

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA

JULIANA PEREIRA DE AGUIAR

ESTUDO DO TRANSPORTE DE POLÍMEROS ATRAVÉS DO NANOPORO
PROTEICO UNITARIO BANHADO POR SOLUÇÃO DE SAIS DE HOFMEISTER

Recife
2018

JULIANA PEREIRA DE AGUIAR

**ESTUDO DO TRANSPORTE DE POLÍMEROS ATRAVÉS DO NANOPORO
PROTEICO UNITARIO BANHADO POR SOLUÇÃO DE SAIS DE HOFMEISTER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Profº. Drº. Cláudio Gabriel Rodrigues

Co-Orientador: Profº Drº. Laércio Pol-Fachin

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Aguiar, Juliana Pereira de
Estudo do transporte de polímeros através do nanoporo proteico unitário banhado
por solução de sais de Hofmeister / Juliana Pereira de Aguiar. – 2018.

98 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues.

Coorientador: Laércio Pol-Fachin.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica,
Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Biotecnologia 2. Biossensores 3. Canais iônicos. I. Rodrigues, Cláudio
Gabriel (Orientador). II. Pol-Fachin, Laércio (Coorientador). III. Título.

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 118

JULIANA PEREIRA DE AGUIAR

**ESTUDO DO TRANSPORTE DE POLÍMEROS ATRAVÉS DO NANOPORO
PROTEICO UNITARIO BANHADO POR SOLUÇÃO DE SAIS DE HOFMEISTER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 26/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº. Cláudio Gabriel Rodrigues
Departamento de Biofísica e Radiobiologia-UFPE

Profº Drº. Edbhergue Ventura Lola Costa
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal – UFRPE

Profª. Drª Isvania Maria Serafim da Silva Lopes
Departamento de Biofísica e Radiobiologia-UFPE
Centro Universitário Brasileiro – UNIBRA

Profº. Drº. Janilson José da Silva Júnior
Departamento de Bioquímica; LIKA - UFPE

Profº Drº. Leucio Duarte Vieira Filho
Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal – UFRPE

A minha mãe Carcelina e a minha irmã Elaine Aguiar pelo
apoio e amor de sempre.
Dedico.

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 dedicados. Por todos os ensinamentos e por ser um exemplo de seriedade e ética, no âmbito profissional e pessoal.

À Laércio Pol Fachin pela co-orientação e auxílio em vários momentos.

Aos Professores Doutor Oleg V. Krasilnikov (*in memoriam*) e Liliya Yuldasheva, por serem uma inspiração. Seus ensinamentos sempre serão lembrados.

Agradeço imensamente à minha família, por ser meu porto seguro e apoiar todas as minhas escolhas.

À Rafael Miranda por dividir comigo todas as alegrias, frustrações e conquistas ao longo desses anos. Por ser calma quando eu não era. E por incentivar meus objetivos!

A todos do laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco – Dr. Oleg Krasilnikov: Carolina Melo, Artur Alves, Janilson Júnior, Licya Samara, Dijanah Machado, Sheila Barros, Gisely Albertim, Túlio Queiroga, Thaylany Gomes que me ajudaram direta ou indiretamente na execução dos experimentos, pela amizade e carinho.

Agradeço, especialmente, a Wyndly Daniel por sua amizade, companheirismo e por ser uma pessoa maravilhosa, que quero levar para o resto da vida!

Aos professores, Paloma Medeiros, Thiago Salazar, Márcia Bezerra, Mariana Brayner, Reginaldo Pereira e Jader Cruz pelos ensinamentos científicos e por compartilhar bons momentos.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio sempre que solicitada, especialmente a Paulo Germano 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!

RESUMO

A translocação de polímeros em espaços nanoconfinados ocorre na biologia, medicina e tecnologia. Polímeros abióticos e bióticos podem ser translocados através de espaços nanoconfinados visando o desenvolvimento de dispositivos analíticos baseados no método de sensoriamento estocástico por pulso resistivo no nanoporo (SEPRN). O SEPRN consiste em um método elétrico para a detecção de moléculas individuais que, ao entrar no nanoporo, causam bloqueios transitórios de sua condutância. A magnitude desses bloqueios depende da relação entre o volume molecular e o volume do poro, possibilitando a obtenção de informações sobre a dinâmica de translocação e a interação do polímero-cosoluto-nanoporo. Sabe-se que o transporte do poli (etileno glicol) através do nanoporo protéico da α -hemolisina (α HL) de *Staphylococcus aureus* é considerado um bom modelo para estudo de detecção e translocação de polímeros abióticos em sistemas nanoconfinados, no entanto, são raríssimos, estudos com polímeros sintéticos mais complexos. Neste contexto, estudamos o transporte do poli (vinil álcool) (PVA) e do poli (vinil pirrolidona) (PVP), através do nanoporo da α HL incorporada em bicamada lipídica plana banhada por soluções de sais de Hofmeister visando esclarecer seu processo de translocação, e também determinar as condições adequadas para detecção destes polímeros em meios aquosos. A formação da bicamada lipídica, incorporação do nanoporo e a aquisição dos registros das correntes iônicas ocorreram em condições de fixação de voltagem. As soluções utilizadas foram KCl, CsCl ou RbCl 4M, Tris 5 mM, pH 7,5 a 25°C. Demonstrou-se principalmente que: i) o nanoporo da α HL detecta o PVA e o PVP nas soluções analisadas, porém, o KCl é mais adequada; ii) O PVA induz quatro tipos de pulsos resistivos e dois modos de translocação; iii) A frequência de translocação e o tempo de permanência do PVA no nanoporo são dependentes do potencial transmembrana; iv) As constantes de associação e de dissociação do complexo PVP-nanoporo dependem do tipo de íon de Hofmeister; v) O PVP induz três tipos de pulsos resistivos e um modo de translocação. Finalmente, propomos que cátions de Hofmeister podem formar complexos com o PVA e PVP, tornando-os moléculas carregadas, influenciando na interação e translocação destes polímeros através de espaços nanoconfinados.

Palavras-chave: Alfatoxina. Nanoporo. Polímeros. Translocação.

ABSTRACT

The translocation of polymers into nanoconfined spaces takes place in biology, medicine and technology. Abiotic and biotic polymers can be translocated through nanoconfined spaces for the development of analytical devices based on the nanopore resistive pulse stochastic sensing method (NRPS). NRPS consists of an electrical method for the detection of individual molecules that, upon entering the nanopore, cause transient blockages of their conductance. The magnitude of these blocks depends on the relationship between the molecular volume and the pore volume, making it possible to obtain information about the translocation dynamics and the interaction of the polymer-cosolute-nanopore. It is known that the transport of poly (ethylene glycol) through the protein nanopore of α -hemolysin (α HL) of *Staphylococcus aureus* is considered a good model for the study of detection and translocation of abiotic polymers in nanoconfined systems, however, they are very rare, studies with more complex synthetic polymers. In this context, we studied the transport of poly (vinyl alcohol) (PVA) and poly (vinyl pyrrolidone) (PVP) through the nanopore of α HL incorporated in a lipid bilayer bathed by solutions of Hofmeister salts in order to clarify its translocation process, and also to determine the suitable conditions for detection of these polymers in aqueous solution. The preparation of planar lipid bilayer, and single nanopore insertion into membrane, and records of ionic currents were conducted in conditions of voltage clamp. Solutions used were KCl, CsCl or 4M RbCl, 5 mM Tris, pH 7.5 at 25 ° C. It was mainly demonstrated that: i) nanopore of α HL detects PVA and PVP in the solutions analyzed, however, KCl is more adequate; ii) The PVA induces four types of resistive pulses and two modes of translocation; iii) The translocation frequency and the residence time of the PVA in the nanopore are dependent on the transmembrane potential; iv) The association and dissociation constants of the PVP-nanopore complex depend on the Hofmeister ion type; v) PVP induces three types of resistive pulses and one mode of translocation. Finally, we propose that Hofmeister cations can form complexes with PVA and PVP, making them molecules loaded, influencing the interaction and translocation of these polymers through nanoconfined spaces. Thus, our results can give a new insight into the dynamics of polymer translocation in nanoconflation systems and contribute to the development of nanopore-based devices.

Key words: Alfatoxin. Nanopore. Polymers. Translocation.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina.....	22
Figura 2 - Modelo proposto para a formação do poro da γ -toxina.....	26
Figura 3 - Modelo esquemático do funcionamento do nanoporo de alfatoxina como biossensor.....	27
Figura 4 - Alfatoxina como protótipo de um nanoporo proteico unitário para a detecção, quantificação e caracterização de moléculas em sistemas aquosos.....	29
Figura 5 - Nanoporo da alfatoxina como espectrômetro de massas.....	32
Figura 6 - Exemplos de nanoporos da alfatoxina adaptados.....	34
Figura 7 - Sequência dos ânions e cátions da Série de Hofmeister.....	37
Figura 8 - Gráfico que relaciona o limite de detecção versus concentração do KCl em molar (M) com as concentrações do analito (PEG 2000)	39
Figura 9 - Gráfico que relaciona o limite de detecção versus concentração do PEG...	39
Figura 10 - Diferentes regimes de confinamento de polímeros pelo poro.....	43
Figura 11 - Gênese da barreira entrópica para o transporte de polímeros através de nanoporos.....	45
Figura 12 - Esquema do processo de docking molecular.....	47
Figura 13 - Relação entre a funcionalidade (F), a estrutura e as propriedades dos polímeros.	51
Figura 14 - Estrutura química da molécula de PVP.....	55
Figura 15 - Estrutura química da molécula de PVA.....	56

Metodologia

Figura 16 - A. Condutivímetro de alta precisão (Radiometer analytical, Modelo: CDC 230. B. Viscosímetro modelo Stabinger Viscometer (Anton Paar, SVM™ 3000).....	57
Figura 17 - Ilustração da formação do ponto de nuvem do polímero em solução de KCl 4M.....	58
Figura 18 - Esquema da montagem experimental e aquisição dos dados.....	60

Artigo 1

Figura 1 - Effect of trans-side addition of PVA50 to nanopore-bathing solution.....	64
Figura 2 - Typical traces of the ion current through single α HL nanopore after addition of PVA50 in the bath solution (4 M KCl, 5 mM Tris, pH 7.5) at a time resolution of 0.1 ms.....	65
Figura 3 - Interactions of PVA50 with α HL nanopore at 100 mV with five types of resistive pulses.....	66
Figura 4 - Model of the interaction of a PVA 50 chain with α HL nanopore.....	67
Figura 5 - Scatter plot and characteristic times to different type of events for 100 nm PVA.....	68
Table 1 - The percentage for each type of events for various potentials.....	69
Figura 6 - Voltage dependence of translocation event (type A, D) frequency (A), relative current blockade (B), and, characteristic times (C).....	70

Artigo 2

Figura 1 - The correlation between the ionic conductivity of cations and the α HL channel conductance in 4 M cations solutions.....	77
Figura 2 - Typical traces of the ion current through single α HL channels in the presence of PVP in the bath solution.....	78
Figura 3 - Specific ionic effect on the PVP/ α HL nanopore interaction.....	79
Figura 4 - Solubility of PVP in 4 M cations solutions.....	80
Figura 5 - Interactions of the PVP molecules with the α HL nanopore	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α - HL	alfa-hemolisina (do inglês alpha-hemolysin)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)
PFTs	Proteína formadora de poro (do inglês pore-forming toxins)
Å	Angstrom
Ala	Alanina
Val	Valina
β	Beta
LUK	Leucodina
PVL	Leucodina Panton-Valentine
ssDNA	fita simples do Ácido Desoxirribonucleico (do inglês single-stranded Deoxyribonucleic Acid)
C _{analito}	Concentração do analito
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
PVA	Polivinilalcool
DPHPC	Diftanoilglicerofosfocolina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
SDM	Simulação de Dinâmica Molecular
Eq	Equação
IM-MS	Do inglês <i>ion mobility-mass spectrometry</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
nm	nanômetro
kDa	KiloDalton
mS/cm	milisimens por centímetro
$\mu\text{g/L}$	micrograma por litro
pb	pares de base
I	Corrente
m/z	massa / carga
μm	micrômetro
μs	Microssegundos
ms	Milissegundos
mV	Milivolts
pA	pico ampere
τ_{off}	Tempo de residência
Δg	Condutância
k_{on}	Constante de associação
k_{off}	Constante de dissociação
Kf	constante de formação
f	Frequência
TM	Trademark
T	Timina
A	Adenina
G	Guanina
C	Citosina
I ⁻	Iodeto
NH ₄ ⁺	Amônio
SO ₄ ²⁻	Sulfato

F^-	Fluoreto
Ca^{+2}	Cálcio
Mg^{+2}	Magnésio
Br^-	Bromo
NO_3^-	Nitrato
K^+	Potássio
Rb^+	Rubídio
Na^+	Sódio
Cs^+	Césio
Li^+	Lítio
Hz	Hertz
$^{\circ}C$	Grau Celsius
M	Molar
μM	micromolar
KCl	Cloreto de Potássio
S	Entropia conformacional
N	Número de conformações
R	Raio de Giro
λ	Raio do poro
k_B	Constante de Boltzmann
T	Temperatura
F	Energia livre
L	Comprimento do poro
W	Largura do poro
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Variação de entropia
MM	Massa Molar
PM	Peso molecular
Mw	PM peso médio
Mn	PM numérico médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	BIOSSENSORIZAMENTO ESTOCÁSTICO	18
2.2	ALFATOXINA	21
2.2.1	Estrutura	21
2.2.2	Inserção na membrana, oligomerização e formação do poro	23
2.2.3	Nanoporo proteico da alfatoxina como elemento de reconhecimento molecular	26
2.2.4	Aplicações do nanoporo da alfatoxina	28
2.2.5	Limitações e estratégias de melhorias do nanoporo proteico da alfatoxina	32
2.2.6	Sais da série de Hofmeister	36
2.3	MECANISMOS DE TRANSLOCAÇÃO DE POLÍMEROS ATRAVÉS DE NANOPOROS	40
2.4	ANCORAGEM MOLECULAR	46
2.5	POLÍMEROS	49
2.5.1	Definição e classificação	49
2.5.2	Propriedades	51
2.5.3	Massa molecular	52
2.5.4	Caracterização dos Polímeros	53
3	METODOLOGIA	57
4	RESULTADOS	62
4.1	Artigo 1	62
4.2	Artigo 2	74
5	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO A- Artigo publicado na Revista Química Nova, v. 6, 2015	98

1 INTRODUÇÃO

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, tais como a percepção de parâmetros físicos (por exemplo, campo elétrico), reconhecimento de espécies químicas (como por exemplo, íons sódio) e seleção de elementos químicos entre os meios intra e extracelular (HILLE, 2001; MITSCHA-BAUDE et al, 2016). Em virtude desta versatilidade funcional, os nanoporos proteicos são considerados, atualmente, a principal nanobioestrutura capaz de realizar o biosensoriamento estocástico (KASIANOWICZ et al., 2012).

O biosensoriamento estocástico é uma abordagem que se baseia na observação de eventos de ligação entre as moléculas individuais de analitos e um único receptor. A detecção estocástica baseada em nanoporo fornece uma ferramenta sensível, não destrutiva e econômica para análise de moléculas no limite individual (BAYLEY, CREMER, 2001). Esse método de detecção é de grande interesse científico porque fornece uma abordagem da dinâmica estrutural de moléculas individuais de polímeros, e pode servir como um sistema modelo útil na compreensão de processos físicos e químicos, biologicamente relevantes, em escala nanométrica, (BUTLER et al., 2006; HOWORKA, SIWY, 2009; CHEN et al., 2010).

A técnica também é denominada de sensoriamento por pulso resistivo no nanoporo (Nanopore Resistive Pulse Sensing; NRPS) e consiste em um método elétrico para a detecção de moléculas individuais que, ao entrar no nanoporo, causam bloqueios transitórios de sua condutância iônica (PIGUET et al., 2016). Esses bloqueios contêm informações sobre as propriedades moleculares do analito, sendo os parâmetros mais relevantes sua profundidade e duração (PIGUET et al., 2016). A magnitude desses bloqueios depende da relação entre o volume molecular e o volume do poro (KRASILNIKOV et al., 2006) e, em alguns casos, a interação entre a molécula e os íons em solução (BALIJEPALL et al., 2013). A duração do bloqueio (isto é, o tempo que a molécula passa dentro do poro) depende da força eletroforética através do poro, que pode ser afetada pelo contrafluxo eletrosmótico (KEYSER et al., 2006) ou por interações entrópicas ou entálpicas entre o analito e o poro (BRETON et al., 2013).

O nanoporo protéico formado pela alfatoxina ou α -hemolisina (α HL) de *Staphylococcus aureus* é indiscutivelmente o nanoporo de escolha para estudos de translocação de moléculas individuais via registros elétricos em membranas lipídicas planas artificiais. A α HL é estruturalmente estável em uma ampla gama de condições experimentais e tem sua estrutura cristalina determinada (diâmetro das entradas de 4,6 e 2 nm; constrição de 1,4 nm). Como tal, fornece um espaço altamente confinado que permite a detecção de íons divalentes (Braha et al., 2000), enantiômeros (KANG et al., 2006; BOERSMA et al., 2012), vários tipos de moléculas orgânicas (KRASILNIKOV et al., 2006; ROBERTSON et al., 2007; RAMSAY, BAYLEY, 2018) peptídeos (STREFUREAC et al., 2006; ASANDEI et al., 2015), proteínas (MOBILEANU, 2009; ROTEM et al., 2012; NIVALA et al., 2013), DNA (MAGLIA et al., 2008; CLARKE et al., 2009; BRETON et al., 2013; DING et al., 2015; GUO et al., 2018) e polímeros sintéticos (RODRIGUES et al., 2008; CHEN et al., 2010; PIGUET et al., 2016; CHAVIS et al., 2017).

A dinâmica de translocação de uma cadeia polimérica através de nanoporos tem atraído muita atenção nos últimos anos (MUTHUKUMAR, 2011; OUKHALED, 2012; SARABADANI, 2017). Além de ser um fenômeno complexo e um passo fundamental em muitos processos vitais, como por exemplo, o transporte de proteínas através de nanoporos de membrana, translocação de RNA através de poros nucleares, transferência de moléculas de DNA de vírus para célula hospedeira e transporte de genes entre bactérias (MURPHY, MUTHUKUMAR, 2017; LUO et al., 2017). Outra razão para despertar tal interesse é que a translocação de polímeros ou biomoléculas através de nanoporos tem grande potencial de aplicação em medicina, principalmente, em sistema de entrega de fármaco (MAITZ, 2015). Uma variedade de diferentes polímeros sintéticos de alto peso molecular está sendo amplamente aplicada para essa finalidade (MAITZ, 2015). Nos últimos anos, tem havido uma série de investigações sobre a translocação de macromoléculas simples através de nanoporos protéicos ou de estado sólido (KASIANOWICZ et al., 1996; MELLER, 2002; LUO et al., 2008; COMER, AKSIMENTIEV, 2012). Tais informações podem facilitar a compreensão do mecanismo do transporte macromolecular através de nanoporos proteicos.

Entre os polímeros sintéticos, o polietilenoglicol (PEG) foi o mais estudado. O que permitiu o desenvolvimento de um método de espectrometria de massa para PEG

usando um nanoporo da α HL. Utilizando o fato de que a amplitude do bloqueio da corrente induzida pela presença do PEG no lume aquoso do nanoporo de α HL, depende do peso molecular do polímero, foi possível discriminar claramente a unidade de repetição do etilenoglicol a partir de uma amostra de PEG polidisperso. Embora tenha sido descrito quantitativamente em termos de um modelo simples que compreende uma combinação de exclusão de tamanho e ligação de cátions pelo PEG (BALIJEPALLI et al., 2013; ROBERTSON et al., 2007; REINER et al., 2010; BOUKHET et al., 2016), o mecanismo de interação subjacente a essa discriminação de massa pela modulação da corrente iônica é questionado por alguns autores (BAAKEN et al., 2015). Desconhece-se em que medida esta forte interação, que por motivos cinéticos, deve envolver a ligação do polímero à parede do poro (ROBERTSON et al., 2007; REINER et al., 2010; BALIJEPALLI et al., 2013) ou se é uma propriedade única do nanoporo da α -HL (AKSOYOGLU et al., 2016).

Com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na translocação de outros polímeros sintéticos em espaços nanoconfinados, estudamos o transporte do polivinilálcool (PVA) e da polivinilpirrolidona (PVP), através do nanoporo da α HL banhado por soluções de sais de Hofmeister visando determinar as condições adequadas de interação e detecção destes polímeros em meios aquosos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar o transporte do polivinilálcool (PVA) e da polivinilpirrolidona (PVP) através do nanoporo protéico unitário da alfatoxina banhada por sais de Hofmeister visando descobrir o mecanismo de translocação e as condições físico-químicas mais adequadas para detecção e caracterização de analitos poliméricos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a condutividade e viscosidade das soluções aquosas dos sais de Hofmeister (KCl, CsCl e RbCl) na concentração de 4 M;
- Determinar a solubilidade do PVA e PVP nas soluções dos sais de Hofmeister supracitadas
- Determinar a condutância do nanoporo da alfatoxina nas soluções dos sais de Hofmeister supracitadas;
- Determinar experimentalmente os parâmetros biofísicos (tempo característico de ocupação, tempo característico de desocupação, constante de associação, constante de dissociação e energia de interação) do PVA ou do PVP no nanoporo da alfatoxina;
- Determinar o mecanismo de translocação dos polímeros no nanoporo;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOSSENSORIAMENTO ESTOCÁSTICO

De maneira geral, um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico, que integra um elemento biológico a um transdutor físico que é capaz de converter uma resposta biológica em um sinal mensurável (ex. sinal elétrico), proporcional à concentração ou atividade do analito presente na amostra (OTLES, YALCIN, 2012; KUMAR, RANI, 2013; SOWJANYA;YADLA, 2016). 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, 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.

Dessa forma, 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 (FURTADO et al., 2008).

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). Porém, a ideia 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. Resumidamente, no contador de Coulter partículas

microscópicas (como por exemplo, células) passam através de um poro (microporo) 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 (WANUNU, 2012). Considera-se os biossensores estocásticos baseados em nanoporos, como descendentes nanométricos desse contador (KASIANOWICZ et al., 2008).

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 (por exemplo, a acetilcolina) e principalmente selecionarem os elementos químicos (por exemplo, íons sódio) transferidos entre os meios intra e extracelular, propicia efetivamente a interação célula-célula e célula-microambiente (HILLE, 2001). Em virtude desta versatilidade funcional, os nanoporos proteicos são considerados, atualmente, a principal nanobioestrutura capaz de realizar o biossensoriamento estocástico, como elemento de detecção, quantificação, monitoração e caracterização de moléculas individuais (AGUIAR et al., 2015).

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 estocástica 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 (processo probabilístico ou randômico), ou seja, um fenômeno estocástico (KANG et al., 2007; RHEE & BURNS, 2007; MULERO et al., 2010).

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. Como informado à cima, esse tipo de

sensor pode detectar moléculas individuais que se aproximam do nanoporo por difusão e ocupam temporariamente o lume aquoso do nanoporo (RHEE & BURNS, 2007; GURNEV & NESTOROVICH, 2014). Esta ocupação altera a quantidade de íons fluindo no nanoporo, gerando um evento de bloqueio. Esse perfil de bloqueio é caracterizado pelo tempo de duração (tempo de residência) da interação do analito com o nanoporo, juntamente com a amplitude do bloqueio.

Biossensores estocásticos baseados em nanoporos proteicos individuais podem detectar e caracterizar analitos, simplesmente por meio da análise da série temporal das flutuações discretas nos registros da corrente iônica que flui pelo nanoporo (MOVILEANU, 2009). 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 (BRAHA et al., 2000; NESTOROVICH & BEZRUKOV, 2012) e também apresenta alta sensibilidade e rapidez na análise (KASIANOWICZ et al., 2007).

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 sob diversas condições experimentais (MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012). Outros nanoporos proteicos, também, estão sendo aplicados na detecção de inúmeras moléculas como, por exemplo, o poro formado a partir 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; WANG et al., 2018).

Paralelamente, num esforço de substituir os nanoporos proteicos, surgiram às plataformas de detecção mais robustas, que utilizam nanoporos sintéticos no 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 demonstrada em seus homólogos proteicos (ROBERTSON et al., 2007; CLARKE et al., 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 (SONG et al., 1996), receptividade à engenharia molecular (BAYLEY, 2004; MOHAMMAD, MOVILEANU, 2012), alta condutância iônica (MERZLYAK et al., 2005). Além disso, este poro permanece aberto durante longos períodos de tempo, em condições experimentais bem definidas, como pH (KRASILNIKOV et al., 1988), força iônica (KRASILNIKOV et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008; IVICA et al., 2017), temperatura (JUNG, BAYLEY, MOVILEANU, 2006; PAYET et al., 2015; PIGUET et al., 2016), elevado potencial transmembrana (MELLER et al., 2000; GURNEV, NESTOROVICH, 2014) e até em diversas concentrações de agentes químicos desnaturantes (PASTORIZA-GALLEGO et al., 2007; WINTERS-HILT, STOYANOV, 2016).

2.2 ALFATOXINA

2.2.1 Estrutura

O gene que codifica a alfatoxina foi descoberto em 1980 (FAIRWEATHER et al., 1983; BERUBE & WANDENBURG, 2013). A alfatoxina é uma toxina de 33 kDa secretada pela bactéria patogênica *Staphylococcus aureus* na forma de monômeros polipeptídicos de 293 aminoácidos solúveis em água (ARBUTHNOTT et al., 1967; BHAKDAI et al., 1981; GRAY & KEHOE, 1984). Ela é uma exotoxina proteica que faz parte de um grupo bastante significativo de toxinas, que são capazes de formar poros condutores nas membranas das células alvo. Essas toxinas são denominadas, “toxinas formadoras de poros” ou PFTs, e são capazes de existir em dois estados: uma conformação solúvel em água e uma ainda mais estável, inseridas em membranas de células eucarióticas (PARKER & FEIL, 2005).

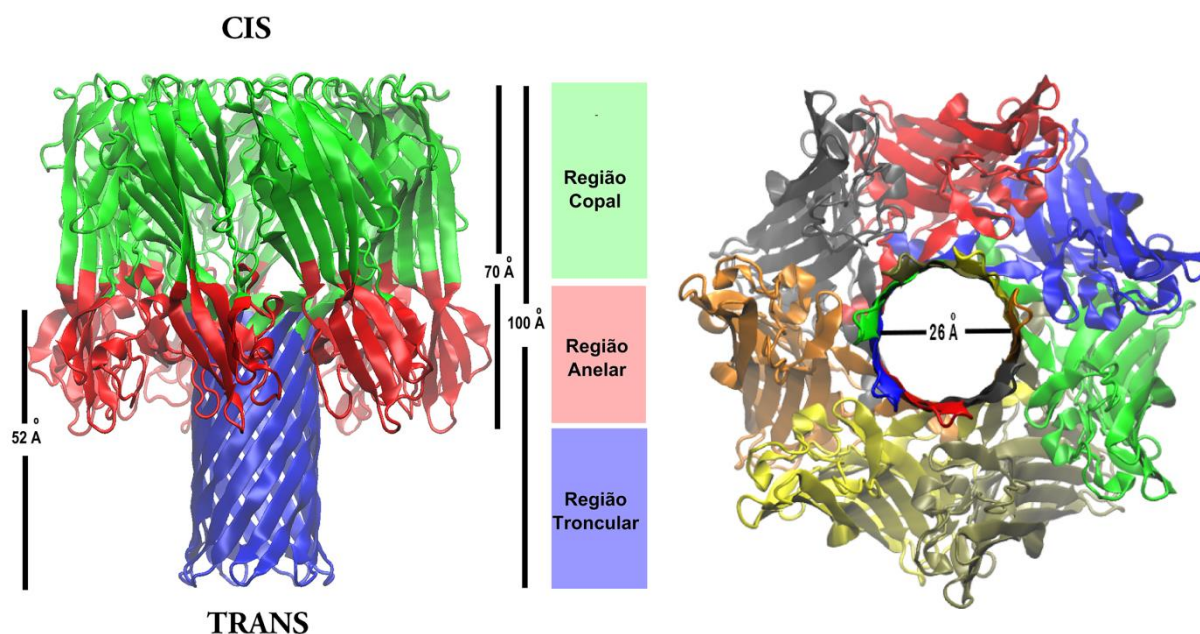
O primeiro estudo de reconstituição do canal da alfatoxina em modelos de bicamadas lipídicas foi realizado por Krasilnikov e colaboradores em 1981. Além desse, outros estudos eletrofisiológicos refinaram a nossa compreensão das propriedades biofísicas do canal, como por exemplo, a geometria do poro aquoso e o seu posicionamento assimétrico em relação ao plano da membrana que foram

elucidados em condições dinâmicas com não eletrólitos (KRASILNIKOV et al., 1988; MERZLYAK et al., 1999).

A estrutura cristalográfica tridimensional deste poro foi elucidada (SONG et al., 1996) e os dados cristalográficos denotam a existência de sete monômeros delimitando o poro aquoso, os quais se inserem em membranas e então se oligomerizam para formar o nanoporo heptamérico transmembranar, permeável 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) (**Figura 1**).

FIGURA 1. Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina



Fonte: AGUIAR et al., 2015. À esquerda visão lateral com cada domínio representado em três cores. Na área central, os retângulos empilhados em três cores específicas correspondem à espessura aproximada de cada domínio. A região da membrana foi suprimida na imagem visando delinear adequadamente a estrutura do nanoporo. 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. À direita visão superior com cada subunidade representada em diferentes cores.

O domínio extramembranar (convencionalmente denominado lado “cis”), possui uma entrada de maior diâmetro ($\sim 46 \text{ \AA}$) 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 ($\sim 20 \text{ \AA}$), sendo composto por 14 folhas β -barril (**Figura 1**) (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 $\sim 40 \text{ \AA}$, constituída de aminoácidos neutros (SONG et al., 1996; MERZLYAK et al., 2005). Os domínios CIS e TRANS estão separados por uma constrição de $26 \text{ \AA}$ de diâmetro, o que torna esse poro, uma ferramenta altamente promissora para uso biotecnológico (SONG et al., 1996; BAYLEY & CREMER, 2001; HOWORKA & SIWY, 2009; AKSIMENTIEV, 2010).

2.2.2 Inserção na membrana, oligomerização e formação do poro da alfatoxina

As modificações estruturais que resultam na incorporação da alfatoxina na bicamada lipídica têm sido intensamente estudadas, através de ferramentas analíticas que favoreçam o entendimento das etapas necessárias para a formação do poro. O mecanismo molecular pelo qual a alfatoxina liga-se à superfície das membranas das células hospedeiras tem sido um assunto discutido por longos anos (CASSIDY, HARSHMAN, 1976; HILDEHAND et al., 1991; VALEVA et al., 2006; YAMASHITA et al., 2014). Evidências experimentais fornecidas por vários pesquisadores sugerem a capacidade da toxina em se ligar a lipídeos específicos (VALEVA et al., 2006; SCHWIERING et al., 2013) e/ou receptores de proteínas na membrana nas células-alvo susceptíveis (CASSIDY, HARSHMAN, 1976).

Com base nas estruturas cristalográficas dos monômeros e do poro, sete subunidades monoméricas associam-se e formam um complexo pré-poro não lítico na membrana da célula. Em seguida, as subunidades inserem-se ainda mais na membrana para formar um poro lítico (FUSSLER et al., 1981; BHAKDI, TRANUM-JENSEN, 1991). Evidências recentes sugerem que a formação dos poros líticos pode não ser a única maneira de toxicidade da alfatoxina. A ativação específica induzida pela toxina no receptor de metaloprotease pode desencadear a ativação de cascatas intracelulares, conduzindo ao aumento da toxicidade (BERUBE, BUBECK

WARDENBURG, 2013). No entanto, a montagem correta dos poros da alfatoxina permanece um passo necessário para a sua ação tóxica (INOSHIMA et al., 2011).

A alfatoxina não contém quaisquer resíduos de cisteína, um fato que foi incorporado por uma série de estudos nos quais a introdução dos resíduos de cisteína permitiu a avaliação da estrutura da toxina e a geração de mutantes incapazes de formar poros inseridos à membrana (VALEVA et al., 1997; KAWATE, GOUAUX, 2003).

Valeva e colaboradores determinaram que o segmento N-terminal da alfatoxina sofre uma mudança conformacional, que estabiliza a estrutura do poro heptamérico. A importância do N-terminal foi demonstrada na percepção de que o resíduo de histidina na posição 35 (His35) modifica a inserção dos segmentos transmembrana na transição do pré-poro para o poro propriamente dito (VALEVA et al., 1997). Por conseguinte, os mutantes que recebem o resíduo cisteína em substituição a histidina são incapazes de formar um oligômero estável, e são, portanto, incapazes de formar um poro lítico, apesar de preservar a capacidade de ligação celular (WALKER, BAYLEY, 1995; JAYASINGHE, MILES, BAYLEY, 2006).

Alguns anos mais tarde, a estrutura do monômero da alfatoxina solúvel em água, foi relatado (MEESTERS et al., 2009) proporcionando ainda uma visão sobre o mecanismo de conversão do pré-poro para o poro totalmente formado. As transições da toxina monomérica solúvel em água para o poro totalmente montado são entidades conformacionais distintas e representam um evento molecular irreversível. Os movimentos observados no processo de transição da toxina monomérica para o poro aberto são consistentes com observações bioquímicas anteriores: 1- desdobramento da região central rica em glicina em cada subunidade; 2- extensão do segmento N-amino terminal (Ala1-Val20) para a subunidade vizinha no heptâmero montado, estabilizando a estrutura; 3- flexibilidade da região de ligação à fosfocolina na interface da região anelar-troncular. Estas descobertas foram apoiadas pela recente demonstração da estrutura do monômero da alfatoxina complexado com um anticorpo monoclonal neutralizante (FOLETTI et al., 2013).

Portanto, quatro fases distintas vinham sendo propostas para a montagem do poro da alfatoxina. De forma genérica, os monômeros solúveis em água (fase 1), a região N-amino terminal e a região pré-troncular seriam dobradas contra o núcleo da proteína. Nesta fase, tanto a região N-amino terminal quanto a pré-troncular estariam

susceptíveis à proteólise. Quando os monômeros se ligassem a membrana (fase 2), o pré-tronco tornar-se-ia resistente à proteólise. No entanto, a região N-amino terminal permaneceria protease-sensível. Uma difusão lateral, em seguida, daria origem à formação de um pré-poro (fase 3), e em seguida - a região transmembranar flexível formaria uma estrutura rígida para, finalmente formar o poro que transpassa a membrana (fase 4). Estudos mais recentes corroboram com esses achados (BERUBE; WARDENBURG, 2013; YAMASHITA et al. 2014; GURNEV; NESTOROVICH, 2014).

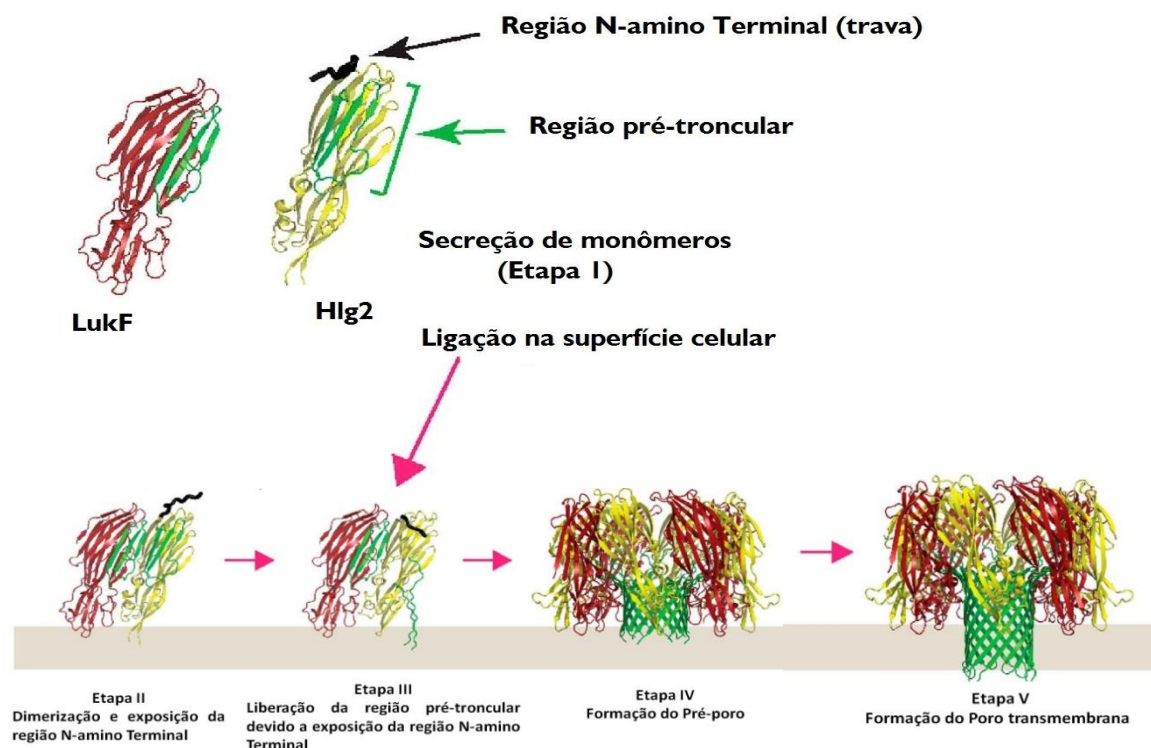
No trabalho de Yamashita e colaboradores de 2014 foram demonstradas as bases moleculares para a formação do β -barril das toxinas formadoras de poros liberadas pela bactéria *Staphylococcus aureus* (**Figura 2**). Dentre as toxinas, além da alfatoxina, também são secretadas a γ -toxina, a leucocidina (LUK) e a leucocidina Pantón-Valentine (PVL). A alfatoxina consiste em um único polipetídeo, ao passo que as outras exigem dois componentes diferentes, isto é, componentes proteicos da classe F e S que atuam sinergicamente; γ -HL, LUK e PVL são compostas de LukF e Hlg2, LukF e LukS, e LukF-Pantón-Valentine (PV) e LukS-PV, como componentes de classe F e S, respectivamente. Diferentemente da estrutura da alfatoxina na forma heptamérica, as estruturas cristalográficas das outras toxinas citadas, se apresentam na forma octamérica. Mas, apesar dessa diferença estrutural, sugere-se devido à homologia entre as toxinas (~70% para toxinas da mesma classe) que os mecanismos de formação do β -barril seguem o mesmo modelo para todas essas toxinas, inclusive a alfatoxina.

Na **figura 2**, pode-se entender melhor esse processo. Cada PFT é secretada como monômero solúvel em água (Etapa I). Os dois componentes Hlg2 e LukF formam um dímero na superfície celular. Ao liberar a região N-amino terminal (“trava”) localizada ao lado do domínio copal, ocorre às interações entre os monômeros (Etapa II). A região pré-troncular é formada (Etapa III). E posteriormente o pré-poro octamérico é formado (Etapa IV). No estado pré-poro, apenas a metade extramembranar do β -barril é formada. A metade transmembranar do β -barril é inserida na membrana, e a formação de poro é concluída (Etapa V).

Os detalhes da via de oligomerização ainda são desconhecidos. Deve-se notar que todas as ligações intramoleculares de hidrogênio dentro da região pré-troncular são interrompidas e novas ligações de hidrogênio são formadas dentro e entre os

monômeros. A força motriz das mudanças drásticas de conformação na montagem seria fornecida pela entalpia favorável destas ligações de hidrogênio (YAMASHITA et al., 2014).

FIGURA 2. Modelo proposto para a formação do poro da γ -toxina.



Fonte: Adaptado de YAMASHITA et al., 2014. (Etapa I), cada PFT é secretada como monômero solúvel em água. Os dois componentes Hlg2 e LukF formam um dímero na superfície celular. Ao liberar a região N-amino terminal ("trava") localizada ao lado do domínio copal, ocorre às interações entre os monômeros (Etapa II). Liberação da região pré-troncular (Etapa III). Formação do pré-poro octamérico (Etapa IV). Formação do Poro Transmembrana (Etapa V).

2.2.3 Nanoporo proteico da alfatoxina como elemento de reconhecimento molecular

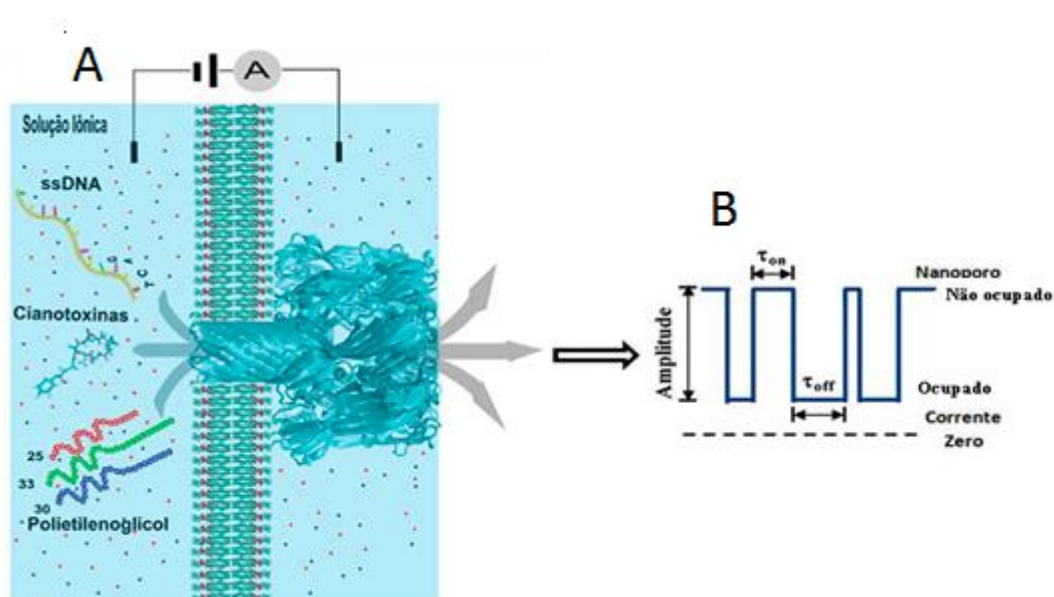
O princípio de funcionamento do biossensor estocástico baseado no nanoporo proteico unitário formado pela alfatoxina consiste essencialmente na interação de cada molécula individual do analito (ssDNA, cianotoxinas, polietilenoglicol, por exemplo) com um único nanoporo (KASIANOWICZ et al., 2007; AGUIAR et al., 2015).

Quando um potencial elétrico é aplicado através da membrana com um único nanoporo incorporado (**Figura 3A**), 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 (**Figura 3B**). O

resultado de cada interação se reflete na variação temporária (bloqueio parcial) da corrente iônica que passa através do nanoporo como representado na **figura 3B**.

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, como pode ser observado na **figura 3B**. 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 (WANG et al., 2013). Os intervalos de tempo de duração dos bloqueios diferem entre si, e podem ser descritos estatisticamente por uma distribuição exponencial.

FIGURA 3. Modelo esquemático do funcionamento do nanoporo de alfatoxina como biossensor.



Fonte: AGUIAR et al., 2015. A interação dos analitos com um único nanoporo em uma bicamada lipídica plana banhada por solução iônica induz uma modulação (bloqueio parcial) da corrente iônica.

Dessa forma, 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 ($[C]$) do analito. A partir deste coeficiente e da constante de associação (K_{on}) analito- -nanoporo, obtemos: $f = K_{on}[C]$ (CHELEY et al., 2002; GU, SHIM, 2010). A partir destas informações é possível calcular a constante de associação e a constante de dissociação do analito-nanoporo e o valor das suas energias de interação aparente com o nanoporo, usando a seguinte expressão $\Delta G^{app} \approx kT \ln K^{app}$.

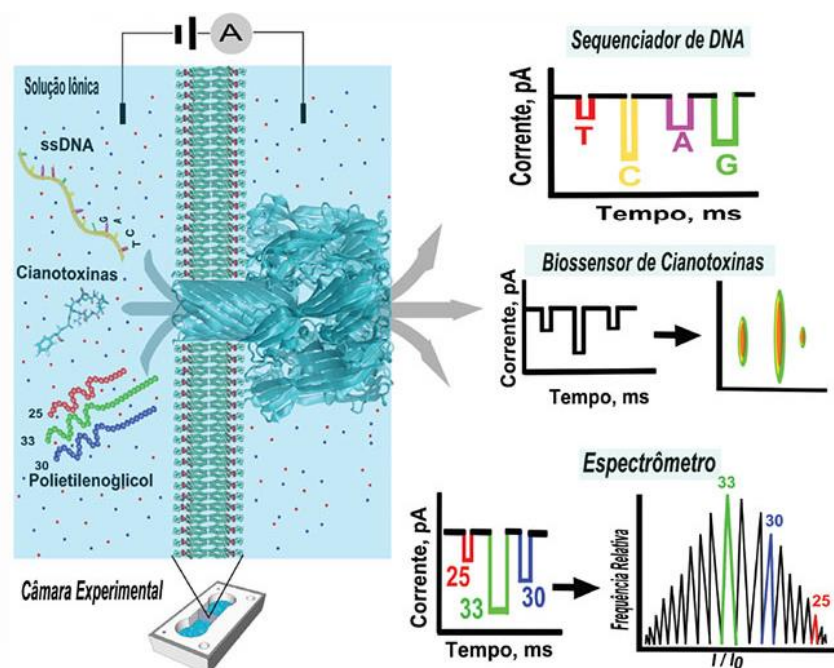
Demonstra-se então, que a cinética entre o estado ocupado (presença do analito) e não ocupado (ausência do analito) no nanoporo evidenciado experimentalmente pelas flutuações discretas no registro da corrente iônica fornece informações relevantes que permitem quantificar e identificar o analito (KASIANOWICZ et al., 2008).

2.2.4 Aplicações do nanoporo da alfatoxina

A tecnologia de detecção estocástica baseada em nanoporos é uma abordagem nova e promissora no desenvolvimento de dispositivos analíticos: espectrômetros de massa, biossensores e sequenciadores moleculares (**Figura 4**) (KASIANOWICZ, 2012.; WU et al, 2014.; AGUIAR et al, 2015).

Além disso, o nanoporo têm-se mostrado, principalmente, do ponto de vista acadêmico, como ferramenta molecular capaz de quantificar, detectar e caracterizar uma grande variedade de moléculas, desde as mais simples, como íons (JAYAWARDHANA et al., 2009), enantiômeros (KANG et al., 2006), armas químicas (LIU et al., 2010), cianotoxinas (PAT WO2013026123, 2013) até as mais complexas como polímeros naturais (DNA) (CLARK et al., 2009; QUICK et al., 2016) ou sintéticos (PEG) (ROBERTSON et al., 2007); Especificamente em relação aos polímeros e o processo de interação destes com o nanoporo consistir no objetivo principal deste trabalho, abordar-se-á este tema de maneira mais detalhada no item 1.1.5.

FIGURA 4. Alfatoxina como protótipo de um nanoporo proteico unitário para a detecção, quantificação e caracterização de moléculas em sistemas aquosos.



Fonte: AGUIAR et al., 2015. Nanoporo da alfatoxina como sequenciador de DNA, como biossensor de cianotoxinas e como espectrômetro de massas. Representação esquemática do padrão de bloqueios na corrente iônica através do nanoporo da alfatoxina durante a translocação desses analitos. 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, no caso do DNA; pelo tamanho no caso das cianotoxinas; E pelo espectro de massas no caso do polietilenoglicol.

Monitoração de cianotoxinas na água

Uma das aplicações mais recentes foi à 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 90 diferentes variantes estruturais de microcistinas, mas, todas apresentam alguns aminoácidos na configuração D, ausente nas proteínas presentes no organismo humano (SHENG et al., 2012). 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 (SINGH, 2012). 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. Este método é dotado de elevada sensibilidade, possibilitando o monitoramento dessas moléculas em tempo real (PAT WO2013026123, 2013).

Sequenciador de ácido desoxirribonucleico

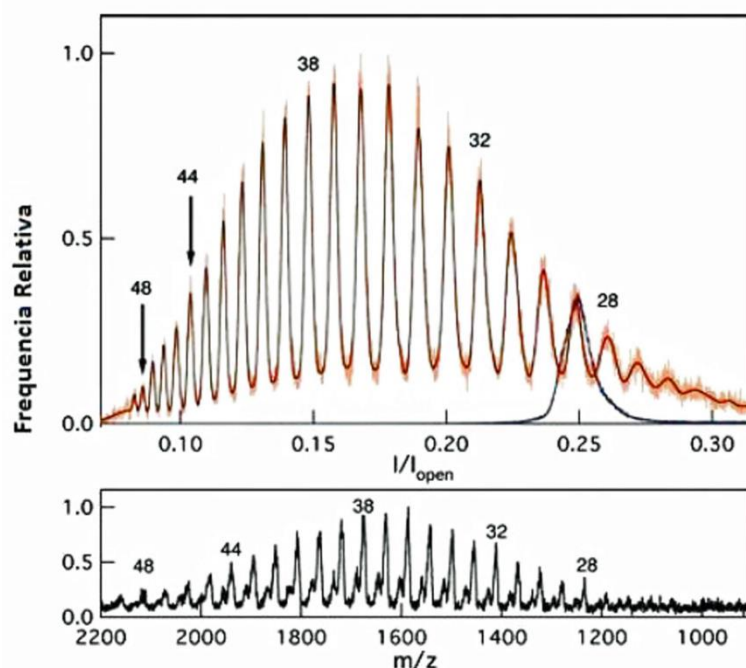
O uso de nanoporos para o sequenciamento de biopolímeros foi proposto há mais de uma década, com a primeira demonstração experimental da translocação de ácido desoxirribonucleico de fita simples (ss-DNA) através do nanoporo proteico da alfatoxina (KASIANOWICZ et al., 1996). Uma vantagem importante dessa 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 (BRANTON et al., 2008; ERVIN et al., 2014). A tecnologia de detecção baseada em nanoporo possibilita um sequenciamento de ácidos nucleicos, com maior rapidez de análise e sem a necessidade de marcação ou amplificação do DNA (CLARKE et al., 2009; DEAMER, 2010; MAGLIA et al., 2010). 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 está esquematicamente representado na **Figura 4**.

Significativos avanços na aplicação de nanoporos proteicos no desenvolvimento de sequenciadores de DNA ocorreram nos últimos seis anos, devido principalmente ao incentivo dado pelo financiamento da União Européia ao projeto intitulado “Dispositivos e Abordagens Revolucionárias para Ácidos Nucleicos” (The Revolutionary Approaches and Devices for Nucleic Acid - READNA). Esse projeto teve 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 (RINCON-RESTREPO et al., 2011). O nanoporo da alfatoxina preencheu esses requisitos e se tornou a plataforma de sequenciamento de terceira

geração produzida pela Oxford Nanopore Technologies (Disponível em: <http://www.nanoporetech.com>. Acesso em fevereiro de 2018). Nos últimos anos, essa plataforma foi utilizada no sequenciamento do vírus ebola na África Ocidental por Quick e colaboradores em fevereiro de 2016 (QUICK et al., 2016).

Espectrômetro de massa para homopolímeros

A determinação da massa, tamanho e concentração de moléculas em amostras é de grande interesse científico e tecnológico (CUNHA, MARIANA, FONTES, 2006; ABDELNUR, 2010). A principal técnica padrão para determinação da massa de moléculas é a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) (KARAS, HILLENKAMP, 1988; SARAIVA, 2008). Esta técnica, apesar de amplamente empregada, apresenta o inconveniente de ser um ensaio destrutivo e não permitir a análise em meio líquido (MACHADO, 2014). Graças aos estudos que demonstram maior sensibilidade do nanoporo da alfatoxina em soluções eletrolíticas com valor de concentração de aproximadamente 4 mol L^{-1} (KRASILNIKOV et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008), foi possível pioneiramente utilizar este nanoporo como espectrômetro de massa para o polietilenoglicol (PEG) (**Figura 5**). Foram analisadas amostras polidispersas de PEG 1500 e também amostras monodispersas de PEG 1294 (ROBERTSON et al., 2007; STANFORD et al., 2010). Demonstrou-se uma boa correlação entre os espectrogramas obtidos com o nanoporo da alfatoxina e pela técnica do MALDI como visto na **Figura 5**, 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.

FIGURA 5. Nanoporo da alfatoxina como espectrômetro de massas.

Fonte: Adaptado de ROBERTSON et al., 2007. Espectro de massa (superior) para o polietilenoglicol (PEG 1500, $M_r=1500$ 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.

2.2.5 Limitações e estratégias de melhorias do nanoporo proteico da alfatoxina

Similarmente a outras metodologias e técnicas analíticas algumas limitações podem dificultar o desenvolvimento de dispositivos comerciais baseados no biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual. São três as mais relevantes limitações:

- 1- A reprodutibilidade e estabilidade das membranas lipídicas artificiais.

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 poliméricas ultrafinas, que podem ser de Teflon® (RHEE, BURNS, 2007; WANG, YING, LONG, 2010) que facilitam a montagem de membranas de lipídeos

sintéticos com elevada reprodutibilidade (MONTAL & MUELLER, 1972) e tem boas propriedades elétricas (alta resistividade e baixa constante dielétrica); ou podem ainda ser suportadas em elastômero de silicone polidimetilsiloxano (PDMS) (SHIM, GU, 2007) ou em folhas de parileno (SUZUKI, PIOUSFLE, TAKEUHEI, 2009) que também são polímeros estáveis. 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 outro lado, melhorias consideráveis na durabilidade da membrana já foram relatadas (SHIM & GU, 2007). Em 2007, 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 (SHIM & GU, 2007). 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 e funcional com o nanoporo incorporado.

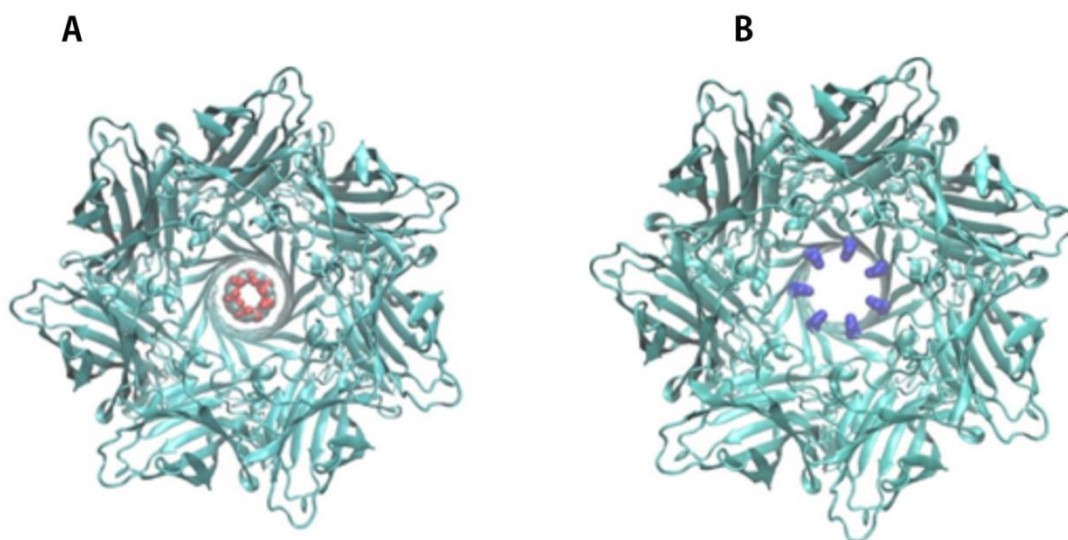
2- A detecção de moléculas de tamanhos muito diferentes do diâmetro do nanoporo.

A razão entre o valor do diâmetro da molécula do analito e o valor do diâmetro do nanoporo deve permanecer maior que 0,1 e menor que 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 (KASIANOWICZ et al., 2008). 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.

Por outro lado, há estudos que utilizam adaptadores moleculares introduzidos no lume do poro formado da α -HL tornando ainda mais estreita a constrição presente no interior do nanoporo, 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). Um exemplo desses adaptadores é a β -ciclodextrina (**Figura 6A**).

FIGURA 6. Exemplos de nanoporos da alfatoxina adaptados.



Fonte: PDB código 3M3R. Exemplo de nanoporo da alfatoxina adaptado: Poro contendo uma β -ciclodextrina como adaptador molecular próximo à região de constrição. (B) poro geneticamente modificado. Os resíduos dos aminoácidos são inseridos próximo à região mais estreita do poro (resíduos em azul).

3. Alta velocidade de translocação através do nanoporo, principalmente de moléculas poliméricas com carga residual.

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 ou a caracterização polimérica. O caso mais emblemático é o heteropolímero constituído por adenina, timina, citosina e guanina, ou seja, o ácido desoxirribonucléico (DNA) (VOET & VOET, 2004; MARTIN, 2011). 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 (FULLER et al., 2016).

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 μ s por base (MUTHUKUMA, 2007). 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 viável para o sequenciamento de DNA (KAWANO et al., 2009.; DING et al., 2010).

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 (ROTEM et al., 2012). 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 6B** (BANERJEE et al., 2010; MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012).

Técnicas de mutagênese sítio específicas foram realizadas para introdução de D-aminoácidos não encontrados nos mamíferos superiores (MOHAMMAD & MOVILEANU, 2012). 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 (BANERJEE et al., 2010).

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 (MAITRA et al., 2012; ZHAO et al., 2009). Zhao e

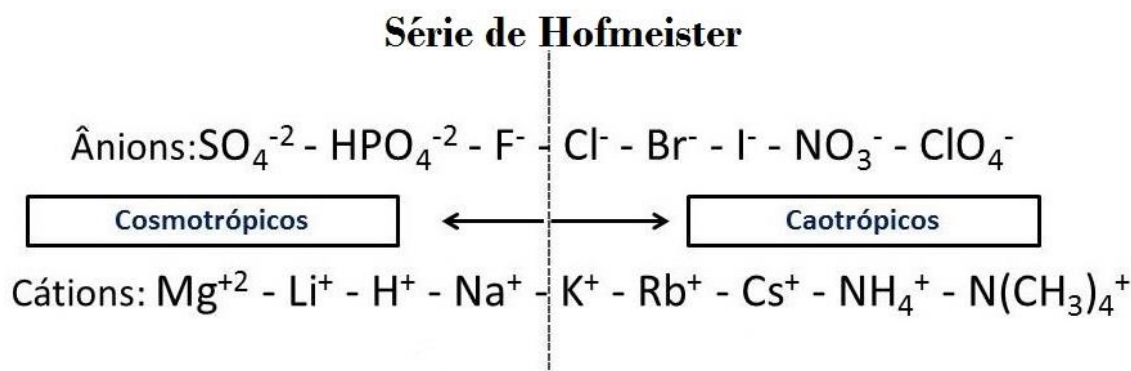
colaboradores demonstraram, em 2009, que nanoporos modificados com resíduos aromáticos apresentam uma maior afinidade de interação na detecção de peptídeos curtos (sequência variando de 2 a 11 aminoácidos), incluindo aqueles que diferem em apenas um aminoácido (ZHAO et al., 2009).

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 (TAVARES, 2004; JONES, ATKINS, 2012). Assim sendo, as alterações na condutividade, viscosidade e grau de estruturação da água da solução banhante do nanoporo da alfatoxina, devido a sais da série de Hofmeister ou líquidos iônicos, influenciam na intensidade da interação entre o analito e o nanoporo, possibilitando a sintonização da sensibilidade deste elemento sensor (COLLINS, 1995; KRASILNIKOV et al., 2006; JAYAWARDHANA, 2010).

2.2.6 Sais da série de Hofmeister

A série de Hofmeister ou série liotrópica é constituída por sais que podem ser divididos em duas classes, caotrópicos (fracamente hidratado) e cosmotrópicos, (fortemente hidratado) em função de sua capacidade de organizar as moléculas de água ao redor do íon (**Figura 7**) (HOFMEISTER, 1888).

FIGURA 7. Sequência dos ânions e cátions da Série de Hofmeister



Fonte: Adaptado de ZHANG, CREMER, 2006 e YANG, 2009.

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.

Quando um íon é adicionado a um dado volume de água, ele liga-se às moléculas mais próximas do solvente e 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 ao contrário interagem com a água mais fracamente do que às moléculas de água entre si (LO NOSTRO et al., 2006).

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 (SCHWIERZ et al., 2010). Os íons caotrópicos são responsáveis pelo efeito salting-in, uma vez que causam desestruturação na organização das moléculas de água (LO NOSTRO & NINHAM, 2012).

Os efeitos específicos dos íons dessa série são observados em várias situações como na estabilidade de proteínas (COLLINS, 2006) interações proteína-proteína, cristalização de proteínas (NISHIMURA et al. 1999), atividade enzimática (ZHANG & CREMER, 2006), desnaturação de macromoléculas biológicas (LO NOSTRO et al., 2006) e crescimento bacteriano (PEGGRAM et al., 2007). Os 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; LO NOSTRO & NINHAM, 2012).

Além disso, os efeitos específicos dos íons também são observados em outros fenômenos físico-químicos como tensão superficial (PEGGRAM & RECORD, 2007) concentração micelar crítica (LÓPEZ et al., 2005; WANG & SATOH, 2009), e estabilidade coloidal (LÓPEZ-LÉON et al., 2005). 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 (GRIGORJEV, BEZRUKOV, 1994; JENKINS, MARCUS, 1995; COLLINS, 1997; COLLINS, 2004; LO NOSTRO & NINHAM, 2012).

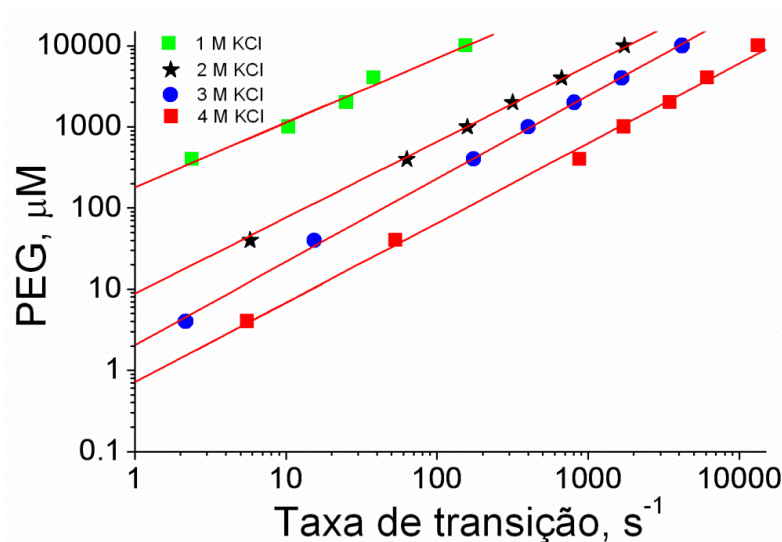
Um dos primeiros estudos para verificar a influência dos íons de Hofmeister nas propriedades dos canais iônicos foi realizado por Grigorjev e Bezrukov em 1994 (GRIGORJEV & BEZRUKOV, 1994). Os efeitos de Hofmeister devem ser perceptíveis nos casos em que as dimensões do nanoporo se aproximam ao valor do diâmetro do íon a ser transportado como, por exemplo, os canais de K^+ dependentes de voltagem (COLLINS, 2006). Nesse estudo, foi avaliada a influência dos íons halogênicos (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 (LÓPEZ et al., 2005). 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 (GURNEV et al. 2009; MACHADO, 2014).

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 (KANG et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008; MULERO et al., 2010; MACHADO et al., 2016). Dentre eles, Rodrigues 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 (**Figura 8**) (RODRIGUES et al., 2008).

Nesse estudo, estabeleceu-se uma forte correlação entre o aumento da concentração de um mesmo sal com o nível de sensibilidade do nanoporo em relação à detecção do polietilenoglicol (PEG). Como demonstrado na determinação do limite de detecção representado na **Figura 9**, como o ponto de intersecção no eixo y,

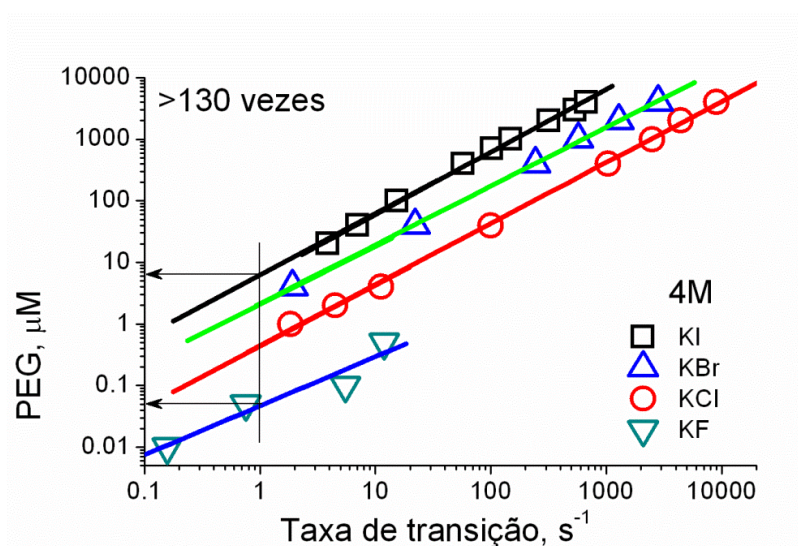
referente a menor concentração de PEG detectada pelo nanoporo em cada uma das concentrações analisadas.

FIGURA 8. Gráfico que relaciona o limite de detecção versus concentração do KCl em molar (M) com as concentrações de PEG (2000).



Fonte: Adaptado de RODRIGUES et al., 2008. Os menores valores de detecção do PEG (2000) ocorrem quando utilizado o KCl como solução banhante em concentração de 4M.

FIGURA 9. Gráfico que relaciona o limite de detecção versus concentração do 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 igual 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).

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 (RODRIGUES et al., 2011).

Recentemente, Machado e colaboradores demonstraram que os cátions alcalinos e amônio também exercem influência em ambas as constantes de velocidade da interação do PEG com o nanoporo da α HL. Estas constantes foram alteradas e conseqüentemente a sensibilidade do sensor mudou de acordo com o tipo de sal (MACHADO et al., 2016). 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, também para outros polímeros, inclusive de maior complexidade estrutural.

2.3 MECANISMOS DE TRANSLOCAÇÃO DE POLÍMEROS ATRAVÉS DE NANOPOROS

Polímeros são macromoléculas que consistem em subunidades repetidas chamadas monômeros. Polímeros como DNA e proteínas são blocos de construção fundamentais da vida. Muitos processos em biologia envolvem o transporte de biopolímeros através de canais incorporados nas membranas citoplasmáticas ou nuclear da célula (FENG et al., 2011; MOISIO, 2014). Exemplos incluem transferência de genes por transdução, troca de genes através de pili bacteriano, transporte de RNA e fator de transcrição através de complexos de poros nucleares e a captação de oligonucleotídeos por algumas proteínas da membrana (MUTHUKUMAR, 2000; LUO et al., 2017; MURPHY, MUTHUKUMAR, 2017). Além disso, outra razão para despertar tal interesse é que a translocação de polímeros ou biomoléculas através de nanoporos tem grande potencial de aplicação em medicina, principalmente, no rápido sequenciamento de DNA, terapia gênica, análise de estrutura protéica e controle em sistema de entrega de fármaco (MARKOSYAN, 2014; MAITZ, 2015). Uma variedade de diferentes polímeros sintéticos de alto peso molecular está sendo amplamente aplicada para essa finalidade (MAITZ, 2015).

As regras físicas que governam a dinâmica dos biopolímeros dentro desses canais são até hoje desconhecidas, e o estudo da dinâmica dos polímeros continua sendo um campo importante e fascinante (PALYULIN et al., 2014). Assim, entender a dinâmica dos polímeros é fundamental para entender uma ampla gama de fenômenos biológicos (MOISIO, 2014). Para um poro suficientemente estreito, a longa cadeia polimérica pode apenas espremer-se através do orifício, um monômero de cada vez (MUTHUKUMAR et al., 2001; MUTHUKUMAR, 2007).

A translocação é um processo em que um polímero passa de uma câmara para outra através de um orifício estreito na parede (BAYLEY, CREMER, 2001; MELLER, BRANTON, 2002; MUTHUKUMAR, 2007; DEAMER, 2010; GURNEV, NESTOROVICH, 2014). Como a translocação do polímero é um processo microscópico e as escalas de tempo envolvidas são da ordem de milissegundos, portanto, a observação direta de uma translocação *in vitro* é difícil (MOISIO, 2014).

A translocação de polímeros através de nanoporos foi primeiro estudada experimentalmente por Bezrukov, Vodyanoy e Parsegian em 1994 e por de Kasianowicz em 1996. Kasianowicz e colaboradores conduziram moléculas de RNA e DNA de filamento único através do nanoporo de α HL em uma membrana lipídica usando um campo elétrico. Em seu trabalho, a detecção da translocação baseou-se na medição da corrente iônica através do nanoporo. Enquanto o polímero permanece no poro, ele bloqueia a corrente. Medindo a duração do bloqueio, eles foram capazes de inferir os tempos de translocação. Técnicas semelhantes foram, posteriormente, utilizadas em estudos experimentais de translocação de polímeros (MELLER et al., 2000; MAGLIA et al., 2008; DING et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011; MACHADO et al., 2016).

A dinâmica de transporte de polímeros através de poros de tamanho nanométrico ("nanoporos") é de interesse fundamental para física, química, biologia e medicina. Como o diâmetro desses canais não é muito maior do que os polímeros que passam por eles, a dinâmica de transporte nessas pequenas constricções é o resultado de vários fatores, incluindo interações estéricas, hidrodinâmicas e eletrostáticas (LUBENSKY, NELSON, 1999; DEAMER, BRANTON, 2002; STORM et al., 2005; MUTHUKUMAR, 2011).

A maioria dos artigos sobre transporte de polímeros se concentra no contexto experimental (DEKKER, 2007; BRANTON et al., 2008; GU et al., 2012; WANUNU,

2012; VENKATESAN, BASHIR, 2011). E as abordagens teóricas e de simulação se concentram em simulações computacionais do fenômeno do bloqueio da corrente iônica (AKSIMENTIEV, 2010), ou principalmente resumem o comportamento do polímero translocado (MUTHUKUMAR, 2011; PALYULIN et al., 2014).

Abordagens iniciais para explicar a translocação do polímero e especialmente prever o tempo de translocação em função do número (N) de monômeros do polímero foram baseadas em conceitos de barreira entrópica e de mecânica estatística de equilíbrio (MUTHUKUMAR, 1999; MUTHUKUMAR, 2001). Tais abordagens ainda são usadas em estudos teóricos contemporâneos (PALYULIN, 2014).

Considerando uma abordagem de quase-equilíbrio para a transferência do polímero é possível entender alguns dos fenômenos envolvidos na translocação como: a influência da sequência e rigidez da cadeia, os efeitos de carga, força motriz, forma e qualidade do solvente e as interações dos polímeros com o poro. Teoricamente e especialmente por meio de simulações extensivas, pode-se mostrar que o processo de translocação do polímero - mesmo no limite de longas cadeias de translocação - não é caracterizado por poucas leis de escala universais. Em vez disso, certos detalhes podem influenciar fortemente a dinâmica de translocação específica (MUTHUKUMAR, 2011).

Segundo os estudos experimentais, o processo aparentemente simples de passar um polímero por um poro estreito é bastante complexo e altamente estocástico. Em geral, uma molécula individual do polímero pode passar através do poro em conformações esticadas ou dobradas, dependendo da proporção do diâmetro do poro e da espessura do esqueleto do polímero (LI et al., 2003; WONG, MUTHUKUMAR, 2010).

Os principais conceitos básicos sobre os polímeros e que são relevantes para o entendimento do processo de translocação são (MUTHUKUMAR, 2007; MUTHUKUMAR, 2011):

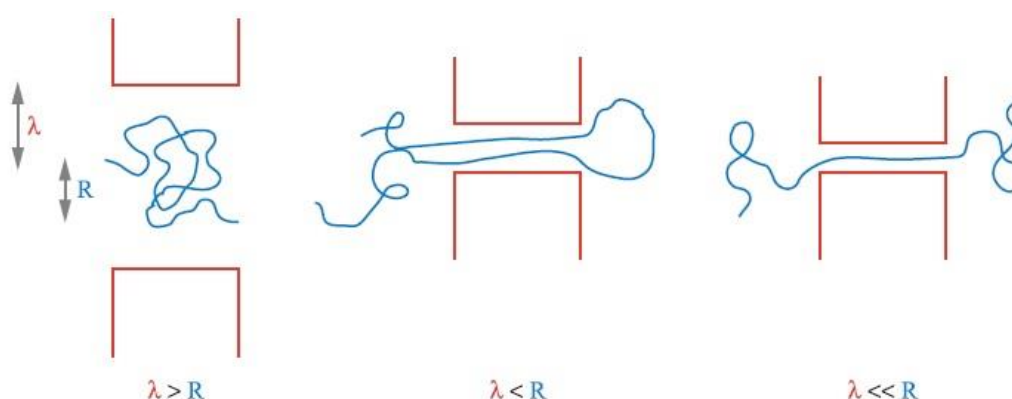
- A entropia conformacional (S) de uma molécula é alta devido à capacidade da molécula adotar um enorme número de conformações (N). O valor real de N depende das várias interações potenciais entre os monômeros constituintes das moléculas e a natureza do meio.

- Os contra-íons do polímero se organizam em torno da estrutura do polímero e podem reduzir significativamente o potencial eletrostático efetivo local e a carga efetiva do polímero.

A mobilidade de um polímero, sob um campo elétrico constante em soluções salinas diluídas é independente do seu comprimento. Esta notável característica é o resultado do equilíbrio entre o arrasto hidrodinâmico do polímero e as forças opostas do contra-íon.

O transporte de moléculas poliméricas pode ser amplamente classificado em três regimes de confinamento com base na razão entre o raio de giro (R) do polímero e o raio (λ) do poro (**Figura 10**). O estreitamento do poro reduz significativamente a entropia conformacional que, por sua vez, forma a base do mecanismo de transporte (MUTHUKUMAR, 2007).

FIGURA 10. Diferentes regimes de confinamento de polímeros pelo poro



Fonte: Retirado de Muthukumar, 2007. Raio de giro (R) do polímero e o raio (λ) do poro.

Quando um polímero é forçado através de um poro estreito, a molécula é submetida a uma barreira entrópica (DAOUD, DEGENNES, 1977; DIMARZIO, MANDELL, 1997; MUTHUKUMAR, 1999; MUTHUKUMAR, 2001, MUTHUKUMAR, 2002; KONG, MUTHUKUMAR, 2004). A dinâmica do polímero submetido a essa barreira entrópica constitui o conceito central da translocação de polímeros através dos nanoporos.

Uma das propriedades inerentes de uma cadeia polimérica flexível isolada em soluções é a sua capacidade de assumir um grande número de conformações (N).

Como resultado, a entropia da cadeia ($k_B \ln N$; k_B é a constante de Boltzmann) pode ser alta, e sua energia livre F é dada por $F = E - TS = E - k_B T$ (MUTHUKUMAR, 2007).

Onde E é a energia de interação entre os monômeros e as moléculas de solvente circundantes e T é a temperatura absoluta. Pode haver contribuições entrópicas adicionais para F devido a uma reorganização das moléculas de solvente que acompanham as mudanças conformacionais da cadeia. Quando tal cadeia é exposta a um ambiente confinado, como poros, o número de conformações que podem ser assumidas pela cadeia é reduzido e, como resultado, a entropia da cadeia diminui e a energia livre da cadeia aumenta. Este efeito é mostrado na **Figura 11** (MUTHUKUMAR, 2001; MUTHUKUMAR, 2007).

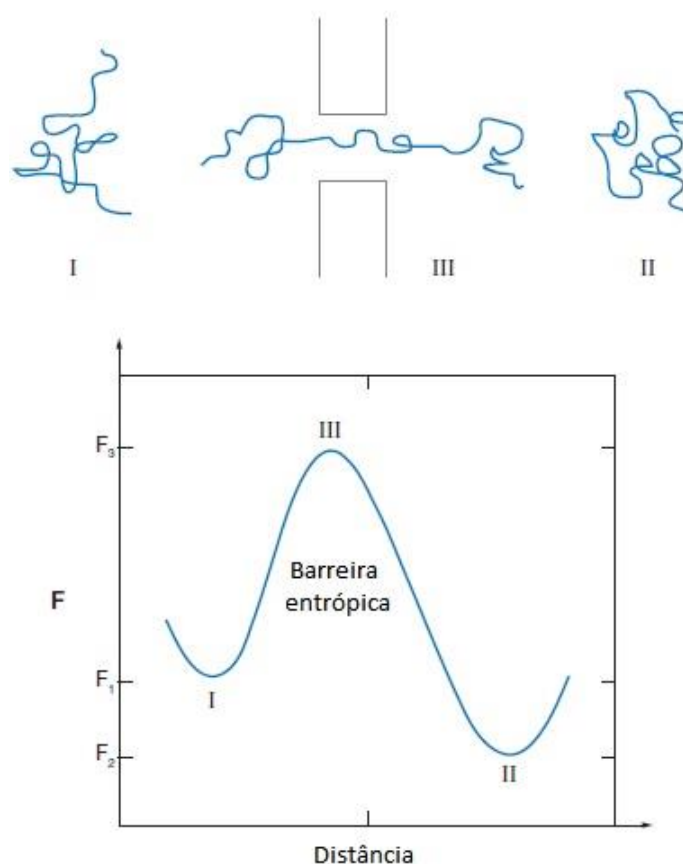
F_1 , F_2 e F_3 são as energias livres da cadeia nas regiões I, II e III, respectivamente. Devido à redução das conformações na região III, F_3 é maior que F_1 e F_2 . Chamamos de $F_3 - F_1$ a barreira entrópica à passagem do polímero para fora da região I. Embora essa barreira seja chamada de barreira entrópica, ela é de fato uma barreira de energia livre, porque contribuições entálpicas adicionais para F_3 podem surgir das interações entre o polímero e o poro. Em geral, o ambiente da cadeia na região II pode ser diferente daquele da região I, devido a diferentes potenciais eletroquímicos nessas regiões, de modo que F_2 não é necessariamente igual a F_1 . O potencial resultante para transporte de polímero da região I para a região II é ($F_1 - F_2$). A cadeia polimérica deve sobrepor a barreira entrópica para que chegue com sucesso ao lado oposto do poro (MUTHUKUMAR, 2001; MUTHUKUMAR, 2007).

A captura de um polímero depende principalmente da concentração de macromoléculas na solução eletrolítica, da tensão de polarização e da concentração salina (KRASILNIKOV et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008). Para cadeias longas e diluídas, essa probabilidade torna-se muito pequena. Assim, os efeitos do gradiente de campo hidrodinâmico e elétrico desempenham um papel essencial. Em conjunto com a difusão, esses efeitos levam à captura bem-sucedida da cadeia no poro (MUTHUKUMAR, 2011).

Uma força dieletroforética resultante atua sobre o polímero, o que causa a captura do polímero e o bloqueio da corrente iônica, superando fatores entrópicos. Muito provavelmente, o arrasto hidrodinâmico na seção do polímero fora do poro é a força dominante que contrabalança a força motriz elétrica. O equilíbrio entre as duas

forças dominantes determina a dinâmica de translocação de uma molécula de polímero através de um nanoporo: uma força motriz que puxa localmente o polímero através do poro e uma força de arraste viscosa que atua em toda a superfície do polímero (STORM et al., 2005).

FIGURA 11. Gênese da barreira entrópica para o transporte de polímeros através de nanoporos



Fonte: Retirado de Muthukumar, 2007.

Quando o polímero está no poro, o campo elétrico o impulsiona ainda mais. O polímero pode escapar do poro apenas quando as flutuações térmicas experimentadas por ele são grandes o suficiente para superar a barreira devido à combinação do campo elétrico aplicado ou as cargas do polímero. Essa barreira energética aumenta com o campo elétrico, então quanto maior o potencial aplicado, maior o tempo médio de permanência (ASANDEI et al., 2015; GROSBURG, RABIN, 2010).

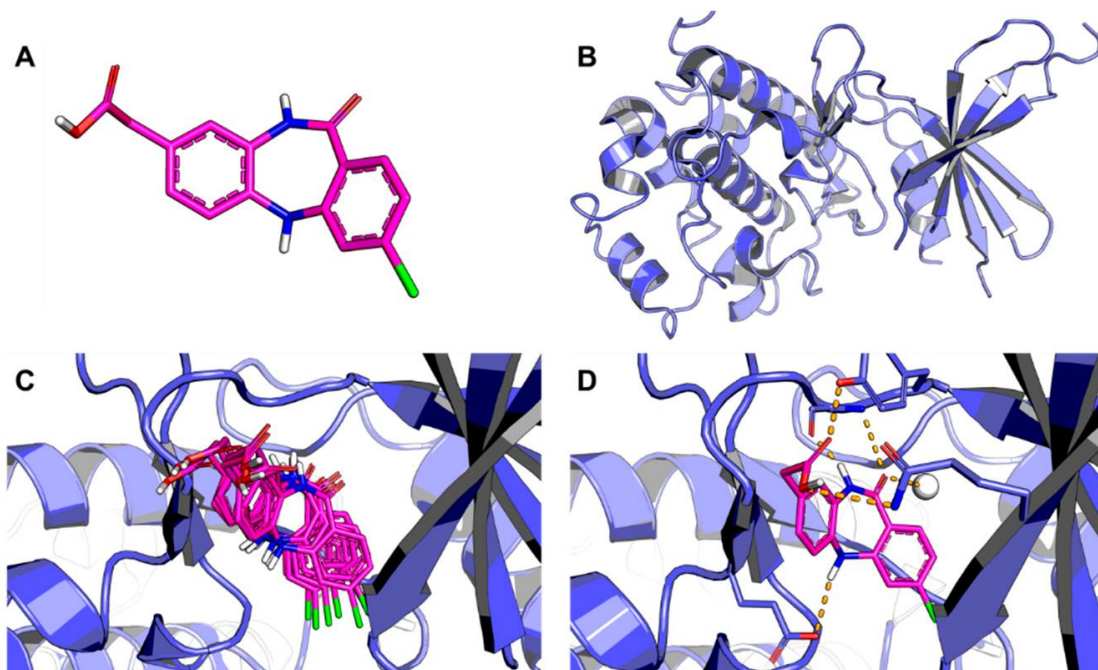
Assumindo que o tempo de translocação é muito maior do que o tempo de relaxação do polímero, a translocação do polímero pode ser tratada como um processo de quase-equilíbrio e a energia livre da translocação pode ser obtida por diferentes métodos. Com base na energia livre, o tempo de translocação pode ser derivado da equação de Fokker-Planck. Para simplificar, o coeficiente de difusão D do polímero, que está envolvido na equação de Fokker-Planck, é geralmente considerado constante durante a translocação (LUO et al., 2017).

Ao longo dos anos, está sendo feito um grande esforço para descobrir a dependência do tempo de translocação (τ) dos parâmetros do sistema, como comprimento da cadeia polimérica, comprimento L e largura do poro W , sequência, estrutura secundária e interações polímero-poros (LUBENSKY, NELSON, 1999; MELLER, NIVON, BRANTON, 2001; LUO, ALA-NISSILA, YING, 2003; LUO et al., 2009). Neste contexto experimentos, simulações e abordagens teóricas ainda irão contribuir com novas descobertas enquanto nenhum consenso universal sobre o tema seja elucidado.

2.4 ANCORAGEM MOLECULAR

A metodologia de ancoragem molecular (docking molecular) é uma técnica computacional utilizada para calcular as interações atômicas entre diferentes conformações de um ligante e uma macromolécula visando obter as conformações de menor energia para o complexo macromolécula-ligante como mostrado no modelo da **Figura 12** (GUEDES et al., 2014; FERREIRA et al., 2015). De modo geral, é um método que prevê a orientação preferencial de uma molécula a uma segunda, quando ligados entre si para formar um complexo estável (LENGAUER, RAREY, 1996). O conhecimento da orientação preferida por sua vez, pode ser utilizado para prever a força de associação ou a afinidade de ligação entre duas moléculas (KITCHEN, 2004).

As ferramentas básicas de uma metodologia de ancoragem incluem um algoritmo de busca e uma pontuação de energia (funções de ranqueamento, scoring) para gerar e avaliar as conformações mais prováveis do ligante na região alvo do receptor (JAIN, NICHOLLS 2008; KOLB, IRWIN 2009; KOKH et al. 2011; FORREY et al. 2012).

FIGURA 12. Esquema do processo de docking molecular.

Fonte: Ferreira et al., 2015. (A) a estrutura tridimensional do ligante; (B) a estrutura tridimensional do receptor; (C) O ligante está encaixado no interior da cavidade do receptor e as conformações possíveis são exploradas; (D) A conformação mais provável de ligação e as interações intermoleculares correspondentes são identificadas.

Os primeiros algoritmos começaram a ser desenvolvidos no início da década de 80, com o trabalho de Kuntz e colaboradores, e seu desenvolvimento permanece até hoje constituindo uma área de pesquisa altamente ativa (FERREIRA et al., 2015). São vários os algoritmos e eles se diferenciam em relação a: 1- função de avaliação utilizada; 2- grau de flexibilidade das moléculas biológicas interagentes; e 3- método de busca empregado. Os primeiros algoritmos/programas de docking tratavam tanto o receptor quanto o ligante como moléculas rígidas, considerando apenas os graus de liberdade translacionais e rotacionais da molécula ligante (algoritmos de docking rígido) (KROVAT, STEINDL, LANGER, 2005). Esses algoritmos estão longe de representar a realidade e, por serem mais rápidos, são utilizados atualmente na triagem de grandes bibliotecas de ligantes para identificação de compostos bioativos, visando a posterior reinvestigação dos mesmos com técnicas de ancoragem mais acuradas. Mais recentemente, a maioria dos programas inclui a flexibilidade do ligante, considerando além dos graus de liberdade translacionais e rotacionais, os graus de liberdade conformacionais (algoritmo de docking flexível, ou seja, a

conformação da macromolécula é tratada como invariável enquanto que a conformação do ligante no sítio ativo da macromolécula é amostrada durante o cálculo (ZSOLDOS et al., 2007; YURIEV et al., 2011).

As interações intra e intermoleculares que estão envolvidas no processo de reconhecimento molecular receptor-ligante, como por exemplo, as interações de van der Waals, as interações eletrostáticas e a formação das ligações de hidrogênio são importantes para a estabilização dos complexos biomoleculares (PAULING, DELBRUCK, 1949; MAGALHÃES, 2006). O solvente também possui um papel importante nessas interações, uma vez que, moléculas de água podem mediar a formação das ligações de hidrogênio entre o ligante e a molécula receptora (POORNIMA, DEAN, 1995).

De modo geral, o processo de reconhecimento molecular receptor-ligante é dirigido por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos (BROOIJMANS, KUNTZ, 2003). Estes efeitos podem ser estimados através da energia livre de Gibbs (ΔG_{lig}), dada pela Equação 1.

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S \text{ (Eq.1)}$$

Onde ΔH é a variação de entalpia, T é a temperatura e ΔS é variação de entropia. A energia livre de ligação de Gibbs é uma quantidade experimental que pode ser obtida através de métodos teóricos (TEMBE, MCCAMMON, 1984).

O objetivo do cálculo da energia livre de ligação é a obtenção de uma estimativa acurada das constantes de inibição observadas experimentalmente (KOLLMAN, 1993; MAGALHÃES, 2006, GUEDES et al., 2014). Nos algoritmos de ancoragem molecular são utilizados dois componentes para avaliar a energia de interação de cada conformação do ligante ao receptor (macromolécula), um método para amostragem do espaço conformacional acessível ao sistema e uma função de energia, associada a um campo de força (STRYNADKA et al, 1996; GUEDES et al. 2014).

Nesse contexto, cálculos de ancoragem molecular podem ser utilizados para identificar o modo de ligação dos polímeros com a região de constrição do nanoporo da alfatoxina. Pois, tem a capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, funcionando até como uma forma de validação dos mesmos (SILVA, 2007).

2.5 POLÍMEROS

2.5.1 Definição e classificação

De maneira geral, polímero é qualquer material orgânico ou inorgânico, sintético ou natural, que tenha um alto peso molecular e unidades estruturais repetitivas normalmente de baixo peso molecular (MANRICH, 2005; PASSATORE, 2013).

A palavra POLÍMERO vem do grego *Poli*, cujo significado é muito, e *Mero*, que quer dizer “parte” ou “unidade”. Os meros (que são monômêros), para formarem um polímero, são ligados entre si através de ligações covalentes do tipo *sp*³ (13C-12C; 13C-13C; 14C-12C;...). Este tipo de ligação favorece uma grande estabilidade físico-química, formando longas cadeias, resultando em compostos de alta massa molecular (SILVA & SILVA, 2003; PASSATORE, 2013).

Quando existem tipos diferentes de meros na composição do polímero, este é designado copolímero. No entanto, se existirem três meros formando o polímero, pode-se chamá-lo de terpolímero. Já os polímeros que possuem somente um tipo de mero, podem ser chamados de homopolímeros (NOGUEIRA et al., 2000). Os polímeros podem ser classificados como polímeros sintéticos e polímeros naturais, e são frequentemente caracterizados por suas funções mais típicas, nomeadamente a sua alta resistividade mecânica, condutividade elétrica e propriedades dielétricas (BIBI et al., 2016).

Os polímeros naturais existentes foram exhaustivamente estudados até que as informações a cerca da sua arquitetura molecular e suas propriedades fossem compreendidas. São também chamados de biopolímeros por serem produzidos por seres vivos como, por exemplo: o látex (borracha); os polissacarídeos, como celulose, amido e glicogênio; as proteínas e as moléculas de DNA e RNA (BIBI et al., 2016).

Por outro lado, a maioria dos materiais poliméricos é de natureza sintética, produzidos pela indústria petroquímica. O primeiro polímero artificial foi produzido por Hancock e Lüdersdorf em 1840, por meio do tratamento da borracha natural com enxofre para criar um material resistente e elástico (GUNAY et al., 2012). Foram muitos avanços significativos que permitiram a produção de materiais poliméricos

complexos com propriedades importantes, tais como heterogeneidade, topologia, composição, funcionalidade e massa (MAITZ, 2015).

Nas últimas décadas, materiais sintéticos biologicamente compatíveis surgiram como um dos campos mais interessantes na química de polímeros, permitindo uma infinidade de aplicações, tais como novos estabilizadores de biomoléculas, veículos de entrega de drogas, biossensores, adesivos biomédicos, materiais anti-incrustantes e scaffolds (KHAN et al., 2015; BLUM et al., 2015; CARLINI et al., 2016).

De acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), os polímeros são designados pelo prefixo “poli” seguido do nome da unidade repetitiva colocado entre parêntesis. No entanto, a IUPAC apesar de reconhecer que um grande número de polímeros são comumente denominados por nomes comerciais, recomenda que a comunidade científica recorra à classificação dos polímeros de acordo com a nomenclatura sistemática.

Os polímeros, diferentemente das substâncias químicas de baixa massa molecular, são produtos heterogêneos, pois podem possuir uma mistura de moléculas de diferentes massas moleculares, apresentando, portanto, polimolecularidade. O número de meros na cadeia polimérica é chamado grau de polimerização. Por via de regra, é simbolizado pela letra *n*. (MANO & MENDES, 2010).

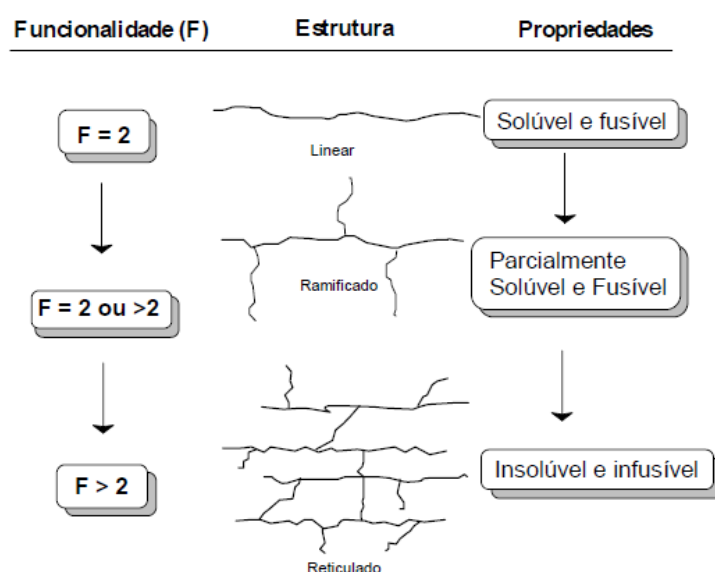
O processo que transforma quimicamente o monômero em polímero é chamado de polimerização e podem ser classificados em: adição e condensação. A polimerização por adição é também denominada polimerização em cadeia, consiste na adição de uma molécula a outra através da utilização de ligações insaturadas. O desenvolvimento da cadeia pode ser iniciado pela introdução de um radical livre ou íon que, adicionado a uma molécula de monômero insaturado, gera uma espécie ativa, que por reações sucessivas com outras moléculas dos monômeros da origem à cadeia polimérica (NOGUEIRA et al., 2000).

Já a polimerização por condensação é um tipo de polirreação que ocorre pela eliminação de uma molécula menor e a formação de ligação entre dois monômeros, cada um contendo dois grupos, de modo que a reação possa ocorrer repetidamente produzindo uma macromolécula (NOGUEIRA et al., 2000).

2.5.2 Propriedades

Para que uma substância possa dar origem a um polímero é necessário que ela possua funcionalidade igual a 2 ou mais, ou seja, a molécula deve possuir, ao menos, dois sítios ativos que possam permitir o crescimento da cadeia polimérica (**Figura 13**) (SILVA & SILVA, 2003; PASSATORE, 2013).

FIGURA 13. Relação entre a funcionalidade (F), a estrutura e as propriedades dos polímeros.



Fonte: SILVA & SILVA, 2003.

Dessa forma, a funcionalidade dos monômeros (número de centros ativos) será responsável pela existência ou não de ramificações nas cadeias poliméricas. Os polímeros podem ter suas cadeias sem ramificações, admitindo conformação em zigue-zague, e são denominados polímeros lineares. Podem apresentar ramificações, e são denominados polímeros ramificados, com maior ou menor complexidade. Podem ainda exibir cadeias mais complexas, com ligações cruzadas, formando polímeros reticulados (CROTTY et al., 2016) (**Figura 13**).

Como consequência imediata, surgem diferentes propriedades no produto, especialmente em relação à fusibilidade e solubilidade. Levando-se em conta a mobilidade relativa das moléculas (movimento Browniano), é fácil compreender porque os polímeros lineares ou ramificados são, em princípio, solúveis em solventes

adequados e passíveis de sofrer escoamento sob a ação de calor e pressão (MANRICH, 2005).

As propriedades especiais tão peculiares aos polímeros são consequências, principalmente, de sua alta massa molecular. Quanto maiores as macromoléculas, melhores suas propriedades mecânicas. Na grande maioria dos polímeros industrializados, o peso molecular se encontra entre 10^4 e 10^6 ; muitos deles são considerados materiais de engenharia. Em alguns produtos de origem natural, o peso molecular pode atingir valores muito altos, de 10^8 ou mais. Todos os polímeros mostram longos segmentos moleculares, de dimensões entre 100 e 100.000 Å, os quais propiciam enlaçamentos e emaranhamentos, alterando o espaço vazio entre as cadeias, denominado volume livre. Com a elevação da temperatura, aumentam os movimentos desses segmentos, tornando o material mais macio (MANO& MENDES, 2010)

São propriedades como resistência mecânica, resistência térmica, estabilidade frente a substâncias químicas, resistência elétrica, permeabilidade a gases que irão determinar como o polímero vai ser utilizado.

2.5.3 Massa Molecular

O material polimérico se diferencia dos demais por possuir uma cadeia longa, isto é, de elevada massa molar, o que influenciará em suas propriedades físico-químicas de tal modo, que o seu conhecimento e controle são de fundamental importância tanto para os setores de síntese, quanto para o mercado de aplicação destes compostos. Normalmente as propriedades são afetadas por mudanças da massa molar (MM) de maneira assintótica, ou seja, considerando-se uma dada variação de massa molar, esta provocará maiores alterações nas propriedades quando ocorrer em moléculas de menor massa molar quando comparadas com sua influência em moléculas de maior massa molar (CANEVAROLO, 2006; BARROS, 2012).

Substâncias puras e simples, como a água, por exemplo, possuem peso molecular único, enquanto que os polímeros comerciais sempre apresentam vários pesos moleculares. Por isso, é prática comum a caracterização do peso molecular médio de um polímero, através de diferentes técnicas de medição, tais como: propriedades coligativas (pressão osmótica, ebuliometria, crioscopia, abaixamento de

pressão), espalhamento de luz, viscosidade das soluções, ultracentrifugação, permeação, por exemplo. Quanto maior for a variedade de pesos moleculares constituindo uma substância, maior a dispersividade do peso molecular. A polidispersividade tem origem na polimerização dos polímeros, onde as condições cinéticas (concentração de iniciador, temperatura, pressão, viscosidade do meio e tempo) variam durante o processo de obtenção desses materiais (CHEN et al., 2002; BOHN & HEERMANN, 2009).

Quando as moléculas poliméricas são todas do mesmo tamanho (não existe distribuição) os valores de M_n (PM numérico médio) e M_w (PM peso médio) são iguais e a relação $M_w/M_n = 1$, esta relação indica a dispersividade do polímero, e quanto maior de 1, mais disperso é o peso molecular do polímero (SILVA & SILVA, 2003).

Além do peso molecular médio, a arquitetura molecular do polímero e sua conformação molecular irão influenciar as propriedades do polímero e, portanto, devem ser entendidas. Dependendo da aplicação do material, polímeros estruturalmente distintos com diferentes propriedades macroscópicas são produzidos a partir de uma grande biblioteca de monômeros. De maneira geral, a proporção e a organização dos monômeros resultam em propriedades físicas e químicas diferentes, permitindo a engenharia de moléculas altamente complexas para aplicações diversas (CROTTY et al., 2016).

2.5.4 Caracterização dos Polímeros

Como resultado do método de polimerização, os polímeros podem apresentar uma mistura de cadeias poliméricas com diferentes tamanhos. Levando em conta que as propriedades dos polímeros apresentam alta dependência do peso médio das moléculas que compõem a mistura (CANEVAROLO, 2006), a caracterização destes compostos quanto à dispersão de massa, estrutura química e ordenação molecular são muito importantes para estabelecer uma correlação entre as propriedades químicas, físicas e mecânicas dos produtos obtidos (BARROS, 2012).

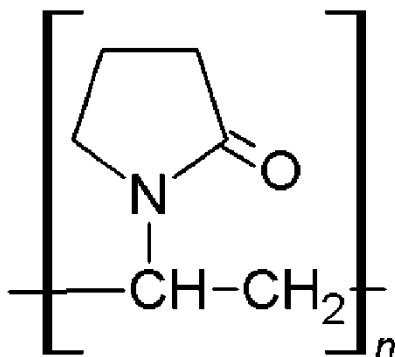
Existem inúmeras técnicas analíticas destinadas à análise e caracterização destes compostos tais como a cromatografia de Permeação em Gel – GPC, osmometria, viscosimetria, difração de Raio X e espectroscopia (GIES, 2011). A técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF é a opção atualmente para a

caracterização de polímeros ramificados (CROTTY et al., 2016). Para a maioria dos polímeros sintéticos com grande polidispersidade, por outro lado, estas técnicas precisam combinação com outros métodos de complementos ou fazer um tratamento prévio da amostra. Além disso, a determinação da distribuição do peso molecular de compostos com elevada polidispersidade e ampla distribuição de massa é uma tarefa difícil, de tal modo que não pode ser obtida com precisão (OKAMOTO, 2006). Tais métodos, embora comumente utilizados para a caracterização de compostos orgânicos, apresentam como problema comum, o fato de perderem detalhes importantes sobre a composição intrínseca dos polímeros, de modo que, na maioria dos casos não são capazes de fazer diferenciação entre os oligômeros, não distinguindo impurezas ou aditivos presentes na amostra (CHEN et al., 2002; BOHN & HEERMANN, 2009). Com o aumento da demanda, os polímeros estão se tornando cada vez mais complexo na sua arquitetura, e, ao mesmo tempo, é mais desafiador caracterizá-los. Seguem abaixo, uma descrição detalhada dos tipos de polímeros polidispersos utilizados nesse estudo.

N-vinil-2-pirrolidona (PVP)

O homopolímero 1-etnil-2-pirrolidinona comercialmente chamado de N-vinil-2-pirrolidona, polivinilpirrolidona (PVP) ou simplesmente povidona é obtido por polimerização do precursor vinil-pirrolidona (**Figura 14**) em água ou em álcool isopropílico, de natureza higroscópica e compatível com uma ampla faixa de resinas hidrofílicas e hidrofóbicas (MAITZ, 2015).

PVP é um tipo de composto macromolecular sintético solúvel em água e na maioria das soluções orgânicas (ácido acético, ácido fórmico, etanol, etilenoglicol, metanol e cloreto de metileno) tem baixa toxicidade e alta compatibilidade fisiológica. As excelentes qualidades de PVP, seu uso está se tornando mais difundido, especialmente nos campos da medicina, alimentos, cosméticos, e outras áreas relevantes para a saúde humana (TRIMPIN et al., 2001; HSIAO, HUANG, 2004).

FIGURA 14. Estrutura química da molécula de PVP.

Fonte: MANO & MENDES, 2010.

Em água ele tem a útil propriedade da viscosidade Newtoniana, por ser um polímero capaz de interações intermoleculares, mesmo em soluções aquosas diluídas a diferentes temperaturas, devido às interações intramoleculares das próprias cadeias de PVP serem mais fortes que as interações PVP- água através de ligações de hidrogênio. Também forma ligações de hidrogênio com as moléculas de água (SAPIR et al., 2016).

PVP foi sintetizado pela primeira vez por Walter Reppe e uma patente foi depositado em 1939 para um dos derivados mais interessantes da química. PVP foi inicialmente utilizada como um substituto do plasma do sangue e mais tarde em uma ampla variedade de aplicações em medicina, farmácia, cosméticos e de produção industrial (FISCHER & BAUER, 2009; KOCZKUR et al., 2015).

Na indústria farmacêutica seu principal uso tem sido no revestimento de comprimidos, retardando e conseqüentemente controlando a liberação do princípio ativo do fármaco. Além disso, PVP adicionado ao iodo forma um complexo (povidone-iodo) que possui propriedades desinfetantes. Este composto está contido em vários produtos como soluções, pomadas, sabões líquidos e esponjas cirúrgicas. É conhecido pelo nome comercial de Betadine, sendo comercializado desde 1950 (ISP TECHNOLOGIES, 2004; BRANDÃO, 2016).

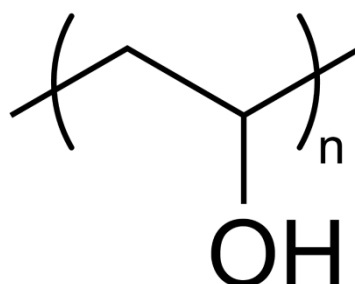
O Food and Drug Administration (FDA) aprovou este produto químico para muitos usos, e é geralmente considerado seguro. E mais recentemente, tem sido amplamente utilizada como estabilizador em síntese de nanopartículas (KOCZKUR et al., 2015).

Álcool polivinílico (PVA)

O Polivinil álcool ou álcool polivinílico (PVA) é um polímero hidrofílico neutro com alto conteúdo de grupo hidroxila, produzido em maior volume no mundo (**Figura 15**) que proporciona propriedades (biocompatíveis, não tóxicas, boa permeabilidade à água, não carcinogênicas, não imunogênicas e inertes em fluidos corporais) adequadas para aplicações biomédicas, principalmente, como dispositivos para liberação controlada de fármacos e proteínas (YUO et al., 2007; MUPPALANENI, OMIDIAN, 2013; MAITZ, 2015).

A solubilidade em água depende do grau de hidrólise, do grau de polimerização e da temperatura da solução. Para o PVA completamente hidrolisado, o elevado número de hidroxilas (grupos hidrofílicos) conduz a formação de ligações de hidrogênio fortes entre os grupos de hidroxilas inter e intramoleculares, impedindo sua solubilidade em água fria.

FIGURA 15. Estrutura química da molécula de PVA.



Fonte: MANO & MENDES, 2010

O efeito da temperatura na solubilidade está vinculado à quebra das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Assim, com o aumento da temperatura, as ligações são rompidas, diminuindo as forças inter e intramoleculares, aumentando dessa forma a solubilidade (WU et al., 2002).

Por ser um polímero solúvel em água (e conseqüentemente no ambiente fisiológico), o PVA vem sendo usado como matriz para sistema de liberação controlada de substâncias químicas no corpo humano (MARTEN, 2005; CRUZ et al., 2008).

3 METODOLOGIA

3.1 Medidas de condutividade e viscosidade

Todas as soluções foram preparadas com substâncias de altíssimo grau de pureza (99,99%), filtradas e com condutividades determinadas por meio de um condutímetro de alta precisão (Radiometer analytical, Modelo: CDC 230) (**Figura 16A**). As medidas de viscosidade foram realizadas em colaboração com o Laboratório Multiusuário de Nanotecnologia (LMNano) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE utilizando um viscosímetro modelo Stabinger Viscometer – Anton Paar, na temperatura de 25 °C (Figura 18B).

FIGURA 16. A. Condutímetro de alta precisão (Radiometer analytical, Modelo: CDC 230).

B. Viscosímetro modelo Stabinger Viscometer (Anton Paar, SVM™ 3000).

A



B



Fonte: Autora (Figura A); disponível em <http://www.anton-paar.com/br> (Figura B).

3.2 Solubilidade

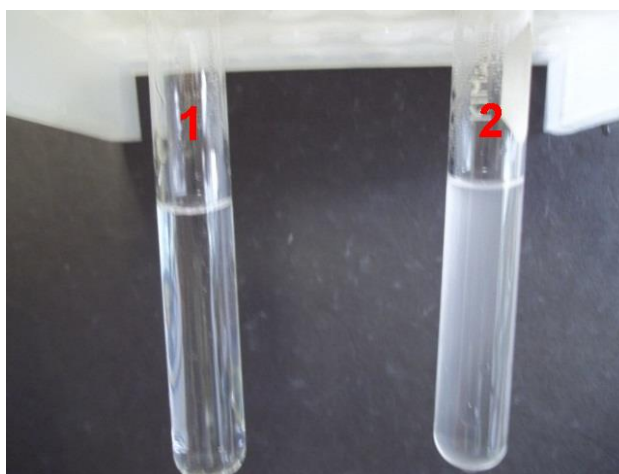
A solubilidade limite dos polímeros foi estimada por adaptação do método “cloud point” (SAHANDZHIEVA et al., 2006) ou ponto de nuvem (**Figura 17**) que é a concentração na qual os sólidos dissolvidos em um solvente não estão mais completamente solúveis, precipitando como uma segunda fase que dá ao líquido uma aparência turva (ZHANG & CREMER, 2009). Neste método pequenas quantidades (normalmente 2 a 40 mg) de um tipo de polímero foi adicionada ao tubo de vidro de 10 mL.

Posteriormente pequenos volumes (300–500 µL) de solução salina foram adicionados à temperatura ambiente (25°C). Após cada adição o tubo foi fechado com tampa de Teflon, agitado e finalmente levado até um banho Maria a 100°C durante 10

a 30 minutos. A formação de uma nuvem do polímero na solução foi determinada visualmente.

Os polímeros utilizados neste trabalho foram a polivinilpirrolidona (PVP) de peso molecular médio 40000 e o polivinil álcool (PVA) de peso molecular médio 30.000- 70.000. Todos esses polímeros foram adquiridos da Sigma®.

FIGURA 17. Ilustração da formação do ponto de nuvem do polímero em solução de KCl 4M.



Fonte: Retirado de Melo, 2012. No tubo 1, a solução está translúcida, ou seja, ausência do ponto de nuvem. No tubo 2, verifica-se uma turbidez na solução característica do ponto de nuvem.

Para avaliar a solubilidade do PVP e PVA utilizou-se solução salina composta por um dos cátions da família 1A - Na^+ , K^+ , Rb^+ e Cs^+ . Todas as soluções foram preparadas a uma concentração de 4M do sal. As soluções de KCl utilizadas na solubilidade do PVA e PVP foram nas seguintes concentrações: 0.8M; 1M; 1,5M; 2M; 2,5M; 3M; 3.5M e 4M. Para o PEG, avaliou-se a solubilidade utilizando sais com íons mono (Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+). A concentração da solubilidade do polímero foi determinada como a concentração média entre duas soluções, uma em que não visualizasse a nuvem, e a outra de concentração próxima, que gera a nuvem, ou seja, ocorra a mudança de fase. Para aumentarmos a precisão da medida, repetimos cada um dos experimentos com uma mistura já bem próxima da mudança de fase. Nesta nova condição adicionamos volumes bem menores de solução. Nas análises estatísticas e na confecção dos histogramas foi utilizado o programa Origin 8.0.

3.3 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 também de Teflon®, contendo soluções aquosas (Figura 19). 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 18A**).

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 (**Figura 18B**), para em seguida elevar o lado oposto e completar a formação da bicamada (**Figura 18C**). A formação da membrana foi monitorada: visualmente pela variação no índice de refração da luz usando lupa binocular, e, eletricamente pela variação nos valores da corrente capacitiva basal do sistema.

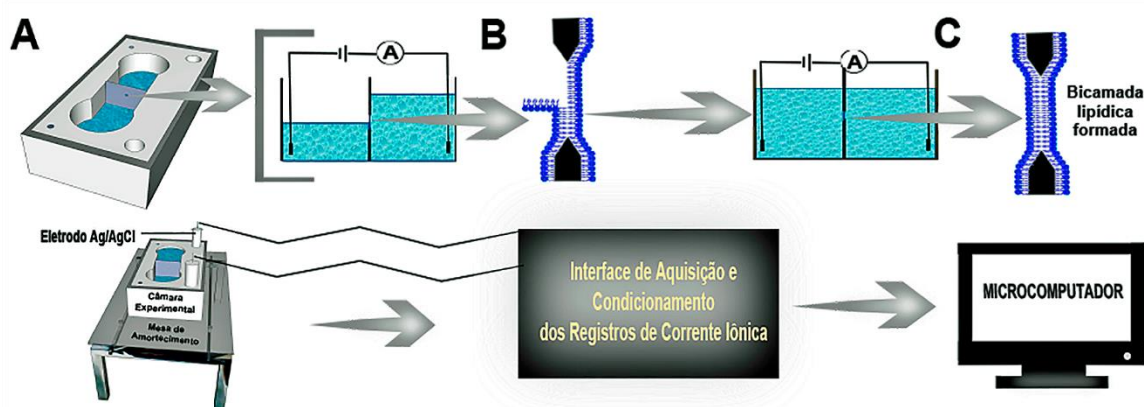
Após a construção da bicamada lipídica realizou-se a incorporação de um único nanoporo pela adição da proteína alfatoxina Calbiochem (USA) na solução que banhava o lado *Cis* da membrana. Posteriormente, adicionou-se os polímeros ao compartimento “trans” da câmara experimental e registrava-se a corrente iônica que fluía através do nanoporo, quando submetido a variações do potencial de -200 a 200 mV ($\Delta = 20$ mV), na solução de KCl na concentração de 4M adicionada do tampão Tris (Hidroximetilamino metano) 5mM, e pH de 7,5. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de 23 ± 2 °C.

3.4 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).

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).

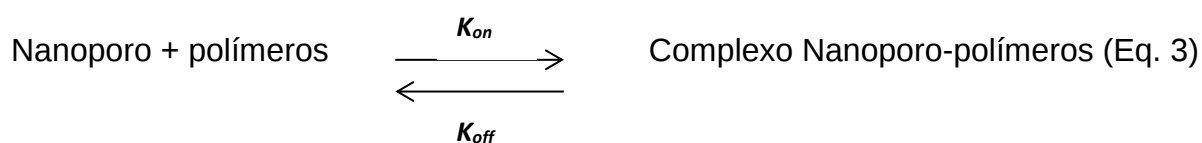
FIGURA 18. Esquema da montagem experimental e aquisição dos dados.



Fonte: AGUIAR et al., 2015. (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.

3.5 Análises das séries temporais de corrente iônica

A análise dos dados foi realizada com o software pClamp ou Sview. Os valores médios de T_{off} e T_{on} , 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 de séries temporais com milhares dos eventos de bloqueio e não bloqueio, respectivamente. É possível calcular esses valores através das seguintes equações:



$$\text{Constante de associação } k_{on} = 1 / (T_{on} \times C_{analito}) \text{ (Eq. 4)}$$

$$\text{Constante de dissociação } k_{off} = 1 / T_{off} \text{ (Eq. 5)}$$

$$\text{Constante de formação } k_f = k_{on} / k_{off} \text{ (Eq. 6)}$$

Onde:

k_{on} é a constante de associação;

k_{off} é a constante de dissociação;

C é a concentração do analito;

T_{on} é o tempo entre os bloqueios;

T_{off} é o tempo de residência;

k_f é a constante de formação

4 RESULTADOS

4.1 Artigo

Poly(vinyl alcohol) translocation through the α -Hemolysin Nanopore bathed by high ionic strength solution submetido na RSC Advances, fator de impacto 2.936.

Poly(vinyl alcohol) translocation through the α -Hemolysin Nanopore bathed by high ionic strength solution[†]

Juliana P. Aguiar^{a,b}, Licya S. S. Xavier^a, Janilson J. S. Junior^a and Claudio G. Rodrigues^{a,b*}

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Understanding polymers translocation in nanoconfined spaces is very important in many areas of science and technology. Biotic polymers translocate through the nanopores in the biomembranes, ensuring, for example, the very efficient flow of genetic material. Abiotic and biotic polymers can be translocated through the nanopores aiming for development of analytical devices: sensors, spectrometers and DNA sequencers. These devices based in the nanopore resistive pulse sensing (NRPS) technique. NRPS consists of an electrical method for the detection of individual molecules that, when entering the single nanopore, cause transient blockages (resistive pulses) of their ionic conductance. So, this process can be considered a simple bimolecular complexation reaction between molecules and nanopore. Here, we use a single α -hemolysin (α HL) nanopore, incorporated in planar lipid bilayer, to analyze the poly(vinyl alcohol) (PVA) translocation in nanoconfined space. We observed mainly four resistive pulse patterns with bilevel of current blockades. Approximately 70% represent two types of resistive pulse events, with a deep block level with current decrease of approximately 90%. In this case, we believe that this is the direct translocation of a PVA through the β -barrel, exiting on the cis side of the α HL nanopore. Another two types of events: one with only one block level with current decrease of 50%; the other have a shallow block level with current decrease of 50% and, sometimes followed with deep block level with current decrease of 70%. In this case, we assume that the PVA enters the β -barrel, however, it exit on the trans side, that is, it does not translocate through the constriction of the α HL nanopore. Duration time distribution for the translocation events show large dispersion suggesting that various PVA chain conformations exist in the KCl solution. Additionally, we observed that duration time of PVA inside the α HL nanopore and frequency of the translocations events are voltage dependent, indicating that neutral PVA molecules bind to the potassium and becoming charged molecules in high ionic strength solution. Finally, our results may give new insight into the translocation dynamics of polymers in nanoconfined spaces and, will contribute the development of devices based on solitary nanopores.

Introduction

Translocation of a polymer chain through nanopores has attracted much attention in recent years.^{1,2,3} In addition to being a complex phenomenon and a fundamental step in many life processes, for examples, the transport of proteins through membrane nanopores, translocation of RNA across nuclear pores, DNA molecule transfer from virus to host cell, and gene transport between bacteria.^{4,5} Another reason, to arouse such interest, is that the translocation of polymers or biomolecules through nanopores has great potential applications in medicine, mainly, in drug delivery system.⁶ A range of different synthetic polymers of high molecular weight is being widely applied for this purpose.⁶ Polymer translocation is also a key process in nanopore-based stochastic sensing technology.⁷ Nanopore-based stochastic detection provides a sensitive, non-destructive, and cost-effective tool for analysis at the individual molecule limit.⁷ This sensing method is of great scientific

interest because it provides a unique view of polymer dynamics and structure at the single-molecule level, and it may serve as a useful model system in the development of our understanding of biologically relevant nanoscale physical and chemical processes.⁸⁻¹⁰ The technique is also called Nanopore Resistive Pulse Sensing (Np-RPS) and consists of an electrical method for the detection of individual molecules that, when entering the pore, cause transient blockades of their ionic conductance.¹¹ These blockades, known resistive pulses, contain information on the molecular properties of the analyte, the most relevant parameters being their depth and duration.¹¹ The magnitude of these blockades depends on the relationship between the molecular volume and the pore volume¹² and, in some cases, the interaction between the molecule and the ions in solution.¹³ The duration of the blockade (ie, the time that the molecule passes within the pore) depends on the electrophoretic drift through the pore, which can be affected by the electroosmotic counterflow¹⁴ or by entropic or enthalpic interactions between the analyte and the pore.¹⁵ In recent years, there has been a series of investigations on the translocation of single macromolecules through protein pores and solid-state nanopores.¹⁶⁻²⁰ Such information may facilitate an understanding of the still elusive mechanism of macromolecular transport through protein nanopores.

Protein nanopore formed by α -hemolysin (α HL) of *Staphylococcus aureus* is arguably the nanopore of choice for single-molecule translocation studies via electrical recordings in

^a Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil. E-mail: cgrufpe@gmail.com; Fax: +55 81 2126 8560; Tel: +55 81 2126 8535

^b Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

[†] The authors dedicate this work to Dr Oleg Vladimirovich Krasilnikov (in memoriam).

artificial lipid membranes. α HL nanopore is structurally stable, electrically-silent over a wide range of experimental conditions and has its crystal structure determined.^{21,22} As such, provides a highly confined space which it allows the detection of divalent ions,²³ enantiomers,^{24,25} various types of organic molecules,^{12,26,27} peptides,²⁸ proteins,²⁹⁻³¹ DNA,^{15, 33-39} and synthetic polymers.^{10-13,29,39-43}

Since the pioneering work of Kasianowicz et al 1996 with nucleic acids,⁴⁴ the dynamics of polymer translocation within the nanopore has been extensively studied. In DNA translocation analyzes three current levels were found for ssDNA translocation: the open state, a mid-amplitude state, and a low-amplitude state.^{33,51} This model has also been demonstrated in the study of synthetic polymers.^{10,52} In addition, these results are also confirmed by molecular dynamic simulation.^{53,54} These papers inspired other studies to understand how the nature of the polymer chain affects the translocation dynamics through the nanopore.

Among the synthetic polymers, the poly (ethylene glycol) (PEG) was the most studied. What allowed the development of a mass spectrometry method for (PEG) using a nanopore of α -hemolysin protein. Using the fact that the amplitude of the PEG-induced current blockade of the α HL pore depends on the polymer molecular weight, the studies clearly resolved the repeat unit of ethylene glycol from a polydisperse PEG sample. While it has been quantitatively described in terms of a simple model comprising a combination of size-exclusion and cation binding by PEG^{13,26,55,56} the mechanism of interaction underlying this mass discrimination by ionic current modulation is questioned by some authors.⁵⁷ It is unknown to which extent this strong interaction, which for kinetic reasons must involve binding of the polymer to the pore wall^{13,26,56} or if it's a unique property of α -HL nanopore.⁵⁸

Aiming to understand the mechanisms involved in the translocation of synthetic polymers in nanoconfined spaces, we report here the transport of poly (vinyl alcohol) (PVA) through the α -HL nanopore. PVA is a neutral hydrophilic polymer with high hydroxyl group contents provide properties (biocompatible, nontoxic, good water permeability, non-carcinogenic, non-immunogenic and inert in body fluids) suitable for biomedical applications, mainly, as devices for controlled release of drugs and proteins.^{6,59-62}

Results and discussion

We examine time-resolved blockages of ion current through the α -HL nanopore by single PVA50 molecules exchanging between the pore and dilute bulk solution. To maximize polymer-pore attractions, promoted by salt, we use the extreme potassium chloride concentration, 4 M, which is close to the salt solubility limit in water at 23 °C. This changes polymer partitioning

qualitatively, strengthening it by orders of magnitude and slowing down exchange kinetics.^{12,13,26,39,63} In the absence of PVA50, the conductance of α -HL nanopore was 3.85 ± 0.07 nS, for 40 mV, pH 7.5, 4.0 M KCl, 5 mM tris buffer (Fig.1), corroborating with our previous results,^{12,39} and other reports.⁵⁷ Conductance-voltage relationship of α -HL nanopore in KCl were found to be slightly asymmetric, like what has been described in other studies.^{42,65}

The addition of PVA in the buffer solution to the trans side of α HL nanopore resulted in resistive pulses in the current trace. The conductance allows to estimate the partitioning of the analytes in the nanopore.^{42,65} (Fig.1 demonstrates the influence of three concentrations of PVA50 (0.1 nM, 1 nM e 100 nM) at the nanopore conductance. The influence of PVA in nanopore conductance occurred principally in potentials greater than 100 mV, therefore, we choose to analyse the translocation process of this polymer in the range of 100-160 mV. Furthermore, the conductance data indicate that the transmembrane potential which provide appropriate conditions for detection of PVA at high potentials, as well as studies of other synthetic polymers.^{10,41,57,66}

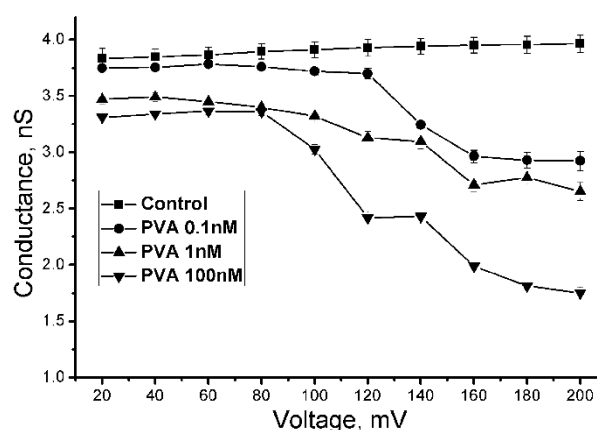


Fig. 1 Effect of trans-side addition of PVA50 to nanopore-bathing solution. Control, nanopore conductance for solution 4 M KCl, no PVA (black squares). PVA 0.1 nM, nanopore conductance for solution 4 M KCl, 0.1 nM PVA (black circles). PVA 1 nM, nanopore conductance for solution 4 M KCl, 1 nM PVA (triangle up). PVA 100 nM, nanopore conductance for solution 4 M KCl, 100 nM PVA (triangle down). Lines were drawn to guide the eye. The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SD) is presented in each case.

Resistive pulses: appearance, characteristics and PVA translocation

Voltage clamping methods was used to investigate the translocation of individual PVA50 molecules through the solitary α HL nanopore. The ionic current through the α HL nanopore bathed by a polymer-free solution is quiescent^{39,56,42} (Fig 2 A, B). On the other hand, the addition of PVA to the membrane-bathing solution causes well-defined resistive pulses (Fig 2. C-H).

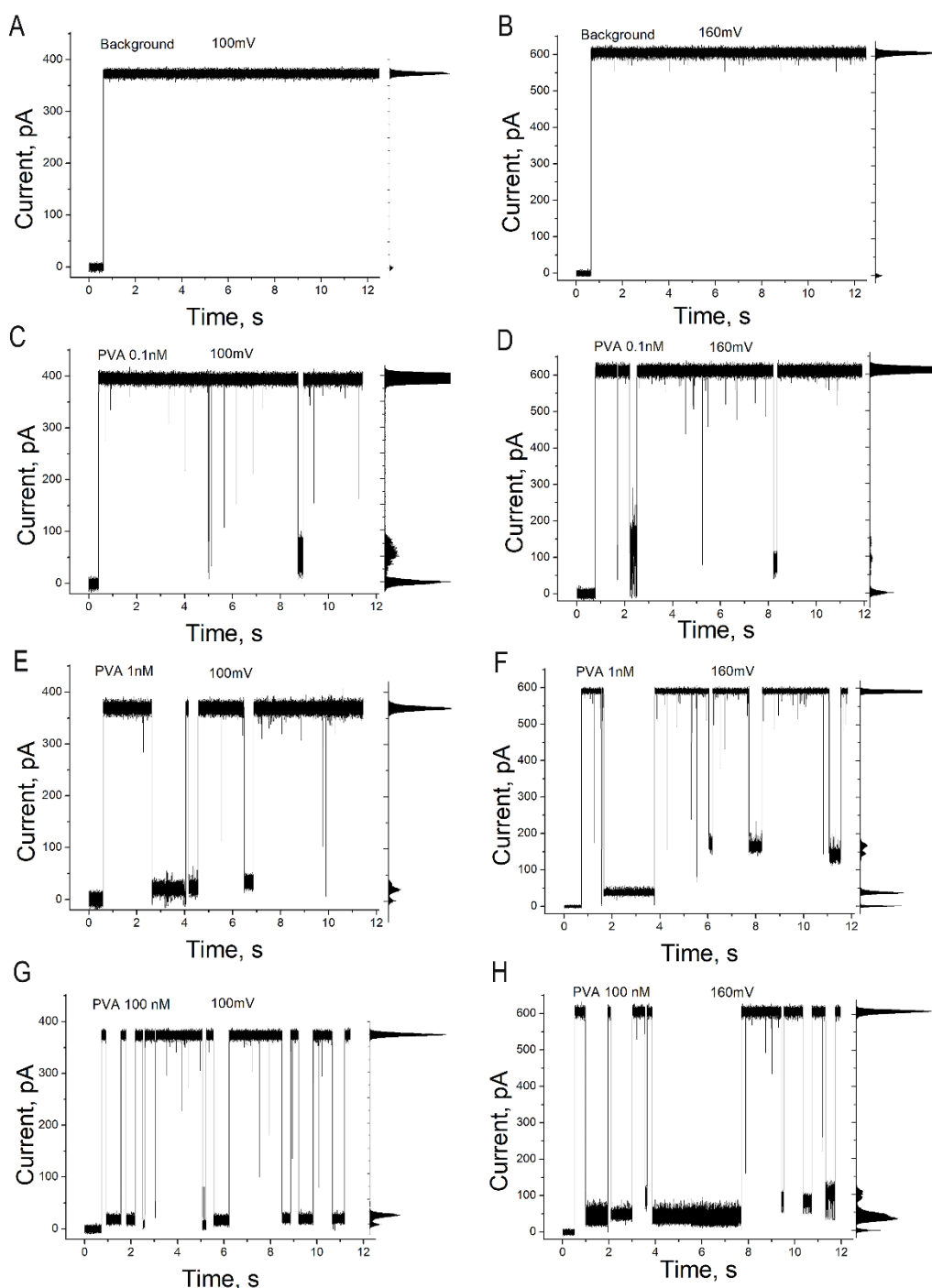


Fig. 2 Typical traces of the ion current through single α HL nanopore after addition of PVA50 in the bath solution (4 M KCl, 5 mM Tris, pH 7.5) at a time resolution of 0.1 ms. (A, B) Background, ionic current for solution (no PVA) at 100 and 160 mV, respectively. The ionic current, through an α HL nanopore bathed by a PVA-free solution, is quiescent. (C, D) Ionic current for solution (0.1 nM PVA) at 100 and 160 mV, respectively. Addition of PVA50 cause persistent resistive pulses. (E, F) Ionic current for solution (1 nM PVA) at 100 and 160 mV, respectively. (G, H) Ionic current for solution (100 nM PVA) at 100 and 160 mV, respectively. Increasing of PVA concentration increase the frequency of resistive pulses. The respective all-point histograms are shown at the right of each record and were used to give the mean value of blockage amplitudes.

ARTICLE

Typical high-resolution recordings in the presence of PVA50 in different concentrations (0.1 nM, 1 nM and 100 nM) 100 mV and 160 mV are shown in Fig 2C-H. In the presence of PVA, the ion current through the single α -HL nanopore exhibits stepwise down transitions between completely open and partially blocked states. The respective all-point histograms are shown at the right of each record and demonstrate the level PVA induced current blockage (Fig 2. C-H). Increasing the PVA concentration causes the capture rate to increase, as is shown qualitatively in Fig. 2. We attribute these spikes to molecular events whereby a single PVA50 enters the protein β -barrel and induces reversible partial blockages of the ionic current through steric occlusions of the ion permeation pathway, before getting

released to the cis side of the membrane under the influence of the potential imposed across the pore.⁶⁷

The resistive pulses are dependent on the polymer length N , polymer configuration, polymer–pore interaction, and charge of the polymer.⁶⁸ The behaviour of can be explained using four factors: (1) volume occupancy fraction inside the pore; (2) the conformation of the polymer; (3) the location of the polymer inside the pore; and (4) the total charge inside the pore.^{69,70} The interactions of the PVA molecules with the α HL nanopore produced 5 different resistive pulses patterns (types A, B, C, D and E) that are combinations of three conductance levels: the open state, a mid-amplitude state and a low-amplitude state (Fig. 3).

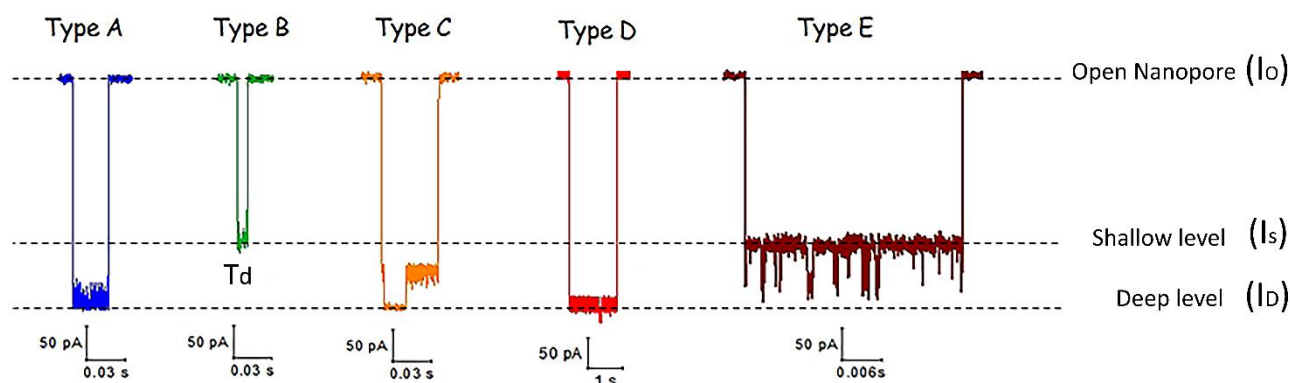


Fig. 3 Interactions of PVA50 with α HL nanopore at 100 mV with five types of resistive pulses. Three current levels of I_0 , I_s and I_d and duration time (t_d) are defined as illustrated. Current and time scale bars are also provided. We considered that PVA translocations occurring only in resistive pulses type A and D. The A and D events corresponding to approximately 70% of each experiment.

Closer inspection shows that for some the deep events there is normally a pre-shallow level followed by a deep level (Type C, D and E). This behaviour has already been described for other polymers such as DNA,^{8,33,53} and poly (styrene sulfonic acid) (PSS).¹⁰

The relatively rapid transitions between levels and types of blockages can be associated with different results of PVA-nanopore interaction. In this case it is possible to be dependent of PVA chain conformation. For type A events, there is a deep current level at 5 - 10% of the open-channel current (I_0). We believe that this is the direct translocation of a PVA chain through the β -barrel, exiting on the cis side of the pore. For type B events, there is only a single shallow current level at $\sim$ 30-50% of the open-channel current. We assume that this is the entry of PVA chain into the trans side and exit, without threading through the narrowest constriction of the pore. For type C events, there are two blockade states: a shallow level followed by a deep stage within the same event. The deep level has a

similar current amplitude as type A. This event is considered to correspond to the situation that the PVA chain is captured in the narrowest constriction the trans side not translocating through the β -barrel. For type D events, there are two blockade states: a shallow level followed by a deep stage within the same event. The shallow level has a similar current amplitude as type A. It is presumed that the PVA chain is trapped in the β -barrel, and then it threads into part of the constriction and translocates through the pore. For type E events, there are multiple shallow segments separated by a deep segment. It is presumed that the PVA chain is trapped in the trans side and then it threads into part of the β -barrel and the retraction process might repeat for many times before the chain finally exits from the trans side of the pore or translocates through the β -barrel to exit at the cis side. We only observed a few type E events in thousands of total events (<1%). In all types of events, PVA is captured by the pore, but only in types A and D does PVA translocation occur. For translocation events of types E, only the last deep segment is

considered as translocation. The types of events are consistent with the description of ssDNA translocation^{8,33} and other polymers^{10,71} through the α HL nanopore.

The translocation process consists of two mainly separate stages. First, in the capture stage, a polymer molecule has to come close enough to the pore to experience the electrostatic force and get pulled in.⁷² The reservoirs are good ionic conductors, and the driving force is only felt in the direct vicinity of the pore. Capture is thus a stochastic process, since the pore has to be reached by diffusion. The second stage consists of the translocation of the polymer through the pore.^{54,72} Analogously to Li et al., 2003,⁵¹ polymer molecules can pass through the pore in a linear or folded form. Over the years, a great effort is being made to uncover the dependence of the translocation time (τ)

of the system parameters, such as polymer chain length, L length and W pore width,⁷³ sequence, secondary structure and polymer-pore interactions.⁷⁴⁻⁷⁶

A scheme for PVA capture and translocation within the nanopore is depicted in Fig. 4 to interpret the various event types. Before a typical translocation event (Type A), a PVA chain collides with the entrance of the pore and occupies the β -barrel region, leading to a current state at a shallow level (Type B). From this configuration, the polymer can proceed into the constriction producing a low-amplitude signal and return to the trans side (type C) or can either complete translocation through the pore and exit on the cis side (type D eventually type E events)

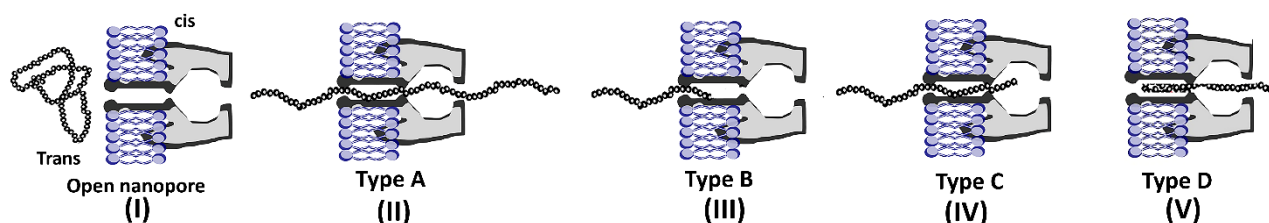


Fig. 4 Model of the interaction of a PVA 50 chain with α HL nanopore.

The polymer is transported by electrophoresis into the narrow β -barrel. Because the pores used here are anion selective, electroosmotic solvent flow occurs in the same direction (trans to cis) and assists polymer transport.^{55,77} Additionally the electro-osmotic flow does not drive macromolecules through the pore in a significant way, although it has been previously known to be able to drive small molecules into the pore.⁵² At this point, the effect of the applied field on the polymer is strongest⁷⁸ it is pulled through the pore into the trans side, the only irreversible step in the scheme. The translocation was observed experimentally by the abrupt reduction of the current to $\sim 90\%$ of the open pore value (resistive pulses type A and D), that is, the same criterion adopted in other studies.^{10,33,79,80}

The scatter plot of type A/D and B/C events for PVA 100 nM at the applied potential of 100 mV and 160 mV is shown in Figure 5A-B and, 5C-D, respectively. Where each point represents a single event. In this case, we separate into two categories: the mid-amplitude state (Fig. 5C-D) and the low-amplitude state (Fig. 5A-B). The frequency of types E events are very small ($< 1\%$); hence, they are not presented. Closer inspection shows two levels of amplitude the mid-amplitude state: type B/C shallow events ($47.5 \pm 10.60\%$ of the open current), and type B/C deep events ($31 \pm 5.65\%$ of the open current) Fig. 5C and 5D, respectively. The polymer it may fold itself, resulting in a greater current blockage. Chains with folded conformation are less likely to translocate through the pore, resulting in larger current blockade and interaction time.¹⁰

For type A/D events increasing the magnitude of the applied potential increases residence times of the PVA50 as can be seen qualitatively by comparing Fig. 5A and 5B, respectively.

Duration time distributions for translocation events (types A and D) are very broad,⁸¹ studied the dynamics of driven polymer translocation through nanopores by 3D Langevin dynamics simulations.⁸¹ They observed two polymer translocation regimes: slow translocation (low driving forces and/or high friction) and rapid translocation (high driving forces and/or low friction).⁸¹ The different behaviour in the two regimes can be understood from analysis of the chain conformations during the translocation process. In the slow translocation case, the configurations at all times are close to the equilibrium case while for the fast translocation regime, there exist highly deformed, unrelaxed chain conformations throughout the translocation process.^{81,82}

For both categories, the time distribution displays an exponential decay, with a time constant τ , as shown in Figures 5E-5H. For type A/D events increasing the magnitude of the applied potential increases residence times of the PVA50 polymer (Fig. 5E-5F). The bin time increment used in the figures is 150 ms. The decay time constant τ increases from 132.83 ± 1.43 ms to 160.25 ± 7.34 ms. Similar results are obtained in the work of Asandei et al, 2015⁸³ with polypeptide. It is presumed that the PVA chain is trapped in the β -barrel, and then it threads into part of constriction and delay longer time to translocate through the pore.⁸³

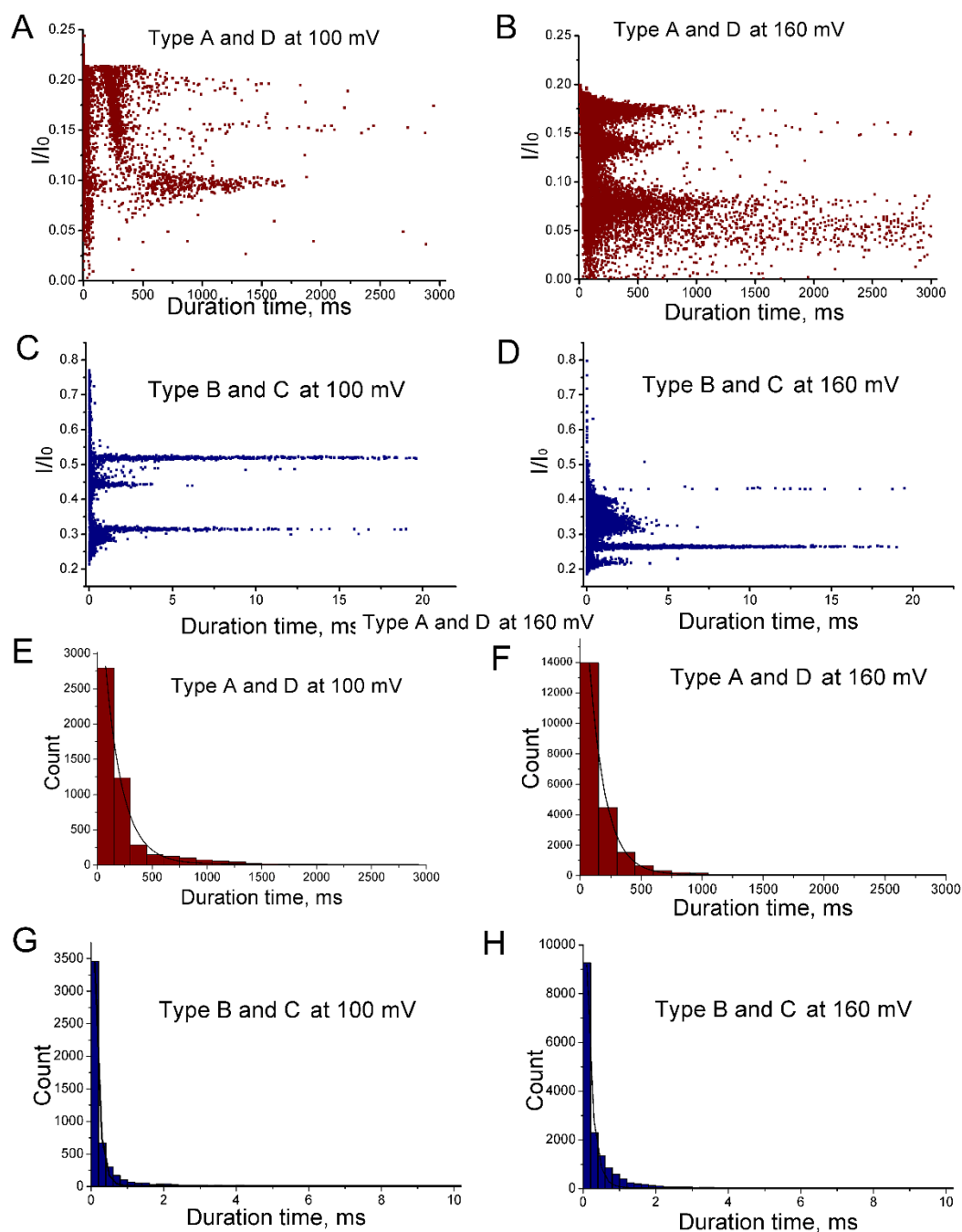


Fig. 5 Scatter plot and characteristic times to different type of events for 100 nm PVA. Each point represents a single event. (A, B) Scattering of the resistive pulses type A and D at 100 and 160 mV, respectively. Increasing of voltage increase the duration time of the translocating events. (C, D) Scattering of the resistive pulses type B and C at 100 and 160 mV, respectively. (E, F) Characteristic times of the resistive pulses type A and D at 100 and 160 mV, respectively. Increasing of voltage increase the characteristic time of the translocating events. (G, H) Characteristic times of the resistive pulses type B and C at 100 and 160 mV, respectively.

Experiments, simulations, and theoretical approaches are still contributing novel insights to date, while no universal consensus on the statistical understanding of polymer translocation has been reached.⁸² Early approaches for explaining the polymer translocation and especially predicting the translocation time as a function of the number of monomers N in the polymer were based on concepts entropic barrier,¹ and from equilibrium statistical mechanics. Such approaches are still used in contemporary theoretical studies.⁸² The capture of a polymer depends mainly on the concentration of macromolecules in the electrolyte solution, the bias voltage, and the salt concentration.^{12,39} For long and dilute chains this probability thus becomes very small. Hence, hydrodynamic and electric field gradient effects play an essential role. In conjunction with the thermally activated diffusion these effects lead to the successful capture of the chain in the pore.¹ In the case of PVA translocation, the applied electric field directs the polymer to enter the pore and that there is a despicable driving force of the electroosmotic network.⁵⁶ A liquid dielectrophoretic force acts on the polymer, which causes the capture of the polymer and the blocking of the ionic current, overcoming entropic factors. Most likely, hydrodynamic drag on the section of the polymer outside the pore is the dominant force counteracting the electrical driving force. The balance between the two dominating forces determines the dynamics of translocation of a polymer molecule through a nanopore: A driving force that locally pulls the polymer through the pore and a viscous drag force that acts on the entire polymer blob.⁷² Once the polymer is in the pore, the electric field drives it further. The polymer may escape the pore only when the thermal fluctuations experienced by it are large enough to overcome the barrier due to the combination of the applied electric field or the charges of the polymer. This free energy barrier increases with the electric field, so the higher the

potential applied, the longer the average dwell time.^{83,84} Assuming that the translocation time is much longer than the relaxation time of the polymer, polymer translocation can be treated as a quasi-equilibrium process and the free-energy landscape of the translocation can be obtained by different methods. Based on the free-energy landscape, the translocation time can be derived from the Fokker–Planck equation. To simplify, the diffusion coefficient D of the polymer, which is involved in the Fokker–Planck equation, is usually assumed to be a constant during the translocation.⁵

For type B and C events, the time distribution displays an exponential decay, with a time constant τ , as shown in Figures 5G and 5H at 100 and 160 mV, respectively. The bin time increment used in the figures is 0.2 ms. When we decreased the applied voltage, the duration time decreases in magnitude with the decay time constant decreasing from $\tau = 0.167 \pm 0.003$ ms to $\tau = 0.129 \pm 0.05$ ms. When the applied voltage is higher, the captured PVA50 is subjected to a stronger electric force, and hence more time is required to exit the pore.

The percentage for the this each type of events for various potentials is listed in Table 1. The percentage of types E are very small (< 1% hence, they are presented together with the type B and C events that are part of the same category (do not translocate through the pore). For a voltage of 160mV, type A $60.46 \pm 1.77\%$, type B $28.02 \pm 0.58\%$, type C $4.36 \pm 0.76\%$, and type D $8.153 \pm 2.06\%$. At this voltage, there is a $68.6 \pm 1.43\%$ probability of a PVA chain translocation event (type A and D) occurring. In most translocation studies, the polymers are added to the cis side of the pore. We know that the translocation dynamics can vary in these conditions. To compare our results with ssDNA and poly (styrene sulfonic acid) (PSS) events using α HL nanopore at 120mV, the percentage of translocation events (types A and D) at 120 mV found were of: ssDNA (86.9%), PSS (21.6 %)10and 60.34 % for PVA.

Table 1 The percentage for each type of events for various potentials.

Voltage (mV)	Type A (%)	Type B/E* (%)	Type C (%)	Type D (%)	Type A/D (%)
100	41.39 ± 2.27	53.11 ± 1.72	4.03 ± 0.93	2.27 ± 0.16	42.85 ± 2.16
120	60.34 ± 0.86	30.63 ± 0.39	5.09 ± 1.65	4.27 ± 0.16	64.60 ± 0.78
140	61.39 ± 2.16	25.52 ± 0.42	6.27 ± 2.33	6.80 ± 0.13	68.19 ± 0.35
160	60.46 ± 1.77	28.02 ± 0.58	4.36 ± 0.76	8.15 ± 2.06	68.60 ± 1.43

The molecular repeat distance (from X-ray diffraction photographs) of PVA it's from 0.252 nm, indicates that the chain

has a simple plane zigzag configuration. The observed repeat distance is equally compatible with a molecular structure in which hydroxyl groups are randomly placed in left- and right-hand positions.⁸⁵

The average length of our polymer chains was ~ 290 nm, within the range of sizes used for ssDNA, sodium (polystyrene sulfonate) (NaPSS)⁵² and poly (styrenesulfonic acid) (PSS),¹⁰ so, we expect the mechanism of translocation through α HL pore to be similar.

In an aqueous solution containing electrolyte, flexible polyelectrolyte chains become crumpled and coiled, surrounded by a diffused layer of counterions. The ssDNA chains are less coiled and much more extended than PSS chains.¹⁰ These differences in translocation dynamics of each polymer probably depends on the nature of the polymer chain. Structurally, PVA is a typical polyhydric alcohol containing a large number of hydroxyl groups in the molecular chain.⁸⁶

In molecular dynamics simulation studies has been shown a heterogeneity in the overall chain structure of PVA. The PVA chain assumes different states and transitions occur between more open structures and more compact and less water exposed coils. The trajectory analysis has revealed that the polymer influence on water structure and dynamics involves about six water molecules per PVA residue, indicating a more extended chain structure,⁸⁷ similar the ssDNA. Experimental studies suggest the presence of superstructured domains in the PVA chain in water and show a phase behaviour based on delicate balance of hydrophilic/hydrophobic interactions.⁸⁸

Probably, the PVA chains that remain in the more extended configuration are more easily translocated through the pore, corroborating with the greater percentage of type A events, that is, those in which the PVA translocation occur. In the curve shown in Figure 6 A, we show voltage dependence of translocation event frequency. The capture rate of PVA by the α HL nanopore was shown to increase exponentially with applied potential. There is a voltage threshold for translocation events from 100 mV the frequency starts to significantly increase with voltage. So, this should be the threshold to overcome the entropy necessary to confine the coiled chain inside the pore, as described in other studies.^{54,81} Fig. 6 B shows that the relative current blockade ($\Delta I = I_{\text{block}} - I_{\text{open}}$) increases proportionally with the applied potential, which suggests the polymer conformation in the pore is not altered by the applied electric field, presumably because the polymer is already fully stretched.⁸¹ Fig 6C duration time of PVA inside the α HL nanopore also increase with a voltage. These results indicate that neutral PVA molecules bind to the potassium and becoming charged molecules. This same behaviour was described for the poly (ethylene glycol) (PEG) in other studies.^{26,39,40} Because the mean residence time increases with the magnitude of the applied potential and thereby increases the signal to noise ratio of the measurement, the use of greater potentials provides an opportunity to further explore the nature of PVA-induced conductance changes with the α HL nanopore.

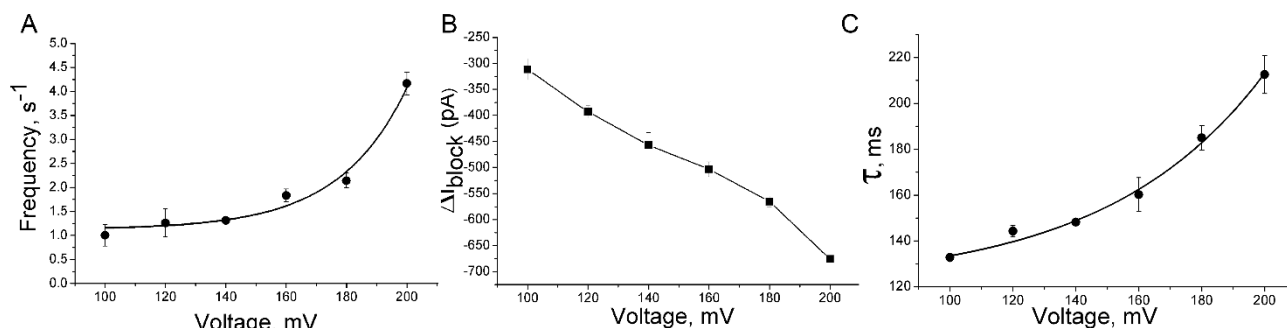


Fig. 6 Voltage dependence of translocation event (type A, D) frequency (A), relative current blockade (B), and, characteristic times (C). Frequency and characteristics times of the translocation events increase exponentially with the potential. In (B), lines were drawn to guide the eye. The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SD) is presented in each case.

Experimental

Materials and methods

All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High-purity water was obtained after a Milli-Q plus (Billerica, USA) treatment. Wild type *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α HL) was purchased from (Calbiochem, Madison, WI). 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). High qualities KCl were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Poly (vinyl alcohol) 30-70 KDa,

henceforth PVA50, was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 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 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) in hexane (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) at 25 ± 1 °C, as described previously.^{40,42} Because it was recently shown that the elevated KCl concentrations considerably improve single molecule identification by (α HL) nanopore^{40,42} in the present study membrane-bathing solutions contained 4 M KCl in 5 mM

TRIS adjusted to pH 7.5 with citric acid. PVA50 was added to the “trans” compartment of the experimental chamber to permit the partitioning of polymer through of the protein nanopore and measurement at temporary change in the trans-pore ionic current. α HL was added from the “cis” side of the membrane in a concentration sufficient to form unitary protein nanopores in planar lipid membrane. Single α HL nanopore incorporation and measurement of the resistive pulses (mean duration and amplitude of the blockage), transition rate of the PVA-nanopore interactions were done essentially as described previously.^{39,40,41} In short, the characteristic time, τ , was obtained from the collected time intervals between the end of one blockade event and the onset of the next. Analysis of current blockade amplitudes and event durations was performed using Clampfit software package (Molecular devices, USA). Between 2000 and 10000 events were recorded for each experiment. Events shorter than 10 μ s were judged to represent transient collisions of PVA50 with the mouth of the pore and were ignored in our analysis. Membrane potential was maintained using Ag/AgCl electrodes in 3M KCl 2% agarose bridges assembled within standard 200- μ L pipette tips. Transmembrane potentials were applied across the lipid bilayer using Ag/AgCl electrodes in both compartments of the chamber. The current was recorded with a patch clamp Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in voltage clamp mode and filtered by a low-pass eight-pole Butterworth filter (model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into the computer memory with a sampling frequency of 50 to 100 kHz.

Conclusions

Before summarizing our main findings, it is important to emphasize that the process of translocating a macromolecule through an ideal nanopore presents essentially three steps: capture of the macromolecule in one of nanopore ends; displacement of the macromolecule in the lumen of the nanopore and, finally, the exit of the macromolecule at the other end of the nanopore. We analysed the translocation events of the individual PVA chains through the wild type α HL nanopore and presented an interpretation for the main patterns of resistive pulses. The current blockade for each event can be regarded as a sequence of shallow (30-50 % of open nanopore) and deep (5-10% of open channel) conductance state. The translocation was observed experimentally by the abrupt reduction of the current to on average 90% of the open pore value. On a typical translocation event, a PVA chain collides with the entrance of the pore and occupies the β -barrel region, leading to a current state at a shallow level. From this configuration, the PVA can proceed into the constriction producing a low-amplitude signal and complete translocation through the pore and exit on the cis side. Most of the observed events showed the abrupt current reduction of approximately 90% of the open pore value, therefore the PVA translocated through the α HL nanopore, that is, it was captured at the trans end of the nanopore, crossed the constriction region and left at

the cis end of the nanopore. Approximately 30% of the observed events showed only a shallow level, so, probably, the PVA did not through the constriction region of the α HL nanopore. The large dispersion of the duration time distribution for the translocations events corroborate that the various PVA chains conformations exist in the KCl solution. We further find that duration time of PVA inside the α HL nanopore and capture rate of polymer increase with a voltage. These findings are relevant because demonstrating that neutral PVA molecules bind to the potassium and becoming charged molecules. Our results may give new insight into the translocation dynamics of polymers in nanoconfined spaces. It is hoped that our results will advance the development of devices with sensor elements based on single nanopores.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant 470008/2012-1 and, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Grant APQ-0707-2.09/15, Brazil.

Notes and references

- 1 Murugappan Muthukumar. *Polymer Translocation*. CRC Press, 2011
- 2 A. Oukhaled, L. Bacri, M. Pastoriza-Gallego, J. M. Betton and J. Pelta, *ACS Chem. Biol.*, 2012, **7**, 1935–1949.
- 3 J. Sarabadani, T. Ikonen and T. Ala-Nissila, *J. Chem. Phys.*, 2015, **143**, 1–11
- 4 R. J. Murphy and M. Muthukumar, , DOI:10.1063/1.2435717. Luo et al., 2017
- 5 M. B. Luo, S. Zhang, F. Wu and L. Z. Sun, *Front. Phys.*, 2017, **12**, 1–9.
- 6 M. F. Maitz, *Biosurface and Biotribology*, 2015, **1**, 161–176.
- 7 H. Bayley and P. S. Cremer, *Nature*, 2001, **413**, 226–230.
- 8 T. Z. Butler, J. H. Gundlach and M. a Troll, *Biophys. J.*, 2006, **90**, 190–199.
- 9 S. Howorka and Z. Siwy, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2360–2384.
- 10 Q. Chen, J. Liu, A. E. P. Schibel, H. S. White and C. Wu, *Macromolecules*, 2010, **43**, 10594–10599.
- 11 F. Piguet, H. Ouldali, F. Discala and M. Breton, *Nat. Publ. Gr.*, 2016, 1–10.
- 12 O. V. Krasilnikov, C. G. Rodrigues and S. M. Bezrukov, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, 97.
- 13 A. Balijepalli, J. W. F. Robertson, J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz and R. W. Pastor, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 7064–7072.
- 14 U. F. Keyser, B. N. Koeleman, S. Van Dorp, D. Krapf, R. M. M. Smeets, S. G. Lemay, N. H. Dekker and C. Dekker, *Nat. Phys.*, 2006, **2**, 473–477.
- 15 M. F. Breton, F. Discala, L. Bacri, D. Foster, J. Pelta, A. J. Oukhaled, *Phys. Chem. Lett.* 2013, **4**, 2202–2208.
- 16 J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton and D. W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, **93**, 13770–13773.

- 17 A.Meller.J. *Phys.Condens. Matter* ,2003,**15**, R581–R607
- 18 K. Luo, T. Ala-Nissila, S. C. Ying and A. Bhattacharya, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2008, **78**, 1–8.
- 19 D. Sean, H. W.de Haan, G.W.Slater, *Electrophoresis*,2015,**36**,682-91.
- 20 J. Comer, A. Ho and A. Aksimentiev, *Electrophoresis*, 2012, **33**, 3466–3479.
- 21 Song et al, 1996L.Song, M.R Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley S, H. Bayley, J.E. Gouaux, *Science*, 1996, **274**, 1859–1865.
- 22 J. P. Aguiar, J. J. S. Junior, D. C. Machado, M. C. A. Melo and C. G. Rodrigues, *Quim. Nova*, 2015, **38**, 817–827
- 23 O. Braha, L. Q. Gu, L. Zhou, X. F. Lu, S. Cheley and H. Bayley, *Nat. Biotechnol.*, 2000, **18**, 1005–1007.
- 24 X. F. Kang, S. Cheley, X. Y. Guan and H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 10684–10685.
- 25 A. J. Boersma and H. Bayley, *Angew. Chem.*, Int. Ed., 2012, **51**, 9606–9609.
- 26 J. W. F. Robertson, C. G. Rodrigues, V. M. Stanford,K. A. Robinson, O. V. Krasilnikov and J. J. Kasianowicz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 8207–8211.
- 27 W. J. Ramsay and H. Bayley, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2018, **57**, 2841–2845.
- 28 R. Stefureac, Y. T. Long, H. B. Kraatz, P. Howard and J. S. Lee,Biochemistry, 2006, **45**, 9172–9179.
- 29 L. Movileanu, *Trends Biotechnol.*, 2009, **27**, 333–341.
- 30 D. Rotem, L. Jayasinghe, M. Salichou and H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 2781–2787.
- 31 J. Nivala, D. B. Marks and M. Akeson, *Nat. Biotechnol.*, 2013,**31**, 247–250
- 32 S. Howorka, S. Cheley and H. Bayley, *Nat. Biotechnol.*, 2001,**19**, 636–639.
- 33 G. Maglia, M. R. Restrepo, E. Mikhailova and H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**, 19720–19725.
- 34 J. Clarke, H. C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid and H. L. Payet, M. Martinho, C. Merstorf, M. Pastoriza-Gallego, J. Pelta, V. Viasnoff, L. Auvray, M. Muthukumar and J. Mathé, *Biophys. J.*, 2015, **109**, 1600–1607.
- 35 L. Payet, M. Martinho, C. Merstorf, M. Pastoriza-Gallego, J. Pelta, V. Viasnoff, L. Auvray, M. Muthukumar and J. Mathé, *Biophys. J.*, 2015, **109**, 1600–1607.
- 36 Y. Ding, A. M. Fleming and C. J. Burrows, *Microchim. Acta*, 2016, **183**, 973–979.
- 37 R. T. Perera, A. M. Fleming, A. M. Peterson, J. M. Heemstra, C. J. Burrows and H. S. White, *Biophysj*, 2016, **110**, 306–314.
- 38 B. Guo, Y. Sheng, K. Zhou, Q. Liu, L. Liu and H. C. Wu, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2018, **57**, 3602–3606.
- 39 C. G. Rodrigues, D. C. Machado, S. F. Chevtchenko and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.*, 2008, **95**, 5186–5192.
- 40 C. G. Rodrigues, D. C. Machado, A. M. da Silva, J. J. Junior and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.* 2011, **100**, 2929–2935.
- 41 A. E. Chavis, K. T. Brady, G. A. Hatmaker, C. E. Angevine, N. Kothalawala, A. Dass, J. W. F. Robertson and J. E. Reiner, *ACS Sensors*, 2017, **2**, 1319–1328.
- 42 D. C. Machado, J. J. S. Júnior, M. C. A. Melo, A. M. B. Silva, A. Fontes and C. G. Rodrigues, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 56647–56655.
- 43 P. A. Gurnev, C. B. Stanley, M. A. Aksoyoglu, K. Hong, V. Adrian, S. M. Bezrukov, U, *Macromolecules.*, 2017,**50**, 2477–2483.
- 44 J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton and D. W. Deamer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, **93**, 13770–13773.
- 45 M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.*, 1999, **111**, 10371–10374
- 46 M. Muthukumar. *J. Chem. Phys.*, 2003,**118**, 5174.
- 47 K. Luo, T. Ala-Nissila, S. C. Ying, A. Bhattacharya, *Phys. Rev. Lett.*, 2007, **99**, 148102.
- 48 M. B. Luo and W. P. Cao, *Phys. Rev.*, 2012, **86**, 031914.
- 49 C. Wang, Y. C. Chen, S. Zhang, and M. B. Luo, *Macromolecules.*, 2014, 47,7215.
- 50 D. Mondal and M. Muthukumar, *J. Chem. Phys*, 2016, **145**, 084906.
- 51 J. L. Li, M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, J.A. Golovchenko, *Nature Mater*, 2003, **2**, 611.
- 52 C. T. A. Wong and M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.*, DOI:10.1063/1.3464333.
- 53 M. Muthukumar and C. Y. Kong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 5273–5278.
- 54 M. Muthukumar, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2007, **36**, 435–450.
- 55 M. Boukhet, F. Piguet, H. Ouldali, M. Pastoriza-gallego, J. Pelta and A. Oukhaled, 2016, 18352–18359.
- 56 J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz, B. J. Nablo and J. W. F. Robertson, 2010, **107**, 6–11
- 57 G. Baaken, I. Halimeh, L. Bacri, J. Pelta, A. Oukhaled and J. C. Behrends, *ACS Nano*, 2015, **9**, 6443–6449.
- 58 M. A. Aksoyoglu, R. Podgornik, S. M. Bezrukov, P. A. Gurnev, M. Muthukumar and V. A. Parsegian, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 1–6.
- 59 C.M.Hassan, N. A. Peppas, *Advances in Polymer Science.*, 2000, **153**,37-65.
- 60 K. Juntanon, S. Niamlang, R. Rujiravanit and A. Sirivat, *Int. J. Pharm.*, 2008, **356**, 1–11.
- 61 D. Mawad, L. A. Poole-Warren, P. Martens, L. H. Koole, T. L. B. Slots and C. S. J. van Hooy-Corstjens, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 263–268.
- 62 Muppalaneni and Omidian, *J Develop Drugs* 2013, **2**,3
- 63 G. Baaken, N. Ankri, A. K. Schuler, J. Rühle and J. C. Behrends, *ACS Nano*, 2011, **5**, 8080–8088.
- 64 O. V. Krasilnikov, P. G. Merzlyak, L. N. Yuldasheva and M. F. Capistrano, *Eur. Biophys. J.*, 2005, **34**, 997–1006.
- 65 M.C.A. Melo, L. R. Teixeira, L. Pol-Fachin, C. G. Rodrigues, *FEMS Microbiol Lett*, 2016, **363**, DOI: 10.1093/femsle/fnv207.
- 66 M.Boukhet,N. F. König, A. A. Ouahabi, G. Baaken, J. F. Lutz, J. C.Behrends, *Macromol Rapid Commun*, 2017,38, doi: 10.1002/marc.201700680.
- 67 J. J. Kasianowicz, J. W. F. Robertson, E. R. Chan, J. E. Reiner and V. M. Stanford, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2008, **1**, 737–766.
- 68 K. Luo, T. Ala-Nissila, S. C. Ying and A. Bhattacharya, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2008, **78**, 1–8.
- 69 P. Tian and G. D. Smith, *J. Chem. Phys*, 2003, **119**, 11475.
- 70 L. Z. Sun and M. B. Luo, *J. Phys. Condens. Matter* , DOI:10.1088/0953-8984/25/46/465101.
- 71 B. J. Jeon and M. Muthukumar, *J. Chem. Phys.*, 2014, **140**, 1–7A.
- 72 A. J. Storm, C. Storm, J. Chen, H. Zandbergen, J.-F. Joanny and C. Dekker, *Nano Lett.*, 2005, 1–5.
- 73 K. Luo, T. Ala-Nissila and S. C. Ying, *J. Chem. Phys.*, 2006, **124**, 1–6.A.
- 74 Meller, L. Nivon and D. Branton, *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **86**, 3435–3438.
- 75 D. K. Lubensky and D. R. Nelson, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 1824–1838.
- 76 K. Luo, T. Ala-Nissila, S. C. Ying and R. Metzler, *Epl* , DOI:10.1209/0295-5075/88/68006.
- 77 L. Gu, S. Cheley and H. Bayley, 2003, 1–6.
- 78 S. Howorka and H. Bayley, *Biophys. J.*, 2002, **83**, 3202–3210.

- 79 L. Movileanu, S. Cheley, S. Howorka, O. Braha, H. Bayley, *GenPhysiol.*, 2001, **117**, 239–251.
- 80 J. Sanchez-Quesada, A. Saghatelian, S. Cheley, H. Bayley, M. R. Ghadiri, *Angew Chem.*, 2004, Int Ed **43**, 3063–3067.
- 81 K. Luo, R. Metzler, T. Ala-Nissila and S. C. Ying, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, DOI:10.1103/PhysRevE.80.021907.
- 82 V. V. Palyulin, T. Ala-Nissila and R. Metzler, *Soft Matter*, 2014, **10**, 9016–9037.
- 83 A. Asandei, M. Chinappi, J. K. Lee, C. H. Seo, L. Mereuta, Y. Park and T. Luchian, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 1–13.
- 84 A. Y. Grosberg and Y. Rabin, *J. Chem. Phys.*, DOI:10.1063/1.3495481.
- 85 B. G. Colvin, *Nature.*, 1974, **248**, 756–759.
- 86 P. Zhang, D. Qiu, H. Chen, J. Sun, J. Wang, C. Qin and L. Dai, *J. Mater. Chem. A*, 2015, **3**, 1442–1449.
- 87 G. Tesei, G. Paradossi and E. Chiessi, .M. B. Luo, S. Zhang, F. Wu and L. Z. Sun, *Front. Phys.*, 2017, **12**, 1–9.
- 88 Komatsu, M.; Inoue, T.; Miyasaka, K. J, *Polym. Phys.* 1986, **24**, 303.

4.2 Artigo

“Transport of poly (vinyl pyrrolidone) through the α HL nanopore bathed in solution of ion of the Hofmeister series” a ser submetido na Faraday Discussions, fator de impacto 3.427

Transport of poly (vinyl pyrrolidone) through the α HL nanopore bathed in solution of ion of the Hofmeister series†

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Juliana P. Aguiar^{a,b}, Maria C. A. Melo^a, Sheila M. Barros^a, Artur, A. R. Silva,^{ab} Dijanah, C. Machado^a, Laércio Pol- Fachin^c and Claudio G. Rodrigues^{a,b*}

Natural or synthetic nanopores have been widely employed in the development of various analytical devices. The working principle of these devices is basically the translocation or interaction of individual analyte molecules with a single nanopore. The main advantage of nanopore-based devices is the ability to analyze the molecules in aqueous media and is therefore a non-destructive method. The elucidation of the translocation or interaction process of the analyte with the nanopore, as well as the discovery of the factors that may influence this process, are crucial in the improvement of these devices. The transport of a very simple polymer – poly (ethylene glycol) – through the α -hemolysin (α HL) nanopore in the presence of Hofmeister salts has been widely used as a model in several studies to understand the translocation and interaction of macromolecules in nanoconfined space. In this context aiming to understand the mechanisms involved in the interaction of others synthetic polymers with the protein nanopore, we report here the transport of poly (vinyl pyrrolidone) (PVP) through the α HL nanopore bathed in solution of ion of the Hofmeister series. In this study, we considered the influence of the Hofmeister series cations on a simple bimolecular complexation reaction between PVP and α HL nanopore at the single-molecule level. The kinetic constants (on-rate and off-rate) of interaction of PVP molecules with α HL nanopore depend on the type of cation. In the case of on-rate constant, the difference reaches two-fold. Because of this, the transition rate of the sensor was changed. The cations track the Hofmeister ranking according to their influence upon the on-rate constant. An inverse relationship was demonstrated for the off-rate constant and the solubility of PVP. Thus, the PVP- α HL nanopore interaction can be influenced by the type of cation. The cation-induced specific effect on PVP interaction with a single α HL nanopore appears to occur by competition of the cation and polymer by water. Additionally, we observed mainly three resistive pulse patterns with only one level of current blockades. One type of resistive pulse event, with deep block level with current decrease of approximately 93%, so, we believe that this is the direct translocation of a PVP through the β -barrel, exiting on the cis side of the α HL nanopore. Finally, our results represent a guide to select the appropriate physicochemical conditions that enhance the translocation and interaction of the polymeric analyte with the protein nanopore.

Introduction

Biological nanopores are known to interact with synthetic and biological polymers, enabling their use in label-free single-molecule analytical tasks such as sequencing and/or mass discrimination.¹⁻³ The latter, called nanopore-based single molecule mass spectrometry (Np-SMMS) has, to date, only been shown for one type of the synthetic polymer, poly (ethylene glycol) (PEG). Using the fact that the amplitude of the PEG-induced current blockade of the pore depends on the polymer molecular weight, the studies clearly resolved the repeat unit of ethylene glycol from a polydisperse PEG sample.^{2,4,5} Much of the success of this application is due to the greater polymer-nanopore attraction induced by the extreme KCl 4 M.⁶ Electrolyte solutions play essential roles in life and

physical sciences. Salts can strongly affect the solubility and behavior of other solutes such as macromolecules and nonpolar molecules in aqueous solutions.⁷⁻¹⁰ Influence of the salt in protein or abiotic polymers is generally called Hofmeister effects.⁷⁻¹¹ The competition between ions and analyte for water is frequently noted as one possible reason for Hofmeister effects.⁹⁻¹² The Hofmeister series has become the subject of a very active research area in recent years.^{10,13} The first attempt to account for the Hofmeister effects is based on the changes in the bulk water structure induced by ions via ionic hydration.^{14,15} Ion specificity depends on the ability of the ion to make (kosmotropic) or break (chaotropic) hydrogen bonds in the water.^{15,16} Indeed, the Hofmeister series has shown to have a universal utility not only in biochemistry, but also in areas such as physics, colloid, polymer and surface chemistry, although the mechanism involved is still being systematically debated and revisited.^{8,17-20} The study of the effects of ions in confined systems, such as the stochastic sensors based on the unitary nanopore protein, has also been intensifying in the last years, considering the great biotechnological importance of this sensor.^{21,22} Recently, we have shown that the increase in salt concentration or alteration of the ionic composition of the membrane-bathing solution modifies the sensitivity of the sensor formed by α -hemolysin (α HL) nanopore, indicating that

^a Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil. E-mail: cgrufpe@gmail.com; Fax: +55 81 2126 8560; Tel: +55 81 2126 8535

^b Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

^c Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil

† The authors dedicate this work to Dr Oleg Vladimirovich Krasilnikov (in memoriam).

the Hofmeister effects are also applicable to the PEG on the nanoconfined spaces.^{12,13} As emphasized above, most of the studies used PEG as a model to study the interaction of synthetic polymers with the protein nanopore. Aiming to understand the mechanisms involved in the interaction of others synthetic polymers with the protein nanopore, we report here the transport of poly (vinyl pyrrolidone) (PVP) through the α HL nanopore bathed in solution of ion of the Hofmeister series.

Experimental

High quality (>99.99%) salt (KCl, NaCl, CsCl and RbCl), 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) and Poly (vinyl pyrrolidone, 40KDa), henceforth PVP40, was purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). Wild type *Staphylococcus aureus* α -hemolysin (α HL) was purchased from (Calbiochem, Madison, WI). 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (TRIS) and citric acid were from Schwarz/Mann Biotech (Cleveland, OH) and Fluka (Buchs, Switzerland), respectively. All chemicals and solvents were of analytical-grade and used as received, without further purification. High-purity water was obtained after a Milli-Q plus (Billerica, USA) treatment.

Lipid monolayer apposition technique were used to form solvent-free planar lipid bilayer, with the DPhPC in hexane (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), as described previously.^{12,13} If not mentioned otherwise, the planar lipid bilayer has capacitance of approximately 40 pF. Because it was recently shown that the elevated ionic concentrations considerably improve single molecule identification by α HL nanopore (RODRIGUES et al., 2011) in the present study membrane-bathing solutions contained 4 M KCl; CsCl or RbCl in 5 mM TRIS adjusted to pH 7.5 with citric acid, at 25 ± 1 °C. PVP40 was added to the “trans” compartment of the experimental chamber to permit the partitioning of polymer through of the protein nanopore and measurement at temporary change in the transpore ionic current. α HL was added to the “cis” side of the membrane in a concentration sufficient to form solitary nanopore in planar lipid bilayer. Single α HL nanopore incorporation and measurement of transport analysis was done essentially as described previously.^{12,13,23} Briefly, the on-rate constant was defined as $K_{on}=1/\tau_{on}$ [PVP]. 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 off-rate constant was defined as $K_{off}=1/\tau_{off}$, where τ_{off} is the characteristic time of PVP staying in the pore. The constant of PVP- α HL nanopore complex formation K_F , was calculated by using the association K_{on} and dissociation K_{off} rate constants as $K_F=K_{on}/K_{off}$. Analysis of current blockade amplitudes and event durations was performed using Clampfit

software package v10.2 (Molecular devices, USA). Between 2000 and 10000 events were recorded for each experiment. Events shorter than 10 μ s were judged to represent transient collisions of PVP40 with the mouth of the nanopore and were ignored in our analysis. Membrane potential was maintained using Ag/AgCl electrodes in 3M KCl 2% agarose bridges assembled within standard 200- μ L pipette tips. The current was recorded with a patch clamp Axopatch 200B amplifier (Molecular devices, USA) in voltage clamp mode and processed by a Butterworth filter (model 9002; Frequency Devices, Haverhill, MA) at 15 kHz and directly saved into the computer memory with a sampling frequency of 50 to 100 kHz. The limiting solubility of the PVP was estimated by adaptation of the cloud point method as described previously.²³

Results and discussion

Integral effect of PVP at α HL nanopore conductance in 4 M chloride solutions: voltage dependence

We examined the conductance of single α HL nanopore surrounded by 4 M chloride solutions of different salts. At the chosen pH (7.5), the channel was in a high conductance state at all transmembrane potentials from - 200mV to + 200mV in all chlorides solutions. The nanopore conductance was considerably higher in solutions of KCl, intermediary for CsCl and lower for RbCl solution in the applied potential of 40mV (Fig. 1). In addition, a strong correlation between ionic conductivity and ion channel conductance is also observed (Fig 1A). This result is consistent with earlier data.^{13,23,24} The charge from α HL channel lumen defines the weak anionic selectivity of the channel and that the charge at the pore entrances determines the shape of the conductance-voltage dependencies.²⁵

Additionally, PVP influences the integral conductance of the nanopore in chloride solutions. Figure 1 demonstrates the influence of several concentrations (4, 40 and 400 μ M) of PVP at the nanopore conductance in the KCl, CsCl, RbCl solutions. As observed in studies of other non-ionic polymers, such as poly (ethylene glycol) (PEG) (Rodrigues et al., 2008; Rodrigues et al., 2011). We found that the PVP effect is strongly influenced by ion type and is voltage- and dose-dependent (Fig. 1 B, C, D). The maximal suppression of PVP-induced on the α HL nanopore conductance was always observed at 120 mV. A strong decrease in conductance was established in the presence of KCl, when compared to CsCl and RbCl. This indicates a dependence on the cation type. These results are pioneering and can help determine the proper conditions for detection and the mechanisms involved in the translocation and interaction of PVP with the protein nanopore.

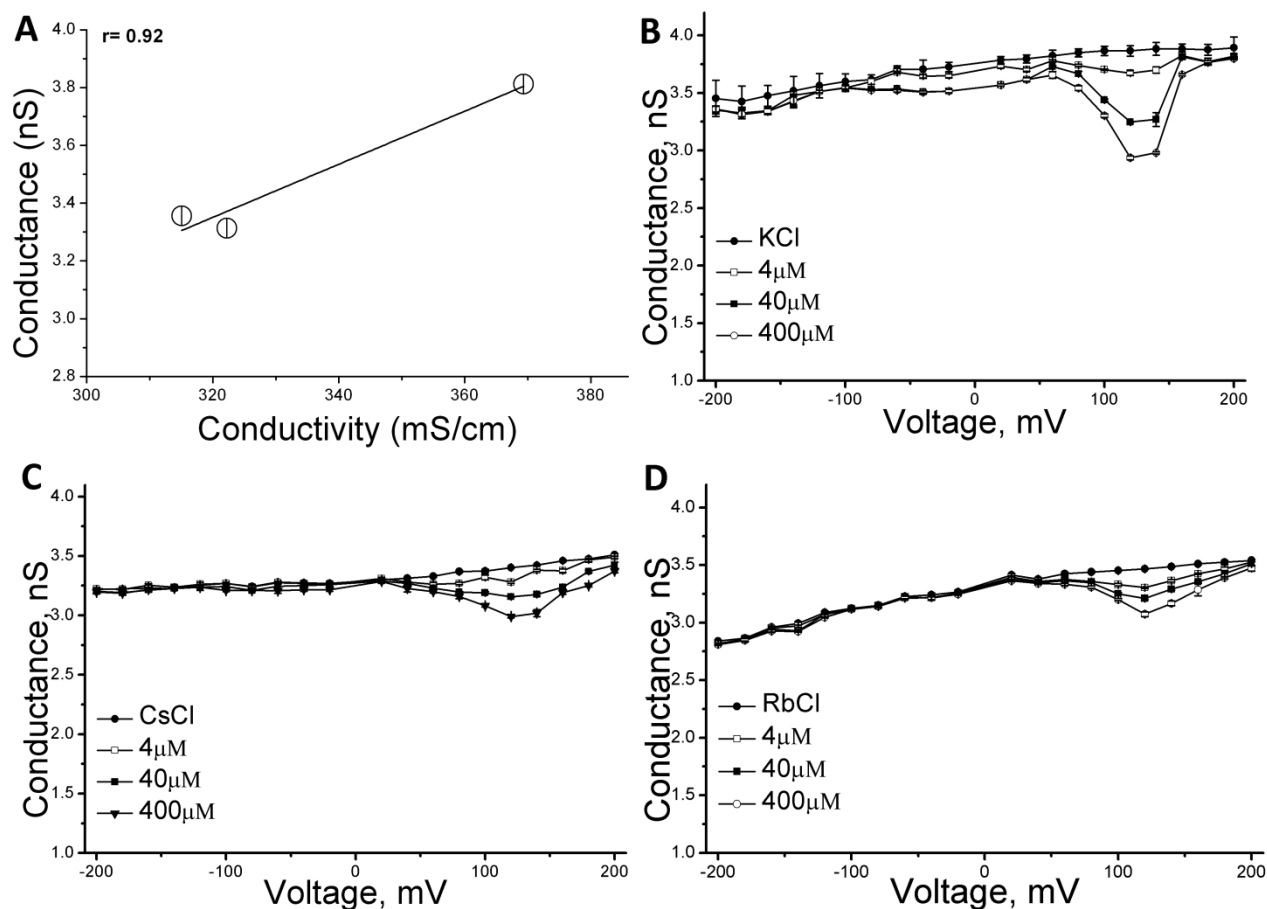


Fig. 1 (A) The correlation between the ionic conductivity of cations and the α HL channel conductance in 4 M cations solutions. Means from at least three separate experiments $\pm$ SD (Line). The correlation coefficient is shown in the figure. Effect of trans-side addition of PVP to membrane-bathing solutions on channel conductance. (B) 4 M KCl; (C) 4 M CsCl and (D) 4M RbCl. The result of at least three independent experiments (mean $\pm$ SE) is presented in each case.

Single molecule events: appearance and frequency

Typical high-resolution recordings of the ionic current through the α HL nanopore in the presence of PVP are shown in Fig. 2. Large ionic current flow through a single α HL nanopore when its aqueous lumen is free of PVP. In the presence of PVP, the ion current through the single α HL nanopore exhibits stepwise transitions between completely open and partially blocked states. Each decrease and subsequent increase in the ionic

current corresponds to a single PVP molecule entering and exiting the pore, respectively. The amplitude, frequency, and duration of these transient steps are very characteristic of the type of cations (Fig. 2 B, C and D). Results obtained in KCl, CsCl, and RbCl solutions indicate that the frequency of events is high in the presence of KCl, lower in the presence of CsCl and lowest in RbCl. The high concentration of cation or anion also influences the partitioning of other polymers, as reported in previous studies.^{12,23}

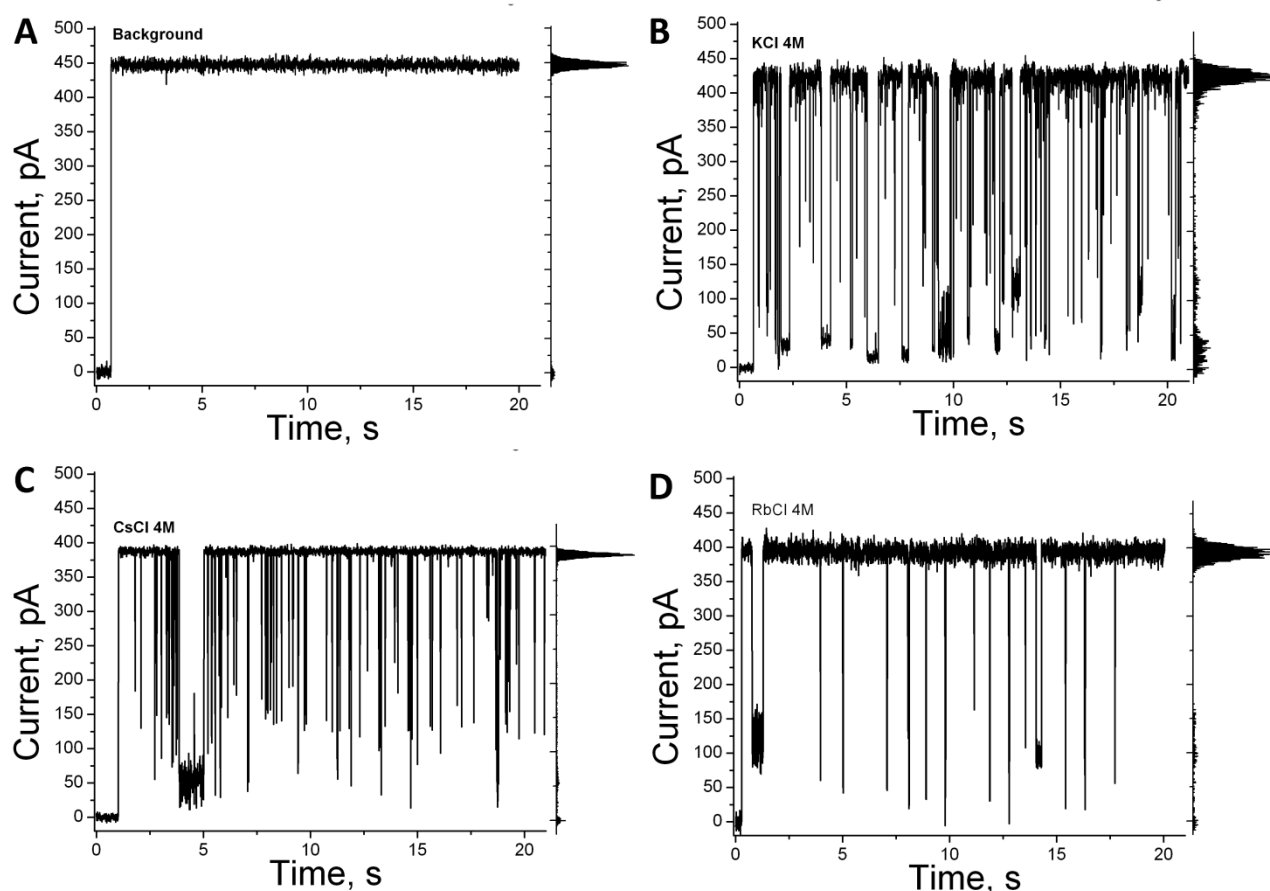


Fig.2 Typical traces of the ion current through single aHL channels in the presence of PVP in the bath solution. Voltage shift from zero to 120 mV. Halide concentration was 4 M. Concentration of PVP was 400 mM (for A–C). The respective all-point histograms are shown at the right of each record and used to give the mean value of blockage amplitudes. The effectiveness of such inhibition was very similar for all cations and comprised 75–85% of the maximal current.

The rate constants of PVP/ α HL nanopore interaction in the presence of different alkaline chlorides

Rate constant for the association (K_{on}) is intimately linked with the frequency of blocking events appearance. It was determined from the long record like those shown in Fig. 2. K_{on} was calculated by assuming a simple bimolecular interaction between PVP-nanopore, such that $K_{on} = 1/\tau_{on}[PVP]$, where $[PVP]$ is the PVP concentration and, τ_{on} is the characteristic time between successive blockages.^{6,23} The rate constant for the dissociation (K_{off}) of PEG was determined as $\frac{1}{\tau_{off}}$, where τ_{off} is the residence time of PVP into the nanopore - duration of the

blockages, which was established from measuring more than 10^5 events as those shown in Fig. 2. Results are shown in Figure 3, where clear dependence of on-rate and off-rate (Fig. 3A) constants on the cation type could be seen. The formation constant (K_F), which is a derivate of association and dissociation constant, ($K_F = K_{on}/K_{off}$), follows the same behaviour (Fig. 3B). We have demonstrated that the on-rate constant (measured at an optimal 120 mV) is strikingly dependent on type of cation (Fig. 3A, solid line). The largest on-rate constant was observed with KCl in the bath and the smallest in the presence of RbCl. These dependencies of the kinetic constants resemble those in we published recently.^{12,13}

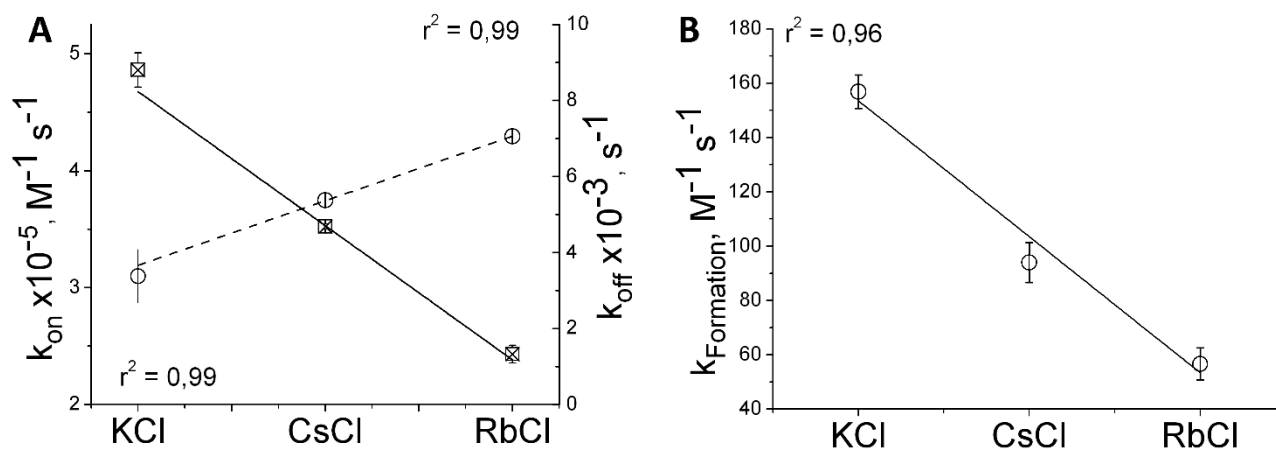


Fig. 3 Specific ionic effect on the PVP/ α HL nanopore interaction. The average K_{on} (A, solid line), K_{off} (dashed line) (A), and PVP/ α HL nanopore complex formation constant (B) in 4 M solutions of different cations (Data points) Means ($\pm$ SD) of at least three single protein nanopores reconstituted in separate experiments with >5000 events as in Fig. 2. The data presented in panel A were used to build the dependence shown in panel B.

Solubility of PVP and its influence on rate constants of PVP- α HL nanopore interaction in the presence of different alkali chlorides

The solubility of both synthetic and natural hydrophilic polymers in aqueous systems is influenced by ions. This specific ion effect generally follows the Hofmeister Series (WANG & SATOH, 2009). We studied the solubility of PVP with the salt solutions composed of the cations of the 1A family at 4 M concentration. We establish that the ability of ions to solubilize PVP decreases in the following sequence: $Rb^+ > Cs^+ > K^+$ (Fig. 4 A). Differently from the sequence for PEG, already described in other studies $Cs^+ > K^+ > Rb^+$.²⁶ Both sequences do not obey the Hofmeister Series.¹⁵ Supposedly, the cations mediated their effects by influencing both the water and the polymer molecule. According to some reports^{27,28} the position of some cations in the series can be altered depending on the system being studied. Knowing that sensibility of the stochastic sensor based on the α HL nanopore for PEG increases with the decrease of the solubility of the polymer; This allows us to predict that among the alkaline chlorides studied, KCl should be used as an "ideal" salt to favor the stochastic detection of the PVP, since it

presents a lower solubility (greater salting-out effect). The established values of the solubilities showed a significant negative correlation with the association rate constant and significant positive correlation with the dissociation rate constant and the constant formation (Fig. 4B, C and D respectively). In accordance with the effect of halide anions, the alkali cations perform their influence at both rate constants for PVP/ α HL nanopore interaction through of the same salting-out phenomenon. This specific effect appears dominated by hydration-dehydration processes where cations and PVP compete for water.

These results corroborate the idea of the salting-out effect in confined spaces proposed by Rodrigues and colleagues to explain the strong dependence of both the resistive pulse frequency and the residence time of the polymer in the nanopore (Rodrigues et al 2008, 2011). In salting-out, competition for hydration water between ions and non-electrolytes leads to precipitation of the latter. This model requires the assumption that hydration is somehow compromised when the polymer is in the nanopore. Thus, a polymer molecule entering the pore encounters an environment depleted of water, i.e. essentially finds itself in a bad solvent, and therefore has an increased probability of undergoing collapse and adsorption to the protein channel.^{6, 12,23,29}

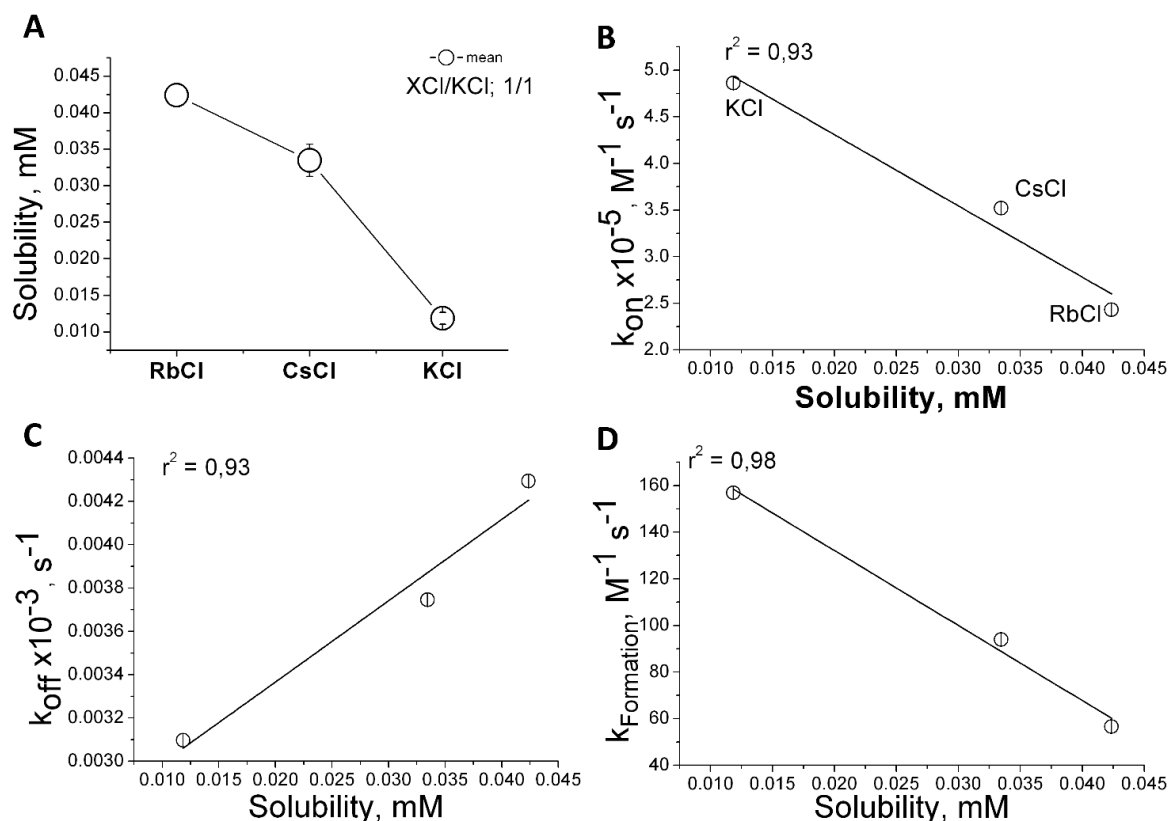


Fig. 4 Solubility of PVP in 4 M cations solutions. (A) Solubility of PVP at 1:1 (M/M) KX/KCl ratio, where X represents K, Cs, Rb. (Lines) Total salt concentration was 4 M. (Data points) Means of 5–8 separate experiments $\pm$ SD. The k_{on} (B) and (C) constants of PVP/ α HL channel interaction as a function of PVP solubility. (Data points) Means of 5–8 separate experiments $\pm$ SD for solubility and at least three separate experiments for the rate constants. (Lines) First-order regression fits of the data. The correlation coefficient is shown in the figure. (D) Dependence of solubility on PVP-nanopore formation constant. The data presented in panel B and C were used to build the dependence shown in panel D.

Mechanisms the translocation of PVP through α HL nanopore bathed by 4M KCl

To promote greater clarification about the mechanisms involved in the sensibility of the stochastic sensor based on the nanopore unitary proteins, we evaluated the mechanisms involved in the translocation of PVP in 4M KCl.

In polymers studies, a numerical model was formulated and associated important aspects of the apparent sensitivity of this polymer-pore interaction to the degree of polymerization. However, a full physical explanation of the exquisite dependence of the residual pore current of the blocking polymer is still lacking. In

particular, it is still not clear which molecular properties, i.e. mass itself, physical length of the chain, monomer number, cross-sectional area, hydrodynamic volume, conformations, density or hydrophobicity are dominant or at least important in determining the depth of block or the dwell time of resistive pulses.²⁹ As shown, in detail, in figure 5 the interactions of the PVP molecules with the α HL nanopore produced 3 different resistive pulses patterns (Level 1, 2 and 3), which are repeated constantly throughout the recording of current. The blockages show relatively rapid transitions between levels and types de blockages can be associated with different results of PVP-nanopore interaction.

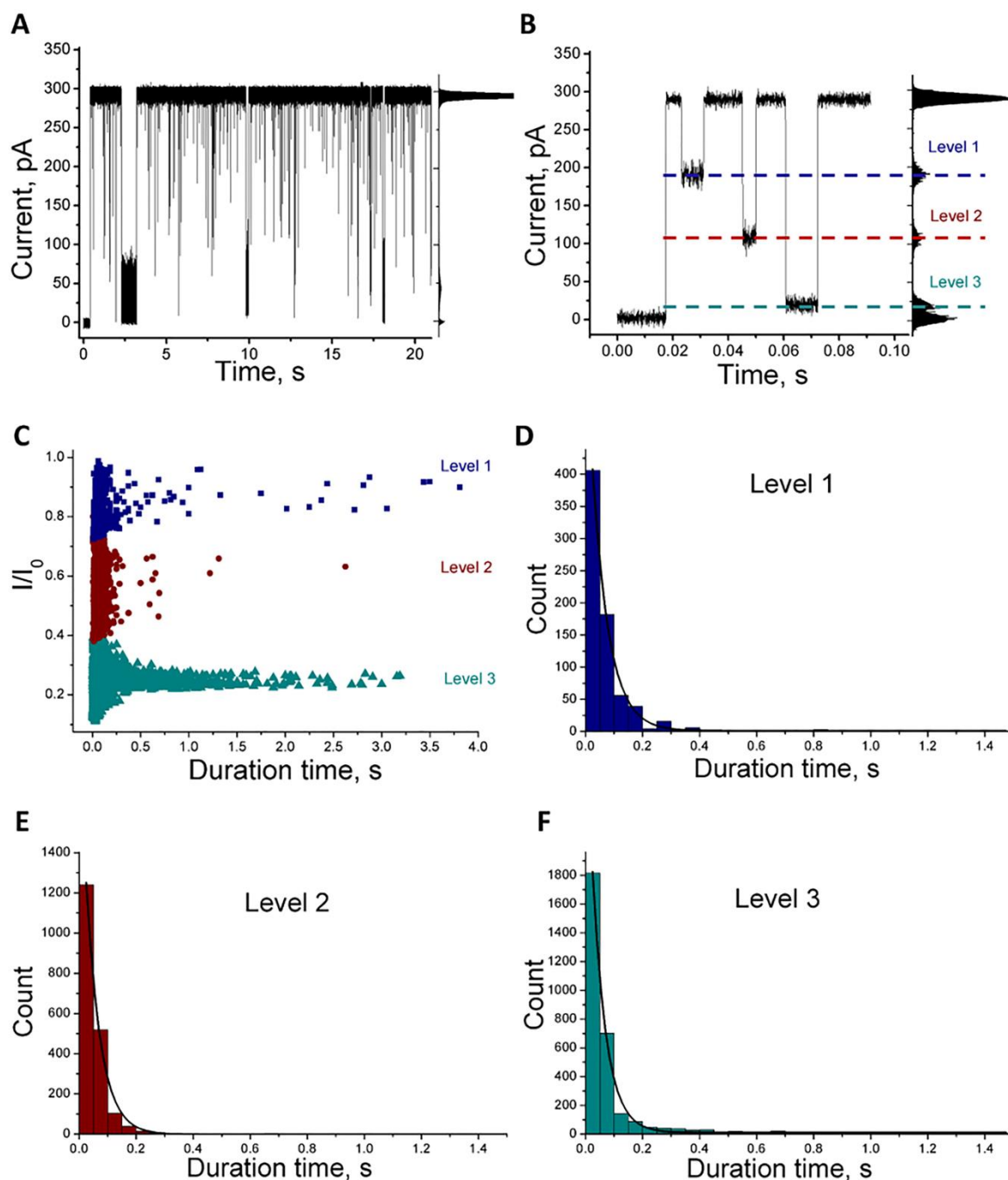


Fig. 5 Interactions of the PVP molecules with the α HL nanopore. (A) Typical traces of the ion current through single α HL channels in the presence of PVP in the bath solution. Voltage shift from zero to 120 mV. Halide concentration was 4 M. Concentration of PVP was 4 μ M. The respective all-point histograms are shown at the right of record and used to give the mean value of blockage amplitudes. (B) The interactions of the PVP molecules with the α HL nanopore produced 3 different resistive pulses patterns (Level 1, 2 and 3). (C) Scatter plot and characteristic times to different type of events for 4 μ M PVA at 100 mV. Each point represents a single event. Characteristic times of the resistive pulses Level 1 (D), level 2 (E) and level 3 (F).

As reported before, we attribute these spikes to molecular events whereby a single PVP enters the protein β -barrel and induces reversible partial blocks of the ionic current through steric occlusions of the ion permeation pathway, before getting released to the cis side of the membrane under the influence of the potential imposed across the pore, positive on the polymer side addition. We stress that in all the analyses we excluded the distinct population of very fast occurring, low-amplitude spikes, which reflected blockage events due to bumping into of the polymer the pore mouth, and not the actual capture events of the polymer into the inner region of the α HL β -barrel that eventually lead to the electrophoretic translocation of the PVP to the cis side of the membrane. The translocation was observed experimentally by the abrupt reduction of the current to $\sim 93\%$ of the open pore value (Level 3), that is, the same criterion adopted in other studies.^{30–33} Levels 1 e 2 were observed experimentally by the abrupt reduction of the current to $\sim 32.75\%$ and 62.06% , respectively. The resistive pulses are dependent on the polymer length N , polymer configuration, polymer–pore interaction, and charge of the polymer.^{34,35}

The behaviour can be explained using four factors: (1) volume occupancy fraction inside the pore; (2) the conformation of the polymer; (3) the location of the polymer inside the pore; and (4) the total charge inside the pore.^{36,37} We believe that in this case, each of the current profiles represents the interaction of the polymer with the two regions (Level 1 and 2) of pore narrowing before finally doing the complete translocation (Level 3). The α -HL's β -barrel (inner diameter of $20\text{ \AA}$) and its vestibule (average diameter of $46\text{ \AA}$) have distinct sizes and distinct chemical and topological properties.³⁸ This results in distinct current blockades when the polymer resides of the along the nanopore. The MD simulation results show that PVP molecules demonstrate globular structure with angularly shaped, when in solution. In addition, polymers when they are confined in the pore at high salt concentrations are not present as random coils, but also as globules.³⁹

This behavior may be associated with decrease in the mean interaction times as the polymer captured to the pore. As shown in the scatter plot and the time duration histograms for each level (Fig. 5C–F). For level 3 events, there is deep current level. We believe that this is the direct translocation of a PVP chain through the β -barrel, exiting on the cis side of the pore. It presents an average translocation time of $0.047 \pm 0.001\text{ s}$. There is a $53.94 \pm 2.18\%$ probability of a PVP chain translocation event (level 3) occurring. These differences in translocation dynamics of each polymer probably depends on the nature of the polymer chain. As for the other two levels, the time gradually increases from level 2 ($0.050 \pm 0.00164\text{ s}$) to level 1 ($0.057 \pm 0.001\text{ s}$). Considering that level 1 presents the shallowest level blockade. We believe that the polymer it may fold itself. Chains with folded conformation are less likely to translocate through the pore, resulting in a greater interaction time.^{33,40} Similar results are obtained in the work of with polypeptide.⁴⁰ It is presumed that the PVP chain is trapped in

the β -barrel, and then it threads into part of constriction and delay longer time to translocate through the pore.⁴⁰ This behavior suggests that the different conformations of the polymer interact differently with the pore interaction sites. Besides the technique allow the detection of the PVP, still can infer about the conformations of the polymer in solution of high ionic strength.

Conclusions

In this work, we systematically investigated the translocation and interaction of the nonionic polymer, PVP, with a protein nanopore formed by α HL in planar lipid bilayers in solutions of different of the cations of the Hofmeister series. We found that the type of cation has very influence on the rate constants of the process. Consequently, the transition rate of the nanopore-based sensor was correspondingly changed. All probed cations follow the Hofmeister ranking according to their influence on the on-rate constant ($K^+ > Cs^+ > Rb^+$). An inverse relationship was demonstrated for the off-rate and the solubility of the analyte ($K^+ < Cs^+ < Rb^+$). Therefore, a salting-out phenomenon is responsible for the cation induced effect on single molecule interaction of PVP with solitary protein nanopores. The specific effect appears dominated by hydration-dehydration (chemical) processes where ions and cosolutes compete for water. Additionally, in the solution (4 M KCl) the occurrence of direct translocation of PVP through the nanopore corresponds to approximately 50% of all types of resistive pulses, therefore, in only half the times the PVP enters one side in the nanopore, its output occurs from the opposite side. The results found in this study can help the understanding of the physicochemical conditions of molecular translocation or interaction of the polymeric analyte with the protein nanopore.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant 470008/2012-1 and, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Grant APQ-0707-2.09/15, Brazil.

Notes and references

- 1 J. Clarke, H. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid and H. Bayley, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, 4, 265–270.
- 2 J. W. F. Robertson, C. G. Rodrigues, V. M. Stanford, K. A. Robinson, O. V. Krasilnikov and J. J. Kasianowicz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, 104, 8207–11.
- 3 J. P. Aguiar, J. J. S. Junior, D. C. Machado, M. C. A. Melo and C. G. Rodrigues, *Quim. Nova*, 2015, 38, 817–827.

- 4 A. Balijepalli, J. W. F. Robertson, J. E. Reiner, J. J. Kasianowicz and R. W. Pastor, .
- 5 M. Boukhet, F. Piguet, H. Ouldali, M. Pastoriza-gallego, J. Pelta and A. Oukhaled, 2016, 18352–18359.
- 6 O. V. Krasilnikov, C. G. Rodrigues and S. M. Bezrukov, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, 97, 1–4.
- 7 F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1888, 24, 247–260.
- 8 Y. Zhang and P. S. Cremer, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2010, 61, 63–83.
- 9 P. Lo Nostro and B. W. Ninham, *Chem. Rev.*, 2012, 112, 2286–322.
- 10 W. J. Xie and Y. Q. Gao, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, 4, 4247–4252.
- 11 C. G. Rodrigues, D. C. Machado, A. M. da Silva, J. J. Junior and O. V. Krasilnikov, *Biophys. J.* 2011, 100, 2929–2935.
- 12 J. Paterova, K. B. Rembert, J. Heyda, Y. Kurra, H. I. Okur, W. R. Liu, C. Hilty, P. S. Cremer and P. Jungwirth, 2013, 1–31.
- 13 D. C. Machado, J. J. S. Júnior, M. C. A. Melo, A. M. B. Silva, A. Fontes and C. G. Rodrigues, *RSC Adv.*, 2016, 6, 56647–56655.
- 14 M.W. Washabaugh, K.D. Collins, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261,12477–12485.
- 15 K.D. Collins, *Biophys. J.*, 1997, 72, 65–76
- 16 HRIBAR et al 2002 B. Hribar, N. T, Southall, V. Vlachy, K. A Dill. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 12302–1231.
- 17 W. Kunz, J. Henle and B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2004, 9, 19–37.
- 18 M. T. Record, E. Guinn, M. T. Record, E. Guinn, L. Pegram and M. Capp, *Faraday Discuss.*, 2013, 160, 9–44.
- 19 L. X. Dang, X. Sun, B. Ginovska-Pangovska, H. V. R. Annapureddy and T. B. Truong, *Faraday Discuss.*, 2013, 160, 151–160.
- 20 B. Eisenberg, *Faraday Discuss.*, 2013, 160, 279–296.
- 21 P. A. Gurnev, D. Harries, V. A. Parsegian and S. M. Bezrukov, *ChemPhysChem*, 2009, 10, 1445–1449.
- 22 A. Oukhaled, L. Bacri, M. Pastoriza-Gallego, J. M. Betton and J. Pelta, *ACS Chem. Biol.*, 2012, 7, 1935–1949.
- 23 C. G. Rodrigues, D. C. Machado, S. F. Chevtchenko and O. V Krasilnikov, *Biophys. J.*, 2008, 95, 5186–5192.
- 24 Y. Marcus, *Ion properties*, Marcel Dekker, New York, 1997.
- 25 P. G. Merzlyak, M.-F. P. Capistrano, A. Valeva, J. J. Kasianowicz and O. V Krasilnikov, *Biophys. J.*, 2005,
- 26 K. D, Collins, G.W, Neilson, J. E, Enderby. *Biophys. Chem* 2007;128:95.
- 27 J. Lyklema, *Chem. Phys. Lett.*, 2009, 467, 217–222.
- 28 *Specific Ion Effects*, 1st ed.; Kunz, W., Ed.; World Scientific: Singapore, 2010.
- 29 M. Talarimoghari, G. Baaken, R. Hanselmann and J. C. Behrends, *Eur. Phys. J. E*, 2018, 41, 77.K.
- 30 L. Movileanu, S. Cheley, S. Howorka, O. Braha, H. Bayley, *GenPhysiol.*, 2001,117,239–251.
- 31 J. Sanchez-Quesada, A. Saghatelian, S. Cheley, H. Bayley, M. R. Ghadiri, *Angew Chem.*, 2004, Int Ed 43, 3063–3067.
- 32 G. Maglia, M. R. Restrepo, E. Mikhailova and H. Bayley, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, **105**, 19720–19725.
- 33 Q. Chen, J. Liu, A. E. P. Schibel, H. S. White and C. Wu, *Macromolecules*, 2010, 43, 10594–10599.
- 34 K. Luo, T. Ala-Nissila, S. C. Ying and A. Bhattacharya, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, 2008, **78**, 1–8.
- 35 Murugappan Muthukumar. *Polymer Translocation*. CRC Press, 2011
- 36 P. Tian and G. D. Smith, *J. Chem. Phys.*, 2003, 119, 11475.
- 37 Luo, T. Ala-Nissila, S. C. Ying and A. Bhattacharya, *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, DOI:10.1103/PhysRevE.78.061918.
- 38 L. Q. Gu and J. W. Shim, *Analyst*, 2010, 135, 441–451.
- 39 Grodaal, V. S. Vikhrenkoa, A. H. Poghosyanb, P. K. Hakobyanb, L. H. Arsenyanb, A. A. Shahinyanb, *JNS*, 2015, 1, 24, 60-67.
- 40 A. Asandei, M. Chinappi, J. K. Lee, C. H. Seo, L. Mereuta, Y. Park and T. Luchian, *Sci. Rep.*, 2015, 5, 1–13.

5 CONCLUSÕES

- i) O nanoporo da α HL detecta o PVA e o PVP nas soluções analisadas, porém, o KCl é mais adequada;
- ii) O PVA induz quatro tipos de pulsos resistivos e dois modos de translocação;
- iii) A frequência de translocação e o tempo de permanência do PVA no nanoporo são dependentes do potencial transmembrana;
- iv) As constantes de associação e de dissociação do complexo PVP-nanoporo dependem do tipo de íon de Hofmeister;
- v) O PVP induz três tipos de pulsos resistivos e um modo de translocação.
- vi) Propomos que cátions de Hofmeister podem formar complexos com o PVA e PVP, tornando-os moléculas carregadas, influenciando na interação e translocação destes polímeros através de espaços nanoconfinados.

Deste modo, nossos resultados podem dar uma nova visão sobre a dinâmica de translocação de polímeros em sistemas de nanoconfinamento e contribuirão para o desenvolvimento de dispositivos baseados em nanoporos.

REFERÊNCIAS

- ABDELNUR, P.A Espectrometria de massas e as bio-moléculas: Relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íon e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos. Universidade Estadual de Campinas.Tese de doutorado, 2010.
- AGUIAR, J. P. et al. **Química Nova**. v. 38, n. 6, p. 817–827, 2015.
- AKSIMENTIEV, A. Deciphering ionic current signatures of DNA transport through a nanopore. **Nanoscale**, v. 2, n. 4, p. 468–483, 2010.
- AKSOYOGLU, M. A. et al. Size-dependent forced PEG partitioning into channels: VDAC , OmpC , and α -hemolysin. **Proceedings of the National Academy of Sciences** n. 18, p. 1–6, 2016.
- ARBUTHNOTT, J. P.; FREER, J. H; BILLCLIFF, B. Lipid-induced polymerization of staphylococcal α -toxin. **Journal of general microbiology**, v.75, p. 309-319, 1973
- ASANDEI, A. et al. Placement of oppositely charged aminoacids at a polypeptide termini determines the voltage-controlled braking of polymer transport through nanometer-scale pores. **Scientific Reports**, v. 5, n. November 2014, p. 1–13, 2015.
- AYUB, M. et al. Nanopore-Based Identification of Individual Nucleotides for Direct RNA Sequencing. **Nano Letters**, p. 7–13, 2013.
- BAAKEN, G. et al. High-Resolution Size-Discrimination of Single Nonionic Synthetic Polymers with a Highly Charged Biological Nanopore. **ACS Nano**, v. 9, n. 6, p. 6443–6449, 2015.
- BALIJEPAI, A. et al. Theory of Polymer – Nanopore Interactions Refined Using Molecular Dynamics Simulations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135. n. 18, 2013.
- BANERJEE, A. et al. 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.
- BAYLEY, H.; CREMER, P. S. Stochastic sensors inspired by biology. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 226–230, 2001.
- BARROS,S.M. Estudo dos efeitos da estrutura química de moléculas poliméricas na interação com o nanoporo protéico unitário.Universidade Federal de Pernambuco.Dissertação de Mestrado, 2012.
- BAYLEY, H.; JAYASINGHE, L. Functional engineered channels and pores (Review). **Molecular membrane biology**, v. 21, n. August, p. 209–220, 2004.
- BERUBE, B. J.; WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. **Toxins**, v. 5, n. 6, p. 1140–1166, 2013.
- BHAKDI, S; TRANUM-JENSEN, J. **Microbiology Reviews**, v. 55, p. 733–751, 1991.

BIBI, F. et al. A Review: Origins of the Dielectric Properties of Proteins and Potential Development as Bio-Sensors. **Sensors**, v. 16, n. 8, p. 1232, 2016.

BLUM, A. P. et al. Stimuli-Responsive Nanomaterials for Biomedical Applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 6, p. 2140–2154, 2015.

BOERSMA, A.J.; BRAIN, K.L.; BAYLEY, H. Real-Time Stochastic Detection of Multiple Neurotransmitters with a Protein Nanopore. **ACS Nano**, v. 6, p. 5304–5308, 2012.

BOHN, M.; HEERMANN, D.W. Conformational properties of compact polymers. **The Journal of Chemical Physics**, v. 130, p. 174901, 2009.

BOUKHET, M. et al. Probing driving forces in aerolysin and α -hemolysin biological nanopores: electrophoresis versus electroosmosis. **Nanoscale**, v. 8, p. 18352–18359, 2016.

BRAHA, O. et al. Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 1005–1007, 2000.

BRANTON et al. The Potential and Challenges of Nanopore Sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1146–1153, 2008.

BRETTON et al. Exploration of Neutral versus Polyelectrolyte Behavior of Poly(ethylene glycol)s in Alkali Ion Solutions Using Single-Nanopore Recording. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 4, p. 2202–2208, 2013.

BROOIJMANS, N. KUNTZ, I.D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, p. 335–373, 2003.

BUTLER, T. Z. GUNDLACH, J. H. TROLL, M. Determination of RNA orientation during translocation through a biological nanopore. **Biophysical journal**, v. 90, n. 1, p. 190–199, 2006.

CANEVAROLO JR., S.V. Ciências dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: Artliber Editora. 2a edição, 2006.

CARLINI, A. S.; ADAMIAK, L.; GIANNESCHI, N. C. Biosynthetic Polymers as Functional Materials. **Macromolecules**, p. acs.macromol.6b00439, 2016.

CASSIDY, P.; HARSHMAN, S. Studies on the binding of staphylococcal 125I-labeled alpha-toxin to rabbit erythrocytes. **Biochemistry**, v. 15, n. 11, p. 2348–55, 1976.

CHAVIS, Amy E.; BRADY, Kyle T.; HATMAKER, Grace A.; et al. Single Molecule Nanopore Spectrometry for Peptide Detection. **ACS Sensors**, v. 2, n. 9, p. 1319–1328, 2017.

COLLINS, K.D. Sticky ions in biological systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 5553–5557, 1995.

COLLINS, K.D. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. **Biophysical Journal**, v. 72, p. 65–76, 1997.

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.

COMER, J. H.O.A. AKSIMENTIEV, A. Toward detection of DNA-bound proteins using solid-state nanopores: Insights from computer simulations. **Electrophoresis**, v. 33, n. 23, p. 3466–3479, 2012.

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

CORNELL et al. A Biosensor that Uses Ion-Channel Switches. **Nature Nanotechnology**, v.387, p. 580, 1997.

CHELEY, S. et al. Stochastic sensing of nanomolar inositol 1,4,5-trisphosphate with an engineered pore. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 829-838, 2002.

CHEN, R. Mass spectrometry for polymer characterization, Thesis of Doctor of Philosophy, university of Alberta, Department of Chemistry, Alberta, Canada, p:2-35, 2002.

CHEN, Q. et al. Translocation dynamics of poly(styrenesulfonic acid) through an α -hemolysin protein nanopore. **Macromolecules**, v. 43, n. 24, p. 10594–10599, 2010.

CLARKE, J. et al. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. April, p. 265–270, 2009.

CROTTY, S. et al. Polymer architectures via mass spectrometry and hyphenated techniques: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 932, 2016.

CUNHA, R. B.; MARIANA, S. C.; FONTES, W. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.36, p. 40, 2006.

DAOUD, M. DEGENNES P.G. Statistics of macromolecular solutions trapped in small pores. **Journal of Physics**, v.38, p. 85–93, 1977.

DEAMER, D.W. BRANTON, D. Characterization of nucleic acids by nanopore analysis. **Accounts of Chemical Research**, v.35, p. 817–25, 2002.

DEKKER, C. Solid-state nanopores, **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 209–215, 2007.

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. et al. Progress of Research on Nanopore-macromolecule Detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 280–285, 2010.

DING, Y. et al. Differentiation of G:C vs A:T and G:C vs G:mC Base Pairs in the Latch Zone of α -Hemolysin. **ACS Nano**, v. 9, n. 11, p. 11325–11332, 2015.

DIMARZIO, E.A. MANDEL, A.J. Phase transition behavior of a linear macromolecule threading a membrane. **The Journal of Chemical Physics**, v.107, p. 5510–14, 1997.

ERVIN et al. Creating a Single Sensing Zone Within an Alpha-Hemolysin Pore via Site- directed Mutagenesis. **Journal of Bionanoscience**, v.4, p. 78-84, 2014.

FENG, J. et al. Translocation of polymer through a nanopore studied by dissipative particle dynamics. **Fluid Phase Equilibria**, v.302, n.1–2, p.26–31, 2011.

FERREIRA et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v.20, p.3384-13421,2015.

FISCHER, H. et al. Recent advances in polyaniline composites with metals, metalloids and nonmetals. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, n. 1, p. 88–93, 2015.

FOLETTI, D. et al. Mechanism of action and in vivo efficacy of a human-derived antibody against Staphylococcus aureus alpha-hemolysin. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, p. 1641–1654, 2013.

FORREY, C. et al. The fundamental role of flexibility on the strength of molecular binding. **Soft Matter**, v. 8, p.6385, 2012.

FULLER, C. W. et al. Real-time single-molecule electronic DNA sequencing by synthesis using polymer-tagged nucleotides on a nanopore array. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 19, p. In Press, 2016.

FURTADO, R.F.; DUTRA, R.A.F.; ALVES, C.R.; 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. Novembro, 2008.

FÜSSLE, R. et al. On the mechanism of membrane damage by Staphylococcus aureus alpha-toxin. **The Journal of cell biology**, v. 91, n. 1, p. 83–94, 1981.

GROSBURG, A. Y.; RABIN, Y. DNA capture into a nanopore: Interplay of diffusion and electrohydrodynamics. **Journal of Chemical Physics**, v. 133, n. 16, 2010.

GU, L. Q. et al. Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 686–690, 1999.

GU, L. Q.; SHIM, J. W. Single molecule sensing by nanopores and nanopore devices. **Analyst**, v. 135, n. 3, p. 441–451, 2010.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014.

GURNEV, P. A. et al. The dynamic side of the hofmeister effect: A single-molecule nanopore study of specific complex formation. **ChemPhysChem**, v. 10, n. 9–10, p. 1445–1449, 2009.

GURNEV, P.; NESTOROVICH, E. Channel-Forming Bacterial Toxins in Biosensing and Macromolecule Delivery. **Toxins**, v. 6, p. 2483-2540, 2014.

GRAY, G.S.; KEHOE, M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 615-618, 1984.

GRIGORJEV, P.A.; BEZRUKOV, S.M. Hofmeister effect in ion transport: reversible binding of halide anions to the roflamycoin channel. **Biophysical Journal**, v. 67, n 6, p. 155-168, 2002.

HILDEBRAND, A; POHL, M.; BHAKDI, S. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 26, p. 17195–200, 1991.

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 Pharmacol**, v. 24, p. 247-260, 1888.

HOWORKA, S.; SIWY, Z. Nanopore analytics: sensing of single molecules. **Chemical Society reviews**, v. 38, n. 8, p. 2360–2384, 2009.

INOSHIMA et al. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of adam10 to cause lethal infection in mice. **Nature medicine**, v. 17, p. 1310–1314, 2011.

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

ISP TECHNOLOGIES, **PVP-Iodine-Povidone Iodine antiseptic Agent**, International Speciality Products Technologies, 2004, 31 pp.

JAIN, A.N; NICHOLLS, A. Recommendations for evaluation of computational methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 22, p.133–139, 2008.

JAYASINGHE, L.; MILES, G.; BAYLEY, H. Role of the amino latch of staphylococcal α -hemolysin in pore formation: A co-operative interaction between the N terminus and position 217. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 2195–2204, 2006.

JAYAWARDHANA, D. A. et al. Nanopore stochastic detection of a liquid explosive component and sensitizers using boromycin and an ionic liquid supporting electrolyte. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 460–464, 2009.

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.

JUNG, Y.; BAYLEY, H.; MOVILEANU, L. Temperature-responsive protein pores. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 128, n. 47, p. 15332–15340, 2006.

KANG, X. F. et al. Stochastic detection of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 33, p. 10684–10685, 2006.

KANG, X.F. et al. A storable encapsulated bilayer chip containing a single protein nanopore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 4701-4705, 2007.

KARAS, M.I.; HILLENKAMP, F. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 2299-2301, 1988.

KASIANOWICZ, J. J. et al. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13770–13773, 1996.

KASIANOWICZ, J.J. et al. 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. et al. Nanoscopic porous sensors. **Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)**, 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. et al. Controlling the translocation of single-stranded DNA through alpha-hemolysin ion channels using viscosity. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 2, p. 1233–7, 2009.

KAWATE, T.; GOUAUX, E. Arresting and releasing Staphylococcal α -hemolysin at intermediate stages of pore formation by engineered disulfide bonds. **Protein Science**, v. 12, p. 997–1006, 2003.

KEYSER, U. F. et al. Direct force measurements on DNA in a solid-state nanopore. **Nature Physics**, v. 2, n. 7, p. 473–477, 2006.

KHAN et al., 2015 polímeros

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. November, p. 935–49, 2004.

KOCZKUR et al., 2015 POLÍMERO

KOLB, P; IRWIN, J.J. Docking screens: right for the right reasons. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 755–770, 2009.

KOKH, D.B; WADE, R.C; WENZEL, W. Receptor flexibility in small-molecule docking calculations. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 1, p. 298–314, 2011.

KOLLMAN, P. Free-Energy Calculations - Applications to Chemical and Biochemical

Phenomena. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 7, p. 2395–2417, 1993.

KONG, C.Y.; MUTHUKUMAR, M. Polymer translocation through a nanopore. II. Excluded volume effect. **The Journal of Chemical Physics**, v. 120, p. 3460–66, 2004.

KUMAR, H.; RANI, R. Development of Biosensors for The Detection of Biological Warfare Agents: **Its Issues And Challenges**. **Science Progress**, v.96, n.3, p.294 – 308, 2013.

KRASILNIKOV et al. A. Properties of conductivity channels induced in phospholipid bilayer membranes by alphasitoxin. **Biofizika** v. 26 n. 2 p. 271 -276, 1981.

KRASILNIKOV et al. Influence of pH on the Potential-Dependence of Staphylococcal Toxin Channels Functioning in Phosphatidylcholine Bilayer. **Ukr. Biokhim. Zh**, v. 60, p. 60-66, 1988.

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, n. 1, p. 1–4, 2006.

KROVAT, E.M.; STEINDL, T.; LANGER, T. Recent advances in docking and scoring. **Current Computer - Aided Drug Design**, v.1, p.93–102, 2005.

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.

KUNTZ et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v.161, nº 2, p. 269-88, 1982.

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.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v.6, n.3, 1996.

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.

LO NOSTRO, P. et al. 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, n. 4, p. 2286–322, 2012.

LÓPEZ-LEON, T. et al. Hofmeister effects on the colloidal stability of an IgG-coated polystyrene latex. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 139-148, 2005.

LUBENSKY, D. K.; NELSON, D. R. Driven polymer translocation through a narrow pore. **Biophysical journal**, v. 77, n. October, p. 1824–1838, 1999.

LUO, K.; ALA-NISSILA, T.; YING, S. C.; et al. Translocation dynamics with attractive nanopore-polymer interactions. **Physical Review e Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics**, v. 78, n. 6, 2008.

LUO, K.; ALA-NISSILA, T.; YING, S. C.; et al. Driven polymer translocation through nanopores: Slow-vs.-fast dynamics. **Europhysics letters**, v.88, n.6, 2009.

LUO, M. B. et al. Translocation time of a polymer chain through an energy gradient nanopore. **Frontiers of Physics**, v. 12, n. 3, p. 1–9, 2017.

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.

MACHADO, D. C. et al. Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha-hemolysin nanopore sensor. **Royal Society of Chemistry Advances.**, v. 6, n. 61, p. 56647–56655, 2016.

MAGALHÃES, C.S. Algoritmos Genéticos para o Problema de Docking Proteína-Ligante. Tese de Doutorado, Laboratório Nacional de Computação Científica/Brasil, 2006.

MAGLIA, G. et al. Enhanced translocation of single DNA molecules through α hemolysin nanopores by manipulation of internal charge. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 50, p. 19720–19725, 2008.

MAITRA, R. D.; KIM, J.; DUNBAR, W. B. Recent advances in nanopore sequencing. **Electrophoresis**, v. 33, n. 23, p. 3418–3428, 2012.

MAITZ, M. F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. **Biosurface and Biotribology**, v. 1, n. 3, p. 161–176, 2015.

MANO, E. B. E MENDES, L. C. Introdução a polímeros, p. 208, 2004.

MANRICH, S. Processamento de termoplásticos. 1 ed, São Paulo: Artiliber Editora, 2005. 431 p.

MARKOSYAN, S. et al. Counterion dynamics in a model biological. **Nanoscale**, v.6, p. 9006–9016, 2014.

MARTIN, H. S. C. Molecular dynamics simulations of nucleotide translocation through α -hemolysin nanopores. University College London, Thesis, February, 2011.

MELLER, A. et al. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 3, p. 1079–1084, 2000.

MELLER, A., NIVON, L., BRANTON, D. Voltage-driven DNA translocations through a nanopore. **Phys. Rev. Lett.** v.86, p. 3435–38, 2001.

MELLER, A.; BRANTON, D. Single molecule measurement of DNA transport through a nanopore. **Electrophoresis**, v. 23, p. 2583–2591, 2002.

MERZLYAK P.G. et al. Polymeric nonelectrolytes to probe pore geometry: application to the alpha-toxin transmembrane channel. **Biophysical Journal**, v. 77, p. 3023-3033, 1999.

MERZLYAK, P. G. et al. Conductance and ion selectivity of a mesoscopic protein nanopore probed with cysteine scanning mutagenesis. **Biophysical journal**, v. 89, n. 5, p. 3059–70, 2005.

MITSCHA-BAUDE et al. Adaptive and iterative methods for simulations of nanopores with the PNP–Stokes equations. **Journal of Computational Physics**, v.338, p. 452-476, 2017.

MOHAMMAD, M.M.; MOVILEANU, L. Protein sensing with engineered protein nanopores. **Methods in Molecular Biology**, v. 870, p. 21-37, 2012

MOISIO, J. Driven translocation of a polymer through a narrow pore in dilute solvent. Aalto University. Thesis, 2014.

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.

MORRIS et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry** 30: 2785–2791. 2009.

MOVILEANU, L. Interrogating single proteins through nanopores: challenges and opportunities. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 333–341, 2009.

MULERO, R. et al. Nanopore-Based Devices for Bioanalytical Applications. **JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 15, n. 3, p. 243–252, 2010.

MURPHY, R. J.; MUTHUKUMAR, M. Threading synthetic polyelectrolytes through protein pores Threading synthetic polyelectrolytes through protein pores. **The Journal of Chemical Physics**, v. 051101, n. 2007, 2015.

MUTHUKUMAR, M. Polymer translocation through a hole. **J. Chem. Phys.**, v. 111, n. 1999, p. 10371–10374, 1999.

MUTHUKUMAR, M. Translocation of a confined polymer through a hole. **Physical Review Letters**, v. 86, n. 14, p. 3188–3191, 2001.

MUTHUKUMAR, M. Mechanism of DNA transport through pores. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 36, p. 435–450, 2007.

MUTHUKUMAR, 2011. Murugappan Muthukumar. Polymer Translocation. CRC Press, 2011.

NESTOROVICH, E. M.; BEZRUKOV, S. M. Obstructing toxin pathways by targeted pore blockage. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 12, p. 6388–6430, 2012.

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.

NOGUEIRA et al. Introdução a polímeros. Editora GPNM, 2000.

NISHIMURA, J. S. et al. The Stimulatory Effects of Hofmeister Ions on the Activities of Neuronal Nitric-oxide Synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 9, p. 5399–5406, 1999.

NIVALA, J. MARKS, D. B. AKESON, M.. NIH Public Access. v. 31, n. 3, p. 247–250, 2013.

OLIVEIRA et al. The enzyme 3-hydroxykynurenine transaminase as potential target for 1,2,4-oxadiazoles with larvicide activity against the dengue vector *Aedes aegypti*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 21: 6996-7003. 2013.

OSAKI, T. et al. Multichannel Simultaneous Measurements of Single-Molecule Translocation in α -Hemolysin Nanopore Array. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 9866–9870, 2009.

OTLES, S. & YALCIN, B. Review on the application of nanobiosensors in food analysis. **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 11, p. 7-18, 2012.

OUKHALED et al. Sensing proteins through nanopores: Fundamental to applications. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 12, p. 1935–1949, 2012.

OKAMOTO, K. MALDI Mass Spectrometry of Synthetic Polymers. **R&D Review of Toyota CRDL**, v. 41, n. 3, p. 29–34, 2006.

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.

PALYULIN, V. V.; ALA-NISSILA, T.; METZLER, R. Polymer translocation: the first two decades and the recent diversification. **Soft Matter**, v. 10, n. 45, p. 9016–9037, 2014.

PASSATORE, C. Química Dos Polímeros. p. 84, 2013.

PAYET et al. Temperature Effect on Ionic Current and ssDNA Transport through Nanopores. *Biophysics Journal*, v.109, nº 8, p. 16000-1608, 2015.

PASTORIZA-GALLEGO, M. et al. Dynamics of unfolded protein transport through an aerolysin pore. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 9, 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.

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.

PIGUET, F. et al. High Temperature Extends the Range of Size Discrimination of

Nonionic Polymers by a Biological Nanopore. **Nature Publishing Group**, n. August, p. 1–10, 2016.

QUICK, J. et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. **Nature**, v. 530, n. 7589, p. 228–32, 2016.

RAMSAY, W. J. BAYLEY, H. Single-Molecule Determination of the Isomers of d-Glucose and d-Fructose that Bind to Boronic Acids. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 57, n. 11, p. 2841–2845, 2018.

REINER et al. Theory For Polymer Analysis Using Nanopore-Based Single-Molecule Mass Spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n. 27, p. 12080-12085, 2010.

RINCON-RESTREPO et al. Controlled Translocation of Individual DNA Molecules through Protein Nanopores with Engineered Molecular Brakes. **Nano Letters**, v. 11, p. 746-750. 2011.

RHEE, M.; BURNS, M. A. Nanopore sequencing technology: research trends and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 580–586, 2006.

ROBERTSON, J. W. F. et al. 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. 8207–11, 2007.

RODRIGUES, C. G. et al. Mechanism of KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors. **Biophysical journal**, v. 95, n. 11, p. 5186–5192, 2008.

RODRIGUES, C.G. et al. Hofmeister effect in confined spaces: halogen ions and single molecule detection. **Biophysical Journal**, v. 100, p. 2929-2935, 2011.

ROTEM, D. et al. Protein detection by nanopores equipped with aptamers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 5, p. 2781–2787, 2012.

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

SAPIR, L et al. Properties of Polyvinylpyrrolidone in a Deep Eutectic Solvent. **The Journal of Physical Chemistry A**, p. acs.jpca.5b11927, 2016.

SARABADANI, J. IKONEN, T. ALA-NISSILA, T. Theory of polymer translocation through a flickering nanopore under an alternating driving force. **Journal of Chemical Physics**, v. 143, n. 7, p. 1–11, 2015.

SARAIVA S. A. Caracterização de Matérias-Primas e Produtos Derivados de Origem Graxa por Espectrometria de Massas. Dissertação de mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, 2008.

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

SCHWIERING, M. et al. Lipid and phase specificity of α -toxin from *S. aureus*.

Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, v. 1828, n. 8, p. 1962–1972, 2013.

SILVA, A. L. B. B. E; SILVA, E. O. DA. Conhecendo materiais poliméricos. Universidade Federal De Mato Grosso, p. 84, 2003.

SILVA, V. B. Estudo de modelagem molecular e relação estrutural atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes. p. 149, 2007.

SILVA, T. P. Potencial Terapêutico de Peptídeos Antimicrobianos Isolados de Venenos de Anfíbios. 2011.

SINGH et al. Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin. **Toxicon**, v. 60, p. 878- 894, 2012.

SONG, L. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, p. 1859-1866, 1996.

SOWJANYA;YADLA, 2016

STANFORD et al. Single Molecule Mass or Size Spectrometry in Solution Using A Solitary Nanopore. US 2010/0122907 A1, 20 maio 2010. 20p.

STEFUREAC, R. et al. Transport of α -helical peptides through α -hemolysin and aerolysin pores. **Biochemistry**, v. 45, n. 30, p. 9172–9179, 2006.

STORM, A. J. et al. Fast DNA Translocation through a. **Nano letters**, p. 1–5, 2005.

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

TRIMPIN et al. Recalcitrance of Poly(Vinylpyrrolidone): Evidence Through Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, **Journal of Chromatography A**, p.938-67, 2001.

VALEVA, A. et al. Staphylococcal α -toxin: The role of the N-terminus in formation of the heptameric pore - A fluorescence study. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1325, n. 2, p. 281–286, 1997.

VALEVA, A. et al. Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of an oligomeric protein pore. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 36, p. 26014–26021, 2006.

VENKATESAN, B. M.; BASHIR, R. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. **Nature nanotechnology**, v. 6, n. 10, p. 615–24, 2011.

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.

WALKER, B.; BAYLEY, H. Key Residues for Membrane-Binding, Oligomerization, and Pore-Forming Activity of Staphylococcal Alpha-Hemolysin Identified By Cysteine Scanning Mutagenesis and Targeted Chemical Modification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 39, p. 23065–23071, 1995.

WANG, J.; SATOH, M. Novel PVA-based polymers showing an anti-Hofmeister Series property. **Polymer**, v. 50, p. 3680-3685, 2009.

WANG, G. et al. Nanopore stochastic detection: Diversity, sensitivity, and beyond. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 12, p. 2867–2877, 2013.

WANG et al. Engineering of protein nanopores for sequencing, chemical or protein sensing and disease diagnosis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 51, p. 80-89, 2018.

WANUNU. Nanopores: A journey towards DNA sequencing. **Physics Life Reviews**, v. 9, n.2, p. 125–158, 2012.

WINTERS-HILT S, STOYANOV A. Nanopore Event-Transduction Signal Stabilization for Wide pH Range under Extreme Chaotrope Conditions. **Molecules**, v.21, n. 3, p.346, 2016.

WONG, C. T. A.; MUTHUKUMAR, M. Polymer translocation through α -hemolysin pore with tunable polymer-pore electrostatic interaction. **Journal of Chemical Physics**, v. 133, n. 4, 2010.

WU, D. et al. Single-molecule study of proteins by biological nanopore sensors. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 10, p. 18211–18222, 2014.

YAMASHITA, D. et al. Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins. **Nature Communications**, v. 5, p. 4897, 2014.

YURIEV, et al. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, p. 149–164, 2011.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, 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. et al. Study of Peptide Transport through Engineered Protein Channels. **Journal of Physical Chemistry**, v. 113, p. 3572–3578, 2009.

ZSOLDOS, Z. et al. eHiTS: a new fast, exhaustive flexible ligand docking system. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, p.198–212, 2007.

ANEXO A- Artigo publicado na Revista Química Nova, v. 6, 2015.*Quim. Nova*, Vol. 38, No. 6, 817-827, 2015<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150073>**BIOSENSORIAMENTO 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 α -toxin as a bacterial exotoxin and prototype of a protein nanopore in real-time detection and characterization of molecules in aqueous systems.

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

Revisão

vol. 38, No. 6, 2015, p. 757-876

