

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 alpha-toxin as a bacterial exotoxin and prototype of a protein nanopore in real-time detection and characterization of molecules in aqueous systems.

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

INTRODUÇÃO

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

Os nanoporos proteicos ou canais iônicos naturalmente encontrados em membranas biológicas são as macromoléculas fundamentais no desencadeamento de vários processos físico-químicos indispensáveis à manutenção da vida. A inerente capacidade destas macromoléculas proteicas de perceberem parâmetros físicos (por exemplo, campo elétrico), reconhecerem espécies químicas (como por exemplo, a acetilcolina) e principalmente selecionarem os elementos químicos (como por exemplo, íons sódio) transferidos entre os meios intra e extracelular, propicia efetivamente a interação célula-célula e célula-microambiente.⁸ Em virtude desta versatilidade funcional, os nanoporos proteicos são considerados, atualmente, a principal nanobioestrutura capaz de realizar o biossensoriamento estocástico, portanto, bioinspiradores à exploração como elemento de detecção, quantificação, monitoração

e caracterização de moléculas individuais. No entanto, essa mudança de paradigma requer um incremento significativo na compreensão da física e da química, que governam a interação nanoporo-analito.⁹ Conceitualmente, do ponto de vista biofísico, a análise da interação de uma substância com o canal iônico faz com que este altere sua conformação e consequentemente varie sua condutância. Por outro lado, esse tipo de biomimetismo não é fácil por várias razões, pois em alguns casos a ligação da substância no canal iônico induz, do ponto de vista químico, uma alteração conformacional média, portanto, um processo difícil de manter o controle experimental preciso. Além do mais, muitos canais iônicos tendem espontaneamente a variar entre diferentes estados condutores, em resposta ao potencial elétrico.¹⁰ Essas dificuldades foram praticamente superadas com a utilização do nanoporo proteico formado pela exotoxina bacteriana de *Staphylococcus aureus*, a alfatoxina ou alfa-hemolisina (α -HL).¹¹⁻¹³ O funcionamento deste nanoporo unitário como elemento sensor deve-se ao fato de ser a única via resistiva em um suporte isolante que separa dois compartimentos contendo soluções eletrolíticas, sendo que em uma delas se coloca o analito. O fluxo de corrente iônica através do nanoporo é alterado de maneira discreta quando ocorre a entrada ou permeação de moléculas individuais do analito no lume aquoso do nanoporo, gerando uma série temporal de flutuações que está correlacionada com a massa e configuração espacial das moléculas analisadas.¹¹ Devido aos resultados promissores com a alfatoxina, outros nanoporos proteicos também estão sendo aplicados na detecção de inúmeras moléculas, inclusive no sequenciamento de DNA de fita simples (ssDNA);¹⁴ por exemplo, o nanoporo formado pela toxina do *Bacillus anthracis*, utilizado para detectar e quantificar proteínas;⁹ o poro formado pela aerolisina, uma toxina derivada de *Aeromonas hydrophila* que também tem sido utilizada como elemento sensor na detecção de proteínas.¹⁵ Recentemente, num esforço de substituir os nanoporos proteicos, surgiram algumas plataformas mais robustas, que utilizam nanoporos sintéticos em materiais sólidos, para detecção de DNA de fita dupla, polinucleotídeos e proteína.¹⁶ Estes nanoporos sintéticos visam eliminar algumas limitações inerentes ao sistema com nanoporos biológicos, mas eles ainda não atingiram o grau de precisão e caracterização física apresentada por seus homólogos proteicos.^{2,9,17} Apesar disso, acredita-se que a evolução da organização dessas estruturas nanométricas sintéticas e biológicas em configurações pré-definidas (biossensores, por

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

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

Devido a essas características, neste trabalho descrevemos, principalmente, como o canal da alfatoxina se tornou o protótipo de nanoporo proteico para o desenvolvimento de biossensores estocásticos e como o progresso de estudos diversos, conforme demonstrado na Figura 1, o transformaram em uma ferramenta molecular para: detecção de íons divalentes²⁵ e monovalentes,²⁶ moléculas enantioméricas,²⁷ cianotoxinas,²⁸ cocaína,²⁹ armas químicas,³⁰ atuação como espectrômetro de massa,³¹ e sequenciamento de DNA de forma barata e rápida.²

BIOSENSORIAMENTO COM NANOPOROS INDIVIDUAIS PROTEICOS

O estudo da estrutura das proteínas de biomembranas é promissor e de grande interesse para química, biologia e medicina, uma vez que de 20 a 35% de todas as proteínas codificadas pelo genoma

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

Os primeiros relatos da proposta de utilização de nanoporos proteicos como elemento de reconhecimento em biossensores surgiram em meados da década de 90.³⁵⁻³⁸ Há um grande interesse na utilização de nanoporos proteicos como o principal elemento de reconhecimento nos biossensores estocásticos.¹ Esse tipo de biossensor detecta moléculas unitárias que entram e ocupam temporariamente o lume aquoso de um único nanoporo.⁵ Esta ocupação altera momentaneamente a quantidade de íons fluindo pelo nanoporo, gerando um evento de bloqueio, ou seja, uma redução discreta na corrente iônica. O bloqueio na corrente iônica pode ser caracterizado por um intervalo de tempo, representativo da duração

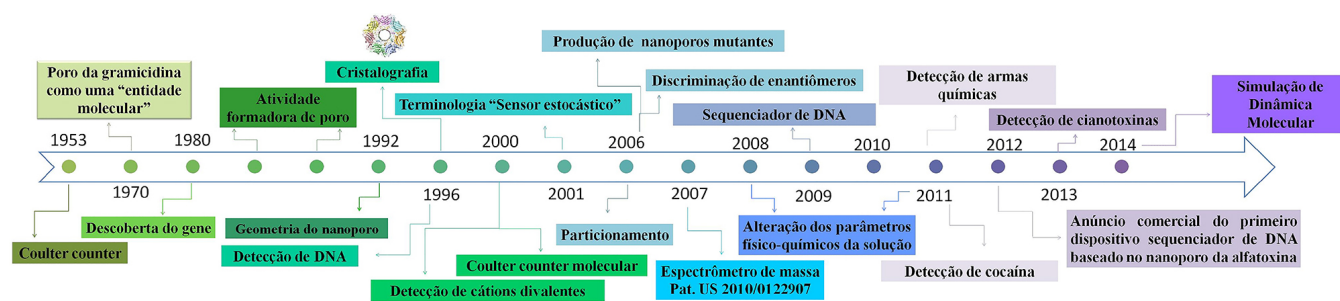


Figura 1. Evolução dos estudos visando à aplicação de poros no desenvolvimento de ferramentas analíticas. O counter Coulter foi o primeiro dispositivo prático baseado em um microporo empregado para contagem de partículas de dimensões micrométricas. A primeira demonstração experimental do fluxo de íons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

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

NANOPOROS PROTEICOS FORMADOS POR EXOTOXINAS BACTERIANAS

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

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

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

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

Aerolisina: É uma toxina derivada de *Aeromonas hydrophila* e também tem sido utilizada como elemento sensor na detecção de proteínas. A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria Gram-negativa, patogênica para alguns animais e causa doenças gastrointestinais em seres humanos.⁴⁶ Ela foi identificada em 1974 por Bernheimer e Avigag,⁴⁷ tendo sido purificada depois de alguns anos.⁴⁸ Finalmente o gene da aerolisina foi sequenciado por Howard e colaboradores em 1987.⁴⁹ Essa toxina é constituída por quatro domínios que se oligomerizam formando um poro heptamérico na membrana da célula alvo após sua ativação por endoproteases, como mostrado na Figura S2. Ela é secretada como pro-aerolisina, que constitui um precursor inativo de 470 aminoácidos com um peso molecular de 52 kDa.⁵⁰ Os domínios 1 e 2 reconhecem o receptor de membrana, o domínio 3 é responsável pela oligomerização, e o domínio 4 é responsável pela inserção na membrana e formação do nanoporo. Como demonstrado em outras toxinas formadoras de poros, a aerolisina é desprovida de atividade enzimática.⁵¹ Embora a estrutura heptamérica do poro da aerolisina ainda não esteja totalmente elucidada, sua estrutura

determinada por microscopia eletrônica indica semelhanças com o nanoporo formado pela alfatoxina.^{48,50}

ALFATOXINA DE *Staphylococcus aureus* COMO FERRAMENTA ANALÍTICA

O gene codificante da alfatoxina foi descoberto em 1980,⁴⁶ e subsequentemente foi relatada a sua atividade formadora de nanoporos em membranas biológicas⁵² e em bicamadas lipídicas artificiais.⁵³ Ela é uma exotoxina proteica de 33 kDa, produzida pelo *Staphylococcus aureus*, liberada na forma de monômeros de polipeptídeos de 293 aminoácidos solúveis em água.⁵⁴

A geometria do nanoporo da alfatoxina e o seu posicionamento assimétrico em relação ao plano da membrana também foram elucidados em condições dinâmicas empregando não-eletrólitos.⁵⁵⁻⁵⁷ Estudos de difração circular revelaram que a toxina é composta quase que inteiramente por β -folhas com pouca estrutura em α -hélice.⁴⁶ A estrutura cristalográfica tridimensional deste nanoporo foi elucidada²⁰ e os dados cristalográficos denotam a existência de sete monômeros, como mostrado na Figura 2, delimitando o nanoporo aquoso, os quais se inserem em bicamadas lipídicas e então se oligomerizam para formar um poro heptamérico transmembranar, permitindo então a passagem de água, íons e diversas moléculas pelo seu interior.^{58,59} Estudos eletrofisiológicos referentes à cinética de incorporação das subunidades proteicas na bicamada lipídica corroboram a estequiometria de 7 monômeros para formação de um nanoporo funcional.⁶⁰

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

Biossensores estocásticos

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

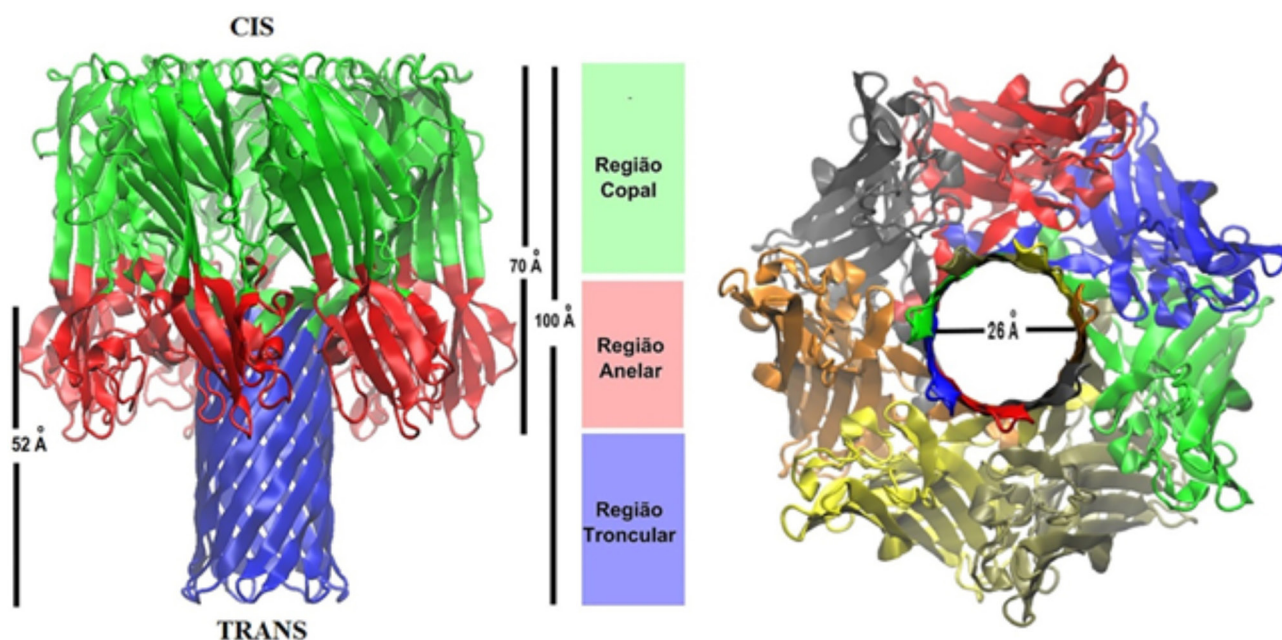


Figura 2. Modelo do nanoporo formado pela alfatoxina. A direita visão superior com cada subunidade representada em diferentes cores. A esquerda visão lateral com cada domínio representado em três cores. Na área central, os retângulos empilhados em três cores específicas correspondem a espessura aproximada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

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

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

Os intervalos de tempo de duração dos bloqueios diferem entre si, e podem ser descritos estatisticamente por uma distribuição exponencial. Neste contexto, a constante de ajuste desta distribuição exponencial é definida como o tempo médio do bloqueio (τ_{off}). As variações de amplitude dos bloqueios juntamente com o valor do τ_{off} representam a “impressão digital” para identificação do analito. O valor de τ_{off} possibilita calcular a constante de dissociação (k_{off}) do complexo analito-nanoporo, por meio da expressão $k_{off} = 1/\tau_{off}$.

Adicionalmente, a determinação da frequência dos bloqueios na corrente iônica, representativos da interação analito-nanoporo, possibilita quantificar a concentração do analito. Operacionalmente isto pode ser determinado mensurando-se os intervalos de tempo entre os bloqueios sucessivos. Similarmente aos tempos de bloqueios, os intervalos de tempo entre bloqueios também são descritos por uma distribuição exponencial, cuja constante de ajuste (τ_{on}) representa o intervalo de tempo médio entre os bloqueios. O inverso do valor de τ_{on} corresponde à frequência de ocorrência dos bloqueios ($f=1/\tau_{on}$), sendo este parâmetro proporcional à concentração ($[T]$) do analito. A partir deste coeficiente e da constante de associação (k_{on}) analito-nanoporo, obtemos: $f = k_{on}[T]$.^{66,67}

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

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

Limitações e estratégias de melhorias do nanoporo proteico da alfatoxina

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

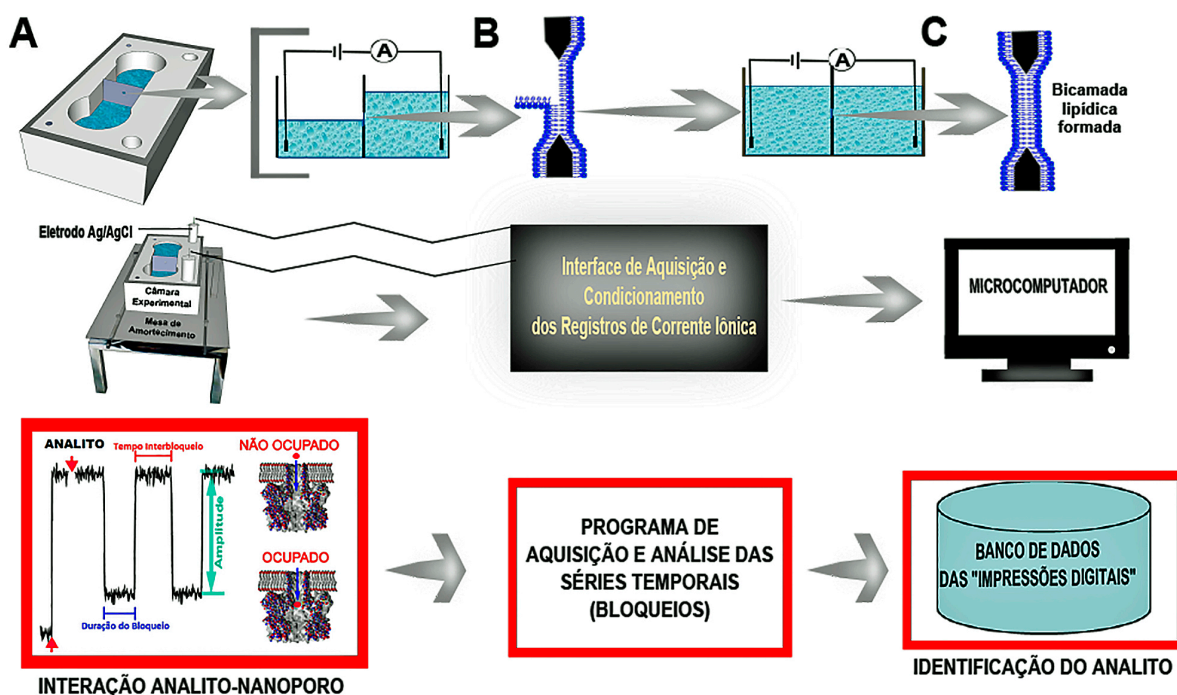


Figura 3. Esquema da montagem experimental do nanoporo da alfatoxina como biossensor estocástico. (A) Desenho da câmara experimental formada por duas hemicâmaras separadas por uma película de Teflon® com um orifício (aproximadamente 40 μm de diâmetro) para a formação da bicamada lipídica plana. (B) Primeira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

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

A razão entre o valor do diâmetro da molécula do analito e o valor do diâmetro do nanoporo deve permanecer entre 0,1 e 1, pois somente nesta faixa é que temos uma relação sinal/ruído adequada, que possibilita uma análise segura da série temporal de registro das flutuações discretas da corrente iônica, ou seja, uma “impressão digital” confiável.¹¹ Moléculas muito menores que o diâmetro do

nanoporo conseguem permear através do lume aquoso do nanoporo, porém, devido ao seu pequeno diâmetro, somente alteram o ruído intrínseco ao registro da corrente iônica e não geram flutuações discretas. As moléculas do mesmo tamanho do diâmetro do nanoporo podem entrar e obstruir completamente o nanoporo, impossibilitando o registro da corrente iônica. Por outro lado, as moléculas maiores que o diâmetro do nanoporo não entram nele e também não geram flutuações discretas no registro da corrente iônica. Nestas condições não há como obter séries temporais efetivamente representativas da dinâmica da interação analito-nanoporo, portanto, torna-se inviável utilizar o nanoporo como elemento de biossensoriamento estocástico.

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

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

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

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

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

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

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

Os efeitos específicos dos íons dessa série são observados em várias situações como na estabilidade de proteínas,⁸⁷ interações proteína-proteína, cristalização de proteínas,⁸⁸ atividade enzimática,⁸⁹ desnaturação de macromoléculas biológicas⁹⁰ e crescimento bacteriano.⁹¹ Além disso, a série de Hofmeister é observada em outros fenômenos físico-químicos como tensão superficial,⁹² concentração micelar crítica⁹³ e estabilidade coloidal.⁹⁴ Esses efeitos também

ocorrem em soluções aquosas de eletrólitos, pois parâmetros como a viscosidade, densidade, índice de refração, elevação do ponto de ebulição, pressão osmótica, dentre outras, mostram-se alterados dependendo da composição e concentração do sal.⁹⁵

Os nanoporos proteicos representam uma região de confinamento (“nanotubo de ensaio”) onde ciclos sistemáticos de hidratação e desidratação ocorrem naturalmente com diversas espécies permeantes. Os efeitos de Hofmeister devem ser perceptíveis nos casos em que as dimensões do nanoporo se aproximam ao valor do diâmetro do íon a ser transportado como, por exemplo, os canais de K^+ dependentes de voltagem.⁸⁷ Um dos primeiros estudos para verificar a influência dos íons de Hofmeister nas propriedades dos canais iônicos foi realizado por Grigorjev e Bezrukov em 1994.⁹⁵ Eles avaliaram a influência dos íons 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.⁹⁵ Estabeleceu-se então que quanto maior for a natureza caotrópica do ânion, mais forte é a ligação dos ânions na estrutura proteica do canal e este desenvolve uma seletividade catiônica devido à redução do fator eletrostático para os cátions.^{96,97}

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

Neste contexto, Rodrigues²³ e colaboradores demonstraram que o aumento na concentração da solução de KCl (de 1 mol L^{-1} para 4 mol L^{-1}) melhorou qualitativamente a sensibilidade do biossensor formado pelo nanoporo da alfatoxina.^{23,98} Nesses estudos, estabeleceu-se uma forte correlação entre o aumento da concentração de um mesmo sal com o nível de sensibilidade do nanoporo em relação a detecção do polietilenoglicol (PEG), como demonstrado na determinação do limite de detecção representado na Figura 4A.⁹⁸ A sensibilidade deste biossensor também depende fortemente do tipo de eletrólito que compõe a solução banhante, como descrito por Rodrigues⁹⁸ e colaboradores em 2011.⁹⁸ Nesse estudo avaliou-se a influência de ânions da família VIIA no biossensoriamento estocástico via nanoporo da alfatoxina.^{99,100} Estabeleceu-se que o ânion halogênio influencia nas propriedades deste sensor, pois a presença do F^- na solução banhante do nanoporo da alfatoxina aumentou em aproximadamente 130 vezes a sua sensibilidade, como pode ser visto na Figura 4B.¹⁰⁰ Deste modo, estabeleceu-se uma forte relação proporcional entre o aumento do nível de resolução do sensor para moléculas unitárias e a composição e concentração da solução salina, levando à necessidade de mais estudos que verifiquem o potencial de outras soluções capazes de aumentar a energia de interação do complexo analito-nanoporo.¹⁰⁰ Sugerimos, então, a possibilidade de realizar a sintonia da sensibilidade do nanoporo da alfatoxina por meio da escolha adequada da solução eletrolítica.

Aplicabilidade do nanoporo da alfatoxina

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

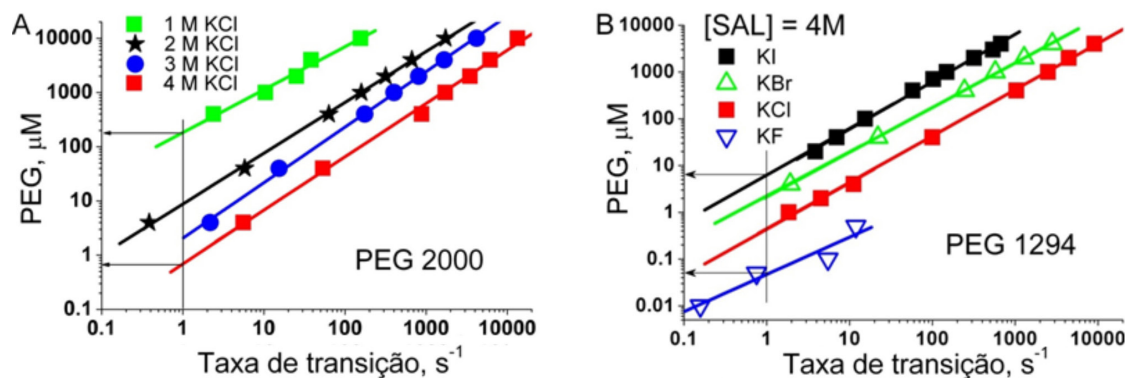


Figura 4. Influência da concentração e composição da solução na sensibilidade do nanoporo da alfatoxina. **A)** O valor da concentração do polietilenoglicol (PEG 2000) é menor ($0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença da solução iônica de elevada concentração de KCl (4 mol L^{-1}), portanto, o aumento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

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

Detecção de íons divalentes e monovalentes em explosivos líquidos

Braha²⁵ e colaboradores, utilizando um nanoporo de alfatoxina mutante (substituição dos aminoácidos das posições 123, 125, 133 e 135 por histidinas), conseguiram detectar simultaneamente íons divalentes em meio aquoso, como demonstrado na Figura 5.²⁵ Estas mutações introduziram um sítio de ligação no interior do nanoporo, que é ocupado de maneira mutuamente exclusiva pelos íons divalentes adicionados em um dos lados da bicamada lipídica como mostrado

na Figura 5A. Na Figura 5B observam-se os registros de bloqueios da corrente iônica, induzidos por íons Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} . O nanoporo mutante realizou a detecção dos íons de Co^{2+} e Zn^{2+} presentes simultaneamente na solução como indicado na Figura 5C.

Em outro estudo, Jayawardhana²⁶ e colaboradores demonstraram, em 2009, que o método do biossensoriamento estocástico baseado no nanoporo da alfatoxina também é rápido e sensível na detecção de cátions monovalentes. A detecção com eficácia e rapidez de cátions monovalentes pode ser útil, uma vez que alguns deles são componentes de explosivos líquidos utilizados em atentados terroristas. Normalmente esses explosivos são misturas binárias nas quais apenas um ou ambos os compostos são líquidos. Além disso, os componentes isoladamente não são explosivos e podem ser de maneira furtiva facilmente transportados. Nesse trabalho utilizou-se o nanoporo da alfatoxina

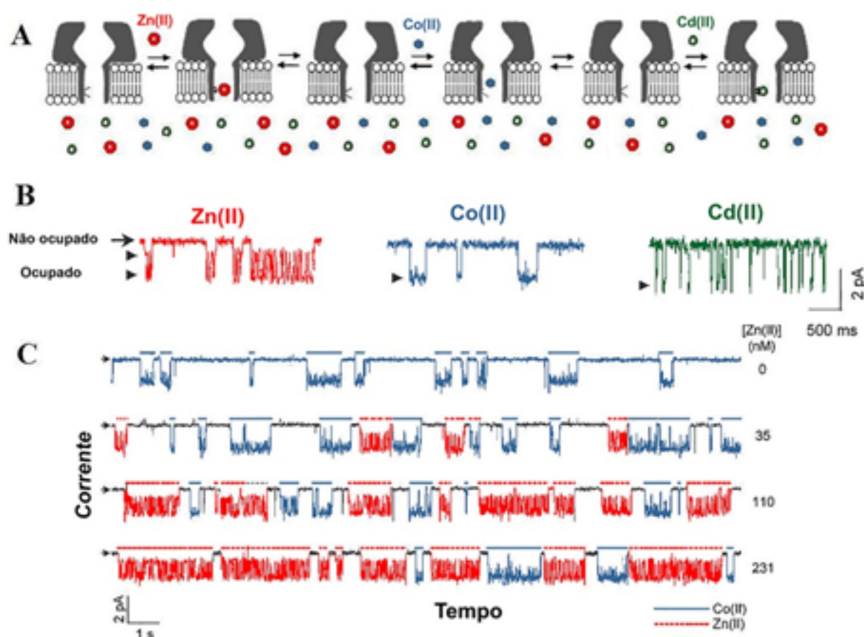


Figura 5. Capacidade do nanoporo da alfatoxina em detectar íons divalentes. **(A)** Representação esquemática do sítio de ligação introduzido por mutação no interior do nanoporo da alfatoxina. As setas indicam a interação de um íon (círculo cheio ou vazio) com o sítio de ligação. **(B)** Registros de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

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

Discriminação de moléculas enantioméricas

Kang²⁷ e colaboradores relataram, em 2006, a capacidade que o nanoporo da alfatoxina possui em discriminar concomitantemente analitos enantioméricos. Nesse estudo foi utilizada uma alfatoxina mutante acoplada a uma β -ciclodextrina (β CD) para aumentar a especificidade do nanoporo, permitindo a detecção das formas enantioméricas do ibuprofeno, como representado na Figura 6.²⁷

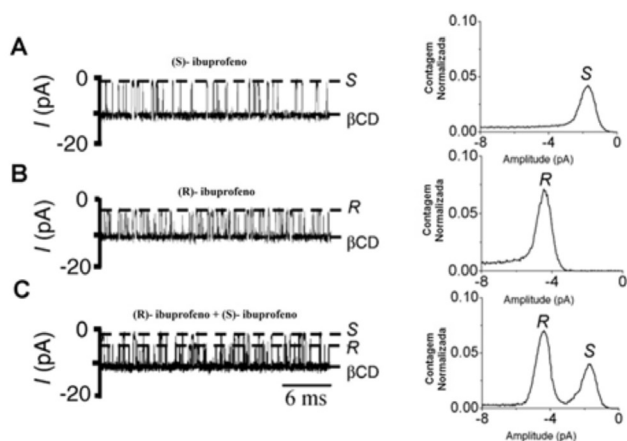


Figura 6. Capacidade do nanoporo da alfatoxina na discriminação de moléculas enantioméricas. A β -ciclodextrina (β CD) foi acoplada na região mais estreita do nanoporo da alfatoxina mutante, diminuindo ainda mais seu diâmetro, portanto, reduz a corrente iônica que passa através do nanoporo como indicado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

Detecção de armas químicas

O combate ao terrorismo tornou-se uma prioridade internacional devido ao aumento das ameaças nos últimos anos. Uma das necessidades urgentes em combater o terrorismo é melhorar a capacidade atual de detecção e identificação com precisão e rapidez, de agentes químicos que podem ser usados para ataque terrorista ou como arma química. No estudo de Liu³⁰ e colaboradores foi demonstrada a utilização do nanoporo formado pela alfatoxina na detecção de explosivos como o trinitrotolueno (TNT), agente químico bastante utilizado em aplicações militares e industriais. Adicionalmente o nanoporo formado pela alfatoxina mostrou-se bastante eficaz na detecção de organofosforados, os quais representam um dos grupos químicos mais tóxicos de substâncias químicas desenvolvidas para fins militares. Os organofosforados são utilizados em alguns defensivos agrícolas. O limite de detecção desse composto detectado pelo nanoporo da alfatoxina foi significativamente inferior aos limites exigidos pelo exército americano.³⁰ Para a detecção do organofosforado PMPA

(pinacolil metilfosfanato) a β -ciclodextrina foi utilizada com um adaptador molecular acoplado no nanoporo objetivando diminuir o diâmetro da constrição e, assim, aumentar a interação do PMPA com o nanoporo. Esse acoplador melhorou a detecção das moléculas unitárias do organofosforado. Esse estudo demonstrou que o nanoporo da alfatoxina apresenta grande potencial para aplicações na área de segurança.

Detecção de drogas ilícitas

Em estudo realizado por Kawano²⁹ e colaboradores foi descrita uma metodologia para a detecção rápida e altamente seletiva de cocaína utilizando um nanoporo proteico acoplado com um aptâmero de DNA.²⁹ Os aptâmeros são ácidos nucleicos geneticamente modificados para terem propriedades específicas de reconhecimento para moléculas. Eles demonstraram que o nanoporo foi capaz de detectar uma concentração baixíssima de cocaína, 300 ng/mL, em apenas 60 segundos. Além disso, este sistema pode ser aplicado não só para a cocaína, mas para uma grande variedade de analitos, dependendo apenas da especificidade do aptâmero. Estudos nesta diretriz são de extrema importância, pois se acredita que esse método possa auxiliar no desenvolvimento de um teste para drogas ilícitas em tempo real.

Espectrômetro de massa para homopolímeros

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

Sequenciador de ácido 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.¹⁰⁵ Uma vantagem importante dessa abordagem em relação aos métodos de sequenciamento por síntese é que, além de ser uma técnica mais direta, ela apresenta uma inerente capacidade de leitura bidirecional do ss-DNA, possibilitando que a mesma fita de DNA seja sequenciada novamente.^{106,107} A tecnologia de detecção baseada em nanoporo possibilitará um sequenciamento de ácidos nucleicos, com maior rapidez de análise e sem a necessidade de marcação ou amplificação do DNA.^{2,108,109} Nesta tecnologia a fita de ss-DNA sofre um processo de nanoeletroforese translocando-se por meio do nanoporo, gerando bloqueios na corrente iônica característicos de cada base nucleotídica, como representado na Figura 8.²

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

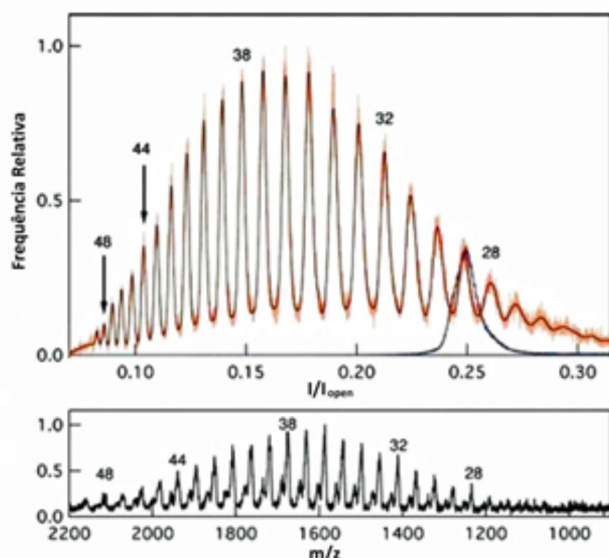


Figura 7. Nanoporo da alfatoxina como espectrômetro de massas. Espectro de massa (superior) para o polietilenoglicol (PEG 1500, $M_r=1500$ g/mol) polidisperso obtido com o nanoporo unitário comparado ao espectro de massa (inferior) obtido pelo MALDI-TOF. Os histogramas representam o valor médio da corrente 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. Adaptado da Ref. 18

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

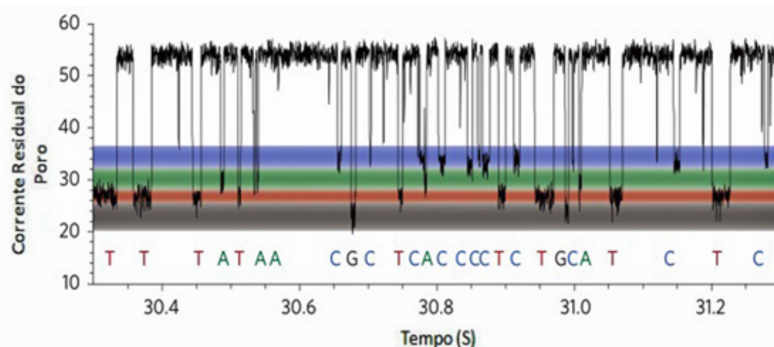


Figura 8. Nanoporo da alfatoxina como sequenciador de DNA. Representação esquemática do padrão de bloqueios na corrente iônica através do nanoporo da alfatoxina durante a translocação de ss-DNA. Observe que a amplitude dos bloqueios indicados pelas faixas coloridas é característica de cada base nucleotídica,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

Monitoração de microcistinas na água

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

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

MATERIAL SUPLEMENTAR

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

AGRADECIMENTOS

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

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

REFERÊNCIAS

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

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