhar um papel significativo realçando ou desfavorecendo a orientação das moléculas de água para o soluto dos não-eletrólitos (salting-in e de salting-out, respectivamente), dependendo da carga iônica. Na realidade, o que se tem é que a hidratação e ordenação dos dipolos são mecanismos acoplados.

Teoria eletrostática: Acredita-se que os efeitos de Hofmeister aparentemente se realizam via mudanças na estrutura da água através de forças eletrostáticas e forças dissipativas de Debay-London (LO NOSTRO et al., 2006). Forças eletrostáticas dependem apenas da carga iônica. Elas não se alteram, por exemplo, se um íon de sódio for substituído por um íon de potássio. As forças de dispersão atuam entre o íon e o seu ambiente. Estas forças surgem de flutuações eletrodinâmicas e dependem da polarizabilidade de cada íon são, portanto, íon específico. Na concentração de sal da maioria dos sistemas biológicos, as forças eletrostáticas são omitidas e as forças de dispersão podem dominar (BOSTRÖM et al., 2002; MOREIRA et al., 2006).

A Figura 18 ilustra esquematicamente o efeito das forças de íons perto de uma superfície. No painel da esquerda observa-se a situação representada por um modelo clássico, onde as forças eletrostáticas agem e determinam a acumulação e a repulsão de íons a partir de uma superfície, dependendo da carga iônica. O painel da direita ilustra o efeito das forças de dispersão as quais competem com as interações eletrostáticas repulsivas podendo produzir uma atração em um íon polarizável (soft) com carga igual a da superfície (LO NOSTRO & NINHAM, 2012).

FIGURA 18. Efeitos de forças sobre os íons perto de uma superfície.



Fonte: Adaptado De Parsons & Ninham, 2011 As forças eletrostáticas (esquerda) e forças dissipativas (direita) atuam nos cátions e ânions. As forças dissipativas podem ser repulsivas ou atrativas dependendo do íon presente na solução

Contudo, os efeitos específicos dos íons não conseguem ser bem explicados apenas pelas teorias clássicas baseadas nas forças eletrostáticas. O tamanho dos íons e a estrutura da água devem ser considerados também, pois os íons afetam a estrutura e a dinâmica da água, principalmente, nas suas camadas de hidratação (XIE et al., 2014). Com uma abordagem relativamente simples, Collins (2004) propôs uma teoria para explicar os efeitos de Hofmeister. Intitulada *Lei de Correspondência de Afinidades da Água* (em inglês: “Law of Matching Water Affinities”) essa lei é útil para o entendimento dos efeitos específicos dos íons qualitativamente e baseia-se, principalmente, na concepção de que íons de cargas opostas em solução formam esferas internas de pares iônicos espontaneamente somente quando estes íons possuem energias livres de hidratação absolutas similares (afinidades de água iguais) (COLLINS,2004).

A energia livre de hidratação absoluta de um íon é uma função monotônica da densidade de carga de superfície, a partir disso, segundo essa lei, há uma tendência de íons com cargas iguais se ordenarem de acordo com o tamanho: ânions grandes formam esferas internas de pares iônicos com cátions grandes, enquanto que, ânions pequenos formam esferas internas de pares iônicos com cátions pequenos.

Basicamente, nessa teoria, íons simples são considerados como uma esfera com uma carga pontual no centro. Quando os íons são pequenos, as moléculas de água circundantes estão firmemente ligadas (íons cosmotrópicos), enquanto que, quando os íons são grandes a

camada de hidratação fica ligada fracamente ao íon (íon caotrópico) (KUNZ & NEUEDER, 2010). Partindo da premissa da lei de Collins, sais com combinação de cátion-ânion cosmotrópico-cosmotrópico ou caotrópico-caotrópico (ou seja, associação de íons que possuem valores próximos de energias livres de hidratação) possuem uma tendência de formar par iônico mais forte do que combinações cátion-ânion cosmotrópico-caotrópico ou caotrópico-cosmotrópico (XIE et al., 2014). Vários grupos vêm tentando validar os conceitos de Collins utilizando métodos de simulação computacional (VLACHY et al., 2009; XIE & GAO, 2013; XIE et al., 2014). Fennel e cols. (2009) investigaram a interação íon-íon em meio aquoso por meio de simulações por dinâmica molecular, permitindo uma interpretação microscópica das observações empíricas da lei de Collins, e observaram que as simulações foram consistentes com as proposições da lei (FENNEL et al., 2009)

3.5.3 Influência dos sais em sistemas confinados

Os canais iônicos representam um ambiente onde ciclos sistemáticos de hidratação e desidratação ocorrem fisiologicamente com as espécies transportadas. Os efeitos de Hofmeister devem ser perceptíveis nos casos em que as dimensões do canal correspondem ao diâmetro do íon a ser transportado, como os canais de K^+ dependentes de voltagem (COLLINS, 1995).

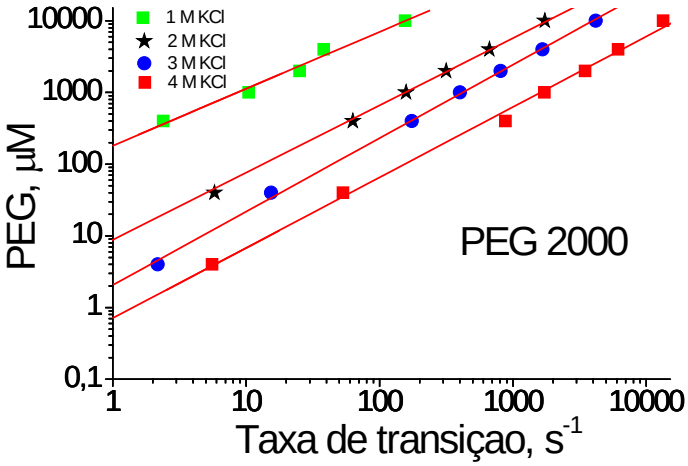
Um dos primeiros estudos avaliando a influência dos íons nas características cinéticas dos canais iônicos foi realizado por Grigorjev e Bezrukov em 1994. Eles avaliaram a influência dos íons halogênios (F^-, Cl^-, Br^-, I^-), formando sais com o K^+, nas propriedades biofísicas (condutância e seletividade) do canal iônico formado pelo antibiótico *roflamycoin*. Tanto a condutância quanto a seletividade iônica foram dependentes do tipo de eletrólito. A condutância do canal iônico unitário aumentou ao longo da série $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$. Com relação à seletividade, observou-se uma redução gradual da seletividade aniônica do canal iônico ao longo da sequência $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$. Houve uma inversão na seletividade, partindo de uma seletividade aniônica com KF para uma seletividade catiônica com KI. Foi estabelecido que quanto maior for a natureza caotrópica do ânion, mais forte é a ligação dos ânions na estrutura protéica do canal e este desenvolve uma seletividade catiônica devido a redução da barreira eletrostática para os cátions (MACHADO, 2014).

O estudo dos efeitos dos íons em sistemas confinados, como os sensores estocásticos baseados no nanoporo protéico unitário, também vem se intensificando nos últimos anos,

tendo em vista a grande importância biotecnológica deste sensor (KANG et al., 2007; MULERO et al., 2010; GURNEV et al., 2009).

No estudo de Rodrigues e cols. (2008) foi mostrado que o simples aumento da concentração do KCl (de 1M para 4M) melhora qualitativamente as características do sensor formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus* em bicamada lipídica plana. Nesse estudo, foi estabelecida uma forte relação entre o aumento da concentração do sal com o nível de resolução do sensor, demonstrado na determinação do parâmetro denominado limite de detecção. Este parâmetro é diretamente proporcional à concentração do analito o que permite avaliar a sensibilidade do sensor. A menor concentração do analito detectável pelo sensor estocástico (com o nanoporo proteico em bicamada lipídica plana) pode ser definido como o valor de concentração que leva ao aparecimento dos eventos de interação (analito-nanoporo) com a frequência a partir de 1 Hz (Figura 19).

FIGURA 19. Gráfico que relaciona o limite de detecção versus concentração do KCl em molar (M) com as concentrações do analito (PEG 2000).

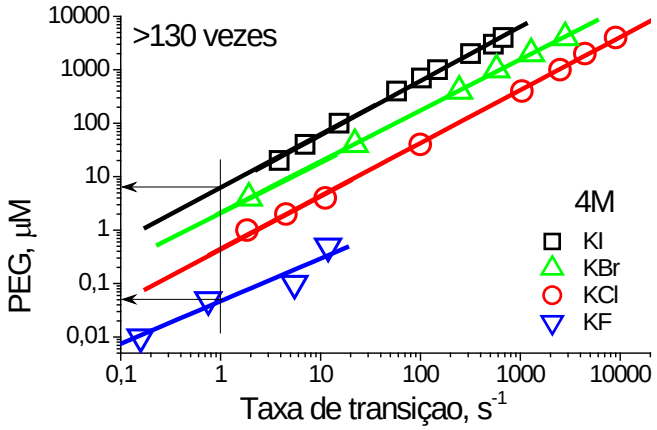


Fonte: Adaptado de Rodrigues et al., 2008. Os menores valores de detecção do PEG ocorrem quando utilizado o KCl como solução banhante em concentração de 4M**.**

A composição iônica da solução que banha o sensor nanoscópico também pode alterar a energia de interação do analito com o nanoporo, modificando a sensibilidade do

sensor (GURNEV et al., 2009; MACHADO et al., 2010). A sensibilidade do sensor depende muito fortemente do tipo do eletrólito que compõe a solução banhante (Figura 20) e isto foi evidenciado por Rodrigues e colaboradores em 2011 onde avaliaram a influência de ânions da família VIIA, formando sais com o K^+, nas propriedades de detecção estocástica do nanoporo-sensor formado pela alfatoxina. Demonstrou-se que na presença dos halogênios extremos (menor e maior tamanho, F^- e I^-) a sensibilidade do sensor diferiu em mais de cem vezes.

FIGURA 20. Gráfico que relaciona o limite de detecção versus concentração do analito (PEG).



Fonte: Adaptado de Rodrigues et al., 2011. Para facilitar a determinação da concentração do analito (setas horizontais), a frequência dos eventos da interação do nanoporo com analito dever ser 60igual ou maior do que 1 Hz (linha vertical). A solução banhante da membrana foi composta por sais de potássio com os ânions F-, Cl-, Br- e I- (4 M), tamponado com Tris (5mM) em pH 7,5. O modelo de analito polimérico utilizado foi o polietilenoglicol de peso molecular 1294 (PEG 1294).

Deste modo, estabeleceu-se uma forte relação proporcional entre o aumento do nível de resolução do sensor para moléculas unitárias e o tipo e concentração da solução salina utilizada, levando a necessidade de novos estudos que verifiquem o potencial de novas soluções capazes de aumentar a energia de interação do complexo analito – nanoporo.

3.6 Viscosidade

Outra estratégia para diminuir a velocidade de translocação do DNA, é a utilização de substâncias que aumentem o coeficiente de viscosidade da solução banhante. A viscosidade é uma das medidas utilizadas para a caracterização reológica de diferentes tipos de produtos. A viscosidade de um líquido mede a resistência interna oferecida ao movimento relativo das diferentes partes desse líquido, ou seja, a resistência ao fluxo (ZORTÉA et al., 2011).

O parâmetro físico-químico que permite relacionar a viscosidade com a série de Hofmeister de maneira quantitativa é o coeficiente B de viscosidade de Jones-Dole. Os íons podem ser sistematicamente classificados como caotrópicos ou cosmotrópicos a partir do sinal do coeficiente. O coeficiente B de viscosidade Jones-Dole correlaciona-se com a densidade de carga dos íons e oferece informações relativas à solvatação dos íons (JENKINS & MARCUS, 1995; COLLINS, 1997). Para uma ampla faixa de concentrações, entre 5 x 10^{-3} a 1 M, a viscosidade específica é definido pela seguinte equação:

$$\eta / \eta_0 = 1 + Ac^{1/2} + Bc \quad \text{(Eq. 1)}$$

onde, c é a concentração do sal; η é a viscosidade da solução eletrolítica aquosa; η_0 é a viscosidade da água pura à mesma temperatura; A é um termo eletrostático, que em concentrações moderadas do sal é igual a 1; e B é uma medida direta da força das interações íon-água normalizada com a força de interações água-água na solução.

Com estes estudos de Jones e Dole foi mostrado que geralmente alguns íons cosmotrópicos tornam a água mais viscosa e os íons caotrópicos a tornam mais fluida (tabela 2) quando comparada com a viscosidade da água pura à mesma temperatura (JENKINS & MARCUS, 1995; MARCUS, 2009; LO NOSTRO & NINHAM, 2012).

De acordo com a tabela 2, o coeficiente B permite-nos dividir os íons em dois grupos: coeficientes B com sinal negativo para íons fracamente hidratados (íons caotrópicos, $\eta < \eta_0$) e coeficientes B com sinal positivo para íons fortemente hidratados (íons cosmotrópicos, $\eta > \eta_0$) (LO NOSTRO & NINHAM, 2012). Nessa mesma tabela, são também apresentados os valores de ADHN (*apparent dynamic hydration numbers*– números de hidratação dinâmica aparente) que indicam o número de moléculas de água fortemente ligadas ao íon (KIRIUKHIN& COLLINS, 2002).

Além disso, outras substâncias, como o glicerol, são normalmente utilizadas em estudo de viscosidade. A viscosidade do glicerol é cerca de mil vezes a viscosidade da água, além do

mais, ele se torna interessante entre os solventes não aquosos, porque, como a água, ele é um solvente ligado por hidrogênios com elevada permissividade relativa. Assim, é natural perceber semelhanças entre esses dois solventes (HAMMADI, 2004).

TABELA 2: Valores dos coeficientes B de viscosidade Jones-Dole (*B*) e dos ADHN (*apparent dynamic hydration numbers*– números de hidratação dinâmica aparente) para diversos cátions e ânions. Fonte: tabela **adaptada de COLLINS, 2006; SINHG, 2007**

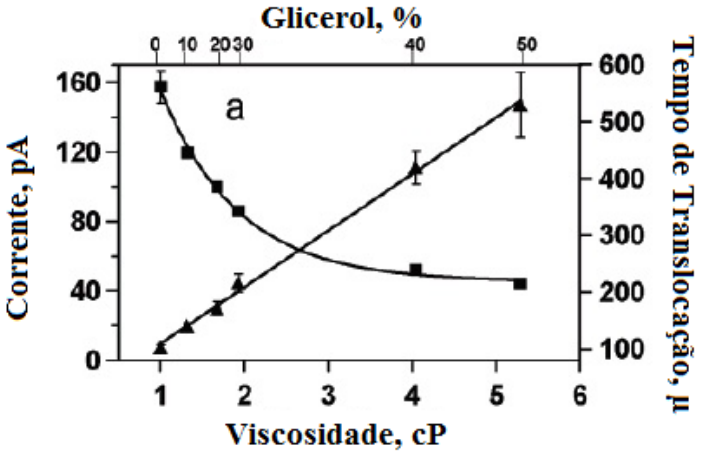
Cátions	*B*	ADHN	Ânions	*B*	ADHN
Mg^{+2}	0.385	5.8	PO_4^{-3}	0.590	5.1
Ca^{+2}	0.285	2.1	HPO_4^{-2}		4.0
			$H_2PO_4^{-2}$		1.9
			$CH_3CO_2^-$	0.250	
Ba^{+2}	0.22	0.35	SO_4^{-2}	0.208	1.8
H^+		1.93			
Li^+	0.150	0.6	F^-	0.1	5.0
			HO^-		2.8
Na^+	0.086	0.22	HCO_2^-	0.052	2.0
K^+	-0.007	0	Cl^-	-0.007	0
NH_4^+	-0.007	0	Br^-	-0.032	0
Rb^+	-0.030	0	NO_3^-	-0.046	0
Cs^+	-0.045	0	ClO_4^-	-0.061	0
			I^-	-0.068	0
			SCN^-	-0.103	0

Soluções aquosas de glicerol são amplamente utilizadas em estudos experimentais de fenômenos de fluxo. Cerca de duas décadas atrás, SABIROV e colaboradores, (1993) demonstrou que canais iônicos inseridos em membranas lipídicas planas são estáveis e funcionam bem em soluções concentradas de não eletrólitos, incluindo glicerol e etilenoglicóis. Foi mostrado que o aumento da viscosidade das soluções por não-eletrólitos diminui a constante de entrada das moléculas do analito no nanoporo (KRASILNIKOV et al., 1999; FOLOGEA et al., 2005; KAWANO et al., 2009).

Não-eletrólitos são capazes não somente de aumentar a viscosidade das soluções, mas diminuem a condutividade das soluções e, como consequência disso, a condutância dos canais iônicos (KRASILNIKOV, 2002). O valor da condutância é um parâmetro muito importante porque influi significativamente na razão sinal/ruído. O ideal é encontrar os não–eletrólitos com habilidade de aumentar a viscosidade de maneira mais acentuada do que diminuir a condutividade da solução salina.

Em um estudo realizado por Fologea e colaboradores (2005), foi mostrada a redução da velocidade de translocação de uma molécula de DNA através de um nanoporo no estado sólido (poro de nitreto de silício de 4-8 nm), com o simples controle de alguns parâmetros como a temperatura, a concentração do sal e principalmente a viscosidade. A viscosidade da solução de KCl foi alterada por adição de glicerol (0-50%), mantendo a concentração constante de KCl a 1,5 M. Observou-se que os tempos de residência aumentam linearmente com a viscosidade (Figura 21).

FIGURA 21. Bloqueio da corrente e tempo de translocação do DNA em função do aumento da viscosidade gerado pela adição de glicerol (0-50%).



Fonte: Adaptado de Fologea et al., 2005. Solução de KCl 1,5 M e voltagem aplicada de 120 mV

O aumento da viscosidade de cerca de 5 vezes (50% de adição de glicerol) aumenta o tempo de translocação e, assim, a resolução temporal, cerca de 5 vezes. Além disso, o

bloqueio de corrente ainda é grande o suficiente para a análise adequada dos sinais (FOLOGEA et al., 2005).

Em outro estudo, realizado por Kawano e colaboradores (2009) também foi demonstrado que o controle preciso dos parâmetros de translocação, ajustando a viscosidade, fornece um meio potencial para melhorar o sequenciamento utilizando métodos baseados em nanoporos proteicos (Figura 22). No estudo em questão, as soluções banhantes utilizadas foram compostas por KCl acrescidas de concentrações diferentes de glicerol (0, 12.5%, 40% e 63% de glicerol), o que levou a um aumento da viscosidade. A figura 23 mostra que a velocidade de translocação de uma fita de DNA 50pb na solução de glicerol a 63% é mais do que 20 vezes menor do que a da solução aquosa e corresponde a um tempo de residência de 66 ±20 µs por nucleotídeo.

FIGURA 22. Tempo (a) velocidade (b) de translocação de uma fita de DNA poli-A 50 pb em função da viscosidade da solução.

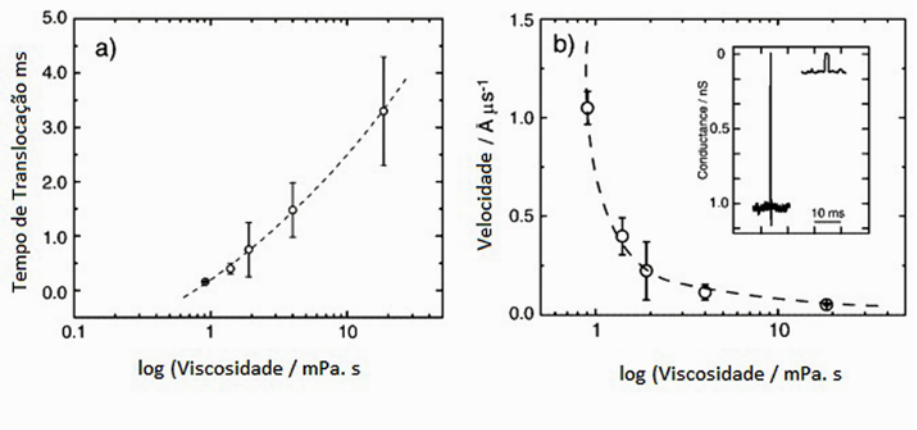
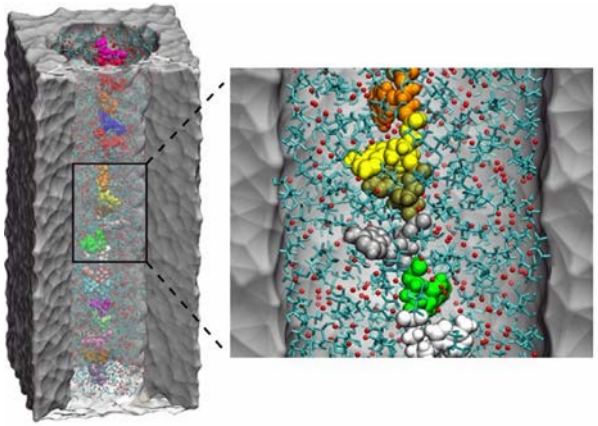


FIGURA 22. Tempo (a) velocidade (b) de translocação de uma fita de DNA poli-A 50 pb em função da viscosidade da solução. Os dados correspondem a 0, 12,5%, 25% , 40% e 63% de glicerol em soluções mistas contendo 1,0 M de KCl, 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA. Todas as medições foram realizado a -120 mV (lado cis negativo) em 24±1 ° C. O tempo de translocação de uma fita de DNA 50pb na solução de glicerol a 63% é mais do que 20 vezes menor do que a do solução aquosa. **Adaptado de KAWANO et al., 2009.**

Em estudo ainda mais recente, de LUAN e colaboradores (2012), com simulações de dinâmica molecular, foi investigado a dinâmica de uma fita simples de DNA em solução aquosa de glicerol, confinados em um nanoporo sintético de SiO_2 4nm de diâmetro(Figura 23).

FIGURA 23. Sistema de simulação do nanoporo sintético SiO_2 de 4nm de diâmetro (cinza) na presença da fita simples de DNA (fita colorida), glicerol (verdes) e água (bolas vermelhas).



Fonte: **Retirado de Luan et al., 2012**

Foram avaliados o coeficiente de atrito e a mobilidade eletroforética, parâmetros que governam a translocação do ss-DNA em glicerol nesse tipo de nanoporo. Os resultados foram comparados com a translocação do ss-DNA em um nanoporo preenchido com água e foi visto que, o coeficiente de atrito da molécula de ss-DNA é cerca de 18 vezes maior na presença de glicerol do que em água, isso justifica o prolongamento do tempo de permanência do ssDNA no nanoporo nessa condição (LUAN et al., 2012).

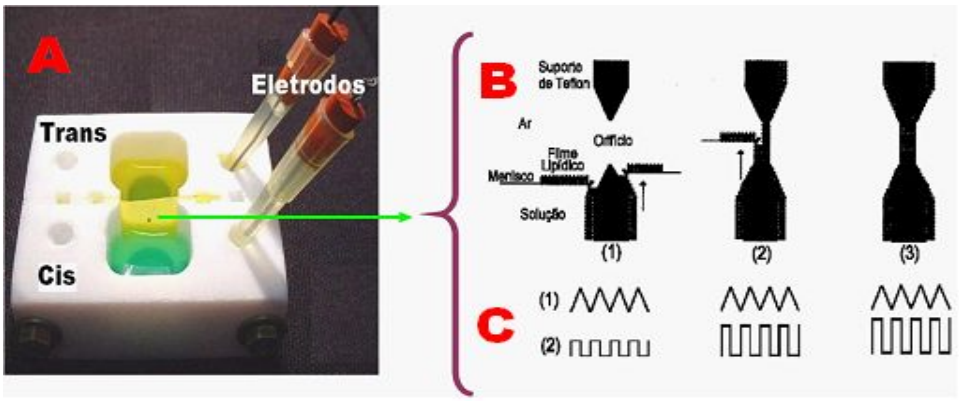
4. METODOLOGIA

4.1 Construção das bicamadas lipídicas planas

Todas as bicamadas lipídicas planas livres de solvente foram confeccionadas conforme as técnicas convencionais de construção de membranas (MONTAL & MUELLER, 1972). Esta técnica consiste basicamente na formação de uma bicamada lipídica por aposição de dois filmes monomoleculares de lipídeo, num orifício de uma partição de Teflon® (Politetrafluoretileno) que separa dois compartimentos de uma câmara experimental (Figura 24A), também de Teflon®, contendo soluções aquosas.

Os filmes monomoleculares de lipídeo foram obtidos a partir da deposição de 10-20 µl de uma solução de lipídeo diftanoil glicerofosfocolina da Avanti Polar Lipids (USA) 2% (p/v) em hexano (Merck) sobre as soluções aquosas. Decorridos 10 minutos, com a evaporação do hexano, ocorria à formação espontânea dos filmes lipídicos monomoleculares na superfície da solução aquosa de cada compartimento.

FIGURA 24. Representação da sistema experimental.



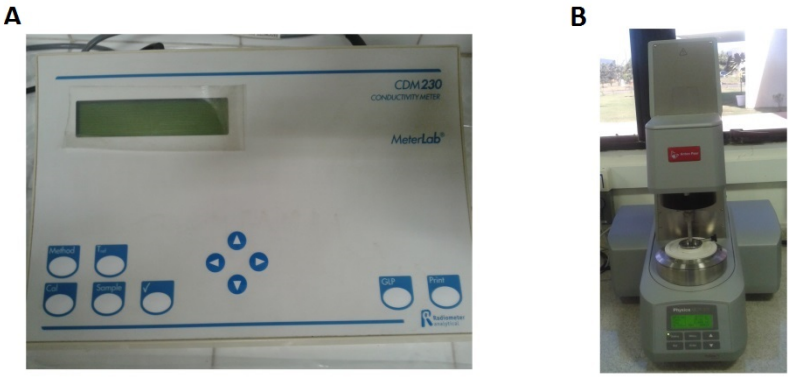
Fonte: Elaborada pela autora. Foto da câmara de Teflon® e esquema representativo do processo de construção e da monitoração da bicamada lipídica plana. **A)** Câmara de Teflon® com indicação dos lados *cis* e *trans*, e eletrodos de conexão da solução aquosa (verde e amarelo) ao sistema eletrônico de monitoramento e aquisição. **B)** Etapas da formação: (1) filmes lipídicos sobre as superfícies das soluções, (2) deposição do segundo filme lipídico e (3) bicamada lipídica plana completamente formada. As setas indicam o sentido da elevação do nível da solução; **C)** Etapas da monitoração: (1) onda triangular aplicada ao sistema e (2) resposta de corrente capacitiva do sistema.

Após o período de tempo necessário para evaporação do solvente, o nível do líquido do compartimento *Trans* foi elevado por adição de mais solução, formando a primeira monocamada, para em seguida elevar o lado oposto e completar a formação da bicamada. A formação da membrana foi monitorada usando lupa binocular e pelo aumento nos valores da corrente capacitiva do sistema.

Após a construção da bicamada lipídica realizou-se a incorporação de um único nanoporo pela adição da proteína alfatoxina Calbiochem (USA) (Figura 24B) na solução que banhava o lado Cis da membrana. Posteriormente, adicionou-se o ss-DNA (Integrated DNA Technologies, USA) ao compartimento "cis" da câmara experimental e registrava-se a corrente iônica que fluía através do nanoporo, quando submetido a variações do potencial de -200 a 200 mV (incrementos de 20 mV), nas soluções composta por um dos cátions da família IA (formando sais com Cl^-) ou por um dos ânions da família VIIA (formando sais com K^+) na concentração de 4M adicionada do tampão Tris (Hidroximetilamino metano) 5mM, e pH de 7.5. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente de 23±2 ºC.

Posteriormente os experimentos foram repetidos acrescentando-se às soluções com cátions ou ânions, o glicerol em concentrações percentuais de 5, 10, 20, 30, 50 e 70 (w/v). Todas as soluções foram preparadas com substâncias de altíssimo grau de pureza (99,99%), filtradas e com condutividades determinadas por meio de um condutivímetro de alta precisão (Radiometer analytical, Modelo: CDC 230) (Figura 25A). As medidas de viscosidade foram realizadas em colaboração com o Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia (LMNano) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE. Foi utilizado o equipamento Reômetro oscilatório Digital (Anton Paar, Physica MCR 301) (Figura 25B).

FIGURA 25. Equipamentos.



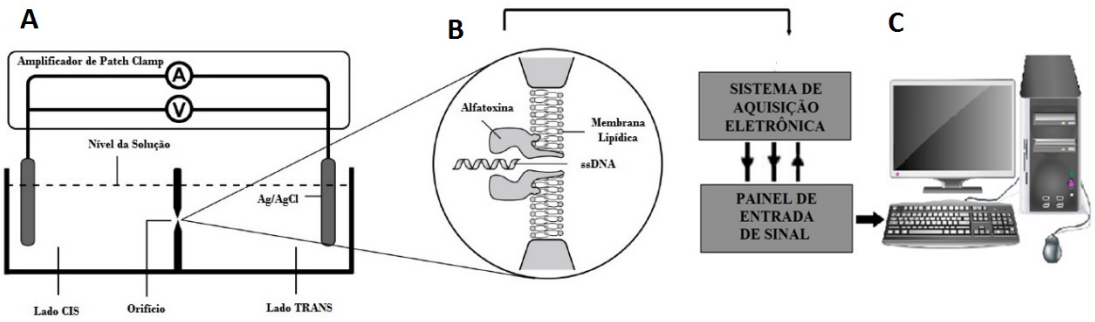
Fonte: Elaborado pela autora. Em **A.** Condutivímetro de alta precisão (Radiometer analytical, Modelo: CDC 230 **B**. Reômetro oscilatório Digital (Anton Paar, Physica MCR 301).

4.2 Sistema de monitoração e aquisição em tempo real das "assinaturas moleculares"

Em todos os experimentos o sistema utilizado para aplicação do potencial transmembrana, monitoração e aquisição dos registros foi constituído por um gerador de funções (Hewlett Packard, modelo 3310B), um filtro Butterworth (Frequency devices, modelo 902), um amplificador de patch clamp (Axonpatch 200B) e uma placa conversora analógico-digital (Digidata 1440) acoplada a um microcomputador IBM PC, executando o Programa PClamp 10 (Axon Instruments) (Figura 26).

Com a finalidade de minimizar a interferência de perturbações mecânicas e eletromagnéticas, a câmara experimental era mantida sobre uma mesa de amortecimento de alto desempenho (TMC 63-500) e blindada por uma gaiola de Faraday de alta eficiência. A conexão dos compartimentos da câmara ao sistema de medidas elétricas era feita através de pontes salinas do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3 M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl).

FIGURA 26. Sistema de aquisição eletrônica do biossensor formado pela alfatoxina.



Fonte: Adaptado de Stefureac, 2012. A) Modelo da câmara de Teflon. B) Canal de alfatoxina incorporado na bicamada lipídica. (C) Diagrama da interface eletrônica de aquisição dos registros de corrente.

A análise dos dados foi realizada com o software pClamp ou Sview. Os valores médios de τ_{on} e τ_{off} , que representam o tempo da permanência do poro no estado desocupado e ocupado, respectivamente, podem ser usados posteriormente para obter informações da cinética e termodinâmica das interações, entre o poro da proteína e as substâncias (JAYAWARDHANA, 2010; RODRIGUES et al., 2011). Estas constantes são obtidas através da análise da distribuição de milhares dos eventos de bloqueio e não bloqueio, respectivamente. É possível calcular esses valores através das seguintes equações:

Nanoporo + ssDNA $\underset{K_{off}}{\overset{K_{on}}{\rightleftharpoons}}$ Complexo Nanoporo-ssDNA (Eq. 2)

Constante de associação $k_{on\,=\,1\,/(}\tau_{on}\,x\,C_{analito)}$ (Eq. 3)

Constante de dissociação $k_{off} = 1/\tau_{off}$ (Eq. 4)

Constante de formação $k_{f\,=}\,k_{on\,/}\,k_{off}$ (Eq. 5)

Onde :

k_{on} é a constante de associação;

k_{off} é a constante de dissociação;

k_f é a constante de formação

C é a concentração do analito;

τ_{on} é o tempo de interação entre os bloqueios;

τ_{off} é o tempo de residência;

5. RESULTADOS

5.1 Short communication para submissão ao periódico Sensors and Actuators B: Chemical

Influence of viscosity on the rate of translocation of ssDNA in protein nanopore formed by alpha-toxin

Juliana Pereira de Aguiar[1], Dijanah Cota Machado[1], Janilson José da Silva Júnior[1], Maria Carolina Araújo Melo,[1] Cláudio Gabriel Rodrigues[1]

[1]Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Emails:cgrufpe@gmail.com

ABSTRACT

Stochastic sensing technology based nanopore to DNA sequencing is the most promising third-generation sequencing method. It has superior read length, speed, and sample requirements compared with state-of-the-art second-generation methods. However, the nucleotide bases identification still presents substantial difficulty because the resolution of the technique is limited compared with the measured signal/noise ratio. This high speed of DNA translocation through the nanopore is still a difficulty for accurate and reliable sequencing of these molecules. In this study was evaluated how the increase in viscosity and the presence of ions of the Hofmeister series in the aqueous environment influence the ssDNA–nanopore interaction, aiming to find better conditions that favor to detect of each nucleotides. Here we demonstrate that the viscosity increase induced by potassium fluoride influence on the sensitivity of the nanopore, however, still not sufficient to allow discrimination of nucleotide bases.

Keywords: Nanopore, Alphatoxin, Hofmeister ions, Viscosity, Ionic channel

1. Introduction

The single protein nanopore formed by alpha-toxin of the Staphylococcus aureus has been widely used for the detection, characterization and analysis of several molecules in aqueous systems.[1] However, the real potential to use it as an alternative technique for DNA sequencing.[2] This method, compared to current methods of sequencing by synthesis, is that besides being a much more direct approach, presents an inherent ability to bidirectional read, a true *de novo* sequencing.[3] In addition, it will provide sequencing of nucleic acids with greater rapidity of analysis and without marking or amplification.[4-8] Electrophoretically there is translocation of a single-stranded DNA through the single nanopore; Each one of four known nitrogenous bases of DNA (adenine, guanine, cytosine and thymine) have an individual interaction and in a distinct way with the nanopore producing specific modulations in the ionic current. Thus the sequence of modulations in the ionic current reflects the sequence of nitrogenous bases of nucleic acid.

One of the biggest challenges for implementation of this technology comes from the low

resolution of the ionic current amplitude between the bases when the translocation of ssDNA occur through the nanopore aqueous lumen. This is due to high speed of DNA translocation through the nanopore is still a difficulty for accurate and reliable sequencing of these molecules (NA AN et al., 2011).[9] In this context, researchers have sought methods that slow the molecular translocation through variations in experimental conditions, changes in the nanopore to improve the resolution and sensitivity of this protein sensor.[8] Thus, the present study sought to alter the physicochemical conditions of the bulk solution the nanopore to investigate how osmolytes which increase the viscosity of the medium along with the Hofmeister series ions, which are altering the degree of structuring of water,[10] can influence the ssDNA-nanopore interaction, aiming to find appropriate conditions, which favor the identification of each of the nucleotide bases in aqueous media detection.

2. Experimental

All the solutions were prepared with deionized water. Wild-type *Staphylococcus aureus* alpha-toxin (a-HL) was purchased from Calbiochem (Madison, WI). 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). High quality (>99.99%) halides (KCl, KF, KBr, LiCl, CsCl) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). ssDNA-poliA was purchased from Integrated DNA Technologies, USA. The 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) and citric acid were from Schwarz/Mann Biotech (Cleveland, OH) and Fluka (Buchs, Switzerland), respectively. Solvent-free planar bilayer lipid membranes, with a capacitance of 40 pF, were formed by the lipid monolayer apposition technique, using DPhPC in hexane (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) at 25 ± 1^{o}C. Because it was recently shown that the elevated KCl concentrations considerably improve single molecule identification by unitary protein nanopores,[11,12] in this study membrane-bathing solutions contained 4 M ions Hofmeister series in 5 mM TRIS adjusted to pH 7.5 with citric acid. The ssDNA was used as a representative analyte and added to the cis compartment of the experimental chamber. a-HL was added from the cis side of the membrane in a concentration sufficient to form unitary protein nanopores in planar lipid membrane. If not mentioned otherwise, the applied potential was 120 mV. A positive current is defined by cation flow from trans to cis. Single a-HL nanopore incorporation and measurement of molecular signature parameters (mean duration and amplitude of the blockage), kinetic constants of the ssDNA-nanopore interactions were done essentially as described by Rodrigues et al. (2011).[13] In short, the characteristic time, τ_{on}, was obtained from the collected time intervals between the end of one blockade event and the onset of the next. The τ_{off} is the characteristic time of ssDNA staying in the pore, was obtained from the collected time intervals of blockades. Experiments were done using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in voltage-clamp mode. Membrane potential was maintained using Ag/AgCl electrodes in 3 M KCl 2% agarose bridges assembled within standard 200-mL pipette tips. Currents were filtered by a low-pass eight-pole Bessel filter (Model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into computer memory with a sampling frequency of 50–250 kHz.

3. Results and Discussions

3.1. Conductance: First, we examined the conductance of single a-HL channels surrounded by 4 M solutions of the ions Hofmeister series. At the chosen pH (7.5), the channel was in high conductance state at all transmembrane potentials from 200 mV to -200 mV in all solutions. Conductance-voltage curves of a-HL channels in KF, KBr and CsCl solutions were found to be slightly asymmetric (data not shown), similar to that in KCl.[14] On the other hand, in LiCl solution the conductance-voltage is almost symmetric, similar to that described in other studies;[15] in this case of LiCl, the trans entrance of the stem is electrically neutral because of Li^- binding to Asp127 and Aps128. Such behavior probably results from the asymmetry in charge distribution between the channel openings and in the channel structure itself. The channel conductance was considerably higher in solutions of KCl, KBr and CsCl compared with KF and LiCl solution (Table 1). This finding appears to be in accordance with ionic conductivities of the ions Hofmeister series[16] because a strong correlation between ionic conductivity of ion Hofmeister series and ion channel conductance was established (Table 1). This result is consistent with earlier data for the channel obtained at low salt concentrations.[17] In addition, we found that the ability of a-HL to form ion channels was influenced considerably by the ions Hofmeister series. It was highest in KCl (~10 pM of aHL is sufficient to form a single channel in the planar lipid bilayer) and smallest in KF solution (where up to 1 nM of aHL must be added). In KBr, LiCl and CsCl solutions, the channel-forming activity was of intermediate magnitude. This result is consistent with earlier observations that the rate of a-HL channel formation is inversely proportional to the size of the anions.[18]

Table 1. Viscosity, ionic conductivity the solution of the ions Hofmeister and alpha-toxin nanopore conductance.

Solution (4M)	Ionic conductivity (mS/cm)	Nanopore conductance (nS)	Viscosity (Pa/s)
KCl	533.33 ± 1.16 (n=6)	3.812 ± 0.02 (n=161)	0.00386 ± 3.11E-04
KF	235.40 ± 0.66 (n=3	2.558 ± 0.01 (n=166)	0.00508± 4.83E-04
KBr	366.00 ± 0.02 (n=3)	3.845 ± 0.01 (n=104)	0.00394± 4.33E-04
CsCl	315.07 ± 4.56 (n=3)	3.356 ± 0.004 (n=181)	0.00417± 3.4E-04
LiCl	161.73 ±1.25 (n=3)	1.674 ± 0.004 (n=118	0.0048± 3.27E-04

3.2. Single molecule events: As expected, high-resolution recordings of ssDNA/aHL interactions in the presence of different of the ions Hofmeister series revealed a huge difference in the frequency and duration of current blockades (Fig. 1). Results obtained in KCl, KBr, KF and CsCl solutions indicate that the frequency of events is high in the presence of KBr (Fig 1A, lower in the presence of KCl (Fig 1B) and KF (Fig 1C; lowest in 4 M CsCl (Fig 1D).

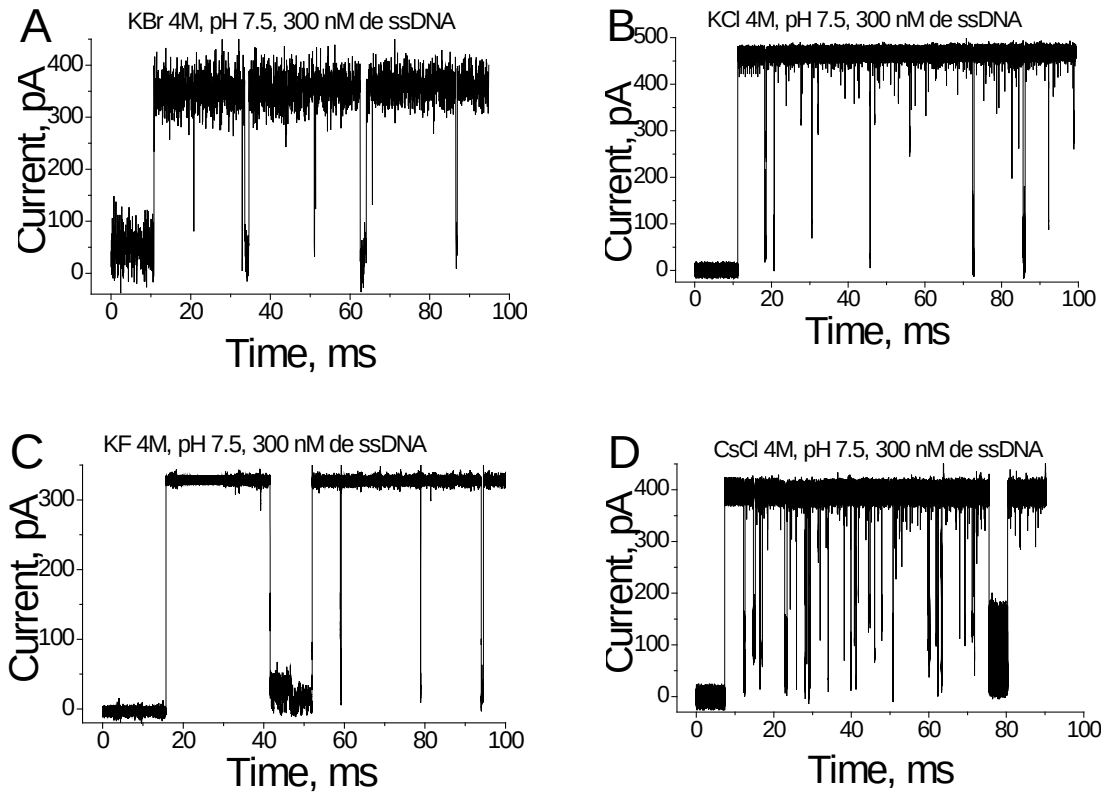


Figure 1. Registration typical ionic current through the nanopore of alpha-toxin in the solutions (4 M) of KBr, KCl, CsCl or KF, pH 7.5, in the presence of 300 nM ssDNA 50bpoliA. Applied potential 120 mV.

The length of the current blockages was greater in KF solution, indicative of increased residence time of ssDNA into nanopore lume (Fig. 2). The KF solution increasing the sojourn time by approximately five times that of the KCl solution (Fig 2 A). On the other hand, time inter-blockages were greater in the presence of KCl solution (Fig 2 B). The KF solution viscosity was approximately 25% greater than the viscosity of the KCl solution, therefore increased the residence time of ssDNA into the nanopore (Table 1).

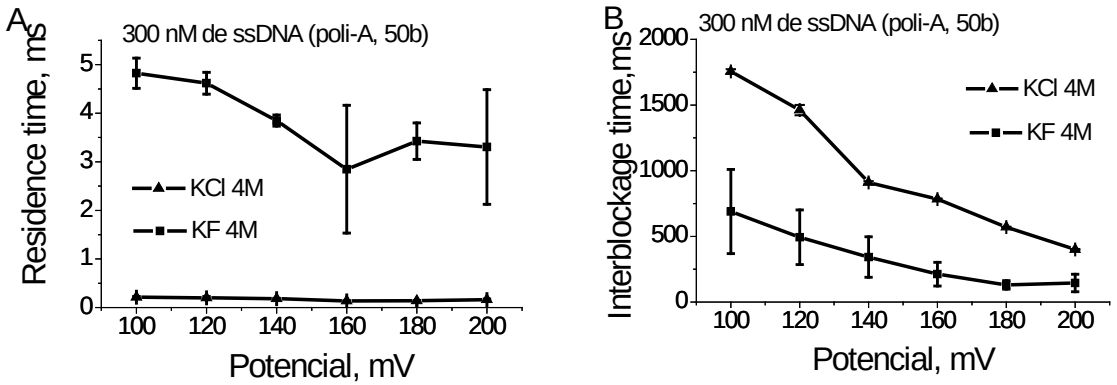


Figure 2. Influence of anion type on the kinetic parameters of ssDNA-nanopore interaction. The residence time of the ssDNA in the nanopore increased due to potassium fluoride solution.

4. Conclusions

The increase in viscosity in the aqueous solution of potassium fluoride-induced increases the residence time of the ssDNA inside the nanopore, but not enough to allow proper identification of nucleotide bases.

5. Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Nanotecnologia Para Marcadores Integrados (INCT-Inami), Brazil.

5. References

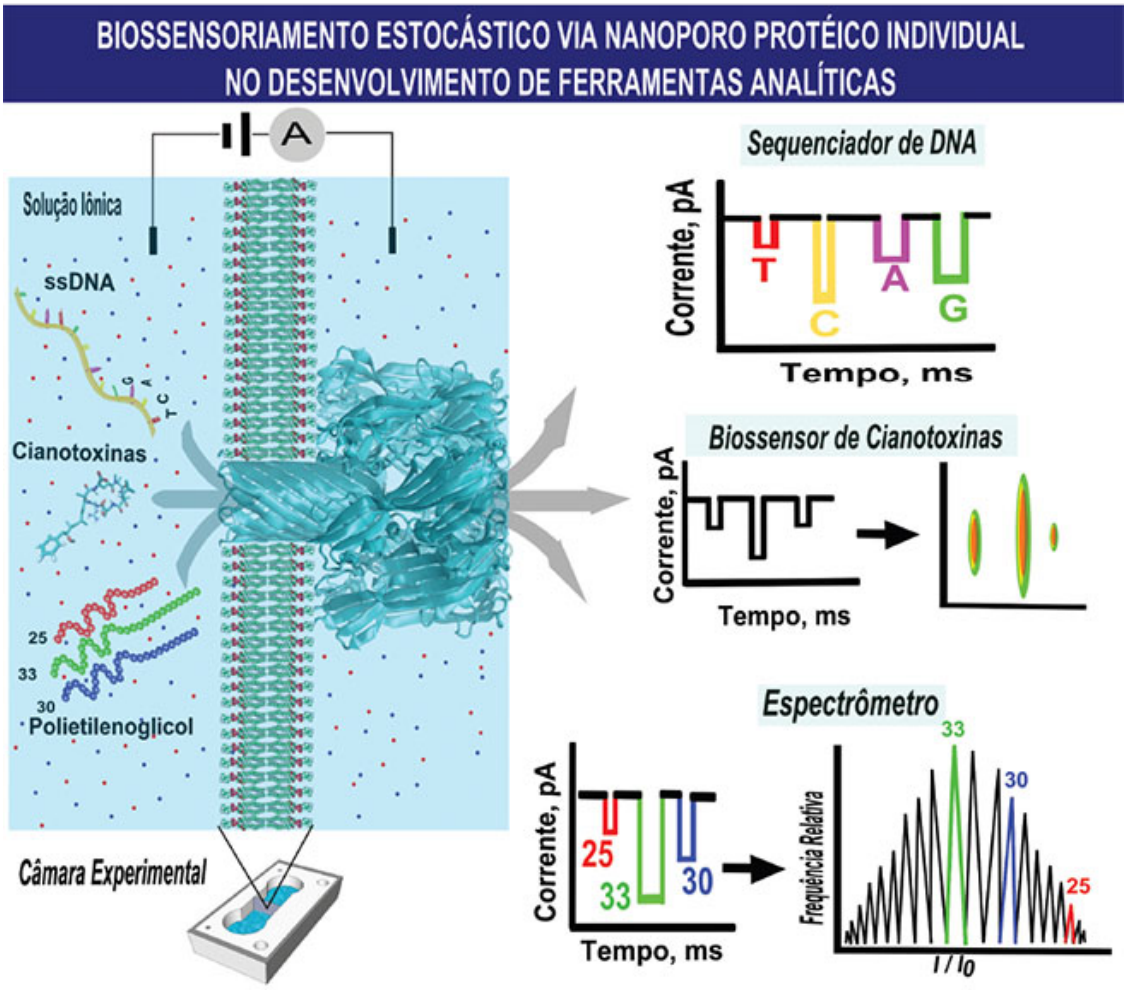
1. MOHAMMAD, M.M., & MOVILEANU,L. Protein sensing with engineered protein nanopores, methods in molecular biology 870 (2012) 21-37.
2. RINCON-RESTREPO, M., E. MILTHALLOVA, H. BAYLEY, AND G. MAGLIA. Controlled translocation of individual DNA molecules through protein nanopores with engineered molecular brakes, Nano Letters 11(2011) 746-750.
3. ERVIN, E.N.; BARRALL, G. A., PAL, P.; BEAN, M.K.; SCHIBEL, A.E.P.; HIBBS, A.D. Creating a single sensing zone within an alpha-hemolysin pore via site- directed mutagenesis, Journal of Bionanoscience 4 (2014) 78-84.
4. CLARKE, J.; WU, H.C..; JAYASINGHE, L.; PATEL, A.; REID, S.; BAYLEY, H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing, Nature Nanotechnology 4 (2009) 265-270.
5. DEAMER, D. Nanopore analysis of nucleic acids bound to exonucleases and polymerases, Annual Review of Biophysics 39 (2010) 79-90.
6. MAGLIA,G.; HERON,A.J.; STODDART,D.; JAPRUNG,D.;BAYLEY,H. Analysis of single nucleic acid molecules with protein nanopores, Methods in Enzymology 475 (2010) 591-623.
7. STODDART, D.; HERON, A.J.; KLINGELHOEFER, J.; MIKHAILOVA, E.; MAGLIA, G.; BAYLEY, H. Nucleobase recognition in ssDNA at the central constriction of the alpha-hemolysin pore, Nano Letters 10 (2010) 3633-3637.
8. WANG,G.; WANG, L.;HAN. Y.;ZHOU, S.; GUAN, X. Nanopore stochastic detection: diversity, sensitivity, and beyond, Accounts of Chemical Research 46 (2013) 2867–2877.
9. NA,AN.; FLEMING,A.M.; WHITE.H.S.; BURROWS, C.J. Crown ether–electrolyte interactions permit nanopore detection of individual DNA abasic sites in single molecules, Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (2012) 11504–11509.
10. HOFMEISTER F. Zur lehre von der wirkung der salze. Zweite Mittheilung, Arch Exp. Pathol Pharmakol 24 (1888) 247-260.

11. RODRIGUES,C.G.; MACHADO,D.C.;CHEVTCHENKO,S.F.;KRASILNIKOV,O.V. Mechanism of KCl Enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors, Biophysical Journal 95 (2008) 5186-5192.
12. ROBERTSON, J.W.; RODRIGUES, C.G.; STANFORD, V.M.; RUBINSON, K.A.; KRASILNIKOV, O.V.; KASIANOWICZ, J.J. single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (2007) 8207-8211.
13. RODRIGUES, C.G.; MACHADO, D.C.; DA SILVA, A.M.B.; SILVA JÚNIOR, J.J.; KRASILNIKOV, O.V. Hofmeister effect in confined spaces: halogen ions and single molecule detection, Biophysical Journal 100 (2011) 2929-2935.
14. KRASILNIKOV, O. V.; MERZLYAK, P. G.; YULDASHEVA, L. N.; CAPISTRANO, M. F. Protein electrostriction: a possibility of elastic deformation of alpha-hemolysin channel by the applied field, European Biophysics Journal with Biophysics Letters 34 (2005) 997- 1006.
15. KOWALCZYK, S. W.; WELLS, D. B.; AKSIMENTIEV, A.; DEKKER, C. Slowing down DNA translocation through a nanopore in lithium chloride, Nano Letters 12 (2012) 1038-1044.
16. MARCUS, Y. Ion properties; Marcel Dekker: New York, 1997.
17. KRASILNIKOV OV, SABIROV RZ. Ion-transport through channels formed in lipid bilayers by staphylococcus- aureus alpha-toxin,General Physiology and Biophysics 8 (1989) 213-222.
18. KRASILNIKOV, O.V.; SABIROV, R.Z.; TASHMUKHAMEDOV, B. A. The influence of ionic composition of the medium on the dynamics of staphylotoxin channel formation in BLM, Biologiecheskie Membrany 3 (1986) 1057-1061.

5.2 Artigo de revisão

Artigo de Revisão de Literatura publicado no periódico Química Nova

química nova
ISSN: 0100-4042 ISSN:1678-7064 on line
Volume 38, Número 6, 2015



Quim. Nova, Vol. 38, No. 6, 817-827, 2015 http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150073

Revisão

BIOSSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS ANALÍTICAS

Juliana P. Aguiar, Janilson J. S. Júnior, Dijanah C. Machado, Maria C. A. Melo e Cláudio G. Rodrigues*
Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife – PE, Brasil

Recebido em 30/12/2014; aceito em 02/02/2015; publicado na web em 30/04/2015

STOCHASTIC BIOSENSING BY A SINGLE PROTEIN NANOPORE IN THE DEVELOPMENT OF ANALYTICAL TOOLS. Studies employing a single protein nanopore as a molecular recognition element in the development of analytical devices - biosensors, spectrometers, DNA sequencing - have increased considerably in the last decade. Several studies show the potential of these bionanostructures for future stochastic biosensing technology. Stochastic biosensing is an approach that relies on the observation of individual binding events between analyte molecules and a single receptor. This approach is inherent to the organisms that use a single protein nanopore as a key element to start, manage and maintain the chemical and biophysical processes of living cells. Here, we discuss alpha-toxin as a bacterial exotoxin and prototype of a protein nanopore in real-time detection and characterization of molecules in aqueous systems.

Keywords: alpha-toxin; biosensor; nanopore; stochastic biosensing.

INTRODUÇÃO

Na última década a nanobiotecnologia alcançou notáveis avanços no desenvolvimento de dispositivos e métodos analíticos para detecção, identificação, caracterização e quantificação de moléculas; na realização de diagnóstico médico; para o monitoramento ambiental; no controle de qualidade de alimentos; no combate ao terrorismo e controle de potabilidade da água, dentre outras aplicações.[1-4] Nesse contexto estão os processos bioinspirados ou biomiméticos em que se utilizam nanoestruturas biológicas como elemento de reconhecimento molecular para o desenvolvimento de uma classe inovadora de sensores, cujo mecanismo de funcionamento se baseia em nanoporos individuais dotados com a capacidade de biossensoriamento estocástico.[1] O biossensoriamento estocástico é uma abordagem que se baseia na observação de eventos de ligação entre as moléculas individuais de analitos e um único receptor. A denominação estocástico para esse biossensoriamento é atribuída, primeiramente, em relação à série temporal aleatória de flutuações discretas registradas, devido à detecção por um único nanoporo, de cada molécula do analito, portanto, as moléculas são detectadas uma a uma, ou seja, de maneira unitária ou individual. Secundariamente, o mecanismo de detecção ocorre com a entrada aleatória de cada molécula do analito em um único nanoporo, e isto é devido essencialmente à difusão molecular, ou seja, um fenômeno estocástico.[5-7]

Os nanoporos proteicos ou canais iônicos naturalmente encontrados em membranas biológicas são as macromoléculas fundamentais no desencadeamento de vários processos físico-químicos indispensáveis à manutenção da vida. A inerente capacidade destas macromoléculas proteicas de perceberem parâmetros físicos (por exemplo, campo elétrico), reconhecerem espécies químicas (como por exemplo, a acetilcolina) e principalmente selecionarem os elementos químicos (como por exemplo, íons sódio) transferidos entre os meios intra e extracelular, propicia efetivamente a interação célula-célula e célula-microambiente.[8] Em virtude desta versatilidade funcional, os nanoporos proteicos são considerados, atualmente, a principal nanobioestrutura capaz de realizar o biossensoriamento estocástico, portanto, bioinspiradores à exploração como elemento de detecção, quantificação, monitoração e caracterização de moléculas individuais. No entanto, essa mudança de paradigma requer um incremento significativo na compreensão da física e da química, que governam a interação nanoporo-analito.[9] Conceitualmente, do ponto de vista biofísico, a análise da interação de uma substância com o canal iônico faz com que este altere sua conformação e consequentemente varie sua condutância. Por outro lado, esse tipo de biomimetismo não é fácil por várias razões, pois em alguns casos a ligação da substância no canal iônico induz, do ponto de vista químico, uma alteração conformacional média, portanto, um processo difícil de manter o controle experimental preciso. Além do mais, muitos canais iônicos tendem espontaneamente a variar entre diferentes estados condutores, em resposta ao potencial elétrico.[10] Essas dificuldades foram praticamente superadas com a utilização do nanoporo proteico formado pela exotoxina bacteriana de *Staphylococcus aureus*, a alfatoxina ou alfa-hemolisina (α-HL).[11-13] O funcionamento deste nanoporo unitário como elemento sensor deve-se ao fato dele ser a única via resistiva em um suporte isolante que separa dois compartimentos contendo soluções eletrolíticas, sendo que em uma delas se coloca o analito. O fluxo de corrente iônica através do nanoporo é alterado de maneira discreta quando ocorre a entrada ou permeação de moléculas individuais do analito no lume aquoso do nanoporo, gerando uma série temporal de flutuações que está correlacionada com a massa e configuração espacial das moléculas analisadas.[11] Devido aos resultados promissores com a alfatoxina, outros nanoporos proteicos também estão sendo aplicados na detecção de inúmeras moléculas, inclusive no sequenciamento de DNA de fita simples (ssDNA);[14] por exemplo, o nanoporo formado pela toxina do *Bacillus anthracis,* utilizado para detectar e quantificar proteínas;[9] o poro formado pela aerolisina, uma toxina derivada de *Aeromonas hydrophila* que também tem sido utilizada como elemento sensor na detecção de proteínas.[15] Recentemente, num esforço de substituir os nanoporos proteicos, surgiram algumas plataformas mais robustas, que utilizam nanoporos sintéticos em materiais sólidos, para detecção de DNA de fita dupla, polinucleotídeos e proteína.[16] Estes nanoporos sintéticos visam eliminar algumas limitações inerentes ao sistema com nanoporos biológicos, mas eles ainda não atingiram o grau de precisão e caracterização física apresentada por seus homólogos proteicos.[2,9,17] Apesar disso, acredita-se que a evolução da organização dessas estruturas nanométricas sintéticas e biológicas em configurações pré-definidas (biossensores, por

*e-mail: cgabrielcg@pq.cnpq.br

exemplo) pode garantir que a nanotecnologia irá desempenhar papel crucial em muitas tecnologias-chave para o presente milênio.[18,19] Neste contexto, o nanoporo formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus* se tornou o modelo de nanoporo proteico para detecção, identificação, caracterização e quantificação de moléculas em meio aquoso. Isto se deve as suas vantagens sobre os outros nanoporos proteicos, tais como estrutura cristalográfica elucidada,[20] receptividade à engenharia molecular [21,22] e grande valor de condutância iônica. Adicionalmente o elevado acúmulo de conhecimento sobre esse nanoporo propiciou o estabelecimento das condições experimentais em que ele permanece aberto por longos períodos de tempo, mesmo quando ocorre pequenas variações em parâmetros físico-químicos, dentre os quais se destacam a força iônica, pH, temperatura, potencial transmembrana e concentração de agentes químicos desnaturantes.[23,24]

Devido a essas características, neste trabalho descrevemos, principalmente, como o canal da alfatoxina se tornou o protótipo de nanoporo proteico para o desenvolvimento de biossensores estocásticos e como o progresso de estudos diversos, conforme demonstrado na Figura 1, o transformaram em uma ferramenta molecular para: detecção de íons divalentes[25] e monovalentes,[26] moléculas enantioméricas,[27] cianotoxinas,[28] cocaína,[29] armas químicas;[30] atuação como espectrômetro de massa;[31] e sequenciamento de DNA de forma barata e rápida.[2]

BIOSSENSORIAMENTO COM NANOPOROS INDIVIDUAIS PROTEICOS

O estudo da estrutura das proteínas de biomembranas é promissor e de grande interesse para química, biologia e medicina, uma vez que de 20 a 35% de todas as proteínas codificadas pelo genoma representam canais iônicos, transportadores e receptores localizados na membrana plasmática.[32] Dentre as proteínas integrais da membrana plasmática, os nanoporos são os mais bem estudados, pois eles constituem a base molecular da atividade muscular e da propagação do impulso nervoso.[8] Além disso, eles atuam controlando o transporte de íons, água e macromoléculas (ácidos nucléicos e proteínas) para dentro e fora das células, algumas organelas e até no núcleo.[10] O crescente interesse em torno dos nanoporos proteicos surgiu devido às funções essenciais que eles desempenham em diversos processos fisiológicos.[33] Muitas das propriedades de transporte dos nanoporos proteicos ainda não são bem compreendidas e a investigação dessas propriedades diretamente nos sistemas biológicos é um desafio, devido à sua inerente fragilidade.[34] A característica mais relevante dos nanoporos proteicos é que eles são as vias através das quais os íons se movem por eletrodifusão.[33] Estes nanoporos são formados por proteínas integrais que abrangem toda a espessura da membrana celular (~ 4 nm), e são consideradas as moléculas indispensáveis para comunicação entre as células.[8]

Os primeiros relatos da proposta de utilização de nanoporos proteicos como elemento de reconhecimento em biossensores surgiram em meados da década de 90.[35-38] Há um grande interesse na utilização de nanoporos proteicos como o principal elemento de reconhecimento nos biossensores estocásticos.[1] Esse tipo de biossensor detecta moléculas unitárias que entram e ocupam temporariamente o lume aquoso de um único nanoporo.[5] Esta ocupação altera momentaneamente a quantidade de íons fluindo pelo nanoporo, gerando um evento de bloqueio, ou seja, uma redução discreta na corrente iônica. O bloqueio na corrente iônica pode ser caracterizado por um intervalo de tempo, representativo da duração

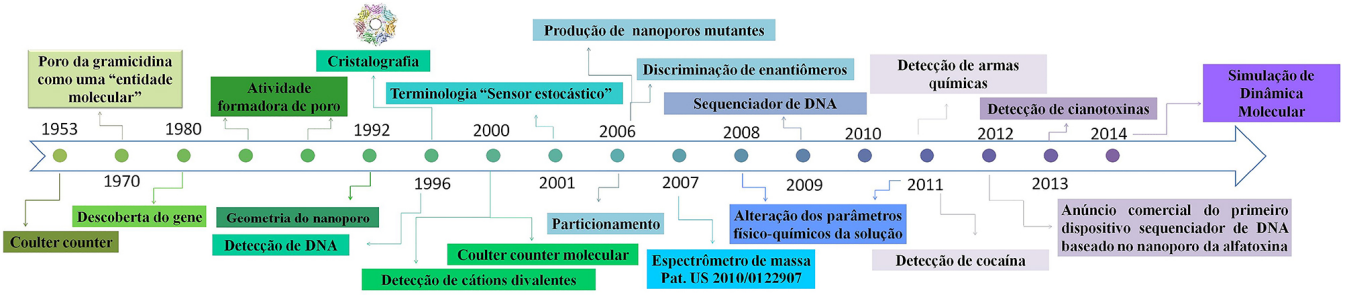


Figura 1. *Evolução dos estudos visando à aplicação de poros no desenvolvimento de ferramentas analíticas. O counter Coulter foi o primeiro dispositivo prático baseado em um microporo empregado para contagem de partículas de dimensões micrométricas. A primeira demonstração experimental do fluxo de íons através de um poro como uma "entidade molecular" inserida em uma bicamada lipídica ocorreu com o antibiótico peptídico gramicidina, uma vez que este poro é formado a partir de duas moléculas isoladas, uma em cada monocamada lipídica, que ao se acoplarem adquirem a funcionalidade de via de permeação à íons. Na década de 80 ocorreu não somente a descoberta do gene da alfatoxina, bem como os primeiros experimentos demonstrando sua atividade formadora de poros em biomembranas e em bicamadas lipídicas artificiais. No ínicio da década de 90 foi mensurado o valor do diâmetro do nanoporo da alfatoxina. A elucidação da estrutura cristalográfica da alfatoxina na metade da década de 90, foi decisiva para corroborar algumas observações experimentais da ação hemolítica da alfatoxina. Neste mesmo período demonstrou-se pioneiramente que o nanoporo da alfatoxina é permeável e apenas detecta DNA de fita simples. Esta descoberta juntamente com a demonstração eletrofisiológica da aglomeração de sete subunidades proteicas para formação do nanoporo da alfatoxina impulsionaram significativamente a partir do ano 2000, a utilização desse nanoporo como elemento sensor para detecção de outros espécimes químicos, e além disso se introduziu a terminologia molecular counter Coulter, sensoriamento estocástico, sensores estocásticos. Em 2006 realizou-se a produção de alfatoxina mutante, portanto, ocorre a primeira melhoria genética no nanoporo da alfatoxina, a qual permitiu sua utilização como ferramenta para discriminação de moléculas enantioméricas. Neste mesmo ano demonstrou-se que o aumento da força iônica torna máxima a interação polietilenoglicol(PEG)-nanoporo e favorece o particionamento deste polímero no lume aquoso do nanoporo, propiciando melhorias na capacidade de detecção do nanoporo da alfatoxina; resultando no ano seguinte com a primeira demonstração deste nanoporo como espectrômetro de massa. Em 2008 demonstrou-se que o aumento na concentração de um mesmo sal (KCl de 1 mol L^{-1} para 4 mol L^{-1}) aumenta em aproximadamente 200 vezes a sensibilidade do nanoporo da alfatoxina. Três anos depois se corroborou que não somente o aumento de concentração do sal, bem como a composição da solução iônica, influenciam na sensibilidade do nanoporo; com a demonstração que os sais da série de Hofmeister, especificamente a substituição do KI pelo KF aumentou em aproximadamente 100 vezes a sensibilidade do nanoporo da alfatoxina. A partir de 2010 diversos relatos demonstram academicamente que o nanoporo da alfatoxina pode ser usado para detectar armas químicas, drogas ilícitas, cianotoxinas, porém, somente no final de 2012 ocorre o primeiro anúncio comercial de um sequenciador de DNA baseado neste nanoporo. Devido aos relevantes resultados obtidos na última década propiciaram nos últimos três anos a utilização de simulação de dinâmica molecular para aumentar o entendimento da interação analito-nanoporo da alfatoxina*

do analito no nanoporo, juntamente com um valor de amplitude, que está correlacionado com o volume ocupado por cada molécula do analito no interior do nanoporo. Atualmente, o nanoporo formado pela alfatoxina de *Staphylococcus aureus* vem sendo utilizado de maneira acadêmica para uma vasta gama de aplicações no biossensoriamento estocástico.[11-13,39-41]

NANOPOROS PROTEICOS FORMADOS POR EXOTOXINAS BACTERIANAS

As toxinas bacterianas podem ser divididas em dois grupos funcionais: endotoxinas e exotoxinas. As exotoxinas são as que apresentam maior importância, uma vez que são capazes de existir em dois estados conformacionais: uma conformação solúvel em água e outra mais estável, inseridas na membrana plasmática de células eucarióticas.[42] As exotoxinas consideradas termodinamicamente mais estáveis após sua inserção nas membranas lipídicas naturais ou artificiais são genericamente denominadas toxinas formadoras de poros (TFPs).[42,43] De acordo com a estrutura dos seus domínios, as TFPs utilizam dois mecanismos para formar nanoporos na membrana da célula: por inserção de alfa-hélices ou por inserção de grampos que se organizam em uma estrutura β-barril.[44]

Alguns nanoporos proteicos unitários formados por exotoxinas estão sendo utilizados como elemento de reconhecimento para detecção de diversas moléculas, inclusive para o sequenciamento de DNA. Dentre estas exotoxinas destacamos as mais relevantes:

Alfatoxina: é uma proteína de 33 kDa produzida pelo *Staphylococcus aureus* e liberada na forma de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos. Neste texto abordamos como esta toxina se tornou o protótipo de nanoporo proteico para o desenvolvimento de biossensores estocásticos, portanto, ela será descrita detalhadamente nas próximas páginas.

Antraz: Esta toxina, secretada pelo *Bacillus anthracis*, é composta por três exotoxinas, o fator de edema (*Edema factor*- EF), o fator letal (*Lethal factor*- LF) e o antígeno protetor (*Protective antigen*- PA). Essas exotoxinas não têm atividade tóxica quando administradas separadamente, mas as combinações binárias que incluem o PA são extremamente tóxicas. O PA liga-se a um receptor na superfície celular, uma proteína de membrana de cerca de 90 kDa encontrada em várias linhagens celulares de mamíferos. Após sua ligação, o PA é submetido a uma clivagem proteolítica e os fragmentos resultantes formam um nanoporo heptamérico, como pode ser visto na Figura 1S, que se liga a LF e/ou EF. Esse nanoporo, quando inserido em membranas lipídicas planas, tem sido utilizado como elemento sensor na detecção de proteínas.[45]

Aerolisina: É uma toxina derivada de *Aeromonas hydrophila* e também tem sido utilizada como elemento sensor na detecção de proteínas. A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria Gram-negativa, patogênica para alguns animais e causa doenças gastrointestinais em seres humanos.[46] Ela foi identificada em 1974 por Bernheimer e Avigag,[47] tendo sido purificada depois de alguns anos.[48] Finalmente o gene da aerolisina foi sequenciado por Howard e colaboradores em 1987.[49] Essa toxina é constituída por quatro domínios que se oligomerizam formando um poro heptamérico na membrana da célula alvo após sua ativação por endoproteases, como mostrado na Figura S2. Ela é secretada como pro-aerolisina, que constitui um precursor inativo de 470 aminoácidos com um peso molecular de 52 kDa.[50] Os domínios 1 e 2 reconhecem o receptor de membrana, o domínio 3 é responsável pela oligomerização, e o domínio 4 é responsável pela inserção na membrana e formação do nanoporo. Como demonstrado em outras toxinas formadoras de poros, a aerolisina é desprovida de atividade enzimática.[51] Embora a estrutura heptamérica do poro da aerolisina ainda não esteja totalmente elucidada, sua estrutura determinada por microscopia eletrônica indica semelhanças com o nanoporo formado pela alfatoxina.[48,50]

ALFATOXINA DE *Staphylococcus aureus* COMO FERRAMENTA ANALÍTICA

O gene codificante da alfatoxina foi descoberto em 1980,[46] e subsequentemente foi relatada a sua atividade formadora de nanoporos em membranas biológicas[52] e em bicamadas lipídicas artificiais.[53] Ela é uma exotoxina proteica de 33 kDa, produzida pelo *Staphylococcus aureus*, liberada na forma de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos solúveis em água.[54]

A geometria do nanoporo da alfatoxina e o seu posicionamento assimétrico em relação ao plano da membrana também foram elucidados em condições dinâmicas empregando não-eletrólitos.[55-57] Estudos de dicroísmo circular revelaram que a toxina é composta quase que inteiramente por β-folhas com pouca estrutura em α-hélice.[46] A estrutura cristalográfica tridimensional deste nanoporo foi elucidada[20] e os dados cristalográficos denotam a existência de sete monômeros, como mostrado na Figura 2, delimitando o nanoporo aquoso, os quais se inserem em bicamadas lipídicas e então se oligomerizam para formar um poro heptamérico transmembranar, permitindo então a passagem de água, íons e diversas moléculas pelo seu interior.[58,59] Estudos eletrofisiológicos referentes à cinética de incorporação das subunidades proteicas na bicamada lipídica corroboram a estequiometria de 7 monômeros para formação de um nanoporo funcional.[60]

O nanoporo da alfatoxina é formado por três domínios (extramembranar ou copal, intramembranar ou troncular, e o anelar); somente os dois primeiros participam da formação do poro.[61] O domínio extramembranar (convencionalmente denominado lado "CIS") possui uma entrada de maior diâmetro (~ 4,6 nm) que possibilita a captura de macromoléculas como pode ser observado na Figura 2.

Biossensores estocásticos

A idéia da utilização de poros micrométricos para contagem de partículas foi pioneiramente proposta por Wallace H. Coulter em 1953, resultando anos depois na comercialização do conhecido contador de Coulter (Coulter counter), amplamente empregado para contagem de células sanguíneas; podemos considerar os biossensores estocásticos baseados em nanoporos, como descendentes nanométricos desse contador.[11,62] Resumidamente, no Coulter counter partículas microscópicas (como por exemplo, células) passam através de um poro (microporo ou microcapilar) e causam uma modulação (bloqueio) detectável na corrente que flui através dele. A frequência das modulações está correlacionada com o número de partículas, enquanto que a amplitude delas é proporcional ao tamanho da partícula.[40] No caso dos biossensores estocásticos, a relação entre o tamanho molecular e a amplitude do bloqueio é muito importante, pois, é indicativo de quais moléculas individuais podem ser detectadas, essencialmente aquelas que apresentam valor de diâmetro semelhante ao diâmetro do nanoporo. Biossensores estocásticos baseados em nanoporos proteicos individuais podem detectar, identificar e caracterizar analitos, simplesmente por meio da análise da série temporal das flutuações discretas nos registros da corrente iônica que flui pelo nanoporo.[63] Eles são ideais para serem usados como biossensores por diversas razões: o analito ao interagir com o nanoporo gera um sinal pelo bloqueio estérico temporário do poro ou pela mudança no potencial eletrostático perto ou dentro do poro; o analito não precisa ser marcado (com sonda fluorescente, por exemplo) para ser detectado como molécula individual; a técnica permite a detecção de mais de um analito presente concomitantemente na solução,[25,64] e também apresenta alta sensibilidade e rapidez na análise.[65] O princípio do

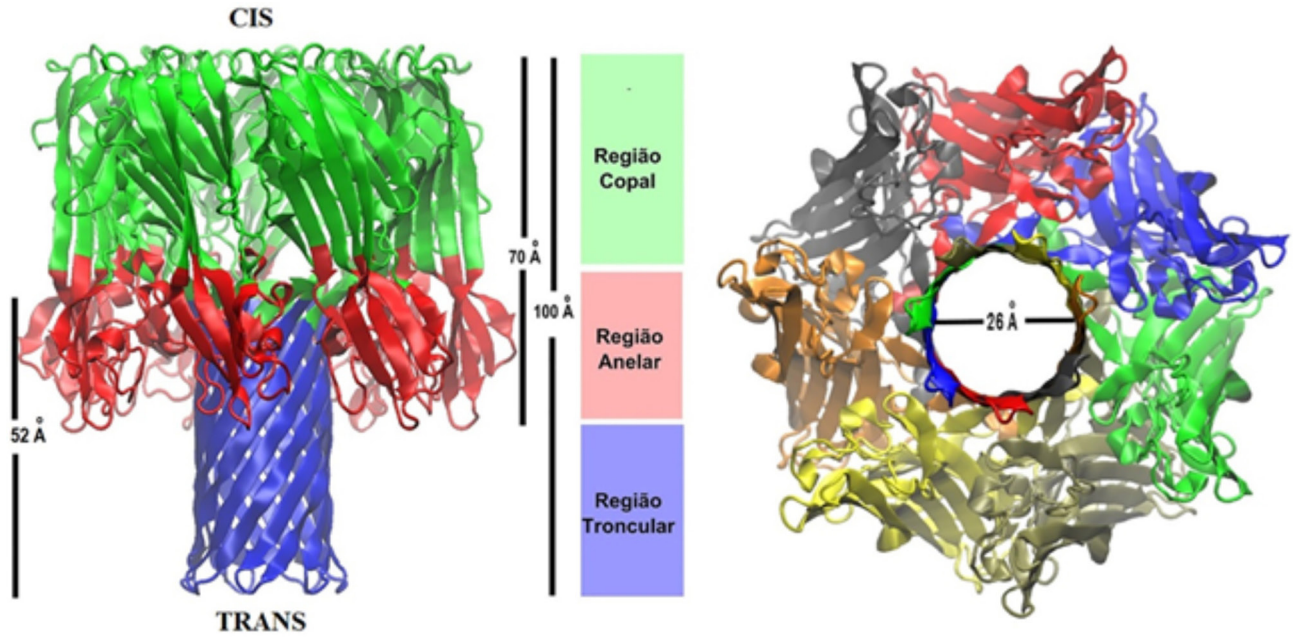


Figura 2. *Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina. A direita visão superior com cada subunidade representada em diferentes cores. A esquerda visão lateral com cada domínio representado em três cores. Na área central, os retângulos empilhados em três cores específicas correspondem a espessura aproximada de cada domínio. A região troncular se insere completamente na membrana lipídica, e fica posicionada com a entrada convencionalmente denominada TRANS no mesmo plano da superfície da membrana. A região copal não se insere na membrana lipídica e a entrada CIS do nanoporo fica distante (~50 Å) da superfície da membrana. A região anelar (parte inferior da copa) fica ancorada na membrana. As barras verticais indicam o comprimento de cada região e o diâmetro do nanoporo. Adaptado do Protein Data Bank (pdb), código 7AHL*

biossensor estocástico baseado no nanoporo proteico unitário formado pela alfatoxina consiste essencialmente na interação de cada molécula individual do analito com um único nanoporo.[65] O resultado de cada interação se reflete na variação temporária (bloqueio) da corrente iônica que passa através do nanoporo como representado na parte inferior da Figura 3.

O nanoporo unitário incorpora-se espontaneamente em uma bicamada lipídica plana montada em um orifício de uma película de Teflon®, que separa dois compartimentos com solução salina como mostrado na Figura 3A. Como visto na Figura 3, a montagem da membrana ocorre pela deposição no orifício de cada uma das monocamadas lipídicas (Figura 3B), devido ao acréscimo na quantidade de solução contida em cada um dos compartimentos (Figura 3C). Como visto na Figura 3, quando um potencial elétrico é aplicado através da membrana com um único nanoporo incorporado, uma corrente iônica flui através do lume aquoso do nanoporo. Toda vez que o analito entra e ocupa o lume, induz uma variação (flutuação) discreta (bloqueio), diminuindo a corrente iônica máxima como visualizado no primeiro retângulo da parte inferior esquerda na Figura 3. Na situação mais simples considere que o nanoporo apresente dois estados - ocupado (pelo analito) e não-ocupado - e um sinal de saída característico associado a cada um dos respectivos estados. A frequência da ocorrência dos bloqueios está relacionada com a concentração do analito, enquanto os valores médios dos tempos de duração no estado ocupado e de amplitude dos bloqueios permitem a identificação do analito, uma vez que representam uma "impressão digital" do mesmo.[13]

Os intervalos de tempo de duração dos bloqueios diferem entre si, e podem ser descritos estatisticamente por uma distribuição exponencial. Neste contexto, a constante de ajuste desta distribuição exponencial é definida como o tempo médio do bloqueio (τ_{off}). As variações de amplitude dos bloqueios juntamente com o valor do τ_{off} representam a "impressão digital" para identificação do analito. O valor de τ_{off} possibilita calcular a constante de dissociação (k_{off}) do complexo analito-nanoporo, por meio da expressão $k_{off} = 1/\tau_{off}$. Adicionalmente, a determinação da frequência dos bloqueios na corrente iônica, representativos da interação analito-nanoporo, possibilita quantificar a concentração do analito. Operacionalmente isto pode ser determinado mensurando-se os intervalos de tempo entre os bloqueios sucessivos. Similarmente aos tempos de bloqueios, os intervalos de tempo entre bloqueios também são descritos por uma distribuição exponencial, cuja constante de ajuste (τ_{on}) representa o intervalo de tempo médio entre os bloqueios. O inverso do valor de τ_{on} corresponde à frequência de ocorrência dos bloqueios ($f=1/\tau_{on}$), sendo este parâmetro proporcional à concentração ([T]) do analito. A partir deste coeficiente e da constante de associação (k_{on}) analito-nanoporo, obtemos: $f = k_{on}[T]$.[66,67]

Neste contexto, demonstra-se que a cinética entre o estado ocupado (presença do analito) e não ocupado (ausência do analito) no nanoporo evidenciado experimentalmente pelas flutuações discretas no registro da corrente iônica fornece informações relevantes que permitem quantificar e identificar o analito.[11]

Nos próximos tópicos citaremos algumas das aplicações do nanoporo da alfatoxina na detecção, quantificação e caracterização de moléculas em meio aquoso. Por outro lado, previamente discutiremos algumas limitações deste método, bem como as estratégias físico-químicas empregadas na tentativa de superá-las.

Limitações e estratégias de melhorias do nanoporo proteico da alfatoxina

Similarmente a outras metodologias e técnicas analíticas algumas limitações dificultam o desenvolvimento de dispositivos comerciais baseados no biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual. São três as mais relevantes limitações: a reprodutibilidade e estabilidade das membranas lipídicas artificiais; a detecção de moléculas de tamanhos muito diferentes do diâmetro do nanoporo e a alta velocidade de translocação através do nanoporo, principalmente de moléculas poliméricas com carga residual.

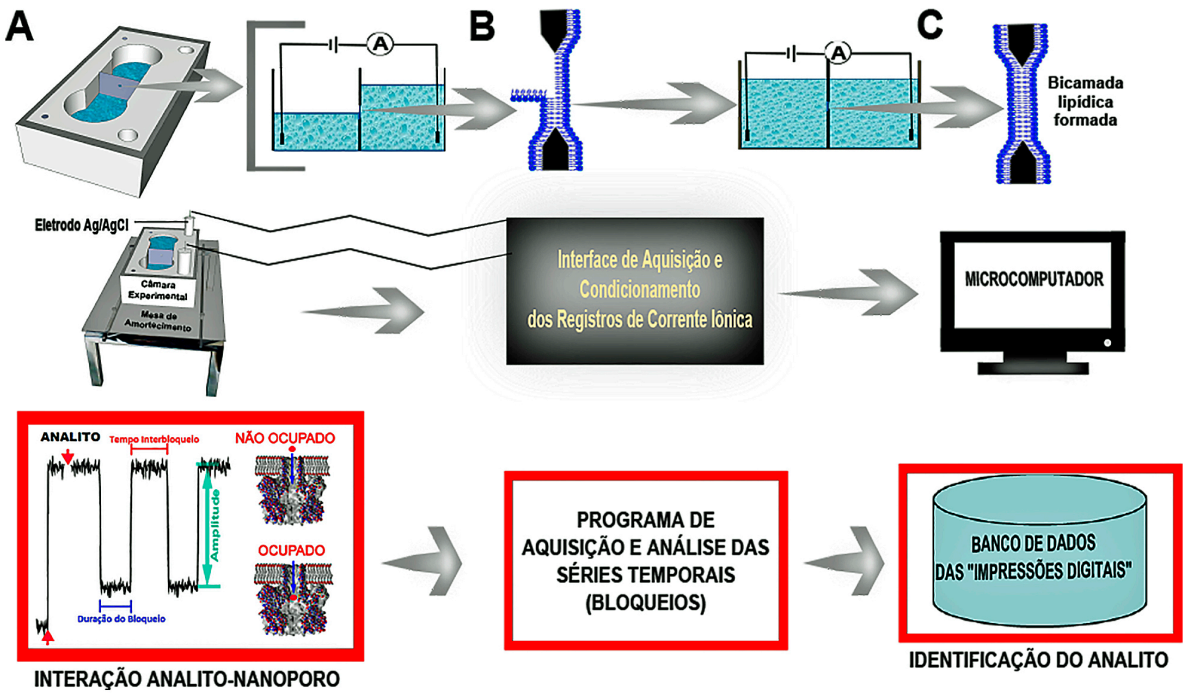


Figura 3. *Esquema da montagem experimental do nanoporo da alfatoxina como biossensor estocástico. (A) Desenho da câmara experimental formada por duas hemicâmaras separadas por uma película de Teflon® com um orifício (aproximadamente 40 µm de diâmetro) para a formação da bicamada lipídica plana. (B) Primeira etapa de montagem da monocamada lipídica ocorre com acréscimo de mais solução em um dos compartimentos da câmara experimental. (C) Montagem da segunda monocamada lipídica. A deposição de cada uma das monocamadas lipídicas ocorre com a introdução de mais solução em cada um dos respectivos compartimentos da câmara. Na região central demonstra-se a mesa de amortecimento com a câmara experimental acoplada através de eletrodos à interface eletrônica de aquisição dos registros de corrente iônica. Esta interface é composta por amplificador e filtro passa-baixa conectados ao conversor analógico-digital acoplado a um microcomputador. Na parte inferior encontra-se um quadro da membrana lipídica com um único nanoporo inserido. A entrada e passagem da molécula de analitos (bolinha vermelha) através do nanoporo induzem bloqueios característicos na corrente iônica. A análise das amplitudes e durações dos bloqueios permite a identificação dos analitos; a análise da frequência dos bloqueios permite a quantificação dos analitos. A aquisição, armazenamento e análise das séries temporais (impressão digital) são processadas por um programa dedicado e a identificação do analito é realizada por comparação em um banco de dados de impressões digitais. Este banco de dados é montado com a calibração do sistema e registro de corrente iônica com analitos de alto grau de pureza*

As técnicas para montagem de bicamadas lipídicas planas são empregadas desde a década de 70 e devido aos recursos tecnológicos atuais é possível a obtenção de orifícios circulares com bordas bem delineadas e diâmetro de até 10 µm em películas de Teflon® ultrafinas que facilitam a montagem de membranas de lipídeos sintéticos com elevada reprodutibilidade.[68] A estabilidade mecânica e durabilidade da bicamada lipídica como suporte para o nanoporo ainda é sofrível, pois toda montagem experimental deve ficar isolada de perturbações mecânicas por meio do uso de mesas de amortecimento de alto desempenho. Por outo lado, melhorias consideráveis na durabilidade da membrana já foram relatadas. Recentemente foi desenvolvida uma câmara experimental miniaturizada e com dispositivo refil em que a bicamada lipídica fica aprisionada de maneira similar a um sanduíche, entre dois folhetos de agarose semi-sólida.[69] Nessa montagem a longevidade da membrana foi prolongada em vários dias. Adicionalmente, a agarose aumentou consideravelmente a estabilidade mecânica da membrana, permitindo inclusive a movimentação manual da câmara experimental na ausência da mesa de amortecimento, e a bicamada lipídica se manteve intacta com o nanoporo incorporado e ainda funcional.[69]

A razão entre o valor do diâmetro da molécula do analito e o valor do diâmetro do nanoporo deve permanecer entre 0,1 e 1, pois somente nesta faixa é que temos uma relação sinal/ruído adequada, que possibilita uma análise segura da série temporal de registro das flutuações discretas da corrente iônica, ou seja, uma "impressão digital" confiável.[11] Moléculas muito menores que o diâmetro do nanoporo conseguem permear através do lume aquoso do nanoporo, porém, devido ao seu pequeno diâmetro, somente alteram o ruído intrínseco ao registro da corrente iônica e não geram flutuações discretas. As moléculas do mesmo tamanho do diâmetro do nanoporo podem entrar e obstruir completamente o nanoporo, impossibilitando o registro da corrente iônica. Por outro lado, as moléculas maiores que o diâmetro do nanoporo não entram nele e também não geram flutuações discretas no registro da corrente iônica. Nestas condições não há como obter séries temporais efetivamente representativas da dinâmica da interação analito-nanoporo, portanto, torna-se inviável utilizar o nanoporo como elemento de biossensoriamento estocástico.

Em relação à alta velocidade de translocação de moléculas poliméricas com carga residual é relevante considerar aqueles casos em que é importante a identificação sequencial de cada uma das unidades monoméricas, ou seja, realizar o sequenciamento molecular. Neste contexto, o caso mais emblemático é o heteropolímero constituído por adenina, timina, citocina e guanina, ou seja, o ácido desoxirribonucléico (DNA).[70,71] Essa problemática tem sido abordada, principalmente, na utilização do nanoporo da alfatoxina como sequenciador de DNA, a aplicação considerada de maior relevância dessa ferramenta analítica. O nanoporo da alfatoxina é permeável ao DNA de fita simples (ssDNA), porém, devido ao seu grande número de grupamentos fosfatos, esta molécula apresenta uma elevada carga negativa, e isto é o principal fator responsável por sua altíssima velocidade de translocação, com valores menores que 10 µs por base.[72] Neste caso, diversas alternativas foram propostas na tentativa de

minimizar esse empecilho, uma delas é o aumento da viscosidade da solução eletrolítica, abordagem que teoricamente induz a diminuição da velocidade de translocação, porém, os resultados experimentais até então demonstram que os incrementos na viscosidade ainda não foram suficientes para permitir a discriminação adequada das bases nucleotídicas de maneira a viável para o sequenciamento de DNA.[73,74]

São muitos os esforços para melhoramento das condições experimentais e aperfeiçoamento do nanoporo da alfatoxina, com a finalidade de aplicá-lo para detecção de diferentes moléculas.[75]

A molécula da alfatoxina apresenta condições que favorecem alterações em sua estrutura molecular por meio de técnicas de engenharia genética que propiciam a produção de nanoporos mutantes. Assim sendo, é possível realizar o remodelamento na molécula da alfatoxina para produzir nanoporos adaptados à detecção de analitos com características físico-químicas diversas; originando os nanoporos proteicos funcionalizados (“adaptados” ou “planejados”) como mostrado na Figura 3S.[24,76] Técnicas de mutagênese sítio específicas foram realizadas para introdução de D-aminoácidos não encontrados nos mamíferos superiores.[24] O nanoporo da alfatoxina também pode ser modificado quimicamente por meio do uso de substâncias que reagem seletivamente com o grupamento lateral de alguns aminoácidos, permitindo a incorporação de uma diversidade de funcionalidades ao nanoporo.[76] Os nanoporos proteicos funcionalizados já estão sendo academicamente utilizados no biossensoriamento estocástico de uma ampla variedade de moléculas em solução aquosa e potencial plataforma ultrarrápida e de baixo custo para o sequenciamento de DNA.[77,78] Zhao e colaboradores demonstraram, em 2009, que nanoporos modificados com resíduos aromáticos apresentam uma maior afinidade de interação na detecção de peptídeos curtos, incluindo aqueles que diferem em apenas um aminoácido como mostrado na Figura 4S.[78]

Em outros estudos foi possível modular a seletividade do nanoporo da alfatoxina com o uso de adaptadores moleculares introduzidos na sua constrição, reduzindo ainda mais o diâmetro daquela região e, desse modo, favorecendo maior especificidade com o objetivo de facilitar a identificação e a quantificação de analitos, incluindo a detecção de bases do DNA.[58,79,80] O melhor exemplo desses adaptadores é a β-ciclodextrina.[76,81]

Outra abordagem para o aperfeiçoamento da capacidade de detecção do nanoporo da alfatoxina é a modificação da solução eletrolítica banhante do nanoporo. A fundamentação química para esta abordagem se baseia no fato de que mudanças dos parâmetros físico-químicos da solução eletrolítica influenciam na interação entre as moléculas.[82] Assim sendo, as alterações na condutividade, viscosidade e grau de estruturação da água da solução banhante do nanoporo da alfatoxina, devido a sais de Hofmeister, influenciam na intensidade da interação entre o analito e o nanoporo, possibilitando a sintonização da sensibilidade deste elemento sensor.[23,83]

A série de Hofmeister ou série liotrópica é constituída por sais que podem ser divididos em duas classes, caotrópicos e cosmotrópicos, em função de sua capacidade de organizar as moléculas de água ao redor do íon.[84] A eficácia desses sais em precipitar macromoléculas poliméricas aumenta com a sua capacidade de maior estruturação das moléculas de água devido à presença de íons cosmotrópicos, consequentemente gerando o efeito *salting-out*.[85] Os íons caotrópicos são responsáveis pelo efeito *salting-in*, uma vez que causam desestruturação no grau de organização da água.[86]

Os efeitos específicos dos íons dessa série são observados em várias situações como na estabilidade de proteínas,[87] interações proteína-proteína, cristalização de proteínas,[88] atividade enzimática,[89] desnaturação de macromoléculas biológicas[90] e crescimento bacteriano.[91] Além disso, a série de Hofmeister é observada em outros fenômenos físico-químicos como tensão superficial,[92] concentração micelar crítica[93] e estabilidade coloidal.[94] Esses efeitos também ocorrem em soluções aquosas de eletrólitos, pois parâmetros como a viscosidade, densidade, índice de refração, elevação do ponto de ebulição, pressão osmótica, dentre outras, mostram-se alterados dependendo da composição e concentração do sal.[95]

Os nanoporos proteicos representam uma região de confinamento (“nanotubo de ensaio”) onde ciclos sistemáticos de hidratação e desidratação ocorrem naturalmente com diversas espécies permeantes. Os efeitos de Hofmeister devem ser perceptíveis nos casos em que as dimensões do nanoporo se aproximam ao valor do diâmetro do íon a ser transportado como, por exemplo, os canais de K^+ dependentes de voltagem.[87] Um dos primeiros estudos para verificar a influência dos íons de Hofmeister nas propriedades dos canais iônicos foi realizado por Grigorjev e Bezrukov em 1994.[95] Eles avaliaram a influência dos íons halogênios (F^-, Cl^-, Br^-, I^-) com o potássio nos parâmetros biofísicos (condutância e seletividade) do canal iônico formado pelo antibiótico *roflamycoin*. Estes parâmetros foram dependentes do tipo de eletrólito. A condutância do canal iônico unitário aumentou em acordo com a série de Hofmeister ($F^- < Cl^- < Br^- < I^-$). Por outro lado, a seletividade aniônica apresentou redução gradual, porém, totalmente inversa com a série de Hofmeister.[95] Estabeleceu-se então que quanto maior for a natureza caotrópica do ânion, mais forte é a ligação dos ânions na estrutura proteica do canal e este desenvolve uma seletividade catiônica devido à redução do fator eletrostático para os cátions.[96,97]

O estudo dos efeitos de Hofmeister em sistemas confinados, como os biossensores estocásticos baseados no nanoporo da alfatoxina, também tem se intensificado nos últimos anos, tendo em vista o potencial biotecnológico desse nanoporo.[6,7,98]

Neste contexto, Rodrigues[23] e colaboradores demonstraram que o aumento na concentração da solução de KCl (de 1 mol L^{-1} para 4 mol L^{-1}) melhorou qualitativamente a sensibilidade do biossensor formado pelo nanoporo da alfatoxina.[23,98] Nesses estudos, estabeleceu-se uma forte correlação entre o aumento da concentração de um mesmo sal com o nível de sensibilidade do nanoporo em relação a detecção do polietilenoglicol (PEG), como demonstrado na determinação do limite de detecção representado na Figura 4A.[98] A sensibilidade deste biossensor também depende fortemente do tipo de eletrólito que compõe a solução banhante, como descrito por Rodrigues[98] e colaboradores em 2011.[98] Nesse estudo avaliou-se a influência de ânions da família VIIA no biossensoriamento estocástico via nanoporo da alfatoxina.[99,100] Estabeleceu-se que o ânion halogênio influencia nas propriedades deste sensor, pois a presença do F^- na solução banhante do nanoporo da alfatoxina aumentou em aproximadamente 130 vezes a sua sensibilidade, como pode ser visto na Figura 4B.[100] Deste modo, estabeleceu-se uma forte relação proporcional entre o aumento do nível de resolução do sensor para moléculas unitárias e a composição e concentração da solução salina, levando à necessidade de mais estudos que verifiquem o potencial de outras soluções capazes de aumentar a energia de interação do complexo analito–nanoporo.[100] Sugerimos, então, a possibilidade de realizar a sintonia da sensibilidade do nanoporo da alfatoxina por meio da escolha adequada da solução eletrolítica.

Aplicabilidade do nanoporo da alfatoxina

O nanoporo proteico unitário formado pela incorporação da alfatoxina em bicamada lipídica plana tem sido aplicado para detecção, monitoração e caracterização de moléculas relevantes em diversos setores da atividade humana. Isto é possível devido à capacidade de multidetecção desse nanoporo, relativa facilidade de adaptações em sua estrutura molecular e sua elevada estabilidade molecular. As adaptações moleculares no nanoporo podem ser realizadas por meio de mutações sítio específicas ou modificação química seletiva, e

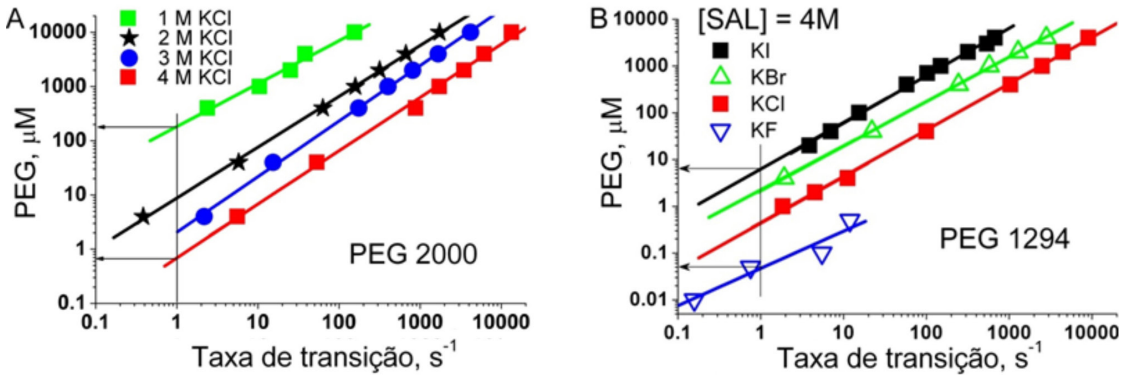


Figura 4. *Influência da concentração e composição da solução na sensibilidade do nanoporo da alfatoxina.* ***A)*** *O valor da concentração do polietilenoglicol (PEG 2000) é menor (0,7 µmol L^{-1}) na presença da solução iônica de elevada concentração de KCl (4 mol L^{-1}), portanto, o aumento da concentração do KCl de 1 para 4 mol L^{-1}, aumentou a sensibilidade do nanoporo em aproximadamente 214 vezes. Adaptado da Ref. 98.* ***B)*** *O valor da concentração do polietilenoglicol (PEG 1294) é menor (0,05 µmol L^{-1}) na presença da solução iônica de fluoreto de potássio (4 mol L^{-1}), portanto, a substituição do iodeto pelo fluoreto aumentou a sensibilidade do nanoporo em aproximadamente 130 vezes. As setas horizontais indicam o menor valor de concentração do analito (PEG), considerando a frequência dos bloqueios na corrente iônica, maior ou igual a 1 Hz como indicado pela linha vertical. Adaptado da Ref. 100*

permitem a incorporação de funcionalidades ao nanoporo. A elevada estabilidade molecular viabiliza a variação de parâmetros físico-químicos da solução eletrolítica, enquanto a integridade funcional do nanoporo é mantida, permitindo a adequação de sua sensibilidade a diversos analitos.

Detecção de íons divalentes e monovalentes em explosivos líquidos

Braha[25] e colaboradores, utilizando um nanoporo de alfatoxina mutante (substituição dos aminoácidos das posições 123, 125, 133 e 135 por histidinas), conseguiram detectar simultaneamente íons divalentes em meio aquoso, como demonstrado na Figura 5.[25] Estas mutações introduziram um sítio de ligação no interior do nanoporo, que é ocupado de maneira mutuamente exclusiva pelos íons divalentes adicionados em um dos lados da bicamada lipídica como mostrado na Figura 5A. Na Figura 5B observam-se os registros de bloqueios da corrente iônica, induzidos por íons Zn^{+2}, Co^{+2}, Cd^{+2}. O nanoporo mutante realizou a detecção dos íons de Co^{+2} e Zn^{+2} presentes simultaneamente na solução como indicado na Figura 5C.

Em outro estudo, Jayawardhana[26] e colaboradores demonstraram, em 2009, que o método do biossensoriamento estocástico baseado no nanoporo da alfatoxina também é rápido e sensível na detecção de cátions monovalentes. A detecção com eficácia e rapidez de cátions monovalentes pode ser útil, uma vez que alguns deles são componentes de explosivos líquidos utilizados em atentados terroristas. Normalmente esses explosivos são misturas binárias nas quais apenas um ou ambos os compostos são líquidos. Além disso, os componentes isoladamente não são explosivos e podem ser de maneira furtiva facilmente transportados. Nesse trabalho utilizou-se o nanoporo da alfatoxina

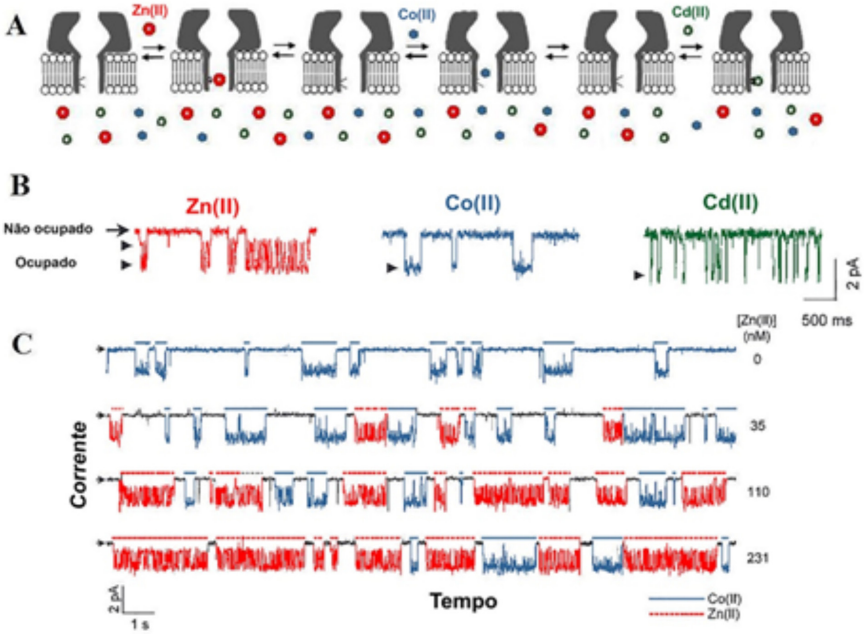


Figura 5. *Capacidade do nanoporo da alfatoxina em detectar íons divalentes.* ***(A)*** *Representação esquemática do sítio de ligação introduzido por mutação no interior do nanoporo da alfatoxina. As setas indicam a interação de um íon (círculo cheio ou vazio) com o sítio de ligação.* ***(B)*** *Registros de bloqueios da corrente iônica, característicos de cada íon (Zn^{+2}, Co^{+2}, Cd^{+2}). Cada registro resulta de um experimento em que apenas um dos íons foi adicionado à solução eletrolítica.* ***(C)*** *Registros da corrente iônica na presença de apenas íons de Co^{+2} na solução eletrolítica (primeiro traçado). Os três traçados inferiores representam sequencialmente os registros da corrente iônica à medida que se aumentou a concentração do Zn^{+2} para 35, 110 e 231 nmol L^{-1}, respectivamente. As linhas cheias e tracejadas indicam o perfil de bloqueio na corrente, característico do Co^{+2} ou Zn^{+2}, respectivamente. Adaptado da Ref. 25*

do tipo selvagem com um adaptador, a boromicina, e como solução banhante do nanoporo, além dos eletrólitos normalmente utilizados (KCl ou NaCl), foi adicionado também um líquido iônico, o Cloreto de Butilmetilimidazol (BMIM-Cl). Nessas condições, o nanoporo detectou vários componentes iônicos presentes na composição de explosivos líquidos, tais como: cloreto de trietilamônio (TEA), cloreto de dietilamônio (DEA), hidrocloreto 4-(2cloretil) morfolina (CM), dicloridrato de hidrazina (HZ), cloreto de tetraetilamonio (TMA), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de amônio (NH_4Cl).[26]

Discriminação de moléculas enantioméricas

Kang[27] e colaboradores relataram, em 2006, a capacidade que o nanoporo da alfatoxina possui em discriminar concomitantemente analitos enantioméricos. Nesse estudo foi utilizada uma alfatoxina mutante acoplada a uma β-ciclodextrina (βCD) para aumentar a especificidade do nanoporo, permitindo a detecção das formas enantioméricas do ibuprofeno, como representado na Figura 6.[27]

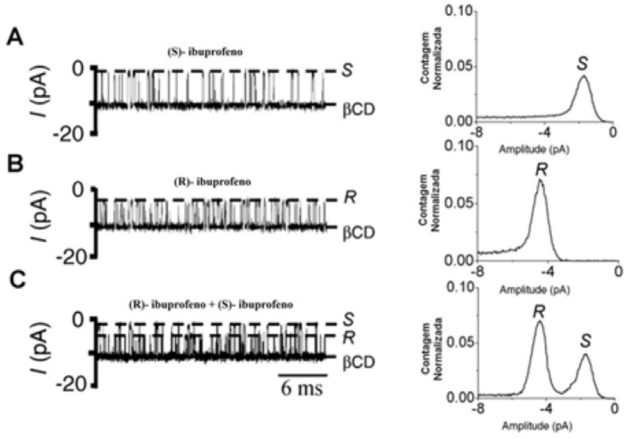


Figura 6. *Capacidade do nanoporo da alfatoxina na discriminação de moléculas enantioméricas. A β-ciclodextrina (βCD) foi acoplada na região mais estreita do nanoporo da alfatoxina mutante, diminuindo ainda mais seu diâmetro, portanto, reduz a corrente iônica que passa através do nanoporo como indicado pela linha contínua nos registros.* ***a)*** *Registro dos bloqueios na corrente iônica característica do (S)-ibuprofeno. A linha tracejada indica a amplitude dos bloqueios;* ***b)*** *Registro dos bloqueios na corrente iônica característica do (R)-ibuprofeno;* ***c)*** *Registro dos bloqueios da corrente iônica de ambas as formas enantioméricas do ibuprofeno. Ao lado direito de cada registro, os respectivos histogramas de amplitude dos bloqueios da corrente iônica. Nota-se claramente que o nanoporo é capaz de discriminar as formas enantioméricas do ibuprofeno. Adaptado da Ref. 27*

Detecção de armas químicas

O combate ao terrorismo tornou-se uma prioridade internacional devido ao aumento das ameaças nos últimos anos. Uma das necessidades urgentes em combater o terrorismo é melhorar a capacidade atual de detecção e identificação com precisão e rapidez, de agentes químicos que podem ser usados para ataque terrorista ou como arma química. No estudo de Liu[30] e colaboradores foi demonstrada a utilização do nanoporo formado pela alfatoxina na detecção de explosivos como o trinitrotolueno (TNT), agente químico bastante utilizado em aplicações militares e industriais. Adicionalmente o nanoporo formado pela alfatoxina mostrou-se bastante eficaz na detecção de organofosforados, os quais representam um dos grupos químicos mais tóxicos de substâncias químicas desenvolvidas para fins militares. Os organofosforados são utilizados em alguns defensivos agrícolas. O limite de detecção desse composto detectado pelo nanoporo da alfatoxina foi significativamente inferior aos limites exigidos pelo exército americano.[30] Para a detecção do organofosforado PMPA (pinacolil metilfosfanato) a β-ciclodextrina foi utilizada com um adaptador molecular acoplado no nanoporo objetivando diminuir o diâmetro da constrição e, assim, aumentar a interação do PMPA com o nanoporo. Esse acoplador melhorou a detecção das moléculas unitárias do organofosforado. Esse estudo demonstrou que o nanoporo da alfatoxina apresenta grande potencial para aplicações na área de segurança.

Detecção de drogas ilícitas

Em estudo realizado por Kawano[29] e colaboradores foi descrita uma metodologia para a detecção rápida e altamente seletiva de cocaína utilizando um nanoporo proteico acoplado com um aptâmero de DNA.[29] Os aptâmeros são ácidos nucléicos geneticamente modificados para terem propriedades específicas de reconhecimento para moléculas. Eles demonstraram que o nanoporo foi capaz de detectar uma concentração baixíssima de cocaína, 300 ng/mL, em apenas 60 segundos. Além disso, este sistema pode ser aplicado não só para a cocaína, mas para uma grande variedade de analitos, dependendo apenas da especificidade do aptâmero. Estudos nesta diretriz são de extrema importância, pois se acredita que esse método possa auxiliar no desenvolvimento de um teste para drogas ilícitas em tempo real.

Espectrômetro de massa para homopolímeros

A determinação da massa, tamanho e concentração de moléculas em amostras é de grande interesse científico e tecnológico.[101,102] A principal técnica padrão para determinação da massa de moléculas é a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).[103,104] Esta técnica, apesar de amplamente empregada, apresenta o inconveniente de ser um ensaio destrutivo e não permitir a análise em meio líquido.[96] Graças aos estudos que demonstram maior sensibilidade do nanoporo da alfatoxina em soluções eletrolíticas com valor de concentração de aproximadamente 4 mol L^{-1},[23,98] foi possível pioneiramente utilizar este nanoporo como espectrômetro de massa para o polietilenoglicol (PEG). Foram analisadas amostras polidispersas de PEG 1500 e também amostras monodispersas de PEG 1294.[18,31] Demonstrou-se uma boa correlação entre os espectrogramas obtidos com o nanoporo da alfatoxina e pela técnica do MALDI como visto na Figura 7, portanto, o nanoporo consegue discriminar polietilenoglicóis, diferentes em apenas uma unidade monomérica. Um diferencial importante no emprego do nanoporo da alfatoxina como espectrômetro de massa é que todo o processamento da amostra ocorre em meio aquoso, portanto, não há à destruição do polímero, possibilitando inclusive o reaproveitamento das moléculas analisadas.

Sequenciador de ácido desoxirribonucléico

O uso de nanoporos para o sequenciamento de biopolímeros foi proposto há mais de uma década, com a primeira demonstração experimental da translocação de ácido desoxirribonucléico de fita simples (ss-DNA) através do nanoporo proteico da alfatoxina.[105] Uma vantagem importante dessa abordagem em relação aos métodos de sequenciamento por síntese é que, além de ser uma técnica mais direta, ela apresenta uma inerente capacidade de leitura bidirecional do ss-DNA, possibilitando que a mesma fita de DNA seja sequenciada novamente.[106,107] A tecnologia de detecção baseada em nanoporo possibilitará um sequenciamento de ácidos nucléicos, com maior rapidez de análise e sem a necessidade de marcação ou amplificação do DNA.[2,108,109] Nesta tecnologia a fita de ss-DNA sofre um processo de nanoeletroforese translocando-se por meio do nanoporo, gerando bloqueios na corrente iônica característicos de cada base nucleotídica, como representado na Figura 8.[2]

Significativos avanços na aplicação de nanoporos proteicos no desenvolvimento de sequenciadores de DNA ocorreram nos últimos

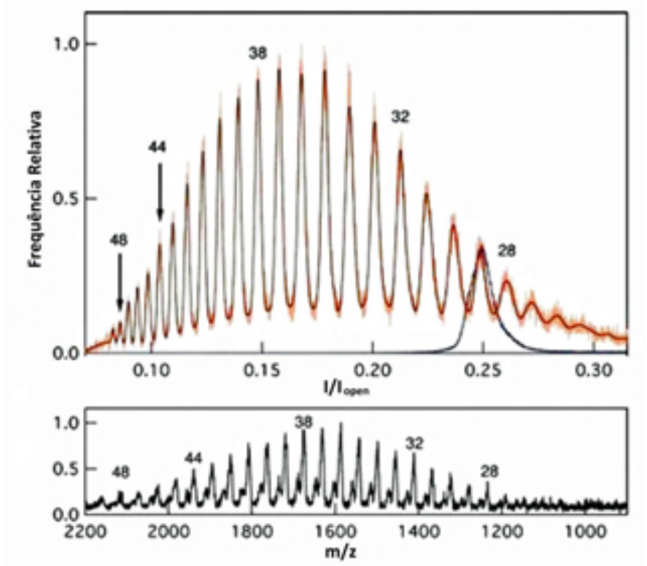


Figura 7. *Nanoporo da alfatoxina como espectrômetro de massas. Espectro de massa (superior) para o polietilenoglicol (PEG 1500, Mr=1500 g/mol) polidisperso obtido com o nanoporo unitário comparado ao espectro de massa (inferior) obtido pelo MALDI-TOF. Os histogramas representam o valor médio da corrente para cada amplitude de bloqueio referente a cada molécula do polímero. Os números na parte superior em cada "pico" do histograma indicam a quantidade de monômeros do etilenoglicol em cada molécula do polímero. Os maiores valores de I/I_{open} correspondem às moléculas de PEG de menor massa molecular. O I indica o valor de corrente iônica através do nanoporo quando este é ocupado pelo polietilenoglicol, e I_{open} é o valor de corrente quando não há moléculas de PEG no interior do nanoporo da alfatoxina. O "pico" indicado pelo número 28 corresponde a análise da amostra de polietilenoglicol (PEG 1294) monodisperso. No MALDI-MS devido ao processo de desorção e ionização, cada molécula do PEG perde um O ou OH. Adaptado da Ref. 18*

seis anos, devido principalmente ao incentivo dado pelo financiamento da União Européia ao projeto intitulado "Dispositivos e Abordagens Revolucionárias para Ácidos Nucléicos" (The Revolutionary Approaches and Devices for Nucleic Acid - READNA). Esse projeto tinha como objetivo principal desenvolver plataformas de sequenciamento de DNA que permitissem sequenciar o genoma humano com custo total de até mil dólares e tempo máximo de 24 horas.[14] O nanoporo da alfatoxina preencheu esses requisitos e se tornou a plataforma de sequenciamento de terceira geração anunciada recentemente pela Oxford Nanopore Technologies.[110] Outros grupos ainda trabalham no desenvolvimento de plataformas de sequenciamento de DNA, porém, baseados em nanoporos sintéticos.[77,111]

Monitoração de microcistinas na água

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos tóxicos produzidos por diversas espécies de bactérias do gênero *Microcystis*, e sua presença no meio aquoso em concentração superior a 1 μg L^{-1} torna a água inadequada à ingestão pelos seres humanos.[112,113] Atualmente já foram relatadas mais de 80 diferentes variantes estruturais de microcistinas, e todas apresentam alguns D-aminoácidos. Dentre elas destacam-se a microcistina LR (MC-LR), microcistina RR, microcistina YR, sendo a primeira considerada a mais tóxica. A MC-LR é um potente inibidor de fosfatases de proteínas e apresentam toxicidade considerável para mamíferos, podendo levar à desorganização celular total do tecido hepático.[114] As microcistinas são encontradas em reservatórios de água doce, porém, desde que a MC-LR foi encontrada em águas salgadas, estudos adicionais têm sido relatados para a detecção delas.[115] A grande variabilidade estrutural das microcistinas representa um empecilho a mais para a monitoração, caracterização e identificação confiável destas moléculas em meio aquoso, exigindo atualmente o emprego de diversos métodos analíticos, dentre os quais se destacam os bioensaios com ratos, imunoensaios (ELISA), ensaios bioquímicos dependentes da inibição de atividade enzimática, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e espectrometria de massas.[116] Adicionalmente, ensaios com microscopia de força atômica foi relatado na identificação de microcistina,[115] e também a utilização do método analítico sem uso da acetonitrila, para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência.[117]

Recentemente relatou-se que o nanoporo da alfatoxina é capaz não somente de detectar, mas também discriminar até 3 variantes de microcistinas em meio aquoso.[28] Nesse estudo demonstrou-se que o método baseado neste nanoporo permite a diferenciação concomitante de até três microcistinas presentes em solução de elevada força iônica como observado na Figura 5S.[28]

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O biossensoriamento estocástico é inerente a todos os seres vivos e desempenha um papel importante para sua sobrevivência, uma vez que possibilitam aos organismos uni ou multicelulares interagirem adequadamente com os diversos meios até os dias atuais. Por outro lado, mesmo com vários estudos sobre os fenômenos celulares, somente com o advento da Nanobiotecnologia foi possível ao homem iniciar de maneira sistemática o emprego de processos biomiméticos e nanobioestruturas no desenvolvimento de métodos e potenciais dispositivos práticos baseados no biossensoriamento estocástico, como os biossensores formados por nanoporos proteicos unitários ou individuais. Os nanoporos proteicos têm-se mostrado, principalmente do ponto de vista acadêmico, como ferramentas moleculares de

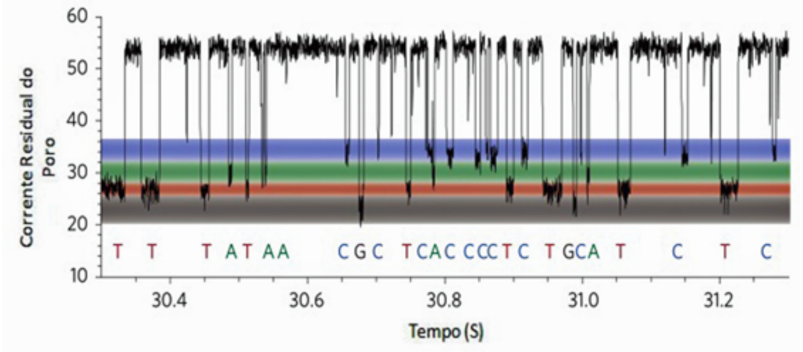


Figura 8. *Nanoporo da alfatoxina como sequenciador de DNA. Representação esquemática do padrão de bloqueios na corrente iônica através do nanoporo da alfatoxina durante a translocação de ss-DNA. Observe que a amplitude dos bloqueios indicados pelas faixas coloridas é característica de cada base nucleotídica, representadas por: T=timina, A=adenina, C=citosina, G=guanina. Adaptado da Ref. 2*

medição capazes de quantificar, detectar, identificar e caracterizar uma grande variedade de moléculas, desde as mais simples, como íons, até as mais complexas, como o DNA. Por outro lado, ainda há muito a ser teoricamente elucidado e tecnicamente aperfeiçoado, até que a sociedade possa se beneficiar com a ampla utilização de dispositivos práticos baseados nos nanoporos proteicos unitários. Com relação à abordagem teórica faz-se necessário aumentar significativamente o entendimento dos mecanismos moleculares da interação analito-nanoporo, enquanto se aperfeiçoa o futuro dispositivo prático em termos de miniaturização, portabilidade e longevidade da bicamada lipídica, atualmente considerado um bom suporte para o nanoporo proteico. O emprego de simulação de dinâmica molecular (SDM) vem sendo utilizada e pode esclarecer ou corroborar alguns achados experimentais importantes, bem como permitir a predição de resultados dificeis de serem obtidos com precisão pelas técnicas experimentais atuais. A SDM permite, por exemplo, estudar teoricamente o fluxo dos íons através dos nanoporos proteicos e as interações eletrostáticas do analito no interior do nanoporo.

Finalmente, o foco principal das pesquisas sobre o biossensoriamento estocástico via nanoporo da alfatoxina consiste em produzir dispositivos comerciais direcionados à solução de problemas relacionados à saúde da sociedade moderna, em que os indivíduos estão cada vez mais expostos a nanopoluentes, cuja ação maléfica nos humanos e outros seres ainda não está adequadamente compreendida.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Algumas imagens dos sistemas utilizados neste trabalho estão disponíveis em http://quimicanova.sbq.org.br, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Nanotecnologia para Marcadores Integrados (INCT-Inami), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Agradecemos ao Doutor Luiz Hamiel Almeida Consoni do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE; à Doutora Liliya Yuldasheva do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE e, à Doutora Paloma Lys de Medeiros do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da UFPE, pelas críticas, comentários, sugestões e revisão do texto.

Este trabalho foi concebido em memória do Doutor Oleg Vladimirovich Krasilnikov.

REFERÊNCIAS

1. Bayley, H.; Cremer, P. S.; *Nature* **2001**, *413*, 226.
2. Clarke, J.; Wu, H. C.; Jayasinghe, L.; Patel, A.; Reid, S.; Bayley, H.; *Nat. Nanotechnol* **2009**, *4*, 265.
3. Liu, A.; Zhao, Q.; Guan, X.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, 675,106.
4. Boersma, A. J.; Brain, K. L.; Bayley, H.; *ACS Nano* **2012**, *6*, 5304.
5. Rhee, M.; Burns, M. A.; *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 174.
6. Kang, X.F.; Cheley, S.; Rice-Ficht, A.C.; Bayley, H. J.; *Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4701.
7. Mulero, R.; Prabhu, A. S.; Freedman, K. J.; Kim, M. J.; *JALA (1998-2010)* **2010**, *15*, 243.
8. Hille, B; *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed., Sinauer Sunderland: Massachusetts, 2001.
9. Kasianowicz, J. J.; *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6215.
10. Reiner, J. E; Balijepalli, A; Robertson, J. W.; Drown, B. S.; Burden, D. L.; Kasianowicz, J. J; *J. Phys. Chem.* **2012**, *37*, 214903.
11. Kasianowicz, J. J.; Robertson, J. W. F.; Chan, E. R.; Reiner, J. E.; Stanford, V. M.; *Annu. Rev. Anal. Chem* **2008**, *1*, 737.
12. Zhao, Q., Wang, D., Jayawardhana, D. A., Guan, X.; *Nanotechnology* **2008**, *19*, 1.
13. Wang, G.; Wang, L.; Han. Y.; Zhou, S.; Guan, X; *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2867.
14. Rincon-Restrepo, M.; Mikhailova, E.; Bayley, H.; Maglia, G.; *Nano Lett.* **2011**, *11*, 746.
15. Pastoriza-Gallego, R. A M.; Bah, L.; Gibrat, G.; Thiebot, B.; Gisou, F.; Auvray, L.; Betton, J. M.; Pelta, J. J.; *Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2923.
16. Renner, S.; Bessonov, A.; Simmel, F. C.; *Appl Phys. Lett.* **2011**, *98*, 83701.
17. Reiner, J. E.; Balijepalli, A.; Robertson, J. W. F.; Campbell, J.; Suehle, J.; Kasianowicz, J. J.; *Chem. Rev*. **2012**, *112*, 6431.
18. Robertson, J. W.; Rodrigues, C.G.; Stanford, V. M.; Rubinson, K. A.; Krasilnikov, O. V.; Kasianowicz, J. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **2007**, *104*, 8207.
19. Rai, M.; Gade, A.; Gaikwad, S.; Marcato, P. D.; Durán, N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 14.
20. Song, L.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J. E.; *Science* **1996**, *274*, 1859.
21. Howorka, S.; Cheley, S.; Bayley, H. *Nat. Biotechnology* **2001**, *19*, 636.
22. Movileanu, L.; *Protein Pept. Lett.* **2014**, *21*, 235.
23. Krasilnikov, O. V.; Rodrigues, C. G.; Bezrukov, S. M.; *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 183016.
24. Mohammad, M. M.; Movileanu, L.; *Methods Mol. Biol*. **2012**, *870*, 21.
25. Braha, O.; Gu, L. Q.; Zhou, L.; Lu, X.; Cheley, S.; Bayley, H. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1005.
26. Jayawardhana, D. A.; Crank, J. A.; Zhao, Q.; Armstrong, D. W.; Guan, X.; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 460.
27. Kang, X.F.; Cheley, S.; Guan, X.; Bayley, H.; *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, *128*, 10684.
28. Rodrigues, C. G.; Chevtchenko, S. F.; Krasilnikov, O. L.; Machado, D. C.; Aguiar, J. A.; Silva, J. J.; *BR pat* 000322 2012 (WO 2013/026123 A1).
29. Kawano, R.; Osaki,T.; Sasaki, H.; Takinoue, M.; Yoshizawa, S.; Takeuchi, S.; *J. Am. Chem. Soc*. **2011**, *133*, 8474.
30. Liu, A.; Zhao, Q.; Guan, X.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *675*, 106.
31. Stanford, V. M.; Kasianowicz, J. J.; Robertson, J. W. F.; Rodrigues, C. G.; Krasilnikov, O. V.; *US pat.12/435,667* **2010** (WO 2010/122907A1).
32. Robertson, J. W. F.; Kasianowicz, J. J.; Banerjee, S.; *Chem. Rev*. **2012**, *112*, 6227.
33. Behrends, J. C.; *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6218.
34. Bezanilla, F.; *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 555.
35. Walker, B.; Kasianowicz. J.; Bayley, H.; *Protein Eng., Des. Sel.* **1994**, *7*, 655.
36. Sackmann, E.; *Science* **1996**, *271*, 43.
37. Cornell, B. A., Braach-Maksvytis, V. L. B., King, L. G., Osman, P. D. J.,Raguse, B., Wieczorek, L., Pace, R.J.; *Nat. Nanotechnol.* **1997**, *387*, 580.
38. Turner, R. F. B.; Kilburn, D. G.; Phelps, M. R.; *US Pat.* 5,624,537 **1997**.
39. Cherf, G. M.; Lieberman,K. R.; Rashid, H.; Lam, C. E.; Karplus, K.; Akeson, M.; *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 344.
40. Wanunu, M.; *Phys. Life Rev.* **2012**, *9*, 125.
41. Wolna, A. H.; Fleming, A. M.; An. N; He, L; *Isr. J. Chem.* **2013**, *53*, 417.
42. Parker, M. W.; Feil, S. C.; *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, *88*, 91.
43. Barth, H.; Aktories, K.; Popoff, M. R.; Stiles, B. G.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 373.
44. Rádis-Baptista, G.; Kerkis, A.; Prieto-Silva, A. R.; Hayashi, M. A. F.; Kerkis, I.; Yamane, T.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 211.
45. Liu, A.; Zhao, Q.; Krishantha, D. M. M.; Guan, X.; *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *2*, 1372.
46. Berube, B. J.; Wardenburg, J. B.; *Toxins* **2013**, *5*, 1140.

47. Bernheimer, A. W.; Avigag, L. S.; *Infect. Immun.* **1974**, *9*, 1016.
48. Howard, S. P.; Buckley, T.; *J. Bacteriol.* **1985**, *163*, 336.
49. Howard, S. P.; Garland, W. J.; Green, M. J.; Buckley, J. T; *J. Bacteriol*. **1987**, *169*, 2869.
50. Stefureac, R. I.; *Doctoral Thesis*, University of Saskatchewan, Saskatoon, 2012.
51. Feld, G. K.; Thoren, K. L.; Kintzer, A. F.; Sterling, H. J.; Tang, I. I.; Greenberg, S. G.; Williams, E. R.; Krantz, B. A.; *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 1383.
52. Krasilnikov, O. V.; Ternovskii, V. I; Tashmukhamedov, B. A; *Biofizika* **1981**, *26*, 271
53. Menestrina, G.; *J. Membrane Biol.* **1986**, *90*, 177.
54. Gray, G. S.; Kehoe, M; *Infect. Immun*. **1984**, *46*, 615.
55. Krasilnikov, O. V.; Merzlyak, P. G.; Sabirov, R. Z.; Ternovsky, V. I.; Zaripova, R. K.; *Ukr. Biokhim. Zh.* **1988**, *60*, 60.
56. Krasilnikov, O. V.; Sabirov, R. Z.; Ternovsky, V. I.; Merzliak, P. G.; Muratkhodjaev, J. N.; *FEMS Microbiol. Immunol.* **1992**, *1-3*, 93.
57. Merzlyak, P. G.;Yuldasheva, L. N.; Rodrigues, C. G.; Carneiro, C. M. M.; Krasilnikov, O. V.; Bezrukov, S. M.; *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3023.
58. Gu, L. Q.; Braha, O.; Conlan, S.; Cheley, S.; Bayley, H.; *Nature* **1999**, *398*, 686.
59. Noskov, S. Y.; Im, W.; Roux, B.; *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2299.
60. Krasilnikov, O. V.; Merzlyak, P. G.; Yuldasheva, L. N.; Rodrigues, C. G.; Bhakdi, S.; Valeva, A.; *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 1372.
61. Merzlyak, P. G.; Capistrano, M. F. P.; Valeva, A.; Kasianowicz, J. J; Krasilnikov, O. V. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3059.
62. Coulter, W. H.; *US Pat*. 2, 656, 508 **1953**.
63. Movileanu, L.; *Trends Biotechnol*. **2009**, *27*, 333.
64. Nestorovich, E. M.; Bezrukov, S. M.; *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6388.
65. Kasianowicz, J. J.; Henrickson, S. E.; Lerman, J. C.; Misakian, M.; Panchal, R. G.; Nguyen, T.; Gussio, R.; Halverson, K. M.; Bavari, S.; Shenoy, D. K.; Stanford, V. M. Em *Handbook of Biosensors and Biochips*; Marks, R. S.; Cullen, D. C.; Karube, I.; Lowe, C. R.; Weetall, H. H., eds.; Wiley: New York, 2007.
66. Cheley, S.; Gu, L. Q.; Bayley, H.; *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 829.
67. Gu, L. Q.; Shim, J. W.; *Analyst* **2010**, *135*, 441.
68. Montal, M.; Mueller, P.; *PNAS* **1972**, *69*, 3561.
69. Shim, J. W.; Gu, L. Q.; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2207.
70. Martin, H. S. C.; *Doctoral Thesis*, University College, London, 2011.
71. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, 3rd ed., Wiley: New York, 2004, 1591p.
72. Muthukumar, M.; *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*. **2007**, *36*, 435.
73. Kawano, R.; Schibel, A. E. P.; Cauley, C.; White, H. S.; *Langmuir* **2009**, *25*, 1233.
74. Ding, K. J.; Zhang , H. Y.; Hu, H. G.; Zhao, H. M.; Guan, W. J.; Ma, Y. H.; *Chin. J. Anal. Chem.* **2010**, *38*, 280.
75. Rotem, D.; Jayasinghe, L.; Salichou, M.; Bayley, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2781.
76. Banerjee, A.; Mikhailovaa, E.; Cheley, S.; Gub, L. Q.; Montoyac, M.; Nagaokaa, Y.; Gouauxd, E.; Bayley, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 8165.
77. Maitra, R. D.; Kim, J.; Dunbar, W. B.; *Electrophoresis* **2012**, *33*, 3418.
78. Zhao, Q.; Jayawardhana, D. A.; Wang, D.; Guan, X. J.; *Phys. Chem*. **2009**, *113*, 3572.
79. Ayub, M.; Hardwick, S. W.; Luisi, B. F.; Bayley, H.; *Nano Lett.* **2013**, *13*, 6144.
80. Kawano, R.; Osaki, T.; Sesaki, H.; Takinoue, M.; Yoshizawa, S.; Takeuchi, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8474.
81. Kasianowicz J. J.; Henrickson, J. E.; Weetall H. H.; Robertson B.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *73*, 2268.
82. Tavares, L. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 631.
83. Collins, K. D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5553.
84. Hofmeister F.; *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **1888**, *24*, 247.
85. Schwierz, N.; Horinek, D.; Netz, R. R.; *Langmuir* **2010**, *29*, 2602.
86. Lo Nostro, P.; Ninham, B. W.; *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2286.
87. Collins, K. D.; *Biophys. Chem.* **2006**, *119*, 271.
88. Nishimura, J. S.; NarayanasamI, R.; Miller, R. T.; Roman, L. J.; Panda, S.; Masters, B. S. S.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5399.
89. Zhang, Y.; Cremer, P. S.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 658.
90. Lo Nostro, P.; Ninham, B. W.; Milani, S.; Lo Nostro, A.; Pesavento, G.; Baglioni, P.; *Biophys. Chem.* **2006**, *124*, 208.
91. Pegram, L. M.; Record, J. R. M. T.; *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 5411.
92. Wang, J.; Satoh, M.; *Polymer* **2009**, *50*, 3680.
93. López-Leon, T.; Jódar-Reyes, A. B.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Bastos-González, D.; *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *284*, 139.
94. Elberling, B.; Søndergaard, J.; Jensen, L. A.; Schmidt, L. B.; Hansen, B. U.; Asmund, G.; Zunić, T. B.; Hollesen, J.; Hanson, S.; Jansson, P. E.; Friborg, T.; *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 2407.
95. Grigorjev, P. A.; Bezrukov, S. M.; *Biophys. J.* **1994**, *67*, 2265.
96. Machado, D. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2014.
97. Gurnev, P. A.; Harries, D.; Parsegian, V. A.; Bezrukov, S. M.; *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1445.
98. Rodrigues, C. G.; Machado, D. C.; Chevtchenko, S. F.; Krasilnikov, O.V.; *Biophys. J.* **2008**, *95*, 5186.
99. Machado, D. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2010.
100. Rodrigues, C. G.; Machado, D. C.; Da Silva, A. M. B.; Silva Júnior, J. J.; Krasilnikov, O. V.; *Biophys. J.* **2011**, *100*, 2929.
101. Cunha, R. B.; Mariana, S. C.; Fontes, W.; *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2006**, *36*, 40.
102. Abdelnur, P. V.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
103. Karas, M. L.; Hillenkamp, F.; *Anal. Chem*. **1988**, *60*, 2299.
104. Saraiva, S. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2008.
105. Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Branton, D.; Deamer, D. W.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* U. *S. A.* **1996**, *93*, 13770.
106. Branton, D.; Deamer, D. W.; Marziali, A.; Bayley, H.; Benner, S. A.; Butler, T.; Di Ventra, M.; Garaj, S.; Hibbs, A.; Huang, X.; Jovanovich, S. B.; Krstic, P. S.; Lindsay, S.; Ling, X. S.; Mastrangelo, C. H.; Meller, A.; Oliver, J. S.; Pershin, Y. V.; Ramsey, J. M.; Riehn, R.; Soni, G. V.; Tabard-Cossa, V.; Wanunu, M.; Wiggin, M.; Schloss, J. A.; *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1146.
107. Ervin, E. N.; Barrall, G. A., Pal, P.; Bean, M. K.; Schibel, A. E. P.; Hibbs, A. D.; *J. Bionanosci*. **2014**, *4*, 78.
108. Deamer, D.; *Annu. Rev. Biophys*. **2010**, *39*, 79.
109. Maglia, G.; Heron, A. J.; Stoddart, D.; Japrung, D.; Bayley, H.; *Methods Enzymol.* **2010**, *475*, 591.
110. http://www.nanoporetech.com, acessada em Agosto 2014.
111. Mcginn, S.; Gut, I. G.; *New Biotechnol.* **2013**, *30*, 366.
112. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68699/1/WHO_SDE_WSH_04.06.pdf?ua=1, acessada em Abril 2014
113. Silva, J. J. J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2011.
114. Gehringer, M. M.; *FEBS Lett.* **2004**, *557*, 1.
115. Etchegaray, A.; Bueno, C. C.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1848.
116. Silva-Stenico, M. E.; Neto, R. C.; Alves, I. R.; Moraes, L. A. B.; Shishido, T. K.; Fiore, M. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 535.
117. Cassini, S. T. A.; Antunes, P. W. P.; Keller, R.; *Quim. Nova.* **2013**, *36*, 1208.

BIOSSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO VIA NANOPORO PROTEICO INDIVIDUAL NO DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS ANALÍTICAS

Juliana P. Aguiar, Janilson J. S. Júnior, Dijanah C. Machado, Maria C. A. Melo e Cláudio G. Rodrigues*
Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife – PE, Brasil

Estrutura dos nanoporos proteicos biológicos

Anthrax: Depois de se ligar aos receptores na membrana plasmática da célula alvo e sofrer uma ativação proteolítica, o componente antígeno protetor da toxina do antraz formar um pré-poro heptamérico como na Figura 1S. O pré-poro sofre uma conversão dependente do pH que permite a translocação dos fatores de edema e letal para o citosol.[1]

Aerolisina: O poro da aerolisina tem um formato de cogumelo com um domínio extramembranar que varia entre 10-17 Å.[2] O comprimento dos poros da aerolisina e da alfatoxina é aparentemente o mesmo, mas o diâmetro é menor na aerolisina do que na alfatoxina, muito provavelmente pela ausência do domínio vestibular no poro formado pela aerolisina, resultando em um modelo semelhante a um rebite,[3] como indicado na Figura 2S.

Limitações e estratégias de melhorias do nanoporo proteico da alfatoxina

Os nanoporos da alfatoxina podem ser modificados utilizando a técnica de mutagênese, na qual é introduzido, geneticamente, algum dos vinte aminoácidos naturais no poro proteico gerando uma variedade de cadeias laterais de diferentes tamanhos, formas, polaridade e reatividade química. Também pode ser realizadas mutagêneses introduzindo aminoácidos com configuração D não usualmente encontrados nos mamíferos superiores como na Figura 3S.[5]

Outra forma de melhorar a detecção do nanoporo é a utilização de adaptadores moleculares como a β-ciclodextrina como visto na Figura 3S, que apesar de ser muito utilizada, não apresenta seletividade específica para moléculas pequenas por isso, para sua melhor utilização é necessário também à mutação do nanoporo proteico, o que torna essa interação (ciclodextrina--nanoporo) ~10^4 vezes mais forte que com o nanoporo na sua forma selvagem.[6,7]

No trabalho de Zhao e colaboradores foi investigado a translocação de peptídeos aromáticos através do nanoporo proteíco formado pela alfatoxina, como mostrado na Figura 4S. O nanoporo sofreu modificações aromáticas em suas paredes internas com o objetivo de aumentar a afinidade de ligação dos peptídeos com o nanoporo, aumentando assim a sensibilidade do nanoporo. Demonstrou-se a detecção de vários peptídeos incluindo aqueles que diferiam em apenas um aminoácido, além de oferecer uma técnica potencial para o sequenciamento de proteínas.[8]

Aplicações do nanoporo da alfatoxina

Monitoramento de microcistinas na água

Os métodos atualmente disponíveis para detecção e caracterização de cianotoxinas na água, como cromatografia líquida de alta performance, ressonância magnética nuclear e a espectroscopia de massa, são muito trabalhosos para implementação do monitoramento

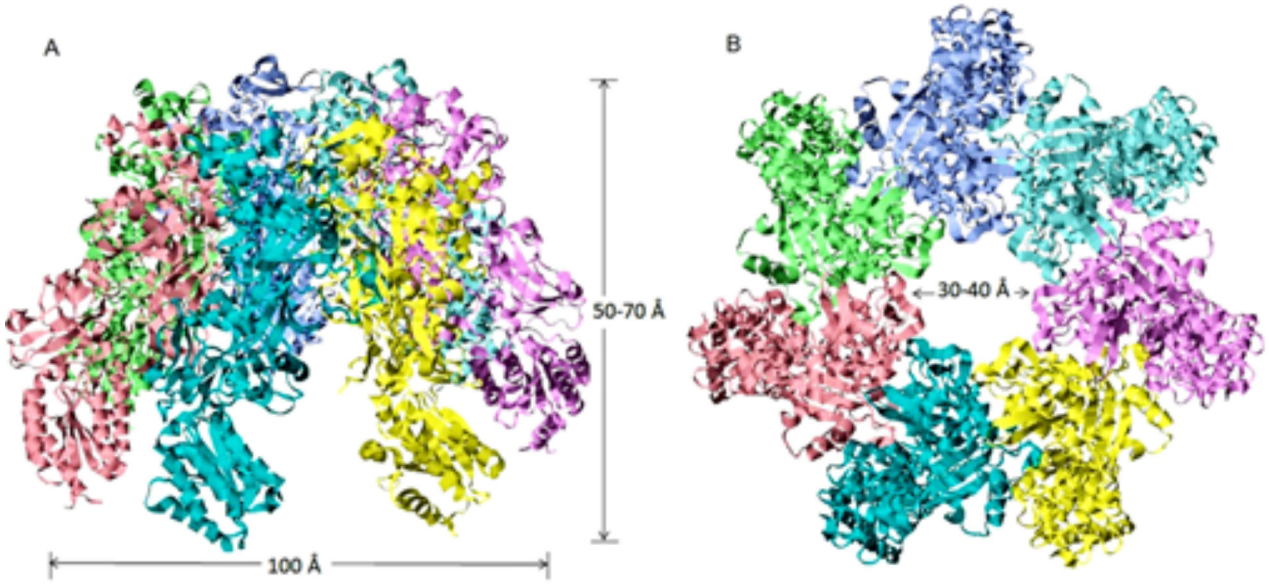


Figura 1S. *Estrutura do nanoporo Antrax. O nanoporo formado pela toxina do Bacillus anthracis é formado por sete subunidades. Uma visão lateral é apresentada em A e uma visão do topo do nanoporo é mostrada em B. Retirado do Protein Data Bank (pdb), código 1TZN*

*e-mail: cgabrielcg@pq.cnpq.br

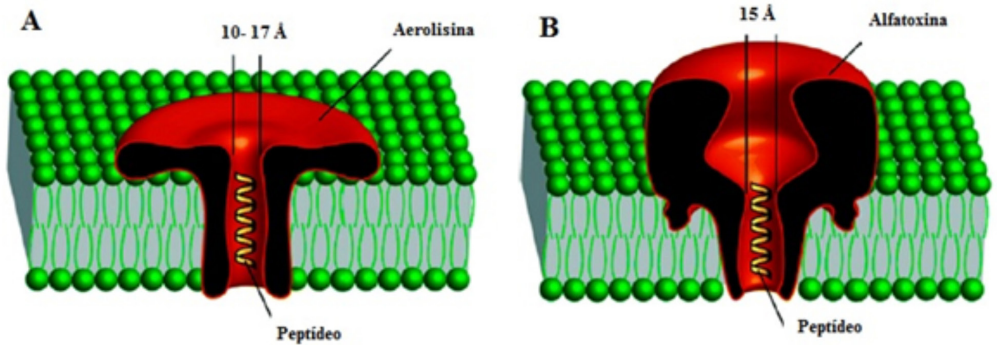


Figura 2S. *Representação esquemática do nanoporo da aerolisina (A) e da alfatoxina (B) incorporados em bicamadas lipídicas planas. Ambos os nanoporos apresentam diâmetro que permite a translocação de peptídeos. Adaptado da Ref. 4*

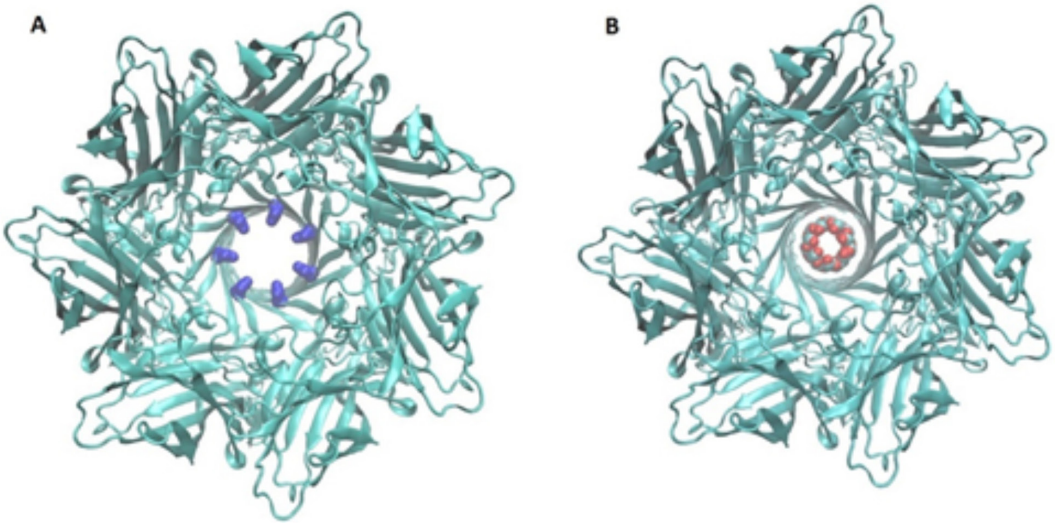


Figura 3S. *Exemplos de nanoporos da alfatoxina adaptados: (A) poro geneticamente modificado. Os resíduos dos aminoácidos são inseridos próximo à região mais estreita do poro (resíduos em azul); (B) poro contendo uma β-ciclodextrina como adaptador molecular próximo à região de constrição*

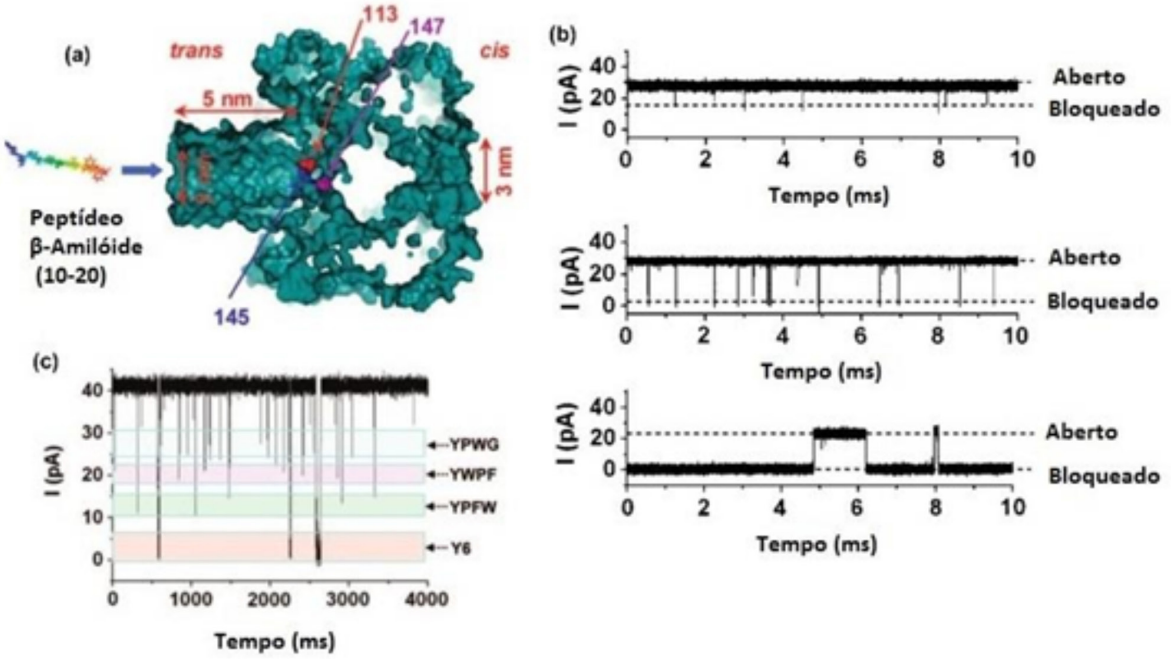


Figura 4S. ***(a)*** *Representação molecular do nanoporo proteico da alfatoxina. As três posições de mutação (113, 145 e 147), utilizadas para detecção de peptídeos estão indicadas em vermelho, azul e roxo, respectivamente. Os nanoporos modificados receberam a denominação de (WT)7, (M113F)7, (2FN)7 de acordo com a localização da mutação* ***(b)*** *Registros típicos, bem como a corrente residual da interação do peptídeo Y6 com os três nanoporos (WT)7, (M113F)7, (2FN). E em* ***(c)*** *o perfil de bloqueios na corrente iônica através do nanoporo na presença simultânea de quatro peptídeos: Y6, YPFW, YWPF, e YPWG. Adaptado da Ref. 8*

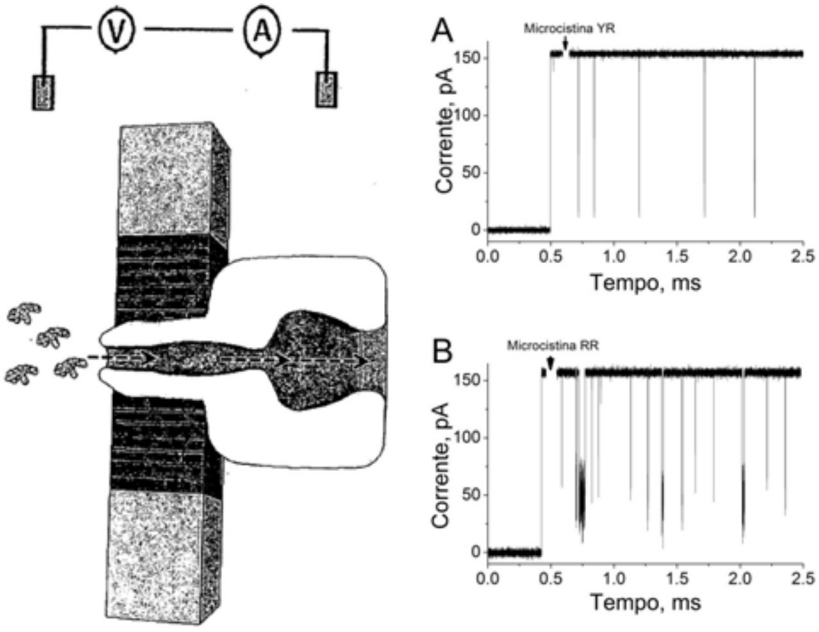


Figura 5S. *Representação esquemática do nanoporo da alfatoxina incorporada em um suporte resistivo à esquerda. Representação dos registros de bloqueios na corrente iônica características da detecção de dois tipos de microcistinas (A) microcistina YR em (B) microcistina RR. Adaptado da Ref. 9*

em tempo real de microcistinas. Na tentativa de melhorar a identificação dessas cianotoxinas, o método baseado no nanoporo proteico foi desenvolvido para detecção, quantificação e caracterização de microcistinas em meios aquosos como visto na Figura 5S. Ele é dotado de elevada sensibilidade, permitindo um monitoramento dessas moléculas em tempo real.[9,10]

REFERÊNCIAS

1. Lacy, D. B.; Wigelsworth, D. J.; Melnyk, R. A.; Harrison, S. C.; Collier, R. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13147.
2. Parker, M. W.; Feil, S. C.; *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, *88*, 91.
3. Renner, S.; Bessonov, A.; Simmel, F. C.; *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *98*, 83701.
4. Nestorovich, E. M.; Bezrukov, S. M.; *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6388.
5. Mohammad, M. M.; Movileanu, L.; *Methods Mol. Biol.* **2012**, *870*, 21.
6. Banerjee, A.; Mikhailovaa, E.;Cheley, S.; Gub, L. Q.; Montoyac, M.;Nagaokaa, Y.; Gouauxd, E.; Bayley, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 8165.
7. Kawano, R.; OsakI, T.; Sesaki, H.; Takinoue, M.; Yoshizawa, S.; Takeuchi, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8474.
8. Zhao, Q.; Jayawardhana, D. A.; Wang, D.; Guan, X. J.; *Phys. Chem.* **2009**, *113*, 3572.
9. Rodrigues, C. G.; Chevtchenko, S. F.; Krasilnikov, O. L.; Machado, D. C.; Aguiar, J. A.; Silva, J. J.; *BR pat* 000322 2012 (WO 2013/026123 A1).
10. Silva, J. J. J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2011.

6. CONCLUSÕES

O nanoporo formado pela alfatoxina detecta o ssDNA poli-A (50b);

Os íons de fluoreto aumentam o tempo de permanência do ssDNA no lume aquoso do nanoporo formado pela alfatoxina;

Os íons de fluoreto diminuem o tempo interbloqueio do ssDNA no nanoporo formado pela alfatoxina;

Os parâmetros biofísicos de tempo de permanência e tempo de chegada do ssDNA poli-A (50b) são influenciados pela composição iônica da solução banhante do nanoporo.

7. PERSPECTIVAS

Estudar a influência dos sais de Hofmeister e de líquidos iônicos na interação do ssDNA e também de outros polímeros como polivinilálcool (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), Poliestireno (PS) com o nanoporo protéico unitário da alfatoxina visando descobrir as condições físico-químicas mais adequadas para caracterização de analitos poliméricos. Adicionalmente realizar simulações de docking molecular dos polímeros (DNA ,PVA, PVP, PS) com a região de constrição do nanoporo da alfatoxina.

8. REFERÊNCIAS

ABONNENC, M., LIANG QIAO, BAOHONG LIU, AND HUBERT H. GIRAULT. Electrochemical Aspects of Electrospray and Laser Desorption/Ionization for Mass Spectrometry. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 231-254, 2010.

AKSIMENTIEV, A. Deciphering Ionic Current Signatures of DNA Transport Through a Nanopore. **Nanoscale**, v.2, nº, 4, p. 468–483, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON. A.; LEWIS,J.;RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia Molecular da Célula. Parte II, Capítulo 4. DNA, Cromossomos e Genomas, 5º edição, editora 2013,p.197-201.

AYUB,M.;HARDWICK,S.W.;LUISI,B.F.;BAYLEY,H. Nanopore-Based Identifi- cation of Individual Nucleotides for Direct RNA Sequencing. Nano Letters, v.13,p.6144−6150, 2013.

BARTH, H.; AKTORIES, K.; POPOFF, M. R.; STILES, B. G. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 373-402, 2004.

BANERJEE, A.; MIKHAILOVAA, E.;CHELEY, S.; GUB, L. Q.; MONTOYAC, M.;NAGAOKAA, Y.; GOUAUXD, E.; BAYLEY, H. Molecular Bases of Cyclodextrin Adapter Interactions With Engineered Protein Nanoporos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8165–8170, 2010.

BARRETT,K.E.; BARMAN, S.M.; BOITANO, S.; BROOKS, H. L A.T.Fisiologia Médica de Ganong .Seção I. Bases Moleculares da Fisiologia Médica .Capítulo 1. Príncipios Gerais e Produção de Energia na Fisiologia Médica, 24ªedição, editora Lange, 2013, p. 14.

BAYLEY, H. & CREMER, P.S. Stochastic Sensors Inspired by Biology. **Nature**, v. 413, p. 226-230, 2001.

BAYLEY, H. JAYASINGHE, L. Functional engineered channels and pores. **Molecular Membrane Biology**, v. 21, n. 4, p. 209-220, 2004. BAYLEY, H. Sequencing Single Molecules of DNA. **Current. Opinion. Chemical Biology**, v. 10, p. 628-637, 2006.

BEHRENDS, J.C. Evolution of the Ion Channel Concept: The Historical Perspective. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 6218−6226, 2012.

BERNHEIMER, A.W.; AVIGAG,L.S. Partial Characterization of Aerolysin, a Lytic Exotoxin from Aeromonas hydrophila. **Infection and Immunity,** v. 9, nº6, p.1016-1021, 1974.

BERUBE,B.J.; WARDENBURG, J.B. Staphylococcus Aureus α-Toxin: Nearly a Century of Intrigue. **Toxins** ,v. 5,p. 1140-1166, 2013.

BEZANILLA, F. The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. **Physiological Reviews,** v. 80, nº 2, p. 555-592, 2000.

BEZRUKOV SM, KRASILNIKOV OV, YULDASHEVA N, BEREZHKOVSKII AM, RODRIGUES CG. Field-Dependent Effect of Crown Ether (18-Crown-6) on Ionic Conductance of α-Hemolysin Channels. **Biophysical Journal**, v. 8, p. 3162–3171,2004.

BORGES-OSÓRIO, M.R; ROBINSON, W.M. Genética Humana.Capítulo 1. As Bases Moleculares Da Hereditariedade, 3ªedição, editora Artmed, 2013, p. 9-12.

BOSTROM,M.;Williams,D.R.M.;Ninham,B.W. Influence of Ionic Dispersion Potentials on Counterion Condensation On Polyelectrolytes, **The Journal of Physical Chemistry**, v..106, p.7908, 2002.

BRANTON, D., D. W. DEAMER, A. MARZIALI, H. BAYLEY, S. A. BENNER, T.BUTLER, M. DI VENTRA, S. GARAJ, A. HIBBS, X. H. HUANG, S. B.JOVANOVICH, P. S. KRSTIC, S. LINDSAY, X. S. S. LING, C. H.MASTRANGELO, A. MELLER, J. S. OLIVER, Y. V. PERSHIN, J. M. RAMSEY, R.RIEHN, G. V. SONI, V. TABARD-COSSA, M. WANUNU, M. WIGGIN, J. A.SCHLOSS. The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, p.1146-1153, 2008.

BRAÜTIGAM, A.;GOWIK, What Can Next Generation Sequencing do for you? Next Generation Sequencing as a Valuable Tool in Plant Research. **Plant Biology**, v. 12, nº 6, p. 831-41, 2010.

COLLINS, K.D. Sticky Ions in Biological Systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p. 5553-5557, 1995.

COLLINS, K.D. Ions from the Hofmeister Series and Osmolytes: Effects on Proteins in Solution and in the Crystallization Process. **Methods**, v. 34, p. 300-311, 2004.

COLLINS, K.D. Ion Hydration: Implications for Cellular Function, Polyelectrolytes, and Protein Crystallization. **Biophysical Chemistry**, v. 119, p. 271-281, 2006.

CORNELL, B.A., BRAACH-MAKSVYTIS, V.L.B., KING, L.G., OSMAN, P.D.J.,RAGUSE, B., WIECZOREK, L., PACE, R.J. A Biosensor that Uses Ion-Channel Switches. **Nature Nanotechnology,** v.387, p. 580, 1997.

COULTER, W.H. 1953. U.S.Patent No.2,656,508; Issued 20 Oct.1953.

CLARKE et al., 2009 CLARKE, J.; WU, H.C..; JAYASINGHE, L.; PATEL, A.; REID, S.; BAYLEY, H. Continuous Base Identification for Single-Molecule Nanopore DNA Sequencing. **Nature Nanotechnology**, v.4, p. 265-270, 2009.

CRACKNELL ,J.A; JAPRUNG, D, BAYLEY H. Translocating Kilobase RNA Through the Staphylococcal α-Hemolysin Nanopore. **Nano Letters**, v. 13,n. 6, p. 2500,2013.

DEAMER, D. Nanopore Analysis of Nucleic Acids Bound to Exonucleases and Polymerases. **Annual Review of Biophysics**, v. 39, p. 79-90, 2010.

DING, K. J.; ZHANG , H.Y.; HU, H.G.; ZHAO, H.M.; GUAN, W. J.; MA, Y. H. Progress of Research on Nanopore-macromolecule Detection. **Chinese Journal Of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 20, pág 280–285, 2010.

DUTERTRE,S.;LEWIS,R.J. **The Journal of Biological Chemistry**,v.285,p. 13315, 2010.

Disponível em:http://www.euro.who.into/data/assents/pdf_file/0016/160018/WHO GuidanceFVLR.pdf?ua=1.Acesso em 25/04/2014.

Disponível em: http://www.genome.gov/sequencingcosts/).Acesso em 01/03/2014.

Disponível em: http://allseq.com/knowledgebank/sequencing-platforms/life technologies-ion-torrent. Acesso em:20/ 04/2014.

DRMANAC,R.;SPARKS,A.B.;CALLOW,M.J.;HALPERN,A.L.;BURNS,N.L.;KERMA NI,B.G.;CARNEVALI,P.;NAZARENKO,I.;NILSEN,G.B.; YEUNG,G.;DAHL,F.;FERNANDEZ,A.;STAKER,B.; PANT,K.P.; BACCASH,J.1 REID,C.A.Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays. **Science**, v. 78, p.327, 2010.

ELBERLING.B.; SØNDERGAARD, J.; JENSEN, LA.; SCHMIDT, LB.; HANSEN, BU.; ASMUND, G.; ZUNIĆ, TB.; HOLLESEN, J.; HANSON, S.; JANSSON, PE.; FRIBORG, T. Arctic Vegetation Damage by Winter-Generated Coal Mining Pollution Released Upon Thawing. **Environmental Science & Technology**, v. 41, nº7, p.:2407-13, 2007.

ERVIN, E.N.; BARRALL, G. A., PAL, P.; BEAN, M.K.; SCHIBEL, A.E.P.; HIBBS, A.D. Creating a Single Sensing Zone Within an Alpha-Hemolysin Pore via Site- directed Mutagenesis. **Journal of Bionanoscience**, v.4, p. 78-84, 2014.

FELD, G. K.; THOREN, K. L.; KINTZER, A. F.; STERLING, H. J.; TANG, I. I.; GREENBERG, S. G.; WILLIAMS, E. R.; KRANTZ, B. A. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.17, p. 1383, 2010.

FENNELL, C.J.; BIZJAK, A.; VLACHY, V.; DILL, K.A. Ion Pairing in Molecular Simulations of Aqueous Alkali Halide Solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 6782-6791, 2009.

FOLOGEA,D.; UPLINGER, J.; THOMAS, B., MCNABB, D.S.; LI, J. Slowing DNA Translocation in a Solid-State Nanopore. NANO LETTERS, v. 5, nº.9, p. 1734-1737, 2005.

FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, R. C.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. **Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. ISSN 1677-1915, Fortaleza, 2008.

GARCIA-MARTINEZ, G.; BUSTABAD, E.A.; PERROT, H.GABRIELLE, C. BUCUR, B.; LAZERGES, M.; ROSE, D.; RODRIGUEZ-PARDO, L.; FARINÃ, J.; COMPERE, C.;VIVES. A. A. Development of a Mass Sensitive Quartz Crystal Microbalance (QCM)-Based DNA Biosensor Using a 50 MHz Electronic Oscillator Circuit.**Sensors** , v. 11,p. 7656-7664, 2011.

GRAY, G.S. & KEHOE, M. Primary Sequence Of The Alpha-Toxin Gene From Staphylococcus Aureus Wood 46. **Infection and Immunit**, v. 46, pág. 615-618, 1984.

GU, L.Q., BRAHA, O., CONLAN, S., CHELEY, S., BAYLEY, H. Stochastic Sensing of Organic Analytes by a Pore-Forming Protein Containing a Molecular Adapter. **Nature**, v. 398, p. 686-690, 1999.

GU, L.Q. & SHIM, J.W. Single Molecule Sensing by Nanopores and Nanopore Devices. **Analyst**, v. 135, p. 441-451, 2010

GURNEV, P.A.; HARRIES, D.; PARSEGIAN, V.A.; BEZRUKOV, S.M. The Dinamic Side of the Hofmeister Effect: A Single-Molecule Nanopore Study of Specific Complex Formation. **Chemical Physics and Chemistry.,** v. 10, p. 1445-1449, 2009.

GRIGORJEV, P.A.;BEZRUKOV, S.M.Hofmeister Effect in Ion Transport: Reversible Binding of Halide Anions to the Roflamycoin Channel. **Biophysical Journal** , v. 67, nº 6, p. 155-168, 2002.

HAMMADI1.A Electrical Conductance, Density, and Viscosity in Mixtures of Alkali-Metal Halides and Glycerol. **International Journal of Thermophysics**, v.25, nº 1, p. 89-111,2004.

HARRELL, C.C. Designing Abiotic Single Nanotube Membranes for Bioanalytical Biomedical Applications. Thesis (Ph.D).University of Florida, 2004.

HILLE, B. Ion Channels of Excitable Membranes, Sinauer 3rd ed., Sunderland, MA,2001.

HOFMEISTER F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. **Arch Exp. Pathol Pharmakol**, v. 24, p. 247-260, 1888.

HOWARD,S.P.;BUCKLEY,T. Activation of the Hole-Forming Toxin Aerolysin by Extracellular Processing. **Journal of Bacteriology,** v.163 ,nº1, p. 336-340, 1985.

HOWARD,S.P.;GARLAND,W.J.;GREEN,M.J.;BUCKLEY,J.T.Nucleotide Sequen-ce of the Gene for the Hole-Forming Toxin Aerolysin of Aeromonas hydrophila. **Journal of Bacteriology**, v.169, nº 6, p. 2869-2871,1987.

HOWORKA, S. & SIWY, Z.; Nanopore Analytics: Sensing of Single Molecules. **Journal of the American Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 2360-2384, 2009.

INPI, 2010. PARREIRA, D.B.;LEITÃO, T.G. Nanobiossensores. Disponível em: marcasepatentes.pt/files/collections/pt_PT/1/300/303/Nanobiossensores.pdf).Acesso em: 21/04/2014.

KANG, X.F.; CHELEY, S.; GUAN, X.; BAYLEY, H. Stochastic Detection of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, p.10684-10685, 2006.

KANG, X.F.; CHELEY, S.; RICE-FICHT, A.C.; BAYLEY, H. A Storable Encapsulated Bilayer Chip Containing a Single Protein Nanopore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 4701-4705, 2007.

KANG, I.; WANG, Y.; REAGAN, C.; FU, Y.; WANG, M. X.;GU, L.Q.Designing DNA Interstrand Lock for Locus-Specific Methylation Detection in a Nanoporo. **Scientific Reports**, v.3, p. 1-6, 2013.

KASIANOWICZ, J.J.; BRANDIN, E.; BRANTON, D.; DEAMER, D.W. Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13770-13773, 1996.

KASIANOWICZ JJ, HENRICKSON JE, WEETALL HH, ROBERTSON B. Simultaneous Multianalyte Detection With a Nanometer-Scale Pore. **Analytica Chimica**, v.73, p 2268-2272, 2001.

KASIANOWICZ, J.J.; HENRICKSON, S.E.; MISAKIAN, M.; LERMAN, J.C.;PANCHAL, R.G.; HALVERSON, K.M.; BAVARI, S.M.; GUSSIO, R.; NGUYEN, T.;SHENOY, D.K.; STANFORD, V.M. The Detection and Characterization of Ions, DNA and Proteins Using Nanometer-Scale Pores. In Handbook of Biosensors and Biochips.R.S. Marks, D.C. Cullen, I. Karube, C.R. Lowe, and H.H. Weetall, editors. John Wiley& Sons. p. 1-20, 2007.

KASIANOWICZ, J.J.; ROBERTSON, J.W.F.; CHAN, E.R.; REINER, J.E.; STANFORD, V.M. Nanoscopic Porous Sensors. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, p. 737-766, 2008.

KASIANOWICZ,J.J.; Introduction to Ion Channels and Disease. **Chemical Reviews**, v.112,p. 6215−6217, 2012.

KAWANO, R.; SCHIBEL, A.E.P.; CAULEY, C.;WHITE, H.S. Controlling the Translocation of Single-Stranded DNA through α-Hemolysin Ion Channels Using Viscosity. **Langmuir**, v. 25, n. 2, p. 1233-1237,2009.

KAWANO, R.; OSAKI, T.; SESAKI, H.; TAKINOUE, M.; YOSHIZAWA, S.; TAKEUCHI, S. Rapid Detection of a Cocaine-Binding Aptamer Using Biological Nanopores on a Chip. **American Chemical Society**, v. 133, p. 8474–8477, 2011.

KRASILNIKOV OV, TERNOVSKII ,V.I; TASHMUKHAMEDOV, B. A. Properties of Conductivity Channels Induced in Phospholipid Bilayer Membranes by Alphastaphylotoxin. **Biofizika** v. 26 n. 2 p. 271 -276, 1981.

KRASILNIKOV, O.V.; MERZLYAK, P.G.; SABIROV, R.Z.; TERNOVSKY, V.I.; ZARIPOVA, R.K. Influence of pH on the Potential-Dependence of Staphylococcal Toxin Channels Functioning in Phosphatydilcholine Bilayer. **Ukr. Biokhim. Zh**, v. 60, p. 60-66, 1988.

KRASILNIKOV, O. V., P. G. MERZLYAK, L. N. YULDASHEVA, C. G. RODRIGUES, AND R. A. NOGUEIRA. Heparin Influence on Alpha-Staphylotoxin Formed Channel. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes** v. 1417, p. 167-182. 1999.

KRASILNIKOV, O. V. KASIANOWICZ, M. S. Z. KELLERMAYER, AND D. W. DEAMER. Sizing Channels With Neutral Polymers in Structure and Dynamics of Confined Polymers. **Dordrecht.** 97-115, 2002

KRASILNIKOV, O.V., RODRIGUES, C.G., BEZRUKOV, S.M. Single Polymer Molecules in a Protein Nanopore in The Limit of a Strong Polymer-Pore Attraction. **Physical Review Letters**, v. 97:018301, 2006.

KING & GOLOVCHENKO**,** 2005 KING, G.M. & GOLOVCHENKO, J.A. Probing Nanotube-Nanopore Interactions. **Physical Reviews Letters.**, v. 95, p. 216103. 2005.

KIRIUKHIN, M.Y.; COLLINS, K.D. Dynamic Hydration Numbers for Biologically Important Ions. **Biophysical Chemistry**, v. 99, p.155-168, 2002.

KOWALCZYK, S. W.; BLOSSER, T. R.; DEKKER, C. Biomimetic Nanopores: Learning from and About Nature. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 607- 614, 2011.

KUMAR, H.; RANI, R. Development of Biosensors for The Detection of Biological Warfare Agents: Its Issues And Challenges. **Science Progress**, v.96, nº3, p.294 – 308, 2013.

KUNZ, W.; HENLE, J.; NINHAM, B.W. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 19-37, 2004.

KUNZ, W. Specific Ion Effects in Colloidal and Biological Systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, p. 34-39, 2010.

KUNZ, W. & NEUEDER, R. An Attempt of a General Overview. Em: SPECIFIC ION EFFECTS. Werner Kunz (University of Regensburg, Germany) (Org.).1 ed. Regensburg/Germany: World Scientific Publishing Co. 2010.

JAYAWARDHANA, D.A. Nanopore stochastic sensing with ionic liquid supporting electrolyte and ionic liquid based water quantitation Using gas chromatography. The University of Texas at Arlington,2010.

JENKINS, H.D.B.; MARCUS, Y. Viscosity B-Coefficients of Ions in Solution. **Chemical Reviews**, v. 95, p. 2695-2724, 1995

LEMAY, S.G. Nanopore-Based Biosensors: The Interface between Ionics and Electronics. **ACS Nano**, v. 3, p. 775-779, 2009.

LIU, A.; ZHAO, Q.; GUAN, X. Stochastic Nanopore Sensors for The Detection of Terrorist Agents: Current Status and Challenges. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, p. 106-115, 2010.

LIU,A.;ZHAO,Q.;KRISHANTHA, D.M.M.;GUAN, X.Unzipping of Double-stranded DNA in Engineered α-Hemolysin Pores. **Journal Physica Chemical Lettes** , v. 2, nº12, p. 1372–1376, 2012.

LO NOSTRO, P.; NINHAM, B.W.; MILANI, S.; LO NOSTRO, A.; PESAVENTO, G.; BAGLIONI, P. Hofmeister Effects in Supramolecular and Biological Systems. **Biophysical Chemistry**, v. 124, p. 208-213, 2006.

LO NOSTRO, P. & NINHAM, B.W. Hofmeister Phenomena: An Update on Ion Specificity in Biology. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2286-2322, 2012.

LÓPEZ-LEON, T.; JÓDAR-REYES, A.B.; VINUESA, O.; BASTOS-GONZÁLEZ. Hofmeister Effects on The Colloidal Stability of an Igg-Coated Polystyrene Látex. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 139-148, 2005.

MACHADO, D. C. Estudo da influência de substâncias cosmotrópicas e caotrópicas na interação de moléculas unitárias orgânicas com nanoporos individuais proteicos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

MACHADO, D.C. Estudo dos Efeitos Específicos dos Íons da Série De Hofmeister na Interação de Moléculas Unitárias com Nanoporos Individuais Protéicos.Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

MAGLIA,G.; HERON,A.J.; STODDART,D.; JAPRUNG,D.;BAYLEY,H. Analysis of Single Nucleic Acid Molecules With Protein Nanopores. **Methods in Enzymology**, v. 475, p. 591-623, 2010.

MAITRA, R.D.; KIM, J.; DUNBAR, W.B. Recent Advances in Nanopore Sequencing. **Electrophoresis**, v. 33, p. 3418-3428, 2012.

MARTIN, H.S.C. Molecular Dynamics imulations of Nucleotide Translocation through α-Hemolysin Nanopores. Thesis Phd, University College London, 2011.

MARCUS, Y. **Chemical. Reviews**, v.109,p. 1346, 2009.

MCGINN, S.; GUT, I.G. DNA Sequencing-Spanning The Generations. **New Biotechnology**, v.30, nº 4,p. 366-372, 2013.

MERZLYAK PG, YULDASHEVA LN, RODRIGUES CG, CARNEIRO CMM, KRASILNIKOV OV, BEZRUKOV SM. Polymeric Nonelectrolytes To Probe Pore Geometry: Application To The Alpha-Toxin Transmembrane Channel. **Biophysical Journal**, v. 77, p. 3023-3033, 1999.

MERZYLYAK, P.G.; CAPISTRANO, M.F.P.; VALEVA, A.; KASIANOWICZ, J.J; KRASILNIKOV, O. V.Conductance and Ion Selectivity of a Mesoscope Protein Nanopore Probed with Cysteine Scanning Mutagenesis. **Biphysical Journal,** v.89, p. 3059-3070, 2005.

MICHAEL L. METZKER, 2010. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**.v.11,p. 1-16, 2010

MOHAMMAD, M.M., & MOVILEANU,L. Protein Sensing with Engineered Protein Nanopores. **Methods in Molecular Biology**, v. 870, p. 21-37, 2012.

MONTAL, M. & MUELLER, P. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and A Study of Their Electrical Properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, p. 3561-3566. 1972.

MOREIRA, L. A.; BOSTR€OM, M.; NINHAM, B. W.; BISCAIA, E. C.; TAVARES, F. W. Colloids and Surfaces A,v. 282, nº283,p.457, 2006.

MOVILEANU, L. Interrogating Single Proteins Through Nanopores: Challenges and Opportunities. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 333-341, 2009.

MÜLLER, E.; FAUDE, A. Investigation of Salt Properties with Electro-Acoustic Measurements and Their Effect On Dynamic Binding Capacity in Hydrophobic Interaction Chromatography. **Journal of Chromatography A,** v. 1177, nº 2, p. 215-25, 2008.

MULERO, R.; PRABHU, A.S.; FREEDMAN, K.J.; KIM, M.J. Nanopore-Based Devices for Bioanalytical Applications. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v.15, p. 243-252, 2010.

MUTHUKUMAR, M. Mechanism of DNA Transport Through Pores. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 36,p.435-50,2007.

NA,AN.; FLEMING,A.M.; WHITE.H.S.; BURROWS, C.J. Crown Ether–Electrolyte Interactions Permit Nanopore Detection of Individual DNA Abasic Sites in Single Molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences** ,v. 109, nº. 29, p.11504–11509, 2012.

NESTOROVICH, E.M.;BEZRUKOV, S.M. Obstructing Toxin Pathways by Targeted Pore Blockage.**Chemical Reviews,** v. 112,p. 6388−6430, 2012.

NINHAM, B. W., YAMINSKY, V. Ion Binding and Ion-Specificity: The Hofmeister Effect and Onsager and Lifshitz Theories. **Langmuir**, v. 13, p. 2097– 2108, 1997.

NISHIMURA, J.S.; NARAYANASAMI, R.; MILLER, R.T.; ROMAN, L.J.; PANDA, S.; MASTERS, B.S.S. The Stimulatory Effects of Hofmeister Ions on the Activities of Neuronal Nitric-oxide Synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p.5399-5406, 1999.

NOSKOV, S.Y.; IM, W.; ROUX, B. Ion Permeation Through the α-Hemolysin Channel: Theoretical Studies Based on Brownian Dynamics and Poisson-Nernst-Plank Electrodiffusion Theory. **Biophysical Journal**, v. 87, pág. 2299-2309, 2004.

OUKHALED, A.; BACRI, L.; PASTORIZA-GALLEGO, M.; BETTON, J.M.; PELTA, J. Sensing Proteins Through Nanopores: Fundamental to Applications. **ACS Chemical Biology**, v. 7, p. 1935-1949, 2012.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-Forming Protein Toxins: From Structure To Function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.88, nº1,p. 91-142, 2005.

PASTORIZA-GALLEGO,RA M.;BAH, L.;GIBRAT, G.; THIEBOT, B.; GISOU,F.; AUVRAY, L.; BETTON, J.M.;PELTA, J.Dynamics of Unfolded Protein Transport through an Aerolysin Pore. **Journal of the American Chemical Society**, v.133, p.2923–2931, 2011.

PATENT WO2013026123 A1.Nanopore Use of a Protein Detection, Identification, Monitoring And Measurement in Real Time Microcystin in Aqueous Systems, 2013.

PARSONS , D.F. BOSTROM, ,. LO NOSTRO, P.; NINHAM, B.W. Hofmeister Effects: Interplay of Hydration, Nonelectrostatic Potentials, And Ion Size. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n] 27, p. 12352-67, 2011.

PEGRAM, L.M. & RECORD, JR. M.T. Hofmeister Salt Effects on Surface Tension Arise From Partitioning of Anions and Cations Between Bulk Water and The Air-Water Interface. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.111, p. 5411-5417, 2007.

REINER, J.E.; KASIANOWICZ,J.J NABLO, B.J.; ROBERTSON, J.W.F.Theory For Polymer Analysis Using Nanopore-Based Single-Molecule Mass Spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, nº 27, p. 12080-12085, 2011.

REINER,J.E; BALIJEPALLI, A; ROBERTSON, J.W; DROWN, B.S; BURDEN, D.L; KASIANOWICZ JJ. The Effects of Diffusion on an Exonuclease/Nanopore-Based DNA Sequencing Engine. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 137, n.21. p.214903, 2012.

RHEE, M. & BURNS, M.A. Nanopore Sequencing Technology: Nanopore Preparations. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 174-181, 2007.

RENNER, S.; BESSONOV, A.; SIMMEL. F. Voltage-Controlled Insertion of Single-Hemolysin and Mycobacterium Smegmatis Nanopores Into Lipid Bilayer Membranes. **Applied Physics Letters**, v.98, p. 1-3,2011.

RINCON-RESTREPO, M., E. MILTHALLOVA, H. BAYLEY, AND G. MAGLIA. Controlled Translocation of Individual DNA Molecules through Protein Nanopores with Engineered Molecular Brakes. **Nano Letters**, v. 11, p. 746-750. 2011.

ROBERTSON, J.W.; RODRIGUES, C.G.; STANFORD, V.M.; RUBINSON, K.A.; KRASILNIKOV, O.V.; KASIANOWICZ, J.J. Single-Molecule Mass Spectrometry in Solution Using a Solitary Nanopore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 20, p. 8207-8211, 2007.

ROBERTSON,J.W.F.;KASIANOWICZ,J.J.;BANERJEE, S. Analytical Approaches for Studying Transporters, Channels and Porins. **Chemical Reviews**, v.112,p. 6227−6249, 2012.

RODRIGUES,C.G.,MACHADO,D.C.,CHEVTCHENKO,S.F.,KRASILNIKOV,O.V. Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors. **Biophysical Journal**, v.95, p. 5186-5192, 2008.

RODRIGUES, C.G.; MACHADO, D.C.; DA SILVA, A.M.B.; SILVA JÚNIOR, J.J.; KRASILNIKOV, O.V. Hofmeister Effect In Confined Spaces: Halogen Ions and Single Molecule Detection. **Biophysical Journal**, v. 100, p. 2929-2935, 2011.

ROTEM, D.; JAYASINGHE, L.; SALICHOU, M.; BAYLEY, H. Protein Detection by Nanopores Equipped with Aptamers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 2781-2787, 2012.

RUSTAGI, S.;KUMAR, P. Biosensor and It's Application in Food Industry. **Advances in Bioresearch** , v. 4, nº2,p. 168- 170, 2013.

SABIROV, R. Z., O. V. KRASILNIKOV, V. I. TERNOVSKY, AND P. G. MERZLIAK. Relation Between Ionic Channel Conductance and Conductivity of Media Containing Different Nonelectrolytes. A Novel Method of Pore Size Determination. **General Physiology and Biophysics**, v. 12, p. 95-111. 1993.

SACKMANN, E. Supported Membranes: Scientific and Practical Applications. **Science**, v. 271, n. 5245, p. 43-48, 1996.

SCHWIERZ,N.;HORINEK,D.; NETZ,R.R.Anionic and Cationic Hofmeister Effects on Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces. **Langmuir,** v.29,p. 2602−2614,, 2010.

SHENG, J. W., M. HE, AND H. C. SHI. A Highly Specific Immunoassay for Microcystin-LR Detection Based On a Monoclonal Antibody. **Analytica Chimica Acta**, v. 603,p.111-118, 2007.

SILVA, J.J.J. Nanoporos como Ferramentas Bionanotecnológicas. Dissertação de Mestrado.Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

SONG, L.; HOBAUGH, M.R.; SHUSTAK, C.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; GOUAUX, J.E. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, p. 1859-1866, 1996.

SU, L.; JIA, W.;HOU, C.; LEI.Y. Microbial biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics** , v.26, p.1788–1799,2011.

STANFORD, V.M.; KASIANOWICZ, J.J.; ROBERTSON, J.W.F.; RODRIGUES, C.G.; KRASILNIKOV, O.V. Single Molecule Mass or Size Spectrometry in Solution Using A Solitary Nanopore. US 2010/0122907 A1, 20 maio 2010. 20p.

STODDART, D.; HERON, A.J.; KLINGELHOEFER, J.; MIKHAILOVA, E.; MAGLIA, G.; BAYLEY, H. Nucleobase Recognition in ssDNA at the Central Constriction of the Alpha-Hemolysin Pore. **Nano Letters**, v. 10, p. 3633-3637, 2010.

TADEO, X.; LÓPEZ-MÉNDEZ, B.; CASTAÑO, D.; TRIGUEROS, T.; MILLET, O. Protein Stabilization and the Hofmeister Effect: The Role of Hydrophobic Solvation. **Biophysical Journal**, v. 97, p. 2595-2603, 2009.

TURNER, R.F.B.; KILBURN, D.G.; PHELPS, M. R.; **Biosensor and interface membrane**. US Patent 5,624,537, 1997.

VLACHY, N.; JAGODA-CWIKLIK, B.; VÁCHA, R.; TOURAND, D.; JUNGWIRTH, P.; KUNZ, W. Hofmeister Series and Specific Interactions of Charged Headgroups with Aqueous Ions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 146, p. 42-47, 2009.

VARUZZA, L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração Versão 2.0.1.Disponível em:http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.01.pdf.

VOET, D.; VOET, J.G. Biochemistry. 3rd ed. Wiley, United States of America. 2004. 1591p.

WALKER, B.; KASIANOWICZ. J.; BAYLEY, H. A Pore-Forming Protein with a Metal-Actuated Switch. **Protein engineering design & select**, v.7. n.5, p. 655-62, 1994.

WANG, J. & SATOH, M. Novel PVA-Based Polymers Showing an Anti-Hofmeister Series Property. **Polymer**, v. 50, p. 3680-3685, 2009.

WANG. H. Y; YING, Y. L.; LI, Y.; LONG,Y.T. Peering Into Biological Nanopore: a Practical Technology to Single-Molecule Analysis. **Asian Journal of Chemistry,** v. 3, n.5, p.1952-61, 2010.

WANG,G.; WANG, L.;,HAN. Y.;ZHOU, S.; GUAN, X. Nanopore Stochastic Detection: Diversity, Sensitivity, and Beyond. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n.12, p. 2867–2877, 2013.

WOLNA, A.H.; FLEMING, A.M.; AN.N; He, L; WHITE, H.S, BURROWS, C.J. Electrical Current Signatures of DNA Base Modifications in Single Molecules Immobilized in the α-Hemolysin Ion Channel. **Israel Journal of Chemistry,** v. 53, p.417-430, 2013.

YANG, Z. Hofmeister Effects: An Explanation for The Impact of Ionic Liquids on Biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 12–22, 2009.

XIE, W.J. & GAO, Y.Q. A simple theory for the Hofmeister series. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 24, p. 4247-4252, 2013.

XIE, W.J.; LIU, C.W.; YANG, L.J.; GAO, Y.Q. On The Molecular Mechanism of Ion Specific Hofmeister Series. **Science China Chemistry**, v. 57, p.36-47, 2014.

ZORTÉA, M.E.B.; DEMIATE, I.M.; PRAXEDES, M.A.; WOSIACKI, G. Avaliação da Viscosidade Aparente de Pastas de Amidos nos Viscosímetros Brookfield RVDV-II+ PRO e Rápido Visco Analisador RVA-4. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 5, p.326-335, 2011.

ZHANG, Y. & CREMER, P.S. Interactions Between Macromolecules and Ions: The Hofmeister Series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p. 658-663, 2006.

ZHANG, Y.; CREMER,P.S. The Inverse and Direct Hofmeister Series for Lysozyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106,nº. 36,p.15249–15253, 2009.

ZHAO, Q., WANG, D., JAYAWARDHANA, D.A., GUAN, X. Stochastic Sensing of Biomolecules in a Nanopore Sensor Array. **Nanotechnology**, v. 19, pág.1-8, 2008.

ZHAO, Q.; JAYAWARDHANA, D.A.; WANG, D.; GUAN, X. Study of Peptide Transport through Engineered Protein Channels. **Journal of Physical Chemistry**, v. 113, p. 3572–3578, 2009.

9. ANEXOS

Anexo A: Depósito de patente sobre a utilização do nanoporo proteico na detecção, identificação e quantificação em tempo real de microcistinas em meio aquoso.

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional
28 de Fevereiro de 2013 (28.02.2013) WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2013/026123 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes :
G01N 27/26 (2006.01) *G01N 33/18* (2006.01)
G01N 27/404 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2012/000322

(22) Data do Depósito Internacional :
29 de Agosto de 2012 (29.08.2012)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
MU9102088-3
25 de Agosto de 2011 (25.08.2011) BR

(71) Requerente *(para todos os Estados designados, exceto US)* : **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE** [BR/BR]; Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP-50670-901 Recife, PE (BR).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes *(para US únicamente)* : **RODRIGUES, Cláudio Gabriel** [BR/BR]; Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP-50670-901 Recife, PE (BR). **CHEVTCHENKO, Sergio Fernandovith** [BR/BR]; Av. Professor Artuir de As, 1168-B, Cidade Universitária, CEP-50740-520 Recife, PE (BR). **KRASILNIKOV, Oleg Vladimirovich** [BR/BR]; Av. Boa Viagem, 3440 - Apto. 1201, CEP-51020-001 Boa Viagem, PE (BR). **MACHADO, Dijanah Cota** [BR/BR]; Rua Estevão de Sá, 390 -Bloco 02 - Apto. 203, Várzea, CEP-50740-270 Recife, PE (BR). **PEREIRA DE AGUIAR, Juliana** [BR/BR]; Rua Rio Novo, 420, Vasco da Gama, CEP-52081-220 Recife, PE (BR). **SILVA JUNIOR, Janilson José da** [BR/BR]; Rua da Hora, 140, Varadouro, CEP-53020-110 Olinda, PE (BR).

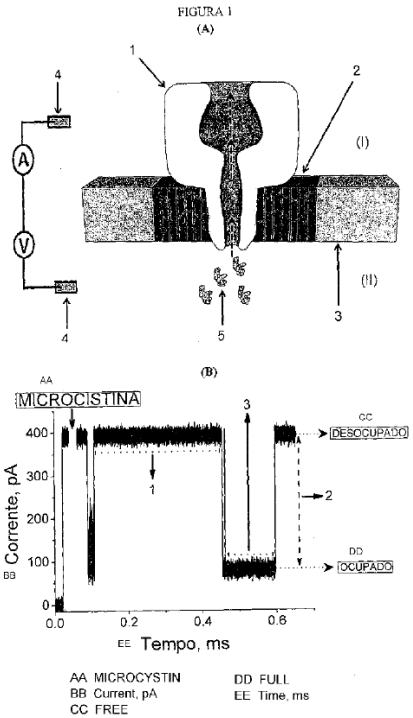
(81) Estados Designados *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : USE OF A PROTEIN NANOPORE FOR THE DETECTION, IDENTIFICATION, QUANTIFICATION AND REAL-TIME MONITORING OF MICROCYSTINS IN AQUEOUS SYSTEMS

(54) Título : UTILIZAÇÃO DE UM NANOPORO PROTEICO PARA DETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE MICROCISTINAS EM SISTEMAS AQUOSOS

FIGURA 1



(57) Abstract : According to the present invention, there are several methods for detecting microcystins, which have a limited capacity to adequately identify and monitor in real time structural variants of said toxins. The present inventive method and inventive device enable the detection, identification, quantification and real-time monitoring of microcystins in aqueous media. The inventive method is based on the fact that the influx and interaction of microcystins in the aqueous opening of a protein nanopore, formed by alpha-toxin incorporated into a resistive matrix, induces discretized events in the ion current that flows through the nanopore. The temporal series of said events is representative of and correlated with the microcystin structural variant present in the solution contained in one of the conductive reservoirs. The segmental statistical analysis of the temporal series, combining the method of least squares and genetic optimization algorithm, allows real-time discrimination of the microcystin variants. The inventive device consists basically of a nanopore incorporated into a lipid bilayer that separates two conductive reservoirs, wherein the microcystins are placed in one of the reservoirs.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)

WO 2013/026123 A1

Anexo B:

Resumos apresentados na XXVIII Reunião Anual da FESBE (2013).

INFLUÊNCIA DE ANIONS DE HOFMEISTER NA INTERAÇÃO DO ssDNA COM O NANOPORO DE ALFATOXINA

Autores [1]AGUIAR, J. P. D. [1], MACHADO, D. C. [1], JÚNIOR, J. J. D. S. [1], RODRIGUES, C. G. [1] Biofísica e Radiobiologia - UFPE

Apoio Financeiro: CNPq,INCT-INAMI,UFPE

Resumo

Introdução

O estudo da translocação e interação de moléculas com nanoporos tem se intensificado nos últimos anos, empregando essas nanoestruturas (naturais ou sintéticas) como elemento fundamental no desenvolvimento de sensores; visando sua utilização como alternativa para o sequenciamento de DNA. Neste contexto, o nanoporo proteico formado pela alfatoxina atua como elemento de reconhecimento para detectar diversas moléculas em meio aquoso, podendo ser até utilizado como um espectrômetro de massas para o polietilenoglicol (Pat. USA 2010/012290, 2010). O uso do nanoporo pode tornar o sequenciamento mais rápido e barato, pois, não há a necessidade de marcação ou amplificação do DNA. Entretanto, há um problema fundamental para o desenvolvimento de um dispositivo comercial baseado nesta tecnologia: insuficiente nível de reconhecimento das bases durante a passagem da molécula do DNA via o poro, devido à altíssima velocidade de translocação (≤10μs por base). A velocidade desejável para o sequenciamento com o nanoporo é 1 ms por base. Tendo em vista a resolução desse problema, neste trabalho foram utilizados especificamente ânions de Hofmeister que alteram o grau de estruturação da água da solução banhante do nanoporo.

Objetivos

Analisar a influência dos ânions de Hofmeister nos parâmetros biofísicos, condutância e tempo de permanência do ssDNA no nanoporo formado pela alfatoxina; visando determinar qual solução permite melhor resolução e capacidade de discriminação de nucleotídeos.

Código de Experimentação Animal

Código de Experimentação Humana

Métodos

Todas as bicamadas planas livres de solvente foram confeccionadas com o lipídeo DPhPC(Avanti Lipids, USA) sintético, conforme as técnicas convencionais de construção de membranas (Proc. Natl. Acad. Sci.USA 69:3561,1972). Os experimentos foram realizados em condições de fixação de voltagem, através de um amplificador de patch clamp (Axonpatch 200B). O valor da condutância média do nanoporo em 40 mV, foi obtida em cada uma das soluções banhantes: KF, KCl ou KBr 4M, Tris 5 mM, pH 7,5, pela incorporação de mais de 100 canais. A incorporação de um nanoporo unitário se deu pela adição de alfatoxina (~0.25μg) (Calbiochem, USA) à solução banhante da membrana. Posteriormente, o ssDNA (Invitrogen, USA) foi adicionado no compartimento cis da câmara experimental em concentração final de 300nM, e o protocolo experimental consistiu na aplicação de potenciais de -200 a 200 mV (incrementos de 20 mV) e registrar a corrente iônica através do nanoporo da alfatoxina nas soluções banhantes supracitadas. Os parâmetros biofísicos foram determinados por meio do programa p-Clamp (Axon).

Resultados

A condutância do nanoporo é um parâmetro importante, pois pode interferir na relação sinal/ruído, na análise da corrente residual (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:20,2007) e consequentemente na identificação dos nucleotídeos. O valor da condutância do nanoporo da alfatoxina em 40 mV foi de: 3.812±0.02 (n=161); 2.558 ± 0.01(n= 166); 3.845±0.01 (n=104) nS na solução de KCl, KF, ou KBr, respectivamente. O valor do tempo de permanência do ssDNA no nanoporo no potencial de 100 mV, aumentou em aproximadamente 20x na solução de Fluoreto (4,82±0.30 ms, n=3), em relação ao Cloreto (0,212±0.02 ms, n=3) e ao Brometo (0,301±0.23 ms, n=3).

Conclusão

Os ânions de Hofmeister interferem na interação ssDNA-nanoporo de alfatoxina, sendo o Fluoreto o mais efetivo no aumento do tempo de residência do DNA no nanoporo.

Palavras-chaves: alfatoxina, DNA, Hofmeister, nanoporo, sequenciador

Anexo C: Simpósio Nordestino de Biomedicina.Revista de Biomedicina, 2014.

BIOSSENSOR ESTOCÁSTICO E A BIOMEDICINA

Aguiar, J.P; Silva, J.J.J; Rodrigues, C.G. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov.

Resumo

A nanobiotecnologia alcançou notáveis avanços no desenvolvimento de dispositivos e métodos de identificação, caracterização e quantificação de moléculas, realização de diagnóstico médico, monitoramento ambiental, controle de qualidade alimentar, combate ao terrorismo, etc. Neste contexto, processos biomiméticos, e principalmente, nanoestruturas biológicas são empregadas como elemento de reconhecimento molecular para o desenvolvimento de uma nova classe de biossensores, baseados no princípio da detecção estocástica. Os canais iônicos ou nanoporos proteicos naturalmente inseridos em membranas biológicas participam dos processos de percepção, interação célula-célula e célula-microambiente, são atualmente a principal nanobioestrutura dotada da propriedade de detecção estocástico e capazes de serem manuseados por técnicas químicas e genéticas. O nanoporo formado pela alfahemolisina do Staphylococcus aureus incorporada em suporte lipídico é o principal modelo de elemento sensor estocástico, devido às seguintes características: elevada condutância iônica, estrutura molecular elucidada, estabilidade estrutural, facilidade de modificação genética e química, diâmetro do poro aquoso similar ao tamanho de diversas moléculas de interesse biomédico. O funcionamento deste nanoporo unitário como elemento sensor estocástico deve-se ao fato dele ser a única via resistiva em uma bicamada lipídica que separa dois compartimentos contendo soluções eletrolíticas, onde em um deles se coloca o analito. O fluxo de corrente iônica através do nanoporo é alterada de maneira discretizada quando dá entrada ou permeação de moléculas unitárias do analito no lume aquoso, gerando uma série temporal de eventos que é representativa e correlacionada com a massa e configuração espacial destas moléculas. A denominação estocástica advém do mecanismo de detecção do analito, que consiste na aproximação por difusão (aleatória, randômica, estocástica) de moléculas unitárias para o lume aquoso do nanoporo, e também pela geração de uma distribuição randômica (probabilística) dos eventos discretos no tempo. As diferentes abordagens de análise da série temporal possibilitam a utilização do nanoporo até como espectrômetro de massa ou sequenciador molecular. Apesar da grande importância do conhecimento em sensores estocásticos e o crescimento acelerado nas pesquisas, ainda há muito a se fazer, pois, ainda são poucos os dispositivos ou equipamentos disponibilizados comercialmente, baseados nesta tecnologia. Assim sendo, é imprescindível o processo de consolidação e difusão do conhecimento sobre sensores estocásticos à sociedade em geral e principalmente a toda a comunidade científica, para não só, popularizar esta tecnologia, com também incrementar o crescimento da nanobiotecnologia, que demonstra ser promissora em todos os seus aspectos, principalmente na área biomédica.

Palavras-chave: Biossensor estocástico; Alfahemolisina; Nanoporo; Canal iônico, Sensor; Espectrômetro. ■