



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MAYSE MANUELE FREITAS VIANA LEAL

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO BASEADO NO NANOPORO
PROTEICO INDIVIDUAL PARA DETECÇÃO DE MADURAMICINA E BIOTOXINAS
CAUSADORAS DE INTOXICAÇÕES ALIMENTARES ASSOCIADAS AO
CONSUMO DE PEIXES**

Recife
2023



MAYSE MANUELE FREITAS VIANA LEAL

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO BASEADO NO NANOPORO
PROTEICO INDIVIDUAL PARA DETECÇÃO DE MADURAMICINA E BIOTOXINAS
CAUSADORAS DE INTOXICAÇÕES ALIMENTARES ASSOCIADAS AO
CONSUMO DE PEIXES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Janilson José da Silva Júnior

Recife

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Leal, Mayse Manuele Freita Viana.

Desenvolvimento de método analítico baseado no nanoporo proteico individual para detecção de maduramicina e biotoxinas causadoras de intoxicações alimentares associadas ao consumo de peixes. / Mayse Manuele Freita Viana Leal – 2023.

46 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Cláudio Gabriel Rodrigues.

Coorientador: Janilson José da Silva Júnior.

Mestrado (dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências e anexos.

1. Tetrodotoxina. 2. Maduramicina. 3. Nanoporo. 4. Alfatoxina. I. Rodrigues, Cláudio Gabriel. (Orient.). II. Silva Júnior, Janilson José da. (Coorient.). III. Título.

616

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-268

MAYSE MANUELE FREITAS VIANA LEAL

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO BASEADO NO NANOPORO
PROTEICO INDIVIDUAL PARA DETECÇÃO DE MADURAMICINA E BIOTOXINAS
CAUSADORAS DE INTOXICAÇÕES ALIMENTARES ASSOCIADAS AO
CONSUMO DE PEIXES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 27 / 07 / 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria
Carolina Accioly Brelaz de Castro, (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Iranildo José da Cruz Filho, (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Artur Alves Rodrigues da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

AGRADECIMENTOS

Primeiramente meus agradecimentos são direcionados a Deus, por me permitir, apesar de todo o esforço, chegar até aqui. Ao meu orientador, o professor Dr. Cláudio Gabriel, por me auxiliar e por todo o ensinamento a mim repassado ao longo dos semestres!

À minha família, em especial ao meu esposo Dr. Janilson Júnior, por me dar incentivos em minha carreira profissional e ser um esposo dedicado e companheiro. Por fim agradeço a todos que me ajudaram a trilhar esse caminho com muito esforço e garra!

RESUMO

A intoxicação alimentar representa uma grande preocupação para a saúde pública e, em sua maioria, é causada por agentes desconhecidos. A intoxicação alimentar por ingestão de peixe se destaca, principalmente, pela ampla variedade de substâncias potencialmente tóxicas. Neste cerne, tetrodotoxina (TTX) e maduramicina representam substâncias com elevada patogenicidade, cuja intoxicação apresenta expressivo grau de morbimortalidade. Diante desse contexto, métodos rápidos e sensíveis para a detecção e quantificação dessas substâncias tornam-se cada vez mais necessários. Portanto, o presente estudo tem como objetivo utilizar um biossensor baseado em nanoporo proteico para a detecção de maduramicina e tetrodotoxina. Foram utilizadas duas abordagens: *i)* experimental, utilizando o nanoporo da alfatoxina inserido em bicamada lipídica plana como elemento de reconhecimento molecular para a detecção estocástica das substâncias; seguida por uma *ii)* abordagem computacional, visando compreender a interação entre as toxinas e o nanoporo. Os resultados experimentais apontam que, para ambas as substâncias, o perfil de bloqueio da corrente apresenta-se diferente. Para o TTX, os eventos de bloqueio apresentam maior tempo de residência (cerca de duas vezes maior) em comparação aos eventos induzidos pela maduramicina, como também apresentam maior variedade de amplitudes de bloqueio, com até três níveis. Os dados obtidos nas análises *in silico*, por meio de docagem molecular, indicam maior energia de interação no complexo toxina-nanoporo para a maduramicina, que pode estar relacionado ao seu elevado peso molecular, propiciando maior quantidade de interações de Van der Waals. Além disso, os dados computacionais revelam ainda que o TTX interage com o nanoporo da alfatoxina através dos mesmos tipos de interações intermoleculares que ocorrem entre o TTX e o canal de sódio. O nanoporo foi capaz de detectar concentrações na ordem de μM para ambas as toxinas, apresentando-se como uma ferramenta promissora para a detecção e quantificação dessas substâncias.

Palavras-chave: Tetrodotoxina; Maduramicina; Nanoporo; Alfatoxina.

ABSTRACT

Food poisoning represents a major concern for public health and is mostly caused by unknown agents. Food poisoning by eating fish stands out mainly for the wide variety of potentially toxic substances. In this core, tetrodotoxin (TTX) and duramycin represent substances with high pathogenicity, whose intoxication presents a significant degree of morbidity and mortality. Given this context, fast and sensitive methods for the detection and quantification of these substances become increasingly necessary. Therefore, the present study aims to use a biosensor based on a protein nanopore for the detection of Maduramycin and Tetrodotoxin. Two approaches were used: i) experimental, using the alphatoxin nanopore inserted in a flat lipid bilayer as a molecular recognition element for the stochastic detection of substances; followed by a ii) computational approach, aiming to understand the interaction between the toxins and the nanopore. The experimental results indicate that, for both substances, the current blocking profile is different. For TTX, the blocking events have a longer residence time (about twice as long) compared to the events induced by duramycin, as well as presenting a greater variety of blocking amplitudes, with up to three levels. The data obtained from the *in silico* analyses, through molecular docking, indicate a higher interaction energy in the toxin-nanopore complex for madeiramycin, which may be related to its high molecular weight, providing a greater number of Van der Waals interactions. Furthermore, the computational data further reveal that TTX interacts with the alphatoxin nanopore through the same types of intermolecular interactions that occur between TTX and the sodium channel. The nanopore was able to detect concentrations in the order of μM for both toxins, presenting itself as a promising tool for the detection and quantification of these substances.

Keywords: Tetrodotoxin; Maduramicin; Nanopore; Alphatoxin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química da tetrodotoxina.	12
Figura 2 –	Mecanismo de bloqueio do TTX nos canais de sódio dependente de voltagem.	13
Figura 3 –	Estrutura química da maduramicina.	14
Figura 4 –	Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina.	18
Figura 5 –	Representação esquemática do nanoporo da alfatoxina inserido na bicamada lipídica plana, baseado na estrutura cristalográfica.	18
Figura 6 –	Princípio de funcionamento do biossensor estocástico.	20
Figura 7 –	Técnica de MONTAL & MUELLER (1972).	23
Figura 8 –	Perfil de bloqueio TTX sobre a corrente iônica do nanoporo formado pela alfatoxina em diferentes voltagens.	27
Figura 9 –	Caracterização dos bloqueios causados pelo TTX sobre a corrente do nanoporo formado pela alfatoxina.	28
Figura 10 –	Frequência de eventos em função da concentração de TTX.	29
Figura 11 –	Caracterização dos bloqueios causados pela maduramicina sobre a corrente do nanoporo formado pela alfatoxina (3, 30, 60 e 120 μ M)	30
Figura 12 –	Frequência de eventos em função da concentração de maduramicina (1, 3, 15 e 30 μ M).	30
Figura 13 –	Diferença entre os traçados típicos de bloqueio do nanoporo causados pela maduramicina, e TTX.	31
Figura 14 –	Valores médios dos tempos de residência da maduramicina e do TTX.	32
Figura 15 –	Interações entre TTX e nanoporo.	34
Figura 16 –	Mapa de potencial eletrostático do TTX.	35
Figura 17 –	Representação em superfície do encaixe do TTX entre os resíduos de glutamato 111 no nanoporo da alfatoxina.	35
Figura 18 –	Confôrmers de maior energia interagindo com o nanoporo.	36
Figura 19 –	Interações entre maduramicina e nanoporo.	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	9
3	REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1	INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ASSOCIADA AO CONSUMO DE PEIXE	10
3.2	BIOTOXINAS MARINHAS E MADURAMICINA	12
3.2.1	Tetrodotoxina	12
3.2.2	Maduramicina	14
3.2.3	Métodos atuais para determinação de biotoxinas marinhas e maduramicina	15
3.3	NANOPORO DA ALFATOXINA COMO BIOSSENSOR ESTOCÁSTICO	17
3.3.1	Aspectos Gerais da Alfatoxina	17
3.3.2	Biossensoriamento Estocástico Utilizando o Nanoporo da Alfatoxina	19
4	METODOLOGIA	22
4.1	CONFEÇÃO DAS BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS	22
4.2	CORRENTE IÔNICA E ANÁLISE DAS SUAS FLUTUAÇÕES	24
4.3	DOCKING MOLECULAR ENTRE AS TOXINAS E O NANOPORO DA ALFATOXINA	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	DADOS EXPERIMENTAIS	26
5.1.1	Tetrodotoxina	26
5.1.2	Maduramicina	29
5.2	DADOS COMPUTACIONAIS	32
5.3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	37
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39
	ANEXOS	45

1 INTRODUÇÃO

Fontes de proteína animal são comumente utilizadas para suprir as necessidades energéticas da dieta. Por sua vez, o consumo de pescados em todo o mundo vem crescendo bastante devido às suas vantagens em relação à carne de origem bovina. Dados apontam que o comércio internacional movimentou cerca de US\$ 175 bilhões no ano de 2022, além disso em solo brasileiro a piscicultura atingiu a receita com de cerca de R\$ 9 bilhões neste mesmo ano, com uma produção de 860.355 toneladas de peixes, em especial a espécie tilápia, ocupando o quarto lugar do ranking de maior produtor mundial (ONU, 2021).

Entre os benefícios, se destacam a prevenção de doenças cardiovasculares, melhora da memória, redução de inflamação, além do alto teor de ácidos graxos como o ômega-3, que são considerados essenciais, pois não são sintetizados pelo organismo. Contudo, tanto a carne quanto o peixe são alimentos considerados perecíveis e suscetíveis à contaminação (Rashid *et al.*, 2021).

Uma das causas mais comuns de morbimortalidade no mundo é a intoxicação alimentar, causada principalmente pelo consumo de alimentos e água contaminados, provenientes de fungos, bactérias, protozoários, vírus ou por suas respectivas toxinas. Quando patogênicas, essas toxinas são capazes de causar doenças ao hospedeiro (Melo *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, os crescentes casos de intoxicação por substâncias marinhas vêm chamando bastante atenção no cenário internacional, sobretudo por surtos observados em humanos de novas toxinas antes não avaliadas e que, por sua vez, apresentam fortes riscos para a saúde da população (Pinto; Pereira; Pereira, 2022; Carvalho *et al.*, 2021).

O crescente aumento de microalgas no meio aquático e sua proliferação de maneira abrupta, gera ameaça tanto para os humanos quanto para a vida selvagem como um todo. Animais que se alimentam dessas espécies de algas, e as armazenam no seu trato digestivo, possuem uma maior concentração de biotoxinas, que são produzidas por microalgas e bactérias, podendo se acumular em seres bivalves e outros animais marinhos (Murk *et al.*, 2019).

As toxinas marinhas mais frequentemente identificadas possuem mecanismos de ação diretamente relacionados a uma interação com os canais iônicos de membranas excitáveis, como é o caso da tetrodotoxina, uma das toxinas mais letais.

Além desta, ainda são apontadas as toxinas inibidoras de fosfatase proteica e a maduramicina que é um contaminante de ambientes aquáticos gerado pela ação antrópica. Trata-se de antibiótico utilizado na avicultura, despejado de maneira inadequada em aquíferos e potencialmente relacionada a doenças graves em seres humanos, como a Síndrome de Haff (Neves, 2015; Gao *et al.*, 2020).

Diversos métodos analíticos químicos e biológicos são empregados para detectar e quantificar as toxinas marinhas. No entanto, limitações como detecção de um único analito por vez, reação cruzadas, entre outros, de métodos considerados como referência para a detecção dessas substâncias, constata-se uma grande busca por novas metodologias com elevada sensibilidade, baixo custo e rapidez (Ye *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual se destaca como um método alternativo de análise de biotoxinas. Visto que, esta técnica se baseia na detecção de moléculas unitárias, bem como, apresenta capacidade multianalítica e detecção em tempo real (Silva *et al.*, 2023; Silva Júnior *et al.*, 2019).

Além disso, foram realizadas simulações de atracamento molecular com o uso do DockThor, que por sua vez, é um método que prevê os modos de ligação e afinidade entre um receptor e um ligante. Portanto, tal método auxilia no rastreamento de moléculas para complementar testes farmacológicos, além de reduzir os custos de uma pesquisa (Fan; Fu; Zhang, 2019).

2 OBJETIVOS

Geral

Desenvolver um método analítico baseado no nanoporo proteico individual da alfatoxina para detecção de Tetrodotoxina e maduramicina causadoras de intoxicação alimentar associadas ao consumo de peixes

Específicos

- Montagem da bicamada lipídica e obtenção dos registros de corrente (“assinaturas digitais”) da tetrodotoxina e da maduramicina na solução de KCl 4 M;

- Avaliar parâmetros eletrofisiológicos da tetrodotoxina e maduramicina no nanoporo proteico individual da alfatoxina na presença de KCl 4 M;
- Avaliar a frequência de eventos diante da alteração na concentração de tetrodotoxina e maduramicina no nanoporo da alfatoxina;
- Determinar os modos de ligação e as energias de interação da tetrodotoxina e da maduramicina com o nanoporo da alfatoxina, por meio de simulações de atracamento molecular.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ASSOCIADA AO CONSUMO DE PEIXE

Apesar de apresentar números expressivos no que diz respeito ao quantitativo de casos e de mortes, a intoxicação alimentar é causada, em sua grande maioria, por agentes desconhecidos, ainda que nos últimos 20 anos tenham sido observados avanços na identificação de novos agentes (Nelson, 2016).

A intoxicação ocorre geralmente pela presença, no alimento, de bactérias, fungos, vírus ou de toxinas oriundas desses micro-organismos, bem como de substâncias químicas capazes de causar doenças, como mercúrio, derivados tóxicos de antibióticos e pesticidas. Além disso, a própria espécie que serviu de alimento pode ser capaz de produzir toxinas naturais potencialmente perigosas, como ocorre em algumas espécies de peixes e vegetais. A caracterização da intoxicação alimentar se sucede clinicamente por dois fatores: a presença de manifestações clínicas semelhantes em mais de um indivíduo exposto ao alimento suspeito e a investigação laboratorial ou epidemiológica relacionada a um agente específico de fonte alimentar (Al-mamun *et al.*, 2018).

Apesar de diversos tipos de alimentos estarem relacionados à intoxicação alimentar, o pescado é considerado um alimento de alta digestibilidade e procura pelo valor nutricional agregado. No entanto, pela sua própria composição, é um dos mais perecíveis, necessitando de atenção quanto à manipulação, desde a captura até o consumo ou industrialização. Outro fator importante relacionado à intoxicação por pescados é a presença de biotoxinas produzidas pelo próprio animal ou adquiridas por ele. Este é o caso das microalgas produtoras de toxinas, que contaminam os

peixes herbívoros e contaminam predadores, na maioria das vezes o homem (Neves, 2015).

Em 2021, a morte de uma médica veterinária, de 31 anos, vítima da Síndrome (ou Doença) de Haff, ou doença da urina preta, em Pernambuco, acendeu a discussão sobre a intoxicação alimentar causada pelo consumo de peixes. Trata-se de uma doença causada pela ingestão de peixe contaminado com biotoxinas que podem ser letais, a depender de fatores imunológicos, tipo de toxina ingerida, tempo entre sinais e sintomas, intervenção médica e quantidade de toxina ingerida. Entre os sintomas, destacam-se: urina escura; mialgia; e rabdomiólise (inchaço e destruição do músculo esquelético, com risco de insuficiência renal aguda) nas primeiras 24 horas após a ingestão do peixe (Pebmed, 2021; Bandeira *et al.*, 2017).

Na Síndrome de Haff, apesar de não haver consenso sobre como o peixe é contaminado, alguns estudos apontam que biotoxinas causadoras da doença podem ser provenientes de algas contaminadas consumidas pelo animal. Entre estas toxinas, destacam-se a palitoxina e a maduramicina, sendo este último um antibiótico utilizado no controle de doenças na indústria avícola, que contamina ambientes aquáticos e se acumula em algumas espécies de peixes. Surto dessa doença já foram registrados em estados como Bahia, São Paulo e no Amazonas. Surto também já foram registrados em diversos países como China, Japão e Estados Unidos (Bandeira *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2019).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, é o órgão responsável pela fiscalização e regulamentação da utilização de anticoccidianos. Porém com a produção elevada de animais, desenvolve-se uma enorme quantidade de excreta, o que acaba ocasionando inúmeros problemas de armazenamento, manejo, distribuição e consequentemente poluição ambiental. Além disso, os rejeitos gerados na avicultura podem chegar ao solo principalmente pela aplicação da excreta animal como fertilizante (EMBRAPA, 2012).

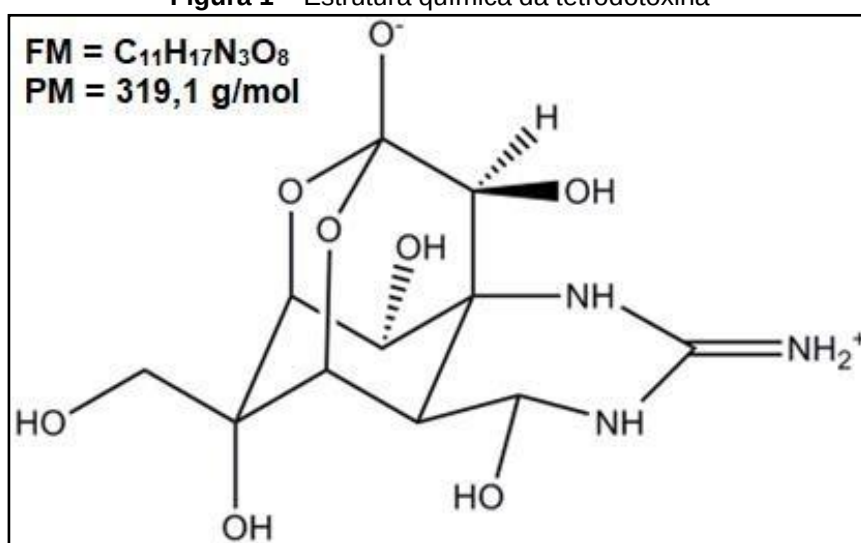
Além disso, os órgãos fiscalizadores brasileiros estão em conformidade às normas de cunho internacional, e anualmente utilizam compostos monitorados, com quantidades adequadas para que se possa evitar contaminações em ambientes aquáticos e garantir o consumo humano e animal (EMBRAPA, 2012).

3.2 BIOTOXINAS MARINHAS E MADURAMICINA

3.2.1 Tetrodotoxina

Descoberta no ano de 1909 por Yoshizumi Tahara, a tetrodotoxina (TTX) é um composto de guanidina heterocíclica solúvel em água, estável em soluções ácidas e que não é inibida no calor. Até o presente momento, 30 análogos estruturais foram evidenciados com diferentes graus de toxicidade. Como observado na Figura 1, a TTX possui um baixo peso molecular (FM = $C_{11}H_{17}N_3O_8$; PM = 319,1 g/mol) (Katikou *et al.*, 2022).

Figura 1 – Estrutura química da tetrodotoxina



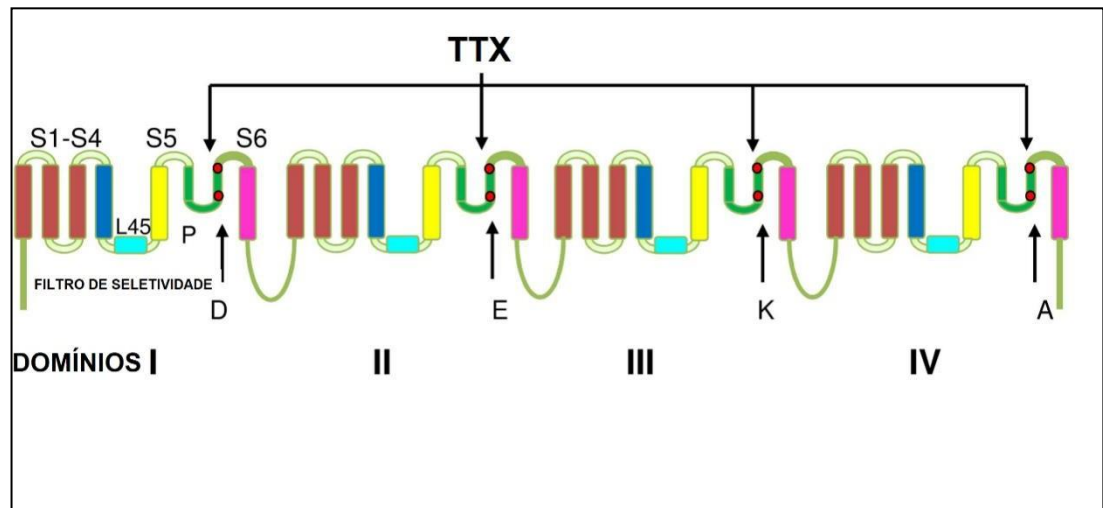
Fonte: Adaptado de Ye et al. (2020).

A TTX é conhecida como a toxina do peixe do gênero *Colomesus spp.*, popularmente conhecido como Baiacu, que é comumente consumida como uma iguaria. Apesar disso, sabe-se que a toxina é encontrada naturalmente em uma grande variedade de vertebrados e invertebrados, desde espécies de sapos a mais de 20 espécies de baiacu e alguns moluscos (Indumathi; Khora, 2017).

Seu principal mecanismo de toxicidade baseia-se no bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem (Na_v s), que é compreendido por subunidades α e β , contudo a prevalência do bloqueio ocorre na subunidade α . Ocorrendo interação do TTX entre o quinto e o sexto segmento das alças extracelulares nos domínios que são encarregados pela seletividade iônica. Na figura 2, é possível avaliar a topologia transmembranar da subunidade α e as posições dos carboxilatos externos e dos resíduos DEKA do filtro de seletividade, que interagem com o TTX (marcados por

pontos vermelhos) atuando na maior parte dos neurônios e células musculares (Tikhonov; Zhorov, 2018).

Figura 2 – Mecanismo de bloqueio do TTX nos canais de sódio dependente de voltagem



Fonte: Adaptado de Tikhonov; Zhorov, 2018. Topologia transmembranar da Subunidade-α. Os pontos em vermelho são as posições dos resíduos DEKA do filtro de seletividade e dos carboxilatos externos, que possui interatividade com TTX.

Além disso, sem o influxo de sódio os músculos e neurônios associados se tornam ineficazes, o que resulta em paralisia muscular e bloqueio neuronal, levando o paciente a ter sintomas clínicos como: paralisia motora, fala arrastada, afonia, hipotensão, bradicardia, formigamento e arritmia cardíaca. O agravamento das manifestações neurológicas pode ser caracterizado por convulsões, parada cardiorrespiratória e dispneia. A morte pode ocorrer em virtude da paralisia muscular, depressão respiratória e falência circulatória (Bucciarelli *et al.*, 2021).

O primeiro método de identificação dessa toxina foi aplicado por Hashimoto e Migita no ano de 1951, por meio de bioensaios com camundongos, usando amostras de baiacu. Atualmente, são utilizados métodos biológicos com ratos, *Enzyme Liked Immunosorbent Assay* (ELISA) e bioensaios com cultura de células, que permitem avaliar a toxicidade da TTX, porém não identificam os seus análogos (Hort *et al.*, 2020; Madejska *et al.*, 2019).

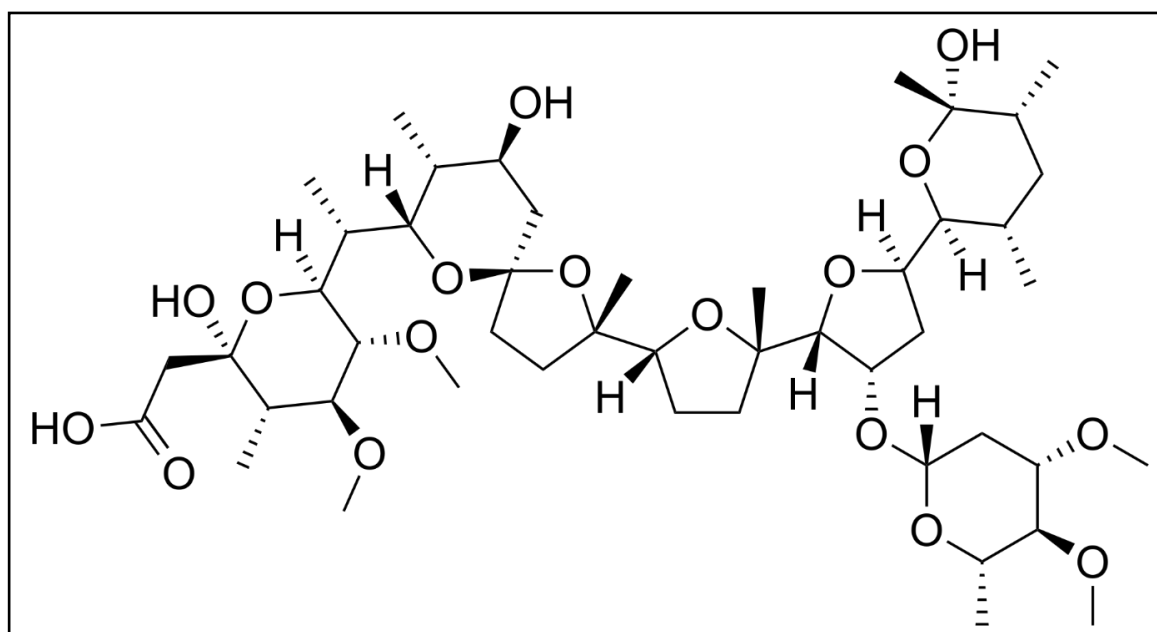
Por razões éticas, o uso de animais está em desuso, além de possuir diversas desvantagens como baixa detecção e sensibilidade. Por sua vez, o método ELISA, ainda que amplamente utilizado, não é útil para a triagem convencional, pois pode não

identificar com precisão os análogos da TTX. Métodos baseados em cromatografia e espectrometria de massas são considerados padrão ouro para a detecção dessa biotoxina. Porém, devido ao alto custo do método e a elevada variabilidade estrutural do TTX, são necessárias técnicas que possam ser introduzidas como meio alternativo, e que seja capaz de discernir a TTX com uma maior precisão (Madejska *et al.*, 2019).

3.2.2 Maduramicina

A maduramicina é um antibiótico ionóforo poliéter, de fórmula química $C_{47}H_{83}NO_{17}$, peso molar 934,2 g/mol, e estrutura química conforme Figura 3. O seu uso na avicultura é de extrema relevância pois contribui para o tratamento de coccidiose, doença essa causada por protozoários que acomete as células intestinais do animal. Além disso, a maduramicina também auxilia como aditivo alimentar na promoção de crescimento das aves e melhora o metabolismo e a saúde do animal (Anadó; Martíñez-Larrañaga, 2014).

Figura 3 – Estrutura química da maduramicina



Fonte: Gao et al. (2018).

No entanto, devido à má absorção da maduramicina no intestino desses animais, mais de 80% do antibiótico é expelido nas fezes e descartado de maneira inadequada, através de descarga direta de resíduos fecais em ambientes aquáticos.

Esse descarte inadequado traz riscos para o ecossistema de maneira geral, pois pode promover a presença de resíduos do fármaco em águas superficiais, solos e sedimentos. Da mesma forma, os seres humanos podem ser afetados, com transporte dos compostos bioativos através da cadeia alimentar (Gao *et al.*, 2021).

A presença de IPA's em águas superficiais, sedimentos e solos foi relatada no Brasil e também em outros países como Estados Unidos, Reino Unido, Argentina e China. Ainda de acordo com Yopasá-Arenas e Fostier (2018), o risco é ainda maior para águas subterrâneas do que para o solo, indicando que há a infiltração desses compostos na terra e consequentemente a exposição das águas.

Dentre as IPA's aprovadas para uso em animais, a maduramicina é apontada como a mais tóxica, podendo induzir nos humanos, nas 24 horas seguintes ao consumo do alimento contaminado, sintomas como rabdomiólise e insuficiência renal aguda. Esses sintomas estão associados aos da síndrome de Haff, que por sua vez, é uma síndrome sem explicação, sendo considerada uma condição clínica rara, correlacionada a ingestão de pescados e que pode levar o indivíduo a óbito (Gao *et al.*, 2021).

3.2.3 Métodos atuais para determinação de biotoxinas marinhas e maduramicina

A União Europeia, por meio do regulamento (EU) nº 15/2011, atesta que métodos de ensaios utilizando camundongos como meios de referência para a análise de substâncias marinhas devem ser substituídos por métodos físico-químicos. Nestes, se incluem os métodos que foram validados em conformidade com o estipulado internacionalmente, tendo como exemplo, vários métodos que foram publicados como padrões pelo Comitê Europeu para Normalização (CEN), como o cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) e da espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*), desde que este seja adequadamente validado e que sejam atingidos os critérios de desempenho determinados pelo Laboratório de Referência da União Europeia para as biotoxinas marinhas. Na Alemanha, desde os anos 80, não se realiza ensaios *in vivo* rotineiramente, somente testes *in vitro* (Thompson; Thompson, 2020).

No ano de 2004, em reunião no Instituto Federal Alemão de Avaliação de Riscos em Berlim, foram verificadas as deficiências dos testes de bioensaio em ratos, e aludiram o uso de métodos de teste *in vitro* para determinar corriqueiramente o

conteúdo de toxinas de algas marinhas em mariscos e seus derivados. No decorrer da discussão foi estabelecido que apesar da ausência de métodos padrões certificados para identificar essas substâncias, os meios mais eficazes seriam as análises físico-químicas. No entanto, as autoridades presentes salientaram a necessidade do uso de camundongos em casos que houvesse limitações para detecção de substâncias (Barbieri, 2010).

No Brasil, tal como em diversos países, os testes de detecção de biotoxinas marinhas e maduramicina nos alimentos contaminados, nesse caso a carne de peixe, de moluscos ou no ambiente aquático, ocorrem principalmente através de técnicas de imunoensaios, por cromatografia acoplada a espectrometria de massas ou bioensaios. A identificação da biotoxina ou do contaminante químico na intoxicação alimentar é necessária para propiciar uma adequada investigação epidemiológica que facilite o diagnóstico, tratamento e prevenção dessas doenças (Fontana, 2016; Gao *et al.*, 2018; Jiang, 2020).

Para a identificação e determinação analítica dos níveis desses contaminantes, etapas de obtenção da amostra, extração, limpeza e finalmente detecção e quantificação, são utilizadas na rotina de grandes centros de análises. A cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) e imunossensores eletroquímicos consistem atualmente nos principais métodos reportados na literatura para detecção e caracterização das biotoxinas supramencionadas e maduramicina (Suzuki *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2021).

Apesar desses métodos serem eficientes, eles também são demorados e onerosos, pois são necessárias etapas de pré-processamento da amostra, além dos altos valores para aquisição de cromatógrafos e espectrômetros (Mcculum *et al.*, 2014). Os métodos imunológicos são utilizados na determinação dessas toxinas em alimentos. No entanto, desvantagens como reações cruzadas, dependência de uma matriz específica e por ser um ensaio que só detecta uma única toxina, o custo de aplicação na rotina torna-se, na maioria das vezes, inviável.

Essas limitações despertam interesse em estudos visando o desenvolvimento de novos métodos para determinação dessas toxinas (Alshannaq & Yu; 2017). Nesse sentido, métodos como o biossensoriamento estocástico, vêm apresentando resultados promissores, em virtude principalmente da rapidez, precisão, baixo custo e ausência de algumas etapas de pré-processamento (Aguiar *et al.*, 2015; Silva Júnior *et al.*, 2019).

Outros métodos se mostram promissores para a detecção e quantificação de biotoxinas, como métodos baseados em ensaio de fluxo lateral, ensaio de polarização de fluorescência direta, técnicas ópticas como a espectroscopia Raman e outras (Noirmain *et al.*, 2018; Otero *et al.*, 2011; Otero; Silva, 2022; Pinzaru *et al.*, 2018).

3.3 NANOPORO DA ALFATOXINA COMO BIOSSENSOR ESTOCÁSTICO

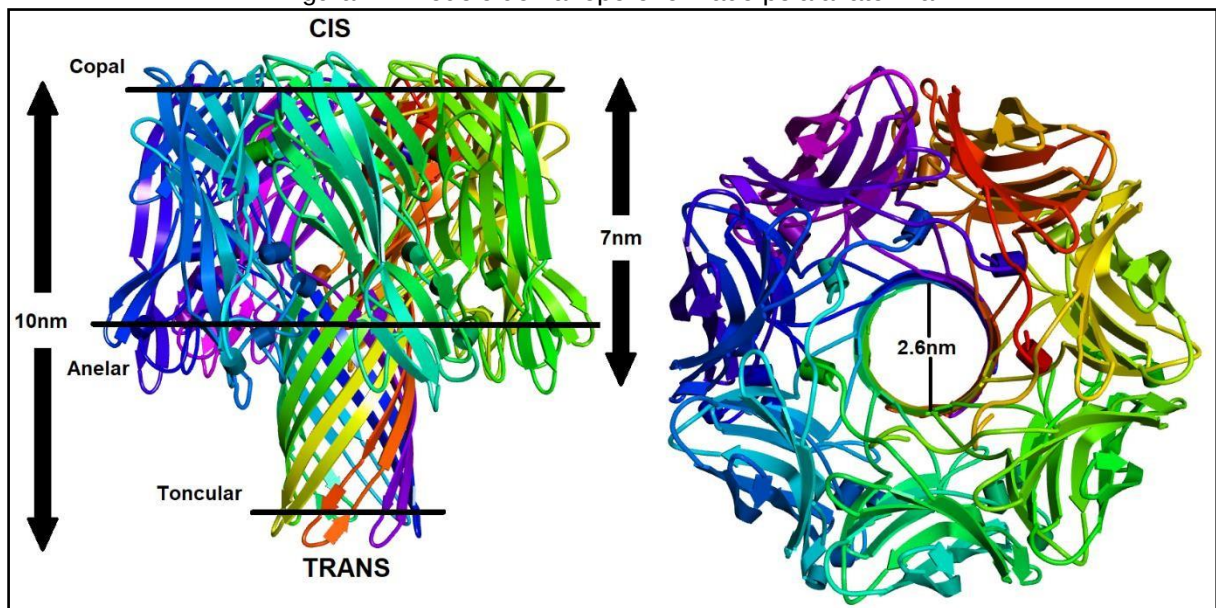
3.3.1 Aspectos Gerais da Alfatoxina

A última década foi marcada por notáveis avanços no desenvolvimento de dispositivos e métodos para detecção, identificação, caracterização e quantificação de moléculas, devido principalmente à contribuição da nanobiotecnologia (AGUIAR *et al.*, 2015). Nanoestruturas biológicas vêm sendo utilizadas como elemento de reconhecimento molecular para o desenvolvimento de uma inovadora classe de sensores, baseados no biossensoriamento estocástico por nanoporos individuais (Kasianowicz *et al.*, 2012; Bhatti *et al.*, 2021).

Dentre as diversas toxinas formadoras de poros, a exotoxina de *Staphylococcus aureus*, denominada alfatoxina, possui uma versatilidade funcional, representando um modelo de nanoporo proteico ideal para detecção de moléculas em meio aquoso. A alfatoxina é uma proteína com aproximadamente 33 kDa de peso molecular, liberada na forma de monômeros de polipeptídios de 293 aminoácidos, podendo se inserir na membrana de células eucarióticas ou bicamadas lipídicas artificiais, formando poros aquosos heptaméricos (Bayley; Cremer, 2000; Aguiar *et al.*, 2015; Silva, 2017).

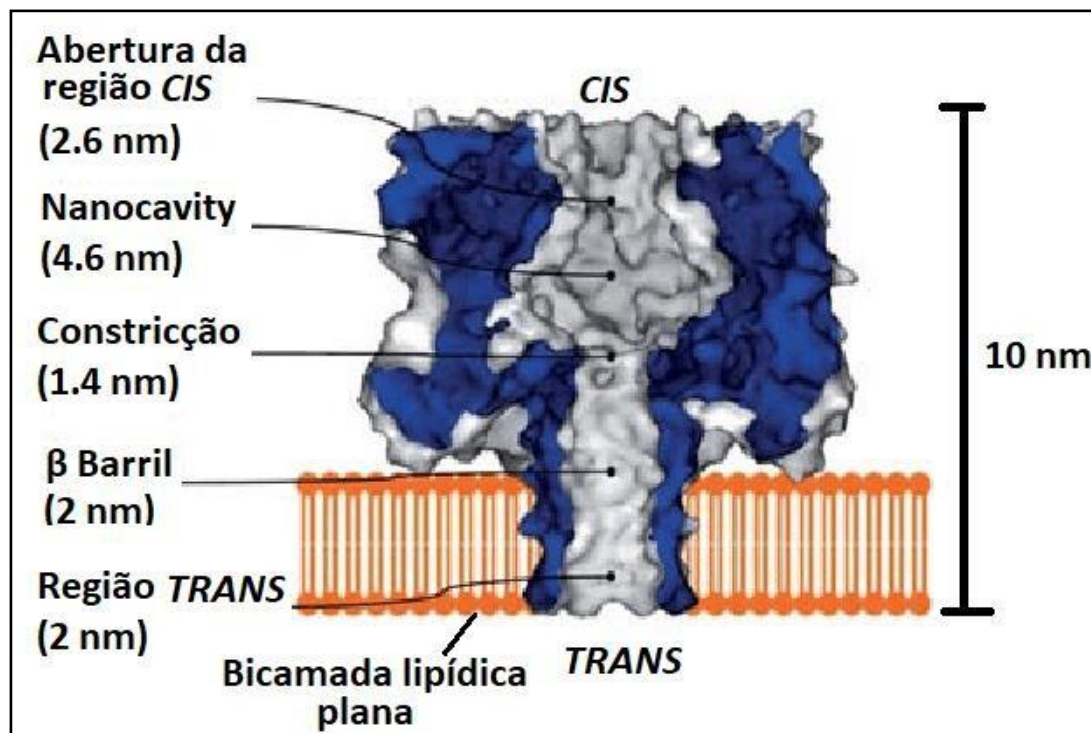
O nanoporo proteico da alfatoxina apresenta a estrutura cristalográfica bem elucidada, apresentando três domínios bem definidos, como ilustrado na Figura 4: o domínio copal, com diâmetro de 4,6 nm, que fica praticamente fora da membrana; o domínio troncular, que se insere na membrana, cujo diâmetro é de aproximadamente 2,6 nm; e o domínio anelar, representado pela parte ancorada na membrana. Os diâmetros das entradas denominadas região CIS e região TRANS medem 2,6 nm e 2,0 nm, respectivamente. Entre essas duas regiões encontra-se uma constrição de 1,4 nm de diâmetro (Figura 5) (Song *et al.*, 1996; Silva Júnior, 2017).

Figura 4 – Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina.



Fonte: Adaptado de Silva Júnior (2017). À esquerda, visão lateral do nanoporo. Estão destacados domínios, dimensões e entradas (CIS e TRANS) em relação à membrana (representada pela linha contínua em preto). À direita, visão superior das subunidades que formam o nanoporo proteico, destacando o diâmetro da região CIS e os 7 monômeros que formam o nanoporo, separados por cores. Visualização obtida a partir do Discovery Studio, PDB ID 7AHL.pdb.

Figura 5 - Representação esquemática do nanoporo da alfatoxina inserido na bicamada lipídica plana, baseado na estrutura cristalográfica.



Fonte: Song et al. (1996).

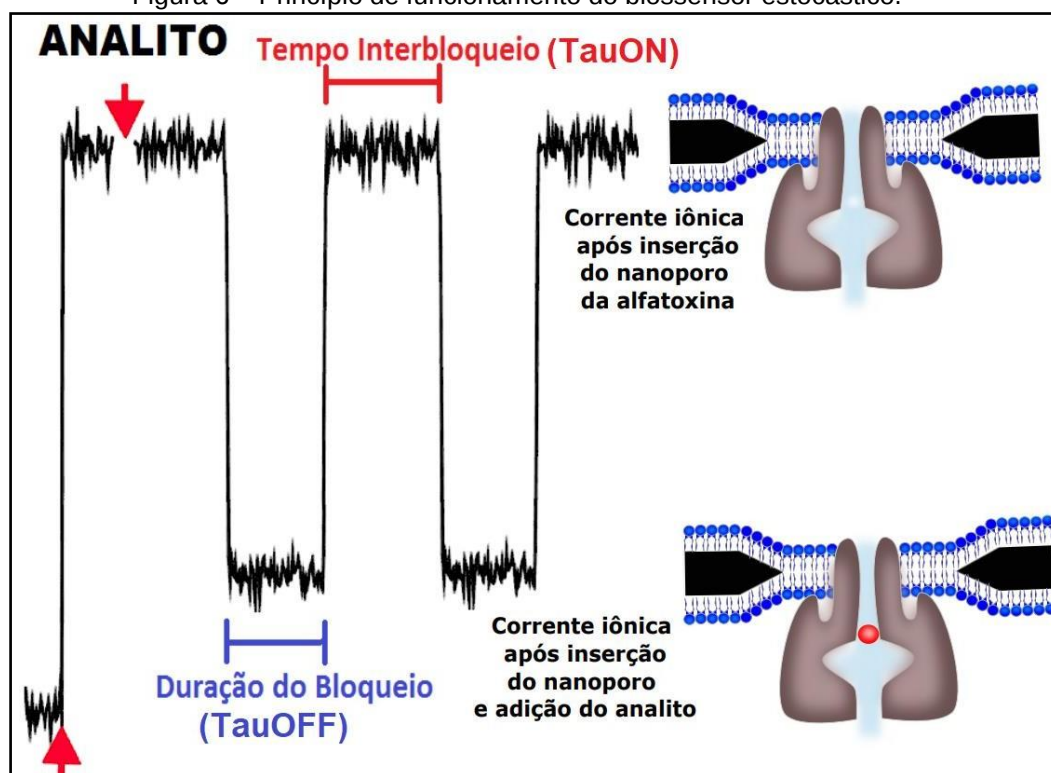
As dimensões e a elevada condutância tornam o nanoporo da alfatoxina promissor para o biossensoriamento estocástico de moléculas de interesse em diversos setores da atividade humana: medicina diagnóstica, produção de alimentos, meio ambiente, entre outras áreas. Estudos demonstram que as propriedades físico-químicas (condutividade e viscosidade) do meio aquoso no lúmen (interior) deste nanoporo são cruciais na capacidade deste em detectar e discriminar moléculas, visto que o aumento na força iônica da solução e a sua composição aniônica ou catiônica alteram significativamente a sensibilidade do nanoporo na detecção de polímeros (Rodrigues *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2016).

Nesta mesma abordagem, pioneiramente, nosso grupo demonstrou que em elevadas concentrações de KCl, o nanoporo da alfatoxina discrimina até 3 variantes de microcistinas simultaneamente (Patente-WIPO-PCT/BR2012/000322, 2013).

3.3.2 Biossensoriamento Estocástico Utilizando o Nanoporo da Alfatoxina

O princípio de biossensoriamento por meio do nanoporo da alfatoxina está esquematicamente mostrado na Figura 6. Um único poro é incorporado em uma bicamada lipídica plana que separa dois compartimentos banhados com solução salina. Quando um potencial é aplicado, uma corrente iônica máxima flui através do nanoporo carregada pelos íons presentes na solução salina. Na situação mais simples, considerando que o nanoporo possui um sítio de ligação para o analito, pode existir dois estados: ocupado pelo analito e não ocupado. Cada vez que o analito ocupa o lúmen, caracteriza-se o estado ocupado, induzindo a uma modulação (evento de bloqueio) e diminuindo a corrente iônica máxima. Desta forma, notam-se pelo menos dois valores médios de corrente iônica, uma para cada estado (Rodrigues, 2006).

Figura 6 – Princípio de funcionamento do biossensor estocástico.



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2006). A interação de um único nanoporo com o analito causam bloqueios característicos na corrente iônica que flui através do canal, retratando o estado ocupado do lúmen do nanoporo. Na ausência do analito, a corrente é máxima, caracterizando o estado não ocupado. A frequência dos eventos de bloqueio é diretamente proporcional à concentração do analito, e o traçado de corrente permite sua identificação. A seta em vermelho direcionada para cima indica a aplicação de potencial transmembrana. A seta em vermelho direcionada para baixo indica a adição do analito.

Tal como ilustrado na figura 6, a frequência da ocorrência dos eventos está relacionada com a concentração do analito, podendo ser medida através dos intervalos de tempo entre os bloqueios (interbloqueios). Esses intervalos são descritos por uma distribuição exponencial, cuja constante de ajuste representa os intervalos médios de bloqueio (r_{on}). O inverso da r_{on} ($1/r_{on}$) equivale à frequência de eventos de bloqueio, que é proporcional à concentração do analito. A série temporal dos eventos de bloqueio serve de “assinatura digital” para a identificação do analito, caracterizada pelos intervalos de tempo de duração do bloqueio, descritos por uma distribuição exponencial, cuja constante de ajuste é definida como o tempo médio de bloqueio (r_{off}). Além da duração do bloqueio, a assinatura digital de cada analito é determinada também pela amplitude de bloqueio. Portanto, a cinética entre o estado ocupado e não ocupado possibilita a obtenção de informações que permitem identificar e quantificar o analito (Kasianowicz *et al.*, 2012; Aguiar *et al.*, 2015).

3.4 DOCKING MOLECULAR

O docking molecular é um método que investiga a interação de moléculas no sítio de ligação de um alvo. Para isso, os algoritmos de busca estabelecem possíveis posições que são classificadas por sua maior interação de energia. Para a descoberta atual de drogas, o acoplamento de proteína-proteína ou proteína-ligante é empregado na previsão da interação do ligante quando está associado a um receptor de enzima ou proteína, utilizando as interações eletrostáticas para que seja quantificado. Além disso, as interações de van der Waals desempenham um papel importante, como também a formação de ligações de hidrogênio e interações coulombicas (Pagadala; Syed; Tuszynski, 2017).

O somatório de todos esses tipos de interação, se aproximam por um escore de encaixe, que representa potencialidade de ligação. Em sistemas básicos de corpo rígido, o ligante é examinado em um espaço translacional de seis dimensões para encaixe no sítio de ligação ou em um espaço rotacional, que podem servir como um composto de chumbo para o desenvolvimento de fármacos (Sledz; Caflisch, 2018).

Embora, algumas mudanças terem sido aplicadas entre as formas livre e ligada, a discrepância na precisão não é totalmente justificada, além disso, a diferença entre estruturas nativas e não nativas não pode ser distinguida, mesmo com aplicação de algumas funções, tais como, energia livre de solvatação, medidas de complementariedade de superfície, energia total de mecânica molecular e energia de interação eletrostática. Portanto, os métodos de acoplamento foram aprimorados por diversos grupos, permitindo assim, flexibilidade de receptores e ligantes (Pagadala; Syed; Tuszynski, 2017).

O primeiro passo que se tem em um cálculo de acoplamento é se obter a estrutura alvo, que é comumente uma molécula biológica, entre as quais pode-se destacar a proteína, RNA e DNA. As estruturas das macromoléculas podem ser adquiridas pelo Protein Data Bank (PDB), que por sua vez fornecem acesso as coordenadas atômicas em 3D conquistadas por meio de experimentos. Quando o local de encaixe não for definido é necessário que seja empregue duas abordagens distintas, prevendo os locais de ligação por meio de algoritmos ou empregando uma simulação de “acoplamento cego”, que por sua vez, a última opção possui um grande custo computacional, visto que a busca abrange toda a estrutura alvo (Torres *et al.*, 2019).

Ao decorrer dos cálculos de encaixe, é comum que seja empregue uma representação no formato de grade, que incluem energias potenciais pré-calculadas para a interação na parte interior do local de ligação. Tal abordagem, acelera os cálculos de atracamento, consistindo apenas na discretização do local de ligação. Após isso, em cada ponto da grade, são calculados os potenciais eletrostáticos e de Lennard-Jones (Sliwoski *et al.*, 2013).

Contudo, a estrutura do ligante é igualmente necessária e pode ser obtida por meio de bancos de dados para micromoléculas, tais como, PubChem e ZINC.

Para ligantes de moléculas pequenas, é necessário inicialmente uma geometria estereoquimicamente definida, tal como o estado exato de protonação relevante, uma vez que a conformação será examinada pela plataforma ou software de acoplamento (Pinzi; Rastelli, 2019).

As cargas são comumente distribuídas por meio de algoritmos que difundem a carga líquida de uma molécula entre os átomos que as constituem. Além do mais, a grande maioria dos métodos de acoplamento já assumem seus estados de protonação e distribuição de carga nas moléculas, não afetando os estados ligado e não ligado. No entanto, é indispensável para que se haja uma atracação bem sucedida que haja a avaliação das atribuições de carga, estado de protonação e torções livres (Sledz; Caflisch, 2018).

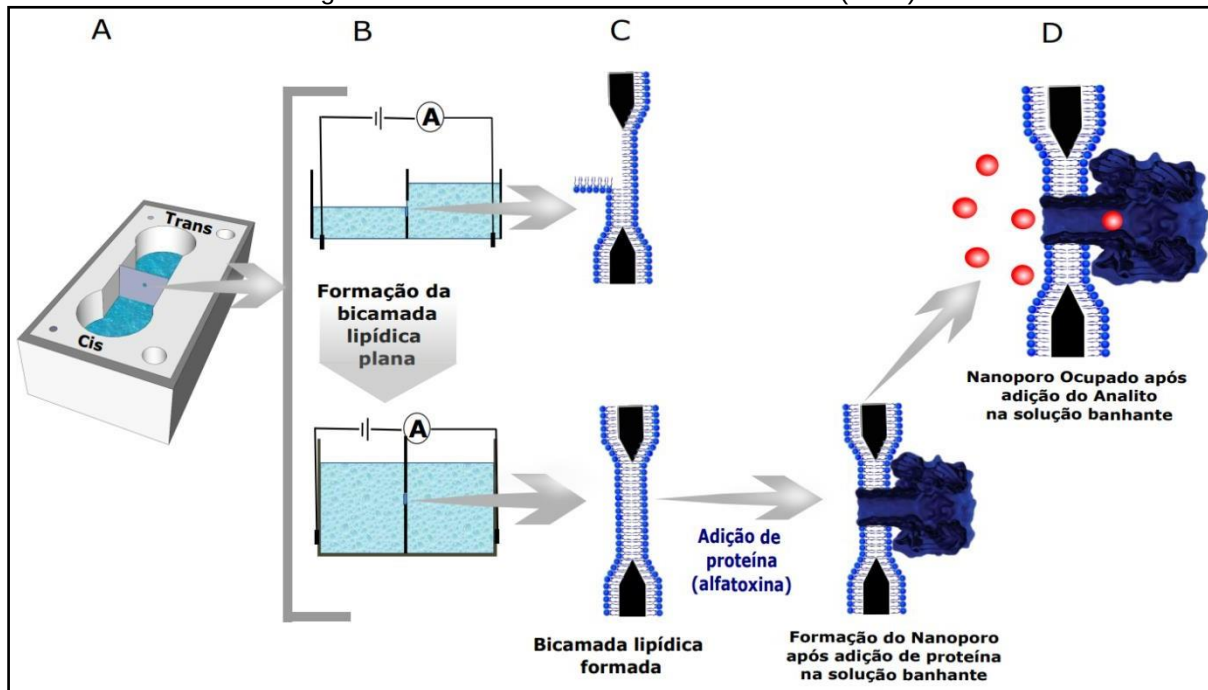
4 METODOLOGIA

4.1 CONFECÇÃO 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 meio da aposição de dois filmes monomoleculares de lipídeo, em um orifício de uma partição de Teflon® (Politetrafluoretileno) que separa dois compartimentos de uma câmara experimental também de Teflon®, contendo soluções aquosas (Figura 7A e 7B). 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 a formação espontânea dos filmes lipídicos monomoleculares na superfície da solução aquosa de cada compartimento.

Figura 7 – Técnica de MONTAL & MUELLER (1972).



Fonte: Adaptado de Aguiar et al. (2015). (A) Esquema ilustrando a câmara experimental com dois compartimentos, separados por uma película com um orifício de aproximadamente 80 µm de diâmetro. (B) Representação esquemática da câmara experimental sendo preenchida com solução. (C) esquema da técnica de Montal & Mueller (1972) para a formação da bicamada lipídica, seguida da inserção do nanoporo proteico e (D) adição do analito (esferas vermelhas).

Tal como ilustrado na figura 7, após a formação do filme lipídico, o nível do líquido do compartimento “TRANS” é elevado por adição de mais solução eletrolítica (Figura 7B), formando a primeira monocamada, para em seguida elevar o lado oposto (CIS) e completar a formação da bicamada (Figura 7C). A formação da membrana é monitorada usando microscópio monocular e por aumento nos valores da corrente capacitiva basal do sistema. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente de 25 ± 2 °C.

Após a construção da bicamada lipídica foi incorporado um único nanoporo da alfatoxina, por meio da adição desta proteína ao lado CIS, na solução que banhava a membrana. Posteriormente foram adicionados TTX diluído em água com concentrações de 3, 30, 60 e 120 µM e Maduramicina com concentrações de 1, 3, 15 e 30 µM no compartimento TRANS da câmara experimental, e se monitorou a corrente iônica através do nanoporo após aplicação de potencial elétrico de ± 40 mV (incremento de 20 mV).

4.2 MONITORAÇÃO E AQUISIÇÃO DA CORRENTE IÔNICA E ANÁLISE DAS SUAS FLUTUAÇÕES

O sistema utilizado para aplicação do potencial transmembrana, monitoração e aquisição dos registros durante os experimentos utilizando o nanoporo foi constituído por um amplificador de patch clamp (Axonpatch 200B da Molecular devices, USA) acoplado a uma placa conversora analógico-digital (modelo BNC-2090 da National Instruments), um gerador de funções (Hewlett Packard, modelo 3310B) com taxa de aquisição de 100 kHz e filtro Butterworth à 15 kHz (Frequency devices, modelo 902). Os dados foram monitorados e registrados através de um microcomputador IBM PC, executando o Programa pClamp versão 10.7 (Silva, 2017; Silva Júnior *et al.*, 2019).

Uma mesa de amortecimento de alto desempenho (TCM 63-500) foi utilizada, bem como blindagem por meio de uma gaiola de Faraday, com o objetivo de minimizar as interferências geradas, respectivamente, pelas perturbações mecânicas e eletromagnéticas do ambiente (Aguiar *et al.*, 2015). Para a captação dos sinais elétricos, foram utilizados eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) confeccionados em Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3 M).

Todos os parâmetros de assinatura molecular foram analisados utilizando o software Clampfit 10.7 (Molecular Devices, USA), visando a obtenção dos valores de condutância do nanoporo na presença do analito e dos tempos médios de residência (r_{off}) e interbloqueio (r_{on}). Resumidamente, é obtido um histograma de frequência dos tempos no estado bloqueado e não bloqueado do canal, onde aos tempos médios (r_{off} e r_{on}) correspondem a uma exponencial ou gaussiana traçada do histograma. São obtidas informações cinéticas e termodinâmicas das interações entre as biotoxinas e o nanoporo, tais como as constantes de associação (K_{on}), de dissociação (K_{off}), de equilíbrio (K_f) do complexo biotoxina-nanoporo e energia de interação (ΔG) (Krasilnikov; Rodrigues; Bezrukov, 2006).

4.3 DOCKING MOLECULAR ENTRE AS TOXINAS E O NANOPORO DA ALFATOXINA

Softwares utilizados no estudo *in silico* incluem:

- Avogadro: software utilizado para obter a minimização de energia das estruturas das toxinas.
- DockThor: plataforma online utilizada nas simulações de docking (DE MAGALHÃES et al., 2014).
- Discovery Studio: software utilizado na visualização das estruturas, bem como na caracterização das interações intermoleculares entre as toxinas e o nanoporo da alfatoxina (versão 17.2.0.16349); (Dassault Systèmes BIOVIA, 2016).
- VMD (*visual molecular dynamics*): visualização de estruturas (Humphrey et al., 1996).

A estrutura do nanoporo formado pela alfatoxina foi obtido no *Protein Data Bank* (PDB), sob código 7AHL. Estrutura das toxinas (maduramicina e tetrodotoxina) foram obtidas do Drugbank e suas estruturas 3D foram construídas utilizando o software Avogadro e em seguida foi realizada a minimização de energia com esse mesmo software.

Para a realização do docking, foi utilizado um GRID com as dimensões 20 x 20 x 20, cujo centro apresentou as seguintes coordenadas: X = - 39,188, y = - 32,853 e z = - 31,429. Estas coordenadas representam a região central da constrição, região definida pela literatura com maior probabilidade de haver interação com moléculas (Leal; Júnior, 2019; Silva Júnior et al., 2019). Foram utilizados os parâmetros padrões de docking da plataforma online do DockThor, empregando um algoritmo genético com o número máximo de 1.000.000 avaliações, com um tamanho de população de 750 e um total de 24 rodadas. O Dockthor é uma plataforma online para a realização de docking molecular que utiliza a proteína rígida e o ligante flexível, respeitando os graus de liberdade desse último.

Para a análise do resultado, foi utilizado um RMSD (*root mean square deviation*) de 2Å separando os confôrmeros em função da energia de interação proteína-ligante. Os demais parâmetros foram estabelecidos como padrão da plataforma (Dos Santos et al., 2020).

Para as análises, foi utilizado o software *Discovery Studio Visualizer*, uma ferramenta capaz de avaliar os tipos de ligações envolvidas na interação macromolécula-ligante. Para as análises de potencial eletrostático foi utilizado o

software APBS-PDB2PQR, que resolve a equação linearizada de Poisson–Boltzmann (Dolinsky *et al.*, 2007).

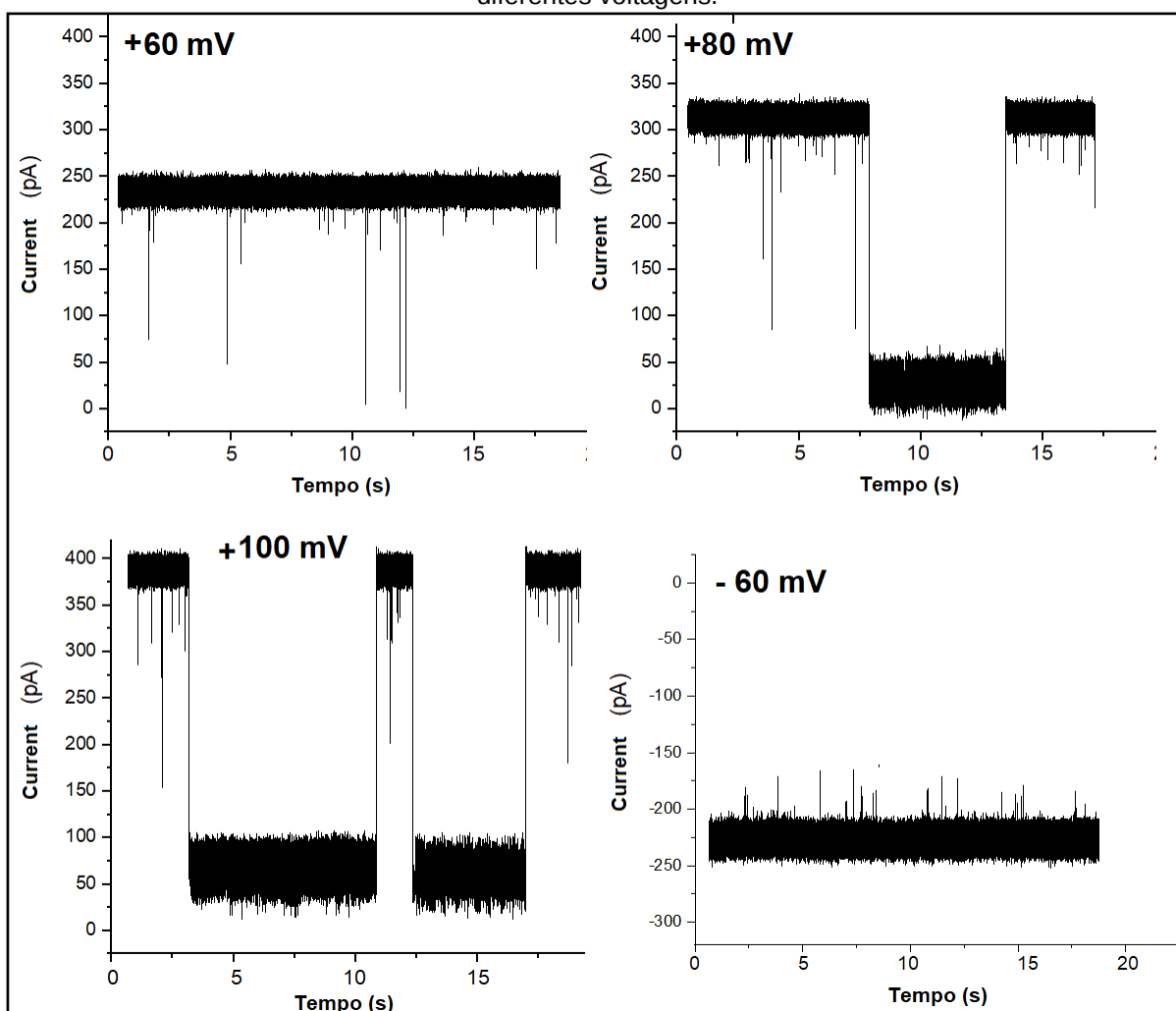
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DADOS EXPERIMENTAIS

5.1.1 Tetrodotoxina

A figura 8 traz um registro típico da corrente iônica da alfatoxina e os bloqueios induzidos pelo TTX na corrente em diferentes voltagens (+ 60 mV, + 80 mV, + 100 mV e – 60 mV). É possível identificar que nas voltagens de + 60 mV e – 60 mV, os bloqueios são rápidos, da ordem de milissegundos. À medida que a voltagem foi sendo incrementada, foram identificados bloqueios duradouros, superiores a 5 segundos. Diante desses achados, é possível observar um possível efeito da voltagem no comportamento do TTX no lúmen do nanoporo. Além disso, os bloqueios longos muitas vezes são irreversíveis, mantendo o nanoporo permanentemente bloqueado, exigindo a inversão da voltagem para a reversão da condição do nanoporo em seu estado não ocupado.

Figura 8 – Perfil de bloqueio do TTX na corrente iônica do nanoporo formado pela alfatoxina em diferentes voltagens.

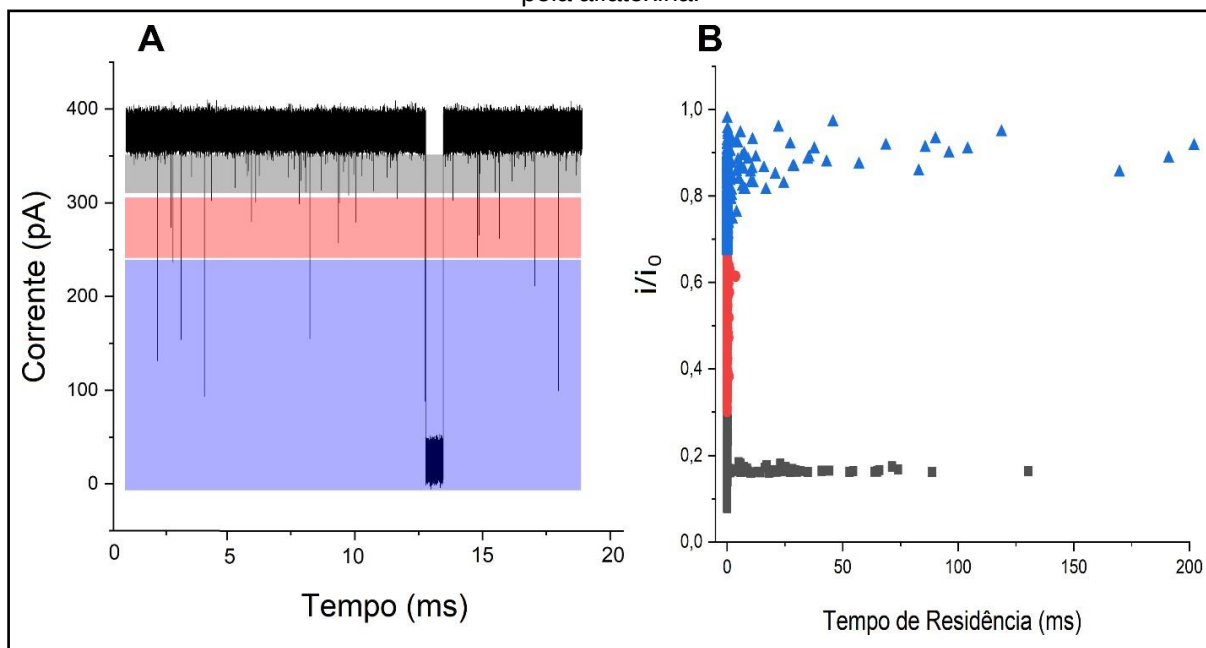


Fonte: autoria própria (2023).

Também é possível observar que na voltagem de -60 mV os bloqueios possuem baixa amplitude e menor frequência de eventos. Em voltagens de ± 20 mV, são observados eventos raros e em voltagens iguais ou maiores que ± 120 mV, são observados bloqueios irreversíveis ainda mais frequentes em comparação à voltagem de $+100$ mV.

A figura 9 permite avaliar a variabilidade de eventos de bloqueio causados pela translocação do TTX no nanoporo da alfatoxina. Diante de uma voltagem de $+100$ mV, são identificadas três populações de bloqueio, desde eventos rápidos e de baixa amplitude de bloqueio, até eventos profundos, com duração de 200 ms ou mais.

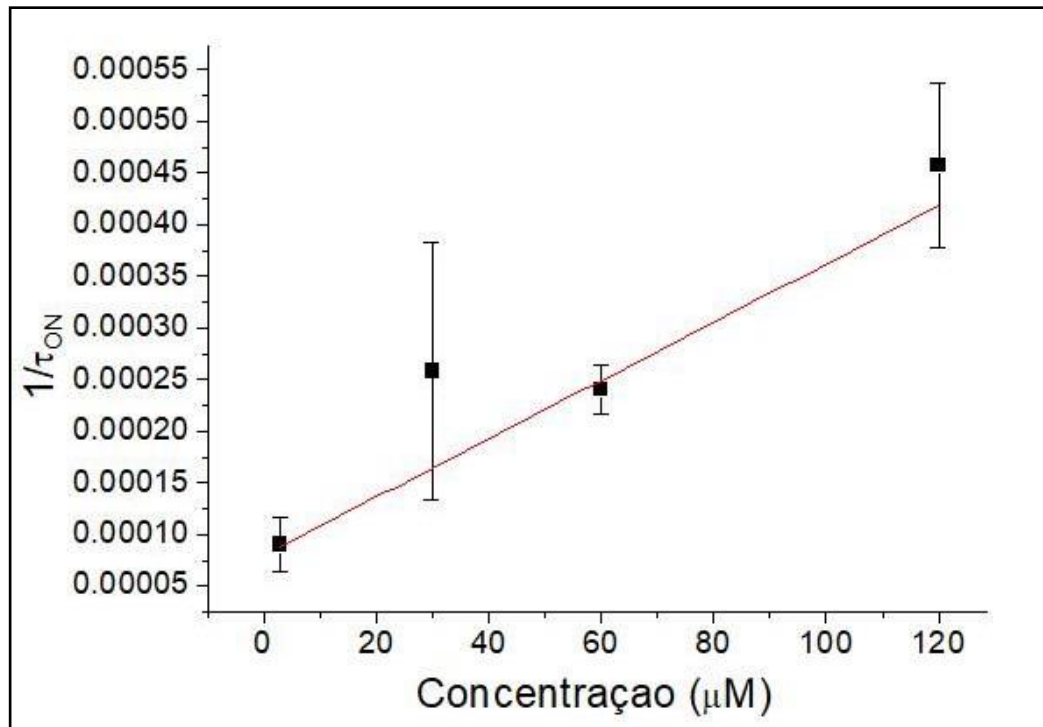
Figura 9 – Caracterização dos bloqueios causados pelo TTX sobre a corrente do nanoporo formado pela alfatoxina.



Fonte: autoria própria (2023). (A) Traço típico de bloqueio da corrente elétrica do nanoporo causado pelo TTX em +100 mV, destacando três níveis de bloqueio. (B) Bloqueio de condutância normalizada versus diagrama de dispersão da duração dos eventos. Foi utilizada uma concentração de 30 μ M de TTX.

O nanoporo da alfatoxina foi capaz de detectar concentração de TTX na ordem de micromolar. O aumento da concentração promove uma diminuição da r_{on} . O inverso da r_{on} equivale à frequência de eventos. Na figura 10, constata-se uma dependência linear da frequência de eventos em relação à concentração de TTX, sendo desta forma possível estabelecer o limite de detecção do nanoporo para esta toxina. Em suma, o nanoporo se mostrou sensível a diferentes concentrações dessa biotoxina.

Figura 10 – Frequência de eventos em função da concentração de TTX (3, 30, 60 e 120 μM)

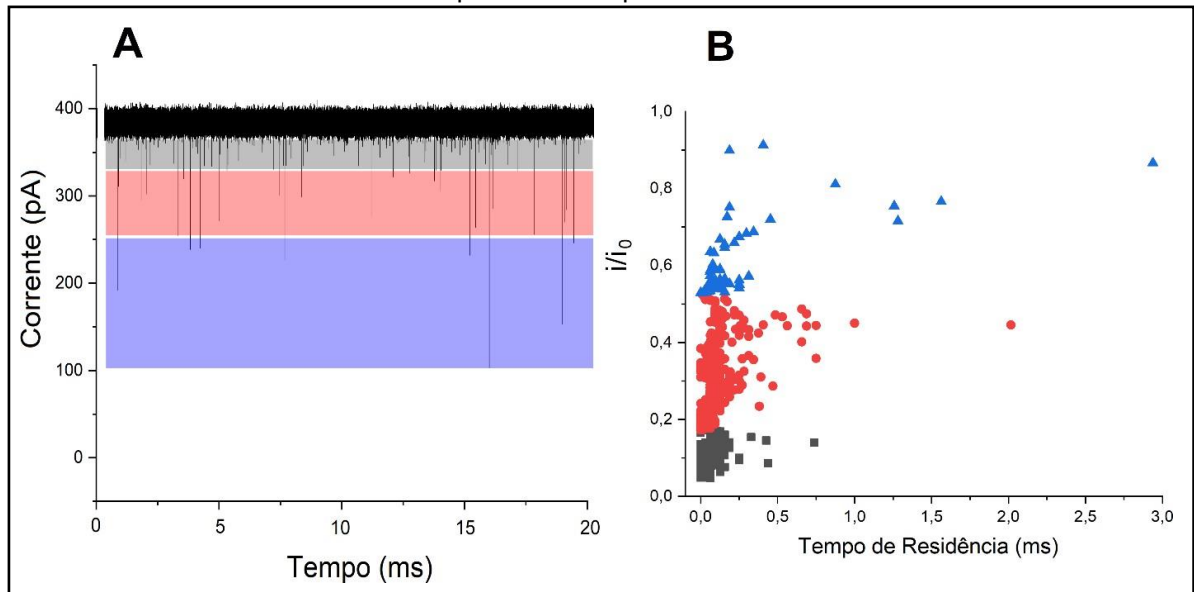


Fonte: autoria própria (2023). Dados obtidos em voltagem de +100 mV. Experimentos realizados em KCl 4 M, Tris 5 mM-HCl, pH 7.5. Coeficiente de correlação de Pearson de 0,95, indicando forte correlação

5.1.2 Maduramicina

A figura 11 apresenta o perfil de bloqueio induzidos pela maduramicina na corrente da alfatoxina. Diante da aplicação de uma voltagem de +100 mV, são identificadas três populações de bloqueio, no entanto, diferentemente do que ocorre com o TTX, a duração dos eventos nessa voltagem não ultrapassa 3 milissegundos.

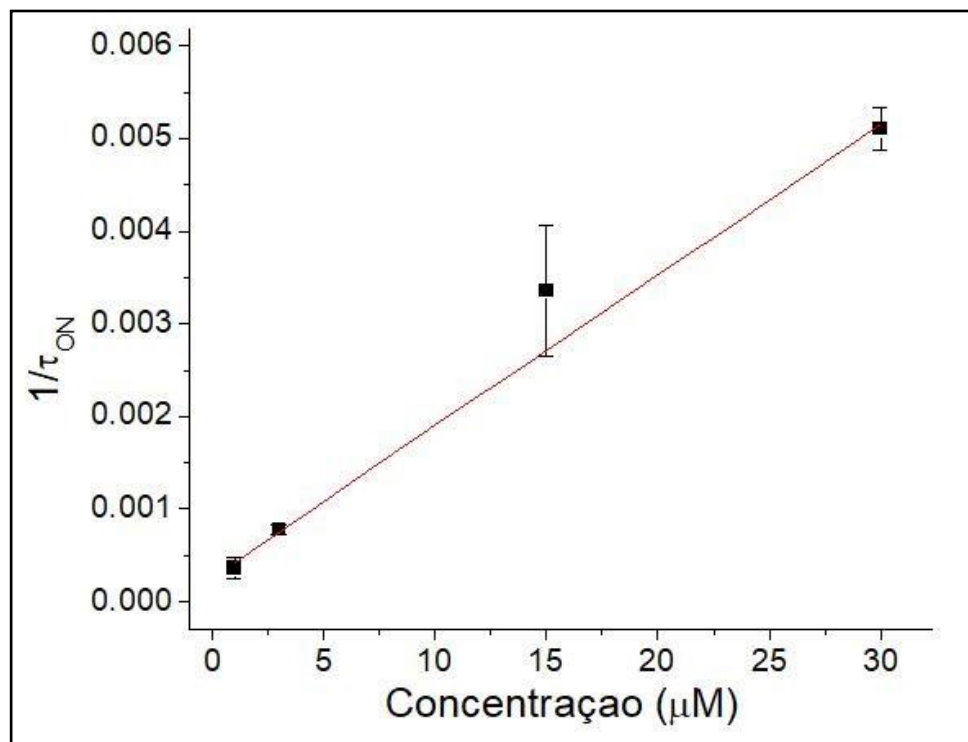
Figura 11 – Caracterização dos bloqueios causados pela maduramicina sobre a corrente do nanoporo formado pela alfatoxina.



Fonte: autoria própria (2023). A) Traço típico de bloqueio da corrente elétrica do nanoporo causado pela maduramicina em +100 mV, destacando três níveis de bloqueio. (B) Bloqueio de condutância normalizada versus diagrama de dispersão da duração dos eventos. Foi utilizada uma concentração de 30 μM de maduramicina.

Na figura 12, tal como ocorreu com o TTX, constata-se uma dependência linear da frequência de eventos em relação à concentração de maduramicina. O nanoporo também foi capaz de detectar diferentes concentrações dessa biotoxina.

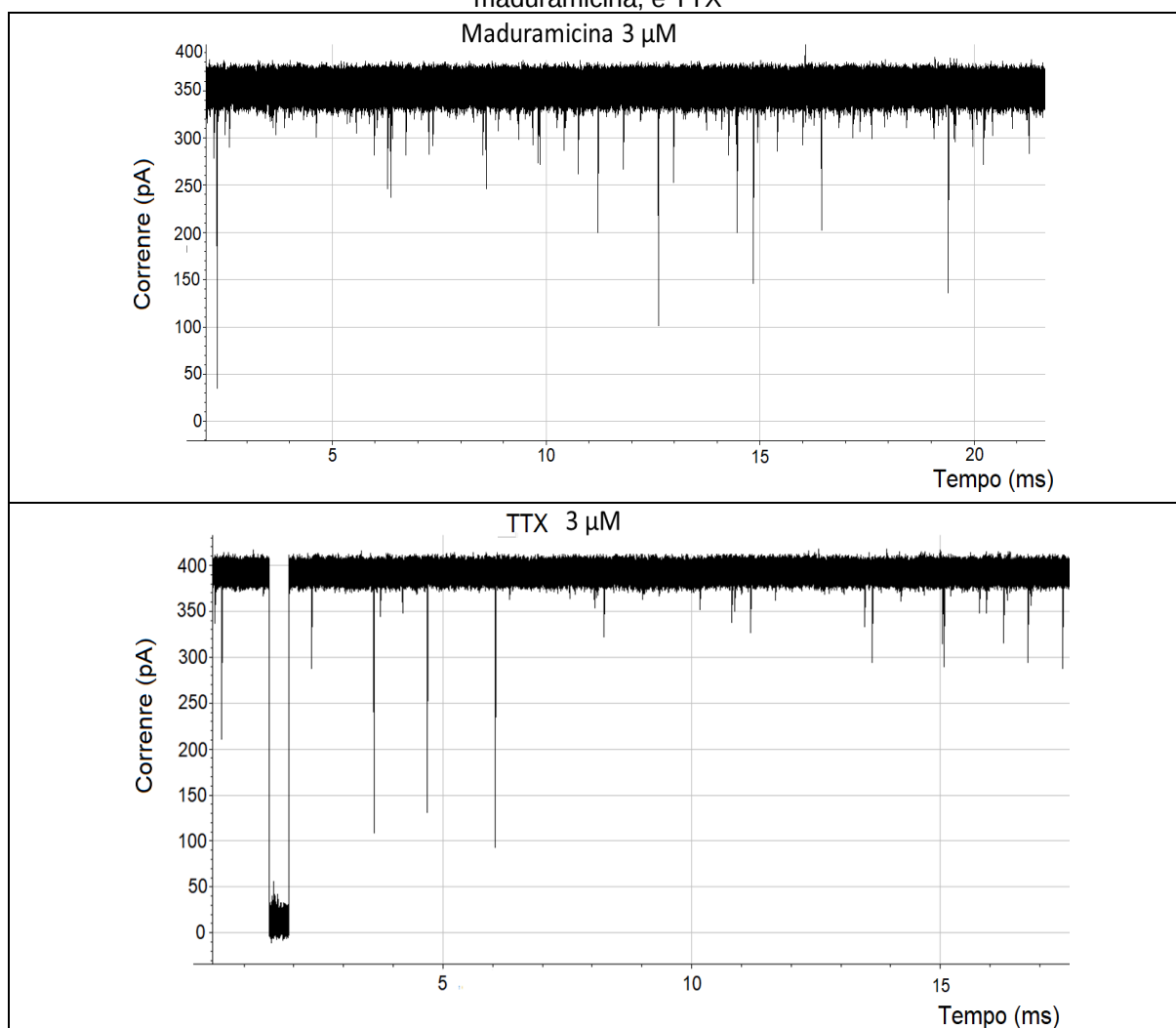
Figura 12 – Frequência de eventos em função da concentração de maduramicina (1, 3, 15 e 30 μM)

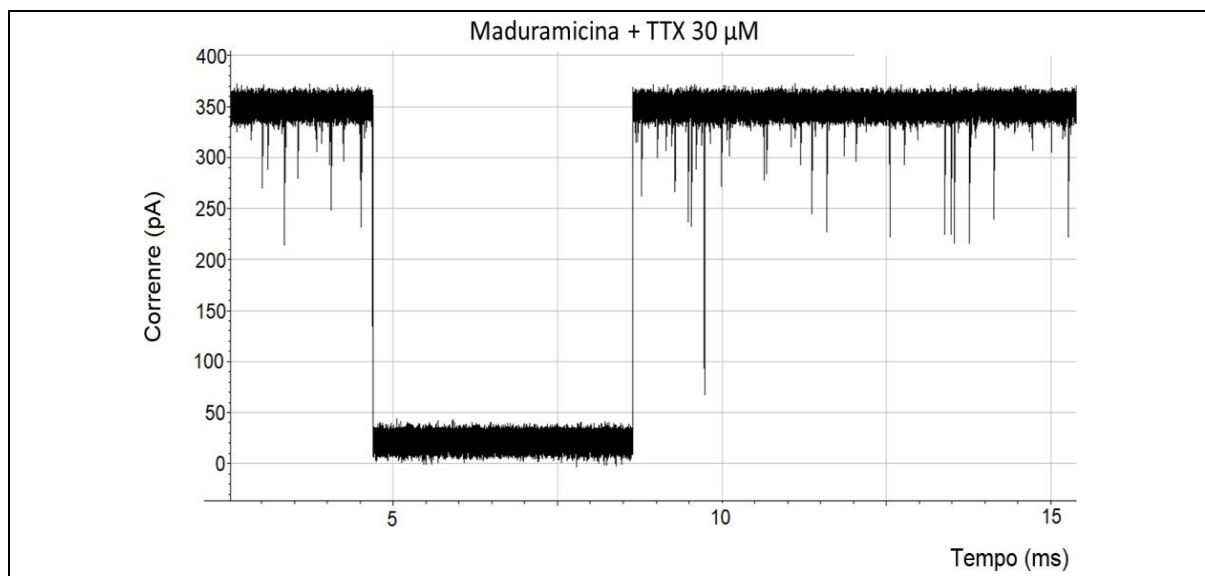


Fonte: autoria própria (2023). Dados obtidos em voltagem de +100 mV. Experimentos realizados em KCl 4 M, Tris 5 mM-HCl, pH 7.5. Coeficiente de correlação de Pearson de 0,99, indicando forte correlação

A figura 13 traz um registro típico de corrente da maduramicina e do TTX adicionados no lado trãns isoladamente e em conjunto. Mais uma vez, é possível constatar as diferenças entre os tempos de residência. A figura 14 traz os valores médios de tempo de residência dos analitos no nanoporo, obtidos através de histogramas, ajustados a uma função exponencial, tal como ocorre com outras toxinas (Silva et al., 2023). Portanto, foi possível constatar que o TTX apresentou tempo de residência médio duas vezes maior, quando comparado à maduramicina.

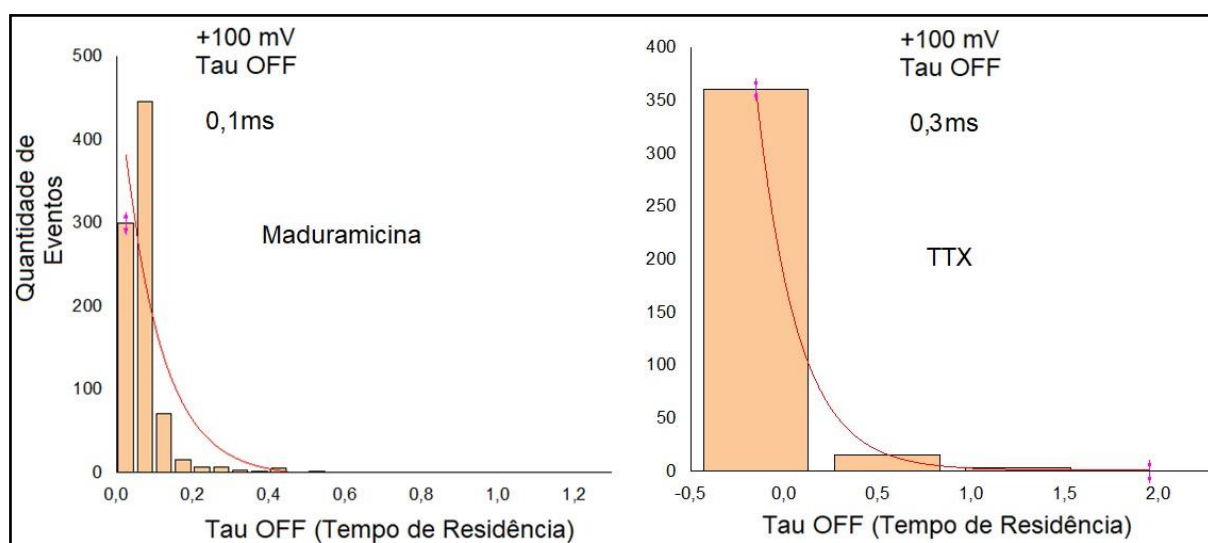
Figura 13 – Diferença entre os traçados típicos de bloqueio do nanoporo causados pela maduramicina, e TTX





Fonte: autoria própria (2023). Traçados típico de bloqueios dos analitos adicionados isoladamente e em conjunto. Potencial aplicado: +100 mV.

Figura 14 – Valores médios dos tempos de residência da maduramicina e do TTX.



Fonte: autoria própria (2023). Comportamento exponencial dos tempos de residência. Concentração utilizada dos analitos: 3 μ M.

5.2 DADOS COMPUTACIONAIS

O Docking Molecular é uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo da interação entre uma proteína e um ligante, em nível atômico, possibilitando caracterizar o comportamento dos ligantes no local de ligação dos receptores-alvo (proteína). Por meio desse método, informações são geradas de modo a auxiliar na

elucidação de processos biológicos (Ferreira, 2017), como a possível interação entre o nanoporo proteico da alfatoxina e as toxinas utilizadas no presente estudo.

Dentre os confôrmeros (isômeros estruturais) do TTX e da maduramicina resultantes do docking, as afinidades de ligação dos melhores ranqueados estão listadas na tabela 1 para ambas as biotoxinas. Constata-se que a maduramicina apresentou maior afinidade de ligação com o nanoporo.

Tabela 1 – Ranking das posições de maior afinidade de ligação resultantes do docking.

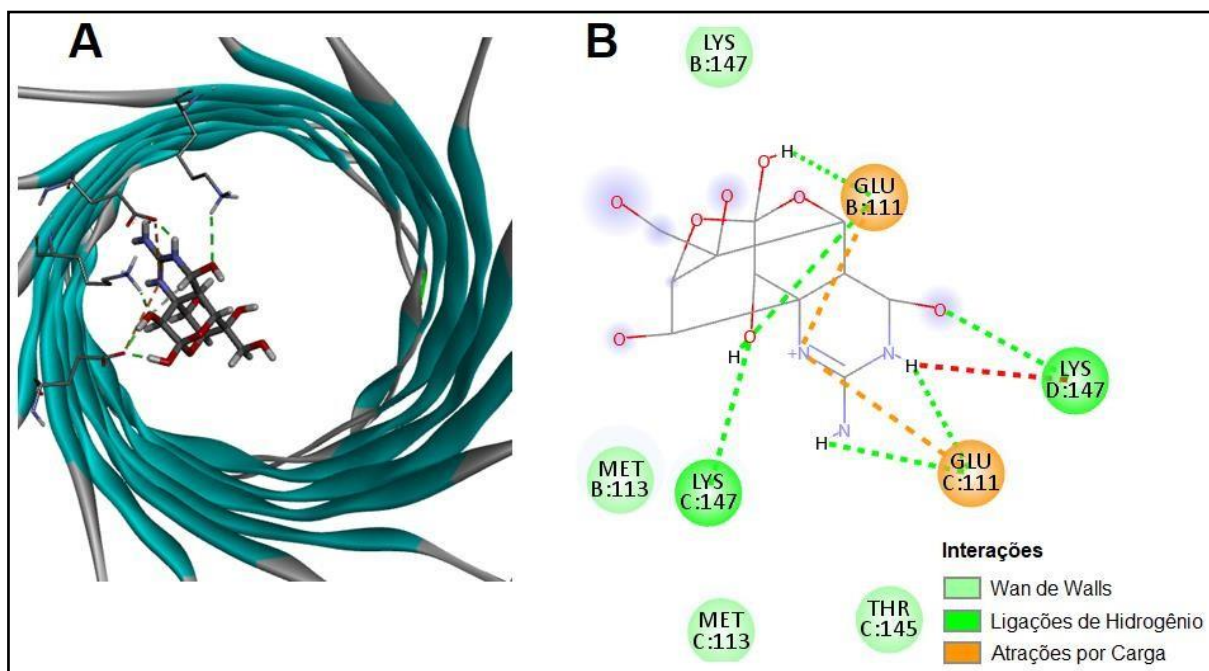
Biotoxina	Rodada	Afinidade de Ligação (Kcal/mol)
TTX	12	-6.371
Maduramicina	13	-8.426

Fonte: autoria própria (2023).

A figura 15 traz um esquema com as interações intermoleculares entre o nanoporo e o TTX. Os principais resíduos do nanoporo envolvidos na interação com o TTX são a lisina 147 e glutamato 111, por meio de ligações de hidrogênio e atrações por carga. Além disso, também foram observadas interações de Van der Waals, mais fracas, com outros resíduos (metionina 113 e tirosina 145). O modo de ligação do TTX ao nanoporo se assemelha ao modo de ligação dessa toxina com canal de sódio dependente de voltagem (NaV1.4), no qual as ligações de hidrogênio e as atrações por carga são responsáveis pela significativa redução da condutância desses canais. Os resíduos ácidos (negativamente carregados) do NaV1.4 atraem fortemente o anel de guanidina (positivamente carregado) do TTX (Mackieh *et al.*, 2021).

Os resultados computacionais apontam que o TTX, através do anel de guanidina formam o mesmo tipo de interação com resíduos de glutamato 111 do lume do nanoporo, assim como ligações de hidrogênio.

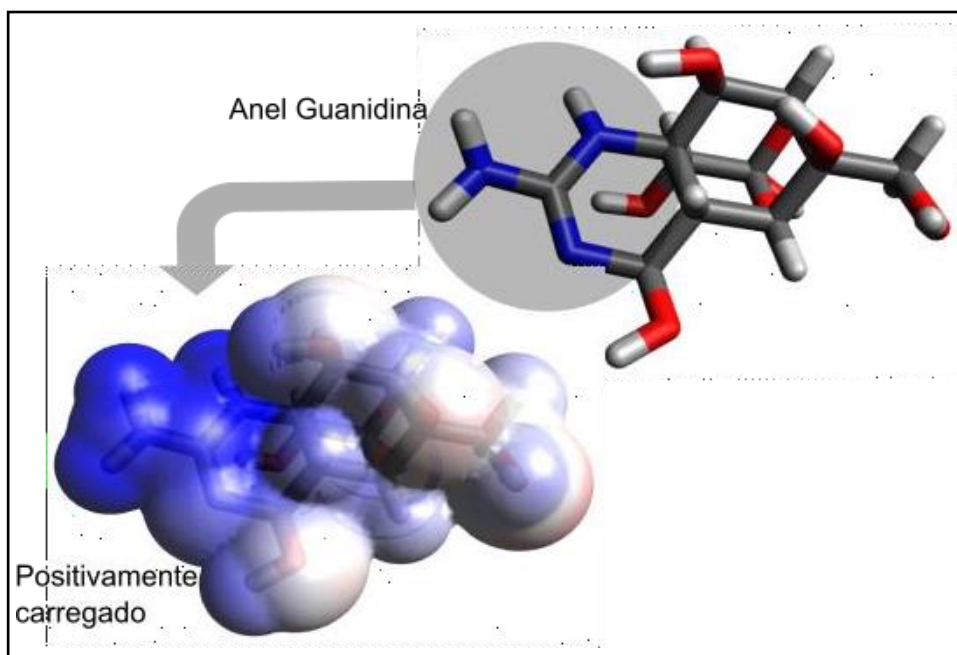
Figura 15 – Interações entre TTX e nanoporo.



Fonte: autoria própria (2023). (A) Visão tridimensional do confômero melhor ranqueado interagindo com os resíduos 111 e 147 do nanoporo. (B) Diagrama 2D da interação entre o TTX e o nanoporo, esquematizando todas as interações resultantes do docking.

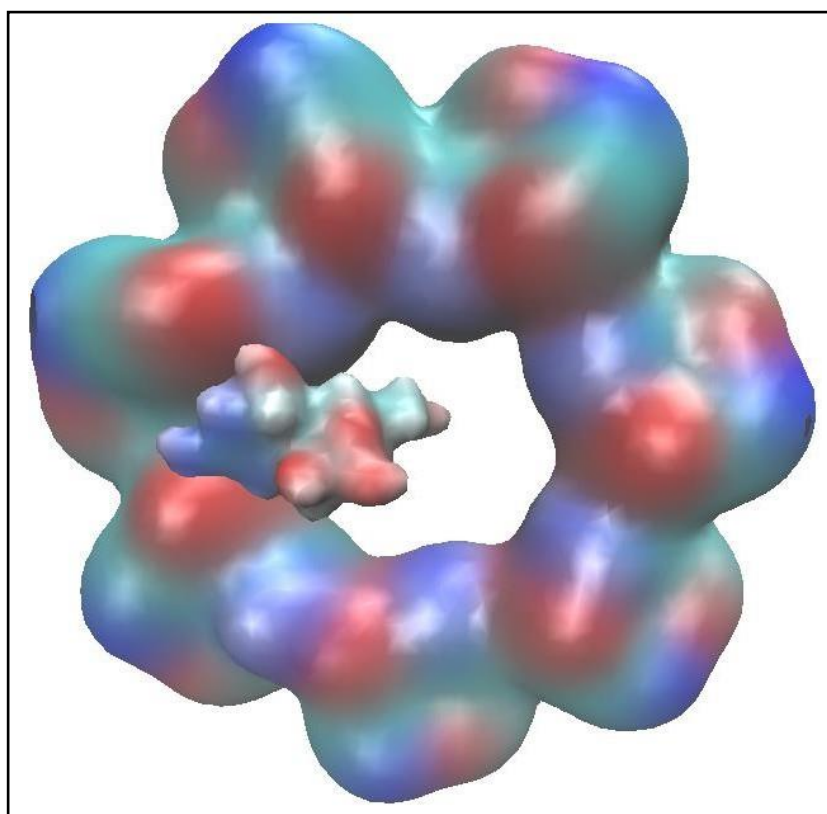
Buscando confirmar a interação de caráter eletrostático envolvendo o anel de guanidina e o glutamato 111 do nanoporo, foi calculado o mapa de potencial eletrostático do TTX. Como ilustrado na figura 16, o anel de guanidina apresenta-se fortemente carregado positivamente, sendo atraído pelo anel carregado negativamente formado pelo resíduo de glutamato 111. Foi evidenciado na figura 16 o encaixe do grupo guanidina entre os resíduos negativamente carregados da posição 111. Interações envolvendo cargas opostas estão entre as interações intermoleculares de maior força (Bissantz; Kuhn; Stahl, 2010), o que pode justificar os eventos de longa duração.

Figura 16 – Mapa de potencial eletrostático do TTX.



Fonte: autoria própria (2023).

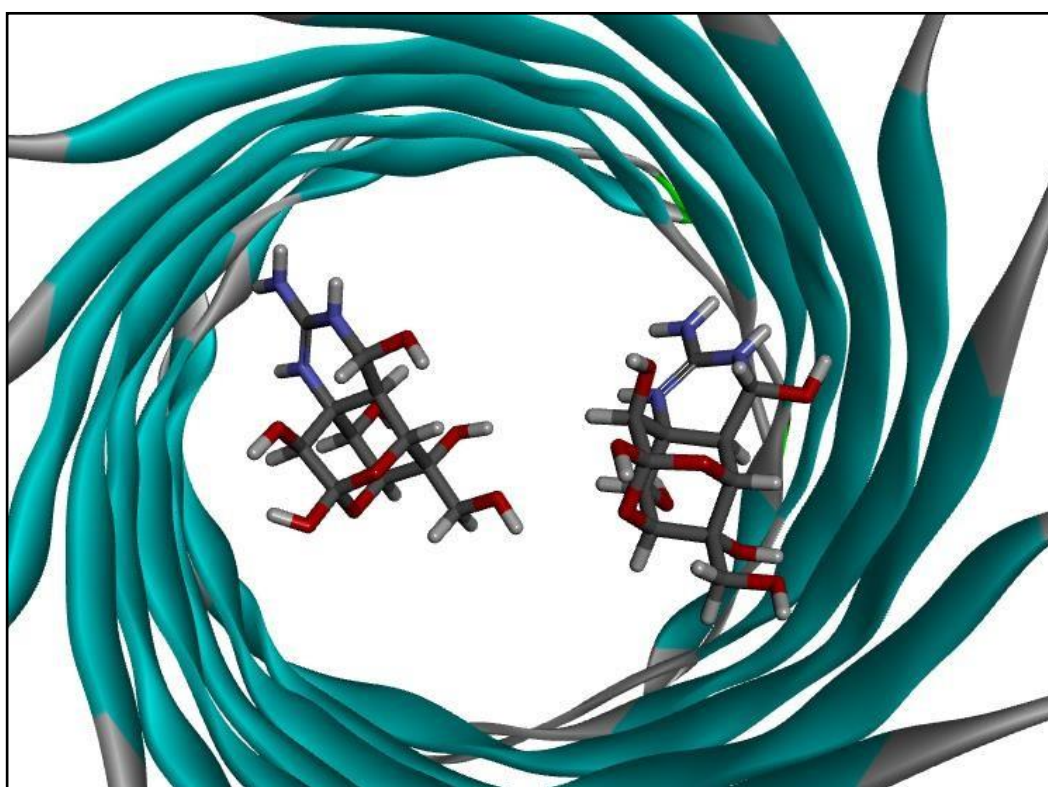
Figura 17 – Representação em superfície do encaixe do TTX entre os resíduos de glutamato 111 no nanoporo da alfatoxina.



Fonte: autoria própria (2023).

Os dados experimentais apontam que o TTX apresenta uma expressiva variedade de eventos de bloqueio, especialmente quando em elevadas voltagens, sendo observados eventos duradouros que bloqueiam o nanoporo quase por completo (figuras 9 e 13). Os dados computacionais apontam que os dois confôrmeros de maior afinidade de interação não se sobrepõem e apresentam os mesmos tipos de interação (ligação de hidrogênio e interação por carga) com o nanoporo, com os mesmos resíduos (figura 18). Isso pode indicar a interação simultânea de mais de uma molécula de TTX entre os resíduos 147 e 111 do nanoporo, ocupando maior espaço, correspondendo aos eventos de maior amplitude de bloqueio da corrente.

Figura 18 – Confôrmeros de maior energia interagindo com o nanoporo.

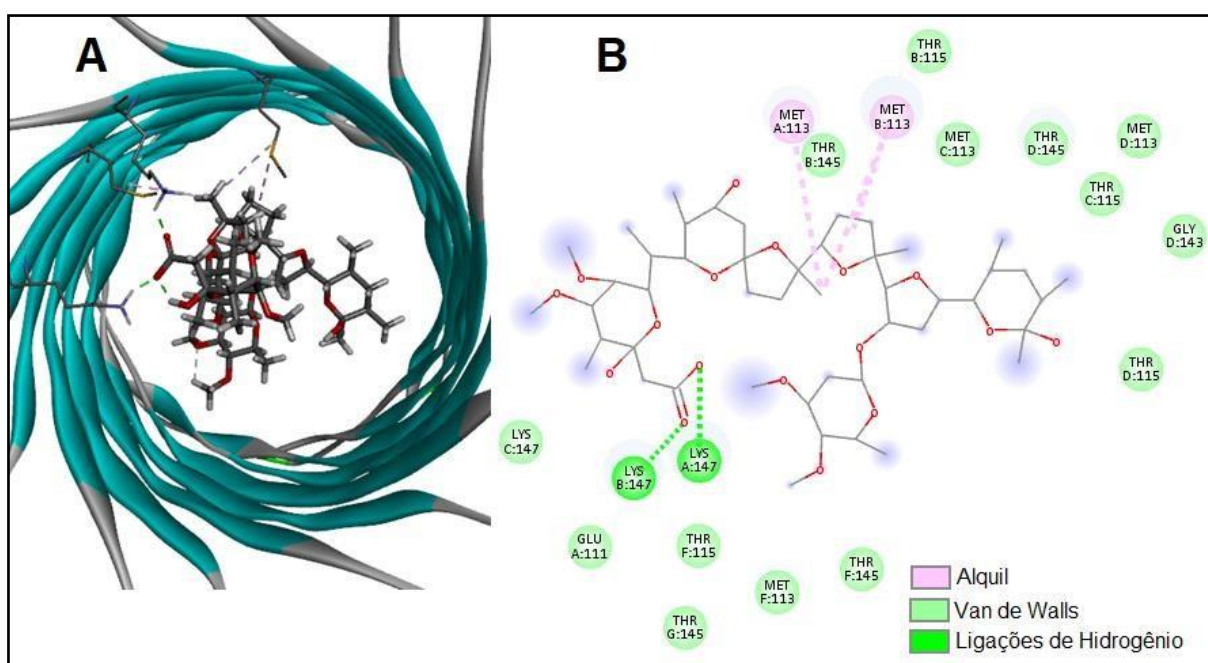


Fonte: autoria própria (2023). Ilustração de dois confôrmeros não sobreponíveis oriundos do docking no lume do nanoporo

Os resultados de docking apontam que a maduramicina apresenta maior afinidade de ligação com o nanoporo, quando comparado ao TTX (Tabela 1). Quando avaliados os modos de ligação, evidencia-se uma maior quantidade de interações intermoleculares em relação ao TTX. Como ilustrado na figura 19, são duas ligações de hidrogênio com a lisina 147 do nanoporo, duas interações alquil com o resíduo 113

e mais de 10 interações de Van der Waals com diversos outros resíduos. Isso pode estar relacionado ao elevado peso molecular da maduramicina, sugerindo que parte da molécula fique fora do canal, o que acarreta no desvio do efeito previsto para os bloqueios, como descrito em outros estudos (Krasilnikov; Rodrigues; Bezrukov, 2006). Além disso, o centro do grid escolhido para a realização do docking, foi a região da constricção. Desta forma o método de docking não é capaz de precisar se a maduramicina realmente ocupa aquela região. Isso nos leva a propor a realização de estudos computacionais que possam simular a

Figura 19 – Interações intermoleculares entre maduramicina e nanoporo.



Fonte: autoria própria (2023). (A) visão tridimensional do confôrmero melhor ranqueado interagindo no lume do nanoporo. (B) diagrama 2D da interação entre a maduramicina e o nanoporo, esquematizando todas as interações intermoleculares resultantes do docking.

5.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Os estudos resultaram em: manuscrito submetido na Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde (Reciis) - Qualis A3 (ANEXO A); e um capítulo de livro aceito para publicação na editora Atena (ANEXO B)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos achados, foi possível observar que a maduramicina e o TTX apresentam perfis distintos de bloqueio do nanoporo da alfatoxina, apontando que os parâmetros eletrofisiológicos característicos do método de detecção estocástica foram diferentes diante de compostos com naturezas químicas completamente distintas. Isso constata a versatilidade do método de detecção baseado em nanoporo protéico como ferramenta multianalítica. Além disso, os resultados de docking molecular contribuíram com a caracterização do perfil de interação entre os analitos e o nanoporo, especialmente no que concerne ao TTX. Quando se trata da maduramicina, ainda não se pode afirmar se a mesma é capaz de ocupar a região da constricção do nanoporo, em virtude do seu peso molecular, apesar de terem sido realizadas simulações nesta região.

São necessários estudos voltados para a avaliação das constantes de associação e dissociação em diferentes voltagens, variando também a força iônica. Vale ressaltar a importância de novos estudos voltados para a avaliação, por métodos computacionais mais robustos, do comportamento no tempo da interação da maduramicina com o nanoporo, bem como avaliar a possível interação de mais de uma molécula de TTX no lume do nanoporo.

O presente estudo possui relevância na sua contribuição com o estado da arte relacionada à aplicação do nanoporo da alfatoxina como ferramenta analítica, bem como do docking molecular como método computacional importante para o entendimento de processos biológicos ao nível molecular.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. P. et al. Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de ferramentas analíticas. **Química Nova**, v. 38, p. 817-827. 2015.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEEZ-LARRAÑAGA, S. R. Veterinary Drugs Residues: Coccidiostats. **Encyclopedia of Food Safety**, v. 3, p. 63-75, 2014.
- AL-MAMUN, M. et al. Food Poisoning and Intoxication: A Global Leading Concern for Human Health. **Food Safety and Preservation**, v. 11, p. 307- 352, 2018.
- ALSHANNAQ A.; YU J. H. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, p. 632. 2017.
- BANDEIRA, A. C. et al. Clinical and laboratory evidence of Haff disease – case series from an outbreak in Salvador, Brazil, December 2016 to April 2017. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 24, p. 30552, 2017.
- BARBIERI, E. **O perigo das biotoxinas marinhas**. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/biotoxinas/index.htm>. Acesso em: 2/2/2023.
- BAYLEY, H.; CREMER, P. S. Stochastic sensors inspired by biology. **Nature**, v. 413, p. 226-230, 2000.
- BHATTI, H. et al. Recent advances in biological nanopores for nanopore sequencing, sensing and comparison of functional variations in MspA mutants. **RSC Advances**, v. 11, n. 46, p. 28996-29014, 2021.
- BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061-84, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Fundação Nacional de Saúde**. Brasília. 2003. Disponível em: <https://docplayer.com.br/19859544-Cianobacterias-toxicas-na-agua-para-consumo-humano-na-saude-publica-e-processos-de-remocao-em-agua-para-consumo-humano.html>. Acesso em 17 jan. 2023.
- BUCCIARELLI, G. M. From Poison to Promise: The Evolution of Tetrodotoxin and Its Potential as a Therapeutic. **Toxins**, v. 13, n. 8, 2021.
- CARVALHO, G. et al. Aspectos relevantes sobre as intoxicações pelo consumo de pescado. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Espírito Santo**, v. 4, p. 118, 2021.
- DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: Expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W522-W525, 2007.

EMBRAPA. Centro de Inteligência e Mercado em Aquicultura. **Produção brasileira: espécies**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-centro-de-inteligencia-e-mercado-emaquicultura/producao-brasileira/especies> Acesso 05 maio 2021. Acesso em 09 jan. 2023.

DOS SANTOS, K. B. et al. Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-peptide Dataset. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 9b00905, 2020.

FAN, J.; FU, A; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89, 2019.

FERREIRA, L. F. G. R. **Novas estratégias para métodos *in silico* na inovação terapêutica utilizando computação distribuída: GriDoMol**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Inovação Terapêutica. Recife, 2017.

GAO, X. et al. Development and Validation of an Ultra-Performance Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry Method to Determine Maduramicin in Crayfish (*Procambarus clarkii*) and Evaluate Food Safety. **Foods**, v 10, p. 301, 2021.

GAO, X. et al. Ionophore Toxin Maduramicin Produces Haff Disease-Like Rhabdomyolysis in a Mouse Model. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 7882, 2020.

GAO, S.; ZHENG, X.; HU, B. et al. Enzyme-linked, aptamer-based, competitive biolayer interferometry biosensor for PTX. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, n. 2, p. 952-958, 2017.

GAO, X. et al. Maduramicin induces apoptosis in chicken myocardial cells via intrinsic and extrinsic pathways. **Toxicology In Vitro**, v. 50, p. 190–200, 2018.

Gao X, Song X, Zuo R, Yang D, Ji C, Ji H, Peng L, Qiu Y, Guo D, Jiang S. Ionophore Toxin Maduramicin Produces Haff Disease-Like Rhabdomyolysis in a Mouse Model. **Int J Environ Res Public Health**, v. 17, n. 21, p. 7882, 2020

GASTALHO, S.; SILVA, G.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

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

GUO, B. et al. Outbreak of Haff disease caused by consumption of crayfish (*Procambarus clarkii*) in Nanjing, China. **Clinical Toxicology**, v. 17, p. 1-7, 2018.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, p. 33-38, 1996.

HORT, V. et al. First detection of tetrodotoxin in bivalves and gastropods from the French mainland coasts. **Toxins**, v. 12, 599, 2020.

INDUMATHI, S. M, KHORA, S. S. Toxicity assessment and screening of tetrodotoxin in the oblong blowfish (Takifugu oblongus) from the Tamil Nadu Coast of Bay of Bengal, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 3, p. 278-284, 2017.

JIANG, B. Review on Marine Biotoxins Toxicity and Detection Methods. **10th International Conference on Biomedical Engineering and Technology**, p. 28-33, 2020.

LEAL, V. F. M. M. JÚNIOR, S. J. J. Interações fármaco nutriente: caracterização e métodos inovadores de avaliação. **Revista Rios Saúde**, v. 1, n. 4, p. 38-48, 2018.

KRASILNIKOV, V. L.; RODRIGUES, G. C.; BEZRUKOV, M. S. Single Polymer Molecules in a Protein Nanopore in the 41 limit of a Strong Polymer-Pore Attraction. **Revista Física**, v. 97, p. 1-4, 2006.

KASIANOWICZ, J. J. et al. **Detecting and Characterizing Individual Molecules with Single Nanopores**. In Nanopore-Based technology. Ed. Springer, 2012.

KATIKOU, P. et al. An Updated Review of Tetrodotoxin and Its Peculiarities. **Marine Drugs**, v. 20, n. 1, p. 47, 2022.

MACHADO, D. C. et al. Effects of alkali and ammonium ions in the detection of poly(ethyleneglycol) by alpha- hemolysin nanopore sensor. **RSC Advances**, v. 6, p. 647-655, 2016.

MADEJSKA, A.; MICHALSKI, M.; OSEK, J. Marine tetrodotoxin as a risk for human health. **Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 4, p. 579, 2019.

MAGALHÃES, C. S. et al. A. Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking of Highly Flexible Ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206-224, 2014.

MELO, S. E. et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: revisão. **PUBVET**, v.12, n.10, p.1-9, 2018.

MCCULLUM, C. et al. Extraction of Aflatoxins from Liquid Foodstuff Samples with Polydopamine-Coated Superparamagnetic Nanoparticles for HPLC- MS/MS Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62. p. 4261–4267, 2014.

MACKIEH, R. et al. Voltage-Gated Sodium Channels: A Prominent Target of Marine Toxins. **Marine Drugs**, v. 19, p. 562, 2021.

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.

MURK, A. J. et al. Marine biotoxins: types of poisoning, underlying mechanisms of action and risk management programmes. **Chemical Hazards in Foods of Animal Origin**, v. 7, p. 207-239, 2019.

NELSON, W. E. **Textbook of pediatrics**, Sauders, 20^a edição. 2016.

NESTOROVICH, E. M. Channel-forming bacterial toxins in biosensing and macromolecule delivery. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2483–2540, 2014.

NEVES, M. C. M. **Levantamento de dados oriundos do DATASUS relativos a ocorrências/surtos de intoxicação alimentar no Brasil de 2007-2014**. 2015.

NOIRMAIN, F.; DANO, J.; VOLLAND, H.; SIMON, S.; SERVENT, D.; ARÁOZ, R. Neurotorp: Fast & Early Warning Device for the Detection of Aquatic Neurotoxins Principle LFT-TR. In Proceedings of the **18th International Conference on Harmful Algae from Ecosystems to Socio-Ecosystems (Icha 2018)**, Nantes, France, 21–26 October 2018.

ONU. Nações Unidas. Comércio internacional de peixes movimentou US\$ 175 bilhões em 2021. 2021. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2022/06/1790912>. Acessado em: 22 ago. 2023.

OTERO, P.; ALFONSO, A.; ALFONSO, C.; ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J.; VIEYTES, M. R.; BOTANA, L. M. First direct fluorescence polarization assay for the detection and quantification of spirolides in mussel samples. **Anal. Chim. Acta.**, v. 701, p. 200–208, 2011.

OTERO, P.; SILVA, M. Emerging Marine Biotoxins in European Waters: Potential Risks and Analytical Challenges. **Marine Drugs**, v. 20, n. 3:199, 2022.

PAGADALA, N. S.; SYED, K. TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophys Rev.**, v. 9, n. 2, p. 91-102, 2017.

PATOCKA, J; WU, Q; KUCA, K. **Palytoxin**. Handbook of Foodborne Diseases. Cap. 97, 2018.

PEBMED. **Doença de Haff: novos casos são diagnosticados no Brasil**. 2021. Disponível em: <https://pebmed.com.br/doenca-de-haff-novos-casos-sao-diagnosticados-no-brasil/>. Acessado em 27/05/2021.

PINTO, A.; PEREIRA, P.; PEREIRA, J. Toxinas produzidas por cianobactérias e dinoflagelados: o caso particular das saxitoxinas. **Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos**, Aveiro, v. 11, p. 2-2, 2022.

PINZARU, S. C. et al. Lipophilic marine biotoxins SERS sensing in solutions and in mussel tissue. **Talanta**, v. 187, p. 47-58, 2018.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2-23, 2019.

REVERTÉ, L. et al. Alternative Methods for the Detection of Emerging Marine Toxins: Biosensors, Biochemical Assays and Cell-Based Assays. **Marine Drugs**, v. 12, p. 5719-5763, 2014.

RASHID, N. et al. Enterotoxigenic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* contamination in salted fish from Gwadar Balochistan. **Brazilian Journal of Biology**, v 83, p. e247701, 2021.

RODRIGUES, C. G. **Transporte de moléculas orgânicas através de poros nanoscópicos unitários**. Tese (Doutorado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2006.

RODRIGUES, C. G. et al. Mechanism of KCl Enhancement in Detection of Nonionic Polymers by Nanopore Sensors. **Biophysical Journal**, v. 95, 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.

RODRIGUES, C. G. et al. **Use of a protein nanopore for the detection, identification, quantification and real-time monitoring of microcystins in aqueous systems**. Depositante: Universidade Federal de Pernambuco. Patente n°: WIPO-PCT/BR2012/000322. Concessão: 2013.

SILVA, A. A. R. **Nanossensor estocástico para detecção de compostos organoestânicos: estudo experimental e teórico-computacional**. 2017. 56f. Dissertação (Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2017.

SILVA, A. A. R. D.; SILVA JÚNIOR, J. J. D.; CAVALCANTI, M. I. D. S.; MACHADO, D. C.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, C.G. Alphatoxin Nanopore Detection of Aflatoxin, Ochratoxin and Fumonisin in Aqueous Solution. **Toxins**, v. 15, n. 183, 2023.

SILVA, P. E. S. et al. Panorama quantitativo de uma década de casos de intoxicação alimentar do norte do Brasil. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v, 7, p. 121-128, 2018.

SILVA JÚNIOR, J. J. **Modelagem computacional, preparação e análise das propriedades do nanossensor estocástico para detecção e identificação de cianotoxinas**. 2017. 90f. Tese (Doutorado) Pelo Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

SILVA JÚNIOR, J. J. et al. Alpha-hemolysin nanopore allows discrimination of the microcystins variants. **RSC Advances**, v. 9, p. 14683-14691, 2019.

SLEDZ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 48, p.93-102, 2018.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE E. J. Computational methods in drug discovery. **Pharmacol Rev.**, v. 31, n. 66, p. 334-95, 2013.

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

SUZUKI, T. et al. LC-MS-MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, p. 1358–1364, 2013.

THOMPSON, F.; THOMPSON, C. **Biotecnologia Marinha**. Ed. FURG, 2020.

TIKHONOV, B. D.; ZHOROV, S. B. Predicting Structural Details of the Sodium Channel Pore Basing on Animal Toxin Studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-14, 2018.

TORRES, M. H. P. *et al.* Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **Internacional Journal of Molecular Sciences**. v. 20, n. 18, p. 2-29, 2019.

XAVIER, G. S. B, L.; MICHAEL, S. Molecular Docking Studies on Antiviral Drugs for SARS. **International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering**, v. 5, p. 75– 79, 2015.

YE, W. et al. Marine Toxins Detection by Biosensors Based on Aptamers. **Toxins**, v. 12, n. 1, p. 1, 2020.

YOPASÁ-ARENAS, A. FOSTIER, H. A. Exposure of Brazilian soil and groundwater to pollution by coccidiostats and antimicrobial agents used as growth promoters. **Science of the Total Environment**, v. 644, p. 112-121, 2018.

ANEXOS

ANEXO A – Manuscrito submetido na Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde (Reciis) - Qualis A3

EMAIL DE CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

[Reciis] Agradecimento pela submissão  Caixa de entrada x  

noreply@icict.fiocruz.br 11:17 (há 1 minuto) ☆ ↶ ⋮
para mim ▾

Mayse Manuele Freitas Viana Leal, Dijanah Cota Machado, Cláudio Gabriel Rodrigues, Janilson José da Silva Júnior

Agradecemos a submissão do trabalho "Biotoxinas marinhas: aspectos estruturais e métodos de detecção" para a Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde.
Acompanhe o progresso da sua submissão por meio da interface de administração do sistema, disponível em:

URL da submissão: <https://www.reciis.icict.fiocruz.br/index.php/reciis/authorDashboard/submission/3890>
Login: janilson

Em caso de dúvidas, entre em contato via e-mail.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de compartilhar seu trabalho.

Se você precisar de ajuda adicional, ou em caso de dúvidas sobre nossas políticas e diretrizes, poderá enviar um e-mail ou telefonar para a Reciis.

Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde
<http://www.reciis.icict.fiocruz.br>
Tel: +55 21 3865-3209 | Sala 142

ANEXO B – Capítulo de Livro Aceito Para Publicação**Editora Atena. Previsão de publicação: agosto de 2023****Título: Mecanismo Molecular de Interação Entre Omeprazol e Vitamina B12****CONFIRMAÇÃO ACEITE****DECLARAÇÃO DE ACEITE**

A Atena Editora, especializada na publicação de livros, revistas internacionais e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, o artigo intitulado "MECANISMO MOLECULAR DE INTERAÇÃO ENTRE OMEPRAZOL E VITAMINA B12" de autoria de "MAYSE MANUELE FREITAS VIANA LEAL, JANILSON JOSÉ DA SILVA JÚNIOR, DIJANAH COTA MACHADO, CLÁUDIO GABRIEL RODRIGUES, foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "A pesquisa em saúde: desafios atuais e perspectivas futuras" a ser divulgado no mês de agosto de 2023

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

Ponta Grossa, 20 de junho de 2023

Prof.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Doutora em ensino de ciência e tecnologia
Editora Chefe
ATENA EDITORA
PREFIXO EDITORIAL ISBN 97865
PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533